



**Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**INMUNOESTIMULACIÓN DE LARVAS DE PARGO  
FLAMENCO *Lutjanus guttatus* EN TÉRMINOS DE  
INMUNIDAD ENTRENADA**

---

Por:

**ANGEL HUMBERTO ROJO CEBREROS**

Tesis aprobada por

**UNIDAD MAZATLÁN  
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

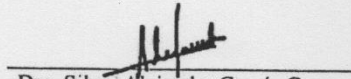
Mazatlán, Sinaloa, México. Agosto 2018

## APROBACIÓN

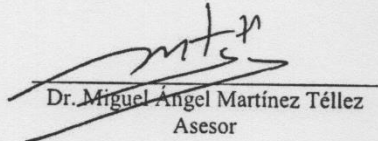
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Angel Humberto Rojo Cebberos, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



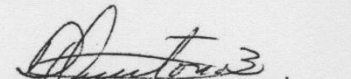
Dr. Leonardo Ibarra Castro  
Director de Tesis



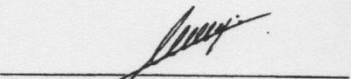
Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
Asesor



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez  
Asesor



Dra. Delia Quintana Zavala  
Asesor



Dr. Daniel Tovar Ramírez  
Asesor

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo prestado durante el posgrado, en especial por la beca otorgada para manutención durante mis estudios.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por haberme aceptado en el programa de doctorado, por el invaluable apoyo del departamento administrativo, por haber facilitado las instalaciones para llevar a cabo mis estudios y trabajos experimentales.

A mi amada Celene León por todo su cariño, paciencia y amor necesarios para poder salir adelante en los retos que se presentaron para lograr este objetivo.

A mi director de tesis y amigo, Dr. Leonardo Ibarra Castro por todo su apoyo, por todas las oportunidades para salir adelante y por su buen ejemplo.

A los miembros de comité de tesis, Dra. Silvia Alejandra García Gasca, Dra. Delia Quintana Zavala, Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez y Dr. Dariel Tovar Ramírez, por su valiosa contribución para la realización de este proyecto doctoral. Muchas gracias por todo el tiempo y paciencia dedicada a mi formación.

Al Dr. Juan Manuel Martínez Brown por todas las horas dedicadas a mejorar el planteamiento del presente proyecto doctoral. Muchas gracias por el valioso apoyo, por el buen consejo y ejemplo siempre.

Al equipo de trabajo de la planta de peces marinos de CIAD-Mazatlán, donde nacieron buenas amistades y de quienes guardo experiencias de vida valiosas. Gracias a Don Juan, Don Manuel, Omar, Ricky, Juan Luis, Lalo, Julio, Guillermo, Jaime, Maran, Manuel, Luis Alexis, Laura, Luis, Edgardo y Antonio. De seguro falta muchos por mencionar, pero a todos mil gracias.

A los laboratorios de biología molecular, histopatología, bacteriología, nutrición y ecotoxicología de CIAD-Mazatlán, por su invaluable apoyo, en especial a sus técnicos Patricia Dominguez, Selene Abad, Irma Martínez, Gabriela Aguilar, Francis Marrujo, Ma. Del Carmen Bolán, Julia Torres y Rubí Hernández.

Mil gracias a todos que directa o indirectamente apoyaron la realización del presente trabajo de tesis.

Sinceramente, Angel.

**DEDICATORIA**

*A todos mis seres queridos, en especial a mis amados*

*abuelos:*

*Amalia Monjardín Castro†*

*y*

*Luciano Cebberos Giusti†*

## CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Tablas.....	X
Estructura de tesis.....	X1
Resumen.....	X11
Abstract .....	XIII
<b>1. Introducción general.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.Introducción.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.1 Inmunoestimulación de larvas y juveniles de peces marinos.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.2 Anti inmunoestimulación en larvas de peces marinos.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1.3 Entrenamiento temprano de la inmunidad en larvicultura de peces marinos.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.4 Referencias.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Cuantificación y caracterización molecular parcial de <math>\beta</math>-glucanos de <i>Nannochloropsis</i> sp.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Floculación de <i>Nannochloropsis</i> sp. inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos</b>	<b>42</b>
<b>2.1.1 Introducción.....</b>	<b>42</b>
<b>2.1.2 Hipótesis.....</b>	<b>44</b>
<b>2.1.3 Objetivos.....</b>	<b>44</b>
<b>2.1.4 Materiales y métodos.....</b>	<b>45</b>
<b>2.1.5 Resultados.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1.6 Discusión.....</b>	<b>56</b>
<b>2.1.7 Conclusión.....</b>	<b>56</b>
<b>2.1.8 Referencias.....</b>	<b>56</b>
<b>2.2 Caracterización cuantitativa y cualitativa de carbohidratos de <i>Nannochloropsis</i> sp.</b>	<b>60</b>
<b>2.2.1 Hipótesis.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.2 Objetivos.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2.3 Materiales y métodos.....</b>	<b>62</b>
<b>2.2.4 Resultados.....</b>	<b>65</b>
<b>2.2.5 Conclusión.....</b>	<b>68</b>
<b>2.2.6 Referencias.....</b>	<b>69</b>
<b>2.3 Caracterización parcial de la molécula de <math>\beta</math>-glucanos aislados de <i>Nannochloropsis</i> sp. y otras microalgas</b>	<b>71</b>
<b>2.3.1 Introducción.....</b>	<b>71</b>
<b>2.3.2 Objetivos.....</b>	<b>72</b>

2.3.3 Materiales y métodos.....	73
2.3.4 Resultados.....	74
2.3.5 Conclusión.....	75
2.3.6 Referencias.....	75
2.4 Potencial de <i>Nannochloropsis</i> en la producción de $\beta$ -glucanos	78
2.4.1 Introducción.....	78
2.4.2 Materiales y métodos.....	96
2.4.3 Resultados.....	98
2.4.4 Discusión.....	102
2.4.5 Conclusión.....	105
2.4.6 Referencias.....	105
3. Ontogenia del sistema inmunológico de <i>Lutjanus guttatus</i> .....	119
3.1 Introducción.....	120
3.2 Hipótesis.....	126
3.3 Objetivos.....	126
3.4 Materiales y métodos.....	127
3.5 Resultados.....	128
3.6 Discusión.....	136
3.7 Conclusión.....	137
3.8 Referencias.....	138
4. Expresión de genes involucrados en la respuesta inmunitaria de larvas de <i>Lutjanus guttatus</i> por inestimulación de diferentes tipos de $\beta$ -glucanos en términos de inmunidad entrenada.....	142
4.1 Introducción.....	143
4.2 Hipótesis.....	145
4.3 Objetivos.....	145
4.4 Materiales y métodos.....	146
4.5 Resultados.....	150
4.6 Discusión.....	152
4.7 Conclusión.....	158
4.8 Referencias.....	159
4.9 Anexo	163
5. Conclusión general.....	167

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Tasa de floculación (promedio $\pm$ DE) de <i>Nannochloropsis</i> sp. por efecto de tres tratamientos de NaOH 0.5N en diferentes tiempos de exposición.	49
2	Eficiencia de floculación con el tratamiento 17 mL de NaOH 0.5N para cada litro de cosecha de <i>Nannochloropsis</i> sp. a alta densidad (promedio $\pm$ DE; n = 3).	50
3	Crecimiento poblacional de <i>Nannochloropsis</i> sp. en cultivos iniciados con inóculo obtenido del sobrenadante (promedio $\pm$ DE; n = 3).	51
4	Crecimiento poblacional de <i>B. rotundiformis</i> alimentado con biomasa concentrada de <i>Nannochloropsis</i> sp. obtenida mediante floculación inducida por NaOH 0.5N (promedio $\pm$ DE; n = 3).	52
5	Protocolo de extracción de carbohidratos de <i>Nannochloropsis</i> sp. Modificado de Bobadilla <i>et al.</i> (2013) y Sadovskaya <i>et al.</i> (2014). Esquema elaborado con el apoyo de Q.B. Francisco Javier Soto Córdova	64
6	Imágenes de biomasa liofilizada de <i>Nannochloropsis</i> sp (a) y pasta comercial (b) por MEB.	66
7	Cromatografía con cinco estándares de carbohidratos	66
8	Cromatografía de <i>Nannochloropsis</i> sp. en 3340 ppm	67
8	Cromatografía de pasta microalgal ( <i>N. oculata</i> ) en 9485 ppm	67
10	Espectro de infrarojo del extracto de carbohidratos desde <i>Nannochloropsis</i> sp.	74
11	Espectro de protón del extracto de carbohidratos desde <i>Nannochloropsis</i> sp.	75
12	La ruta de biosíntesis y degradación de crisolaminarina reconstruida sobre la base del ensamblaje de <i>novo</i> y anotación transcriptómica de <i>E. cf. Polipem...</i>	81
13	Configuración molecular de los $\beta$ -1,3/1,6 glucanos (Modificado de Chan <i>et al.</i> , 2009).	89
14	Figura 14. Curvas de crecimiento de tres cepas de <i>Nannochloropsis</i> en sistema por lotes con medio F/2. Las flechas indican el inicio de la fase estacionaria de los cultivos.	99
15	Ventana de susceptibilidad inmunológica en peces marinos tropicales que presentan desarrollo ontogénico indirecto. Esquema elaborado con el apoyo del Dr. Juan Manuel Martínez Brown.	121
16	Longitud total promedio (mm $\pm$ DE, n=25) en el desarrollo temprano del pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> .	129
17	Desarrollo temprano del pargo flamenco. a: embriones en somatogenesis 0 dpe. b: embrión libre 0 dpe. c: consumo de vitelo	



	2 dpe. d: primera alimentación 3 dpe. e: bazo 8 dpe. f: producción de mucus y células globosas en el pliega de la aleta 11 dpe. g: alimentación nauplio de <i>Artemia</i> 20 dpe. h: alimentación metaanauplio <i>Artemia</i> 26 dpe.	130
18	Descripción histológica de la maduración estructural del riñón cefálico de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes longitudinales de 5 µm, tinción H&E). a: 40x, 6 dpe. b: 40x, 8 dpe. c: vista ventral, 40x, 10 dpe. d: 40x, 12 dpe. e: 40x, 18 dpe. f: 40x, 25 dpe. g: 100x, 29 dpe. h: 100x, 40 dpe. Las flechas indican la ubicación del riñón cefálico.	132
19	Descripción histológica de la maduración estructural del bazo de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes longitudinales de 5 µm, tinción H&E). a: 40x, 6 dpe. b: 40x, 8 dpe. c: 40x, 13 dpe. d: 40x, 12 dpe. e: 100x, 23 dpe. f: 100x, 32 dpe. Las flechas indican la ubicación del bazo.	133
20	Descripción histológica de la maduración estructural del timo de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes longitudinales de 5 µm, tinción H&E). a: 40x, 13 dpe, b: 40x, 18 dpe, c: 40x, 32 dpe, d: 100x 12 dpe, e: 40x, 40 dpe, f: 100x, 51 dpe, g: 40x, 61 dpe, h: 100x, 71 dpe. Las flechas indican la ubicación del timo.	134
21	Detección de IgM de transferencia maternal y autóloga en etapas tempranas de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes 5 µm, tinción H&E). a: eclosión (detección positiva, 0 dpe), b: consumo de vitelo (detección negativa, 0 dpe), c: larva (detección negativa, 5 dpe), d: juvenil (detección positiva en riñón e hígado, 40 dpe), e: juvenil (detección positiva en intestino, 40 dpe), f: juvenil (detección positiva en zona oscura de timo, 100 dpe). Las flechas indican inmunodetección.	135
22	Protocolo de producción de β-glucanos desde <i>Nannochloropsis oculata</i> .	148
23	Muestra las PCR punto final de genes de la respuesta inmunológica de larvas de <i>L. guttatus</i> a 24 horas post administración (10 y 17 dpe) de β-glucanos de levadura (T1) y microalga (T2). neg: negativo, pos: positivo, M: marcador molecular.	153

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Peces marinos con desarrollo ontogénico indirecto cultivados en el año 2014 y su distribución geográfica (Fishstat. FAO, 2016).	17
2	Inmunoestimulación de larvas de peces marinos con importancia acuícola.	21
3	Composición orgánica de <i>Nannochloropsis</i> sp.	65
4	Concentración de monosacáridos por cada 100 mg de peso seco en biomasa de <i>Nannochloropsis</i> sp.	68
5	Concentración de monosacáridos por cada 100 mg de peso seco en biomasa de pasta microalgal	68
6	Relación de características y estructuras moleculares $\beta$ -glucanos de microalgas.	90
7	Métodos utilizados para extracción, purificación y caracterización de $\beta$ -glucanos de microalgas	95
8	Producción de biomasa de los cultivos de tres cepas de <i>Nannochloropsis</i>	100
9	Contenido celular de $\beta$ -glucanos en tres cepas de <i>Nannochloropsis</i> por determinación enzimática.	101
10	$\beta$ -glucano celular y productividad volumétrica de $\beta$ -glucanos en microalgas.	102
11	Inmunización de huevos y embriones de peces marinos por inmunidad transferida maternalmente.	124
12	Aparición de órganos linfoides y primer detección de linfocitos en peces marinos	126
13	Secuencia de los oligos utilizados en el estudio.	151
14	Reactivos y cantidades para PCR.	152
15	Resultados de la expresión de genes de la respuesta inmune en términos de inmuoestimulación por $\beta$ -glucanos e inmunidad entrenada.	158

## ESTRUCTURA DE TESIS

La presente tesis está conformada por 5 apartados, entre los cuales se incluye introducción general, trabajos científicos y conclusión general. Con el objeto de ofrecer una perspectiva acerca de su contenido, a continuación, se describen de forma concisa los apartados que integran el documento.

El apartado I presenta de forma general y precisa la relevancia del tema de la inmunoestimulación de larvas de peces marinos e inmunidad entrenada, la problemática por resolver, las hipótesis y los objetivos del estudio.

El apartado II muestra la importancia de generar concentrados de *Nannochloropsis* sp. mediante métodos factibles como lo es la dosificación de NaOH, en particular para realizar la extracción de compuestos bioactivos como son los  $\beta$ -glucanos. Por lo tanto, se realizó la revisión bibliográfica del potencial de *Nannochloropsis* sp. en la producción de  $\beta$ -glucanos y se confirmó con la cuantificación enzimática de  $\beta$ -glucanos en esta microalga.

El apartado III está basado en el estudio de la ontogenia del sistema inmunológico del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*, ya que es relevante describir los patrones de desarrollo, especialmente de la aparición de órganos linfoides e inicio de la producción autóloga de IgM, para comprender sus mecanismos tempranos de defensa, y hacer comparaciones con lo descrito en otras especies e integrar el conocimiento a la planeación estratégica para inmunoestimular larvas.

El apartado IV se enfoca en la evaluación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunitaria de larvas de *Lutjanus guttatus* por inmunoestimulación de dos tipos de  $\beta$ -glucanos, derivados de *Saccharomyces cerevisiae* y *Nannochloropsis oculata*, en términos de inmunidad entrenada. Los elementos primordiales que se consideraron para una estrategia de este tipo fueron las características moleculares del agente inmunoestimulante y las capacidades inmunológicas de los peces en etapa larval, que se tomaron de los apartados anteriores.

El apartado V presenta la conclusión general de la presente tesis.

## RESUMEN

Poco se sabe sobre las estrategias de inmunización e inmunoestimulación en larvas de peces marinos; sin embargo, ambas estrategias tienen el potencial de mejorar la supervivencia durante los primeros días del cultivo larvario. La variedad biológica de larvas de peces marinos complica la estandarización de la aplicación de estas estrategias. Los experimentos de inmunoestimulación realizados con larvas de peces proporcionan evidencia que ayuda a entender mejor los mecanismos de la *inmunidad entrenada*, que se puede utilizar para comprender las respuestas a los tratamientos de inmunoestimulación. Por lo tanto, se requiere una planificación estratégica para la estandarización de los métodos de inmunoestimulación. Un método estandarizado podría mejorar nuestra comprensión de los efectos de los agentes inmunoestimulantes en la maduración del sistema inmune en las larvas de peces marinos; esta información mejoraría la capacidad de lograr un entrenamiento temprano de la inmunidad innata y determinar su potencial para mejorar la supervivencia de las larvas cultivadas. Como parte de una planeación estratégica de inmunoestimulación para larvas del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* se confirmó que la inmunidad por transferencia materna dependiente de IgM es corta, por lo que presenta una *ventana de susceptibilidad* inmunológica larvaria que es cubierta por la respuesta innata. Se describió la aparición y maduración funcional de los órganos linfoides, riñón cefálico y bazo que se dio a la primera semana post eclosión (dpe,  $3.28 \pm 0.17$  mm), y el esbozo del timo apareció a los 9 dpe (8.9 mm). La última etapa de la ventana de susceptibilidad inmunológica (producción autóloga de IgM, 35-40 dpe, 15-23 mm) puede ser considerada apropiado en la planeación de los futuros programas de vacunación para esta especie. Por otra parte, los aspectos relacionados al agente inmunoestimulante también son de relevancia. Por ejemplo los  $\beta$ -glucanos, que pueden ser obtenidos de microalgas, y se ha propuesto a *Nannochloropsis* sp. como posibles candidatos para la producción de estos compuestos a niveles industriales. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el contenido de  $\beta$ -glucanos en tres cepas de *Nannochloropsis* y un concentrado comercial de *N. oculata* (Nanno 3600®). El contenido individual de  $\beta$ -glucanos es  $\sim 1$  pg·cel<sup>-1</sup>, con una productividad volumétrica máxima de 81.55 mg·l<sup>-1</sup>. Sin embargo, aunque se ha demostrado la presencia de  $\beta$ -glucanos en *Nannochloropsis* sp., todavía no está disponible su caracterización molecular. Por lo tanto, se realizó una caracterización parcial de este polisacárido. Además se describió que con 17 mL de NaOH 0,5N por litro de cultivo de microalgas se puede lograr una eficiencia de floculación de 94,9 % a pH 9,7 en menos de 60 minutos, un método simple, práctico y de bajo costo para producir concentrados de *Nannochloropsis* sp. con fines acuícolas y biotecnológicos como es la producción de  $\beta$ -glucanos. Por último se evaluó comparativamente la expresión de genes (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TLR y CD209) involucrados en la respuesta inmunitaria de larvas de *L. guttatus* asociados a la inmunoestimulación por  $\beta$ -glucanos de levadura y *N. oculata* en términos de inmunidad entrenada. Ambos  $\beta$ -glucanos administrados oralmente a larvas de *L. guttatus* activaron el sistema inmune innato, influyendo en la expresión de genes relacionados a la producción de citocinas clásicas pro-inflamatorias. La expresión de IL-6 y de IL-10 indica una posible respuesta en términos de inmunidad entrenada.

### Palabras claves

Larvas, Inmunoestimulación, Inmunidad Entrenada, Nannochloropsis, Beta Glucanos

## ABSTRACT

Little is known about immunization and immunostimulation strategies in marine fish larvae; however, both strategies have the potential to improve survival during the first days of larval culture. The biological variety of marine fish larvae complicates the standardization of the application of these strategies. The immunostimulation experiments performed with fish larvae provide evidence that helps to better understand the mechanisms of trained immunity, which can be used to understand the responses to immunostimulation treatments. Therefore, strategic planning is required for the standardization of immunostimulation methods. A standardized method could improve our understanding of the effects of immunostimulating agents on the maturation of the immune system in marine fish larvae; this information would improve the ability to achieve early training of innate immunity and determine its potential to improve the survival of cultured larvae. As part of a strategic plan of immunostimulation for larvae of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*, it was confirmed that IgM-dependent maternal immunity is short, so it presents a window of larval immunological susceptibility that is covered by the innate response. The appearance and functional maturation of the lymphoid organs, cephalic kidney and spleen was described in the first week after hatching (dph,  $3.28 \pm 0.17$  mm), and the thymic outline appeared at 9 dph (8.9 mm). The last stage of the immunological susceptibility window (autologous production of IgM, 35-40 dph, 15-23 mm) can be considered appropriate in the fulfillment of future vaccination programs for this species. On the other hand, aspects related to the immunostimulating agent are also relevant. For example the  $\beta$ -glucans, which can be obtained from microalgae, and have proposed *Nannochloropsis* sp. as possible candidates for the production of these compounds at industrial levels. Therefore, in the present study the content of  $\beta$ -glucans was evaluated in three strains of *Nannochloropsis* and a commercial concentrate of *N. oculata* (Nanno 3600®). The individual content of  $\beta$ -glucans is  $\sim 1$  pg·cel<sup>-1</sup>, with a maximum volumetric productivity of 81.55 mg·l<sup>-1</sup>. However, although the presence of  $\beta$ -glucans has been demonstrated in *Nannochloropsis* sp., its molecular characterization is not yet available. Therefore, a partial characterization of this polysaccharide was carried out. It was also described that with 17 mL of 0.5N NaOH per liter of microalgae culture, a flocculation efficiency of 94.9 % at pH 9.7 can be achieved in less than 60 minutes, a simple, practical and low-cost method to produce concentrates of *Nannochloropsis* sp. for aquaculture and biotechnological purposes such as the production of  $\beta$ -glucans. Finally, the expression of genes (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TLR and CD209) involved in the immune response of *L. guttatus* larvae associated with immunostimulation was evaluated comparatively with yeast  $\beta$ -glucans and *N. oculata* in terms of trained immunity. Both  $\beta$ -glucans administered orally to larvae of *L. guttatus* activated the innate immune system, influencing the expression of genes related to the production of classical pro-inflammatory cytokines. The expression of IL-6 and IL-10 indicates a possible response in terms of trained immunity.

### Key words

Larvae, *Lutjanus guttatus*, Immunostimulation, Trained Immunity, *Nannochloropsis*, Beta Glucans

# 1. Introducción general

---

Publicado en:

Rojo-Cebreros, A.H., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J.M., 2018. Immunostimulation and trained immunity in marine fish larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 80, 15–21. doi:10.1016/j.fsi.2018.05.044

## **1.1. Introducción**

Las mortalidades masivas de larvas de peces en la naturaleza pueden ser en parte un fenómeno innato y natural; sin embargo, en acuicultura estas pérdidas se atribuyen a problemas de alimentación e infecciones (Kjørsvik et al., 2011). Las infecciones son provocadas por microorganismos patógenos oportunistas, asociados con el factor estrés que se presenta por densidad de confinamiento y manipulación (Bergh, 2000; Knappskog et al., 1993). Un ejemplo son las bacterias oportunistas patógenas de peces, las cuales son comunes en agua de mar, y que en acuicultura toman ventaja de los cambios ambientales que ocurren en los cultivos. Los pocos reportes de incidencia de patógenos específicos en acuicultura (Frans et al., 2011; Silva et al., 2014), refuerzan la idea de que los patógenos oportunistas son la principal causa de mortalidad.

Por ejemplo, la producción intensiva de peces crea un medio ambiente altamente artificial, que promueve crecimiento bacteriano y afecta negativamente la selección bacteriana (Vadstein et al., 2013, 1993). El resultado es un pobre crecimiento y mortalidad masiva de peces, por lo tanto, las técnicas de cultivo larval deben mejorar para evitar estos problemas (Skjermo & Vadstein, 1999a). Por su parte Vadstein (1997) propuso mantener la atención en tres factores relevantes para incrementar la probabilidad de obtener larvas viables: a) microbiota ambiental, b) factores fisicoquímicos del agua y c) sistema inmune de larvas. Lo anterior es de gran interés al momento de planear una estrategia para mejorar la respuesta inmunológica e incrementar la supervivencia larvaria. Por lo tanto, las medidas preventivas y correctivas durante etapas tempranas de peces, desde la relación agente etiológico (bacterias oportunistas) e inmunidad larval (respuesta innata), sólo pueden ser de tipo inmunoestimulación (IE) no específica (Bricknell & Dalmo, 2005) y/o por inmunización transferida maternalmente (ITM) (Grindstaff et al., 2003).

La IE consiste en la aplicación de compuestos para estimular y/o aumentar la respuesta inmunitaria innata de peces en cultivo; y se define como la estrategia que tiene la finalidad de potenciar el sistema inmunológico y aumentar la resistencia del hospedero frente a las enfermedades infecciosas (Barman et al., 2013; Bricknell & Dalmo, 2005; Hadden, 1993; Vadstein, 1997). El efecto más probado de los inmunoestimulantes en peces es el incremento de la función de las células fagocíticas, con cambios en número y/o función de éstas debido

al aumento en su actividad bactericida y fungicida (Sakai, 1999), entre otros efectos que se estudian actualmente, por ejemplo el efecto sobre el crecimiento (Piaget et al., 2007; Siwicki & Korwin-Kossakowski, 1988; Skjermo et al., 2006). Por otra parte, la ITM es una forma de protección que de manera general se define como la transferencia de factores inmunes por una hembra inmunocompetente a un neonato vulnerable, vía transplacentaria o a través del calostro, leche o vitelo (Grindstaff et al., 2003). Con base en lo anterior, se han realizado investigaciones con el objetivo de promover una mejor ITM (Swain & Nayak 2009; Zhang et al. 2013), y se tiene reportado un incremento significativo de niveles de IgM, y también de varios elementos de respuesta inespecífica, en huevos provenientes de hembras inmunizadas (Mor & Avtalion, 1990; Sin et al., 1994; Oshima et al., 1996; Hanif et al., 2004; Akbary et al., 2015).

De acuerdo con lo anterior y debido a que la eficiencia de inmunizar e inmunoestimular a peces en cultivo depende en gran medida del grado de madurez de su sistema inmunológico (Mulero et al. 2007), entonces se pueden diseñar estrategias que funcionen para especies que presenten similares patrones de desarrollo. Por ejemplo, se puede agrupar y analizar el conocimiento enfocado en peces que desovan huevos pelágicos y presentan ontogenia indirecta (tabla 1), considerando que entre especies de este grupo los mecanismos de desarrollo ontogénico del sistema inmunológico son similares y no existen amplias diferencias en los eventos importantes de desarrollo, así como también los tiempos en que se logra una respuesta inmunológica completa. Sin embargo, es necesario realizar trabajos de investigación que corroboren estos supuestos, sobre todo con aquellas especies en las que se quiere desarrollar su cultivo a escala comercial y requieran enfocar los estudios a la descripción de la ontogenia del sistema inmunológico, incremento de ITM e inmunoestimulación temprana de larvas.



Tabla 1. Peces marinos con desarrollo ontogénico indirecto cultivados en el año 2014 y su distribución geográfica (Fishstat. FAO, 2016).

Especie	Área geográfica
<i>Lutjanus russelli</i>	Tropical
<i>Sparidentex hasta</i>	Tropical
<i>Thunnus maccoyii</i>	Tropical
<i>Acanthopagrus latus</i>	Subtropical
<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Subtropical
<i>Epinephelus coioides</i>	Subtropical
<i>Lutjanus goldiei</i>	Subtropical
<i>Pagrus major</i>	Subtropical
<i>Sebastes schlegeli</i>	Subtropical
<i>Caranx hippos</i>	Tropical y subtropical
<i>Centropristis striata</i>	Tropical y subtropical
<i>Chanos chanos</i>	Tropical y subtropical
<i>Epinephelus akaara</i>	Tropical y subtropical
<i>Epinephelus areolatus</i>	Tropical y subtropical
<i>Epinephelus tauvina</i>	Tropical y subtropical
<i>Evynnis japonica</i>	Tropical y subtropical
<i>Gnathanodon speciosus</i>	Tropical y subtropical
<i>Larimichthys croceus</i>	Tropical y subtropical
<i>Liza vaigiensis</i>	Tropical y subtropical
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	Tropical y subtropical
<i>Micropogonias furnieri</i>	Tropical y subtropical
<i>Morone saxatilis</i>	Tropical y subtropical
<i>Morone saxatilis hibrida</i>	Tropical y subtropical
<i>Mugil cephalus</i>	Tropical y subtropical
<i>Mugil liza</i>	Tropical y subtropical
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Tropical y subtropical
<i>Polydactylus sexfilis</i>	Tropical y subtropical

<i>Psammoperca waigiensis</i>	Tropical y subtropical
<i>Rachycentron canadum</i>	Tropical y subtropical
<i>Seriola dumerili</i>	Tropical y subtropical
<i>Siganus canaliculatus</i>	Tropical y subtropical
<i>Siganus javus</i>	Tropical y subtropical
<i>Thunnus thynnus</i>	Tropical y subtropical
<i>Valamugil seheli</i>	Tropical y subtropical
<i>Centropomus undecimalis</i>	Subtropical y zona templada
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Subtropical y zona templada
<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	Subtropical y zona templada
<i>Lates calcarifer</i>	Subtropical y zona templada
<i>Lutjanus johnii</i>	Subtropical y zona templada
<i>Sciaenops ocellatus</i>	Subtropical y zona templada
<i>Seriola quinqueradiata</i>	Subtropical y zona templada
<i>Sparus aurata</i>	Subtropical y zona templada
<i>Acanthopagrus berda</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Dentex tumifrons</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Eleutheronema tetradactylum</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Lutjanus guttatus</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Muraenesox cinereus</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Pleurogrammus azonus</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Pseudocaranx dentex</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Thunnus albacares</i>	Tropical, subtropical y zona templada
<i>Trachinotus carolinus</i>	Tropical, subtropical y zona templada

---

### **1.1.1 Inmunoestimulación de larvas y juveniles de peces marinos**

A la fecha, se han descrito tres vías ontogénicas por las cuales un pez se vuelve juvenil (Balon, 2002): 1) por desarrollo indirecto, 2) por desarrollo intermedio y 3) por desarrollo directo. Sin embargo, es importante recordar que en peces las etapas larvarias son exclusivas de especies que presentan desarrollo ontogénico indirecto (tabla 1; Flegler-Balon, 1989), y de acuerdo con Balon (1975), el período larval comienza con la nutrición exógena y se extiende hasta la pérdida del pliegue de la aleta media y formación del esqueleto axial. Es decir, la larva se somete a metamorfosis para convertirse en un juvenil. Lo anterior es importante porque, aunque las mortalidades han sido reportadas en todas las etapas de los cultivos de peces, la mortalidad máxima en la mayoría de las especies cultivadas se presenta en la fase larvaria. Una hipótesis generalizada establece que esto se debe a que las larvas de peces no tienen la capacidad de establecer inmunidad adaptativa durante el desarrollo temprano (Akbari et al., 2015; Blancheton et al., 2013; Hanif et al., 2004; Swain et al., 2002), por lo tanto son más susceptibles a infecciones bacterianas.

Las larvas de peces marinos tropicales, en general, eclosionan de huevos pequeños con pocas reservas vitelinas, por lo cual, su tamaño es reducido al momento de la primera alimentación. La etapa larval se caracteriza por presentar propiedades externas transitorias, muy diferentes a los juveniles y necesitan de una completa reprogramación para adaptar la forma siguiente de vida (Kjørsvik et al., 2011). Esta reprogramación es con frecuencia referida como metamorfosis y se define como la suma de cambios de larva a juvenil. La etapa larval es más que una vía para volverse juvenil; debido a que se presentan adaptaciones anatómicas para su hábitat y alimentación. Sin embargo, es una etapa altamente vulnerable y especializada que ha evolucionado para su supervivencia en el hábitat natural, pero que se convierte en un desafío en los cultivos (Kjørsvik et al., 2011), ya que al establecer estrategias de inmunoestimulación durante la etapa larval, con el objetivo de mejorar la respuesta inmunológica ante condiciones adversas de cultivo (brotes de bacterias oportunistas) (Vadstein et al., 2013), las larvas tienen capacidades inmunológicas incipientes (Magnadóttir, 2010) para responder a esta adversidad.

Las estrategias de inmunoestimulación están basadas en el uso de agentes inmunoestimulantes (AI). Bricknell y Dalmo (2005) propusieron que un inmunoestimulante es un componente de origen natural que modula el sistema inmunológico mediante el incremento de la resistencia del hospedero contra enfermedades que en la mayoría de las circunstancias son causadas por patógenos. Por lo tanto, los AI son patrones moleculares abundantes en comunidades microbianas por cual se les ha llamado “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) (Dalmo y Bøggwald, 2008), estos juegan un papel como moléculas de alarma activando el sistema inmune ya que son reconocidos por “receptores específicos que reconocen patrones” (PRRs) que se encuentran en la membrana de células del sistema inmune (López et al., 2003).

Sin embargo, los AI son usados con mayor frecuencia en etapa de engorda y menos en etapa de cultivo larvario. Lo anterior se debe a que existen ejemplos de éxito al mejorar las condiciones de cultivo de peces, aumentando la resistencia a patógenos, lo que por consecuencia genera un aumento en la producción de los cultivos (Bricknell y Dalmo, 2005) (tabla 2). Pero a pesar de lo anterior, durante el cultivo larvario de peces múltiples factores complican la inmunización y/o inmunoestimulación. Por ejemplo, durante la etapa larval es imposible implementar vacunas, debido al poco desarrollo del sistema inmunológico de las larvas, a su tamaño pequeño y al gran número de individuos con las que se inicia un cultivo larvario (Vadstein, 1997). Respecto a la inmunización y/o inmunoestimulación durante la etapa de eleuteroembrion de vida libre, lo más recomendable es usar inmersión. El proceso de inmersión es tomado con reservas por varios inconvenientes, tal como lo explican Bricknell y Dalmo (2005). Por lo tanto, los estudios inmunológicos han preferido administrar AI en la dieta de larvas; comúnmente vía bioencapsulación por el alimento vivo (Skjermo y Vadstein, 1999). Los AI comúnmente usados en larvas de peces marinos son:  $\beta$ -glucanos, pared celular bacteriana, hongos en la dieta, oligosacáridos de manosa, proteínas del semen de bacalao e hidrolizado de proteínas de pescado (tabla 2).

Tabla 2.- Inmunoestimulación de larvas de peces marinos con importancia acuícola.

ZG	Especies	Fase	AI	Vía	AT	Patógeno	Efectos	Referencias
Tropicales y subtropicales	<i>Paralichthys adspersus</i>	6 y 15 DPE	$\beta$ -glucanos y oligosacaridos de mannososa	Inmersión	---	---		Piaget <i>et al.</i> , 2007
	<i>Sparus aurata</i>	Larvas y juveniles	$\beta$ -glucanos de levaduras y hongos	Oral	Alimento balanceado	<i>Photobacterium damsela</i>	Protección dosis dependiente. Incremento en fagocitosis y explosion respiratoria	Couso <i>et al.</i> , 2003
	<i>Centropomus undecimalis</i>	Larva	Pared celular de bacterias	Inmersión	---	---		Kennedy <i>et al.</i> , 1998
	<i>Dentex dentex</i>	Larva	$\beta$ -glucanos 1-3/1-6			---		Efthimiou, 1996
Templadas	<i>Scophthalmus maximus</i>	12 DPE	A-RAM	Oral	Rotíferos	---	Rotación proteica, alta viabilidad larval	Conceição <i>et al.</i> , 2001
		Larva y macrofagos <i>in vitro</i>	A-RAM y $\beta$ -glucanos	Oral	Rotíferos y <i>Artemia</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>		Skjermo <i>et al.</i> , 2002.
		40 DPE	A-RAM	Oral	<i>Artemia</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	Protección	Skjermo <i>et al.</i> , 1995
	<i>Godus morhua</i>	0 DPE	Proteína de pescado hidrolizada	Oral	Rotíferos y <i>Artemia</i>	---		Johannsdotir <i>et al.</i> , 2013
		27 y 18-30 DPE	$\beta$ -glucanos 1-3/1-6 y A-RAM	Oral	Rotíferos y alimento balanceado	---		Skjermo <i>et al.</i> , 2006.
		Larva	Proteína de semen de bacalao			---		Pedersen <i>et al.</i> , 2004
		Larva con saco vitelino	A-RAM	Inmersión	---	---		Vadstein <i>et al.</i> , 1993
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	7 a 43 DPPAE	A-RAM	Oral	<i>Artemia</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> O2	Protección	Skjermo y Bergh, 2004
		Larva con saco vitelino	Laminarin, $\beta$ (1,3)-glucano	Inmersión	---	---	Acumulación de laminarin en piel y epitelio intestinal	Strand y Dalmo, 1997
		Larva con saco vitelino	A-RAM	Inmersión	---	---		Vadstein <i>et al.</i> , 1993

AI= Agente inmunoestimulante  
AT= Agente transportante  
DPE= Días post eclosión  
DPPAE= Días post primera alimentación exógena  
A-RAM= Alginato rico en ácido manurónico  
Vía= Vía de administración  
ZG= Zona geográfica

El grupo más prometedor de inmunoestimulantes para larvicultura de peces son los  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos, ya que han sido ampliamente estudiados en diferentes especies de vertebrados e invertebrados (Vetvicka et al., 2013); gracias a que cuentan con una estructura química bien definida y su modo de acción genera efectos benéficos a los organismos (Dalmo y Bøggwald, 2008; Meena et al., 2013; Novák y Vetvicka, 2009; Sakai, 1999; Skjermo et al., 2006). Además, por su grado de inocuidad han sido reconocidos como productos generalmente seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) por la agencia de drogas y alimentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés) (Veverka et al., 2014).

Por otra parte, la forma de hacer llegar estos AI a nivel sistémico de larvas ha sido mediante bioencapsulación por alimento vivo. Skjermo et al. (2006) describieron un método para enriquecer rotíferos con  $\beta$ -glucanos de microalgas y levaduras. Los resultados mostraron incremento de supervivencia y crecimiento en larvas del bacalao del atlántico (*G. morhua*) al adicionar rotíferos enriquecidos con  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos aislados de diatomeas ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ) durante la primera alimentación, en comparación a larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos extraídos de levadura. De acuerdo con los autores, los resultados obtenidos con  $\beta$ -glucanos extraídos de diatomeas pudieron deberse al bajo peso molecular y el alto grado de ramificación de los  $\beta$ -glucanos microalgales, los cuales pudieron generar una mejor respuesta inmunológica en larvas.

El proceso de inmunoestimulación con  $\beta$ -glucanos se inicia con la respuesta de defensa, a través de la unión del AI a sus receptores específicos (Dectina-1 y TLR2) en la superficie celular de leucocitos (Gantner et al., 2003), que activan la transducción de señales intracelulares y factores de transcripción (SyK/NF- $\kappa$ B). Este fenómeno es decisivo para la transcripción de genes, provocando síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-12), así como activación de diferentes respuestas inmunológicas asociadas a la presencia de patógenos. Por ejemplo, respuesta epitelial que induce expresión

de moléculas de adhesión en endotelio vascular para mejorar la diapédesis de leucocitos (Bricknell y Dalmo, 2005). Sin embargo, aún existen muchas interrogantes sobre los mecanismos por los cuales los  $\beta$ -glucanos pueden prevenir o reducir las infecciones (Dalmo y Bøgwald, 2008).

Por otra parte, tenemos que las dosis aplicadas pueden tener diferentes resultados. Por ejemplo la aplicación por inmersión de 5 mg L<sup>-1</sup> de  $\beta$ G MOS (manano-oligosacáridos) aumentó significativamente supervivencia y crecimiento de larvas de *Paralichthys adspersus*, mientras que concentraciones de 15 mg L<sup>-1</sup>  $\beta$ G MOS suprimieron estas mismas variables. La aplicación de  $\beta$ G MOS a la primera alimentación (alimento vivo) aumentó la supervivencia y crecimiento en comparación con los tratamientos que se administraron después de diez días de alimentarse con presas. De acuerdo con la conclusión de los autores la edad de las larvas de *P. adspersus* al momento que se aplicó  $\beta$ G MOS influyó en los resultados obtenidos (Piaget et al., 2007).

Algunos de estos AI ya han sido ubicados a nivel sistémico en etapas tempranas de peces, por ejemplo Strand y Dalmo (1997) reportaron que laminarin ( $\beta$ -glucano de algas pardas) se localizó y acumuló en el epitelio intestinal y epitelio de la piel de eleuteroembriones de *Hippoglossus hippoglossus*. Por otra parte, en juveniles de salmón del atlántico (*Salmo salar*, 100 gr de peso promedio) se encontró que la laminarina es absorbida por el intestino posterior y se acumula en órganos y/o tejidos inmunológicamente importantes (Dalmo, 1995, 1994).

En general, los efectos por AI son: influencia positiva en crecimiento, supervivencia, resistencia a enfermedades y estrés, y en el equilibrio dinámico de la síntesis y degradación de proteínas (tabla 2). En la mayoría de los casos la aplicación de AI confiere protección ante patógenos, por ejemplo; Skjermo et al. (1995) demostraron como A-RAM (alginato rico en ácido manurónico) fue administrado a larvas de *Scophthalmus maximus* a través del alimento vivo y brindó protección contra *Vibrio anguillarum*, disminuyendo 39% la mortalidad con respecto al control. Además, Skjermo y Bergh (2004) reportaron que la administración A-RAM en *Artemia* para *H. hippoglossus* por periodos cortos de tiempo incrementa la resistencia contra vibriosis. Además, los estudios realizados *in vitro* en macrófagos de peces adultos han confirmado que el incremento en la producción de superóxido y actividad fagocítica, es estimulada por A-RAM, y por lo tanto los efectos positivos en etapa larval y

juvenil se pueden atribuir a la estimulación del sistema inmune no específico (Strand y Dalmo, 1997). Por otra parte, la administración oral de  $\beta$ -glucanos indujeron resistencia en larvas de *Sparus aurata* ante pasteurización, debido a que incrementa la actividad fagocitaria y explosión respiratoria en fagocitos. La dosis óptima de  $\beta$ -glucanos dependió del periodo de administración, las dosis fueron del orden de  $10 \text{ g kg}^{-1}$  de alimento por un periodo corto de tiempo (2 semanas) y de  $1 \text{ g kg}^{-1}$  cuando se administra en periodos largos (Couso et al., 2003). Por lo tanto, sabemos que los peces dependen fuertemente de su respuesta innata (Whyte, 2007), la cual presenta ventajas en comparación con la respuesta adaptativa. La respuesta inmune innata en contraste con la respuesta adquirida no requiere una exposición previa a un antígeno y se compone de barreras tales como la piel y escamas; así como de componentes humorales como son las enzimas líticas, inhibidores del crecimiento y componentes del complemento; además de las células fagocíticas como macrófagos, dendríticas y neutrófilos. La respuesta inmune no específica también se considera que es la primera línea de defensa contra la invasión de microorganismos patógenos (Magnadóttir, 2006). La inmunidad adquirida sólo reconoce un antígeno o patógeno en particular, en cambio, cada componente de la respuesta no específica puede combatir una amplia gama de agentes extraños. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que los peces son más dependientes de la respuesta inmune no específica (Dixon et al., 2016; Magnadóttir, 2010). Por estas razones, gran parte de la investigación sobre inmunoestimulación se ha centrado en la regulación de la respuesta inmune no específica de los organismos, llegando a establecer que los fagocitos mononucleares o macrófagos juegan un papel central en la parte celular del mecanismo de defensa no específico de los peces teleósteos (Magnadóttir, 2010; Sahoo, 2007) y vertebrados en general (Hodgkinson et al., 2015). También es bien conocido que las respuestas inmunes no específicas tales como la fagocitosis y la producción de radicales oxidantes se activan rápidamente por los inmunoestimulantes y ayudan a proteger al huésped frente a un amplio espectro de patógenos (Anderson, 1992; Bricknell y Dalmo, 2005; Uribe et al., 2011; Vetvicka et al., 2013).

Pero algunos estudios no coinciden completamente con lo anterior, por ejemplo, en carpa (*Cyprinus carpio*) la aplicación de levamisol estimuló el crecimiento de larvas pero sin efectos en supervivencia y tasa de desarrollo (Siwicki y Korwin-Kossakowski, 1988). Ante



estos casos, se ha señalado que los elementos de los protocolos de inmunoestimulación [período de administración, tipo y dosis de AI (Couso et al., 2003)] y de desafíos [especies de peces y patógenos (Robertsen et al., 1990)] varían en gran medida en cada experimento, y esto podría explicar, al menos en parte, las diferencias en resultados. Por lo tanto, se puede considerar que los aspectos de mayor relevancia en el establecimiento de un protocolo de inmunoestimulación es elegir un AI bien definido (características moleculares del PAMP) y su célula diana del sistema inmunológico (PRR y su vía de señalización) para predecir su probable respuesta. Sin embargo, se tienen que tomar precauciones con respecto a los efectos no deseados tales como inducción a tolerancia e inmunosupresión; ocasionados por utilizar dosis demasiado altas de AI o por un uso prolongado (Bricknell y Dalmo, 2005).

Otro aspecto importante a considerar cuando se quieren realizar comparaciones en los resultados experimentales de inmunoestimulación, es tener presente que las especies de peces marinos de importancia acuícola con ontogenia indirecta presentan un desarrollo mayormente generalista (tabla 1) con respecto a las especies de peces modelo de investigación científica con ontogenia indirecta que son mayormente especialistas (además algunos presentan ontogenia directa) y que con frecuencia son objeto de estudio en inmunología comparativa. Como son por ejemplo, pez cebra (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*), fugu (*Fugu rubripes*), carpa (*Cyprinus carpio*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Aunque los mecanismos básicos del desarrollo de los teleósteos son similares, hay diferencias con respecto a la sincronización de eventos del desarrollo (Falk-Petersen, 2005). Esto implica que al momento de la eclosión pueden existir diferencias en los niveles de desarrollo entre especies que se deseen comparar, lo anterior se conoce como heterocronía; de tal manera que el desarrollo es mayormente avanzado en generalistas con respecto a especialistas al momento de la eclosión, además los umbrales y tasas de desarrollo comprenden intervalos de tiempo diferentes, que complican las comparaciones debido a que los procesos de cambio son más cortos en especies especialistas que en generalistas (Haeckel, 1866). Aunque no se puede definir un patrón de desarrollo ontogénico en los peces, si se puede inferir que las especies de peces marinos en cultivo presenten estrechas similitudes en el desarrollo ontogénico, particularmente en lo que concierne al sistema inmunológico. Por

lo tanto, al considerar esta similitud se pueden construir bases para estandarizar protocolos de evaluación de efectos inmunoestimulantes por diferentes agentes.

Otro aspecto importante a considerar son las zonas geográficas a la cual pertenecen las especies en estudio, porque la tasa de desarrollo de larvas de peces marinos tropicales y subtropicales es más rápida que la presentada por larvas de peces marinos de zonas templadas, debido a que los peces son organismos poiquiloterms y sus tasas metabólicas son fuertemente influenciadas por la temperatura de su medio ambiente (Dixon et al., 2016; Whyte, 2007). Además, el 97% de los peces marinos de aguas templadas y aguas tropicales producen larvas planctónicas, las cuales son fuertemente sensibles a los cambios de temperatura (Kjørsvik et al., 2011). Lo anterior es muy importante para estandarizar protocolos de inmunoestimulación debido a que el desarrollo temprano del sistema inmunológico depende más de la talla que de la edad (Mulero et al. 2007), y por tanto pueden variar los tiempos en los cambios de administración de los tipos de alimento vivo enriquecidos con AI. Por lo tanto, aunque no se requiere ser puntual, si es necesario marcar generalidades como por ejemplo que la primera alimentación sea enriquecida con AI y al igual el suministro de metanauplios de *Artemia*. Además, también se puede coincidir con mayor probabilidad en la aparición y maduración funcional de los órganos del sistema inmunológico en larvas de especies de iguales zonas geográficas. Por tales razones, lo más recomendado es que se realicen dos líneas de investigación para la estandarización de protocolos de inmunoestimulación para larvas de peces marinos, una para especies de zonas tropicales y subtropicales, y otra para especies de zonas templadas (tabla 1).

### **1.1.2 Anti inmunoestimulación en larvas de peces marinos**

Naturalmente, existe un riesgo en el uso de vacunas y/o inmunoestimulantes en acuicultura, lo cual puede causar problemas imprevistos. Es conocido que los procesos de tolerancia suelen ser la contraindicación en las terapias de inmunoestimulación (Bricknell y Dalmo, 2005), mientras que la inmunosupresión es provocada por múltiples factores ambientales, aunque también son resultado de la exposición a fármacos, como son las vacunas (Kahan, 2003).

La tolerancia ha sido reportada en algunas especies de peces (Bricknell y Dalmo, 2005), y en investigación, se entiende como la hipo-respuesta del sistema inmunológico a un segundo tratamiento de inmunoestimulación posterior a una primera exposición con dosis subletales (Novoa et al., 2009). Este efecto secundario no deseado en acuicultura, es ocasionado por la utilización de altas dosis de inmunoestimulantes o por un uso prolongado de estos compuestos (Bricknell y Dalmo, 2005; Ringø et al., 2011). Por otra parte, el sistema inmunológico cuenta con un mecanismo natural de tolerancia, se le conoce como el estado en el cual el sistema inmunitario, de forma activa, regula negativamente la respuesta efectora frente a antígenos específicos (Arboleda et al., 2011).

Por otra parte, Novoa et al. (2009) reportaron tolerancia en larvas (2, 5 y 10 DPF) de pez cebra a lipopolisacáridos (LPS), peces previamente tratados con una concentración subletal de LPS no murieron después de la exposición a una concentración letal del mismo; además demostraron que en este estado, la producción de IL-1 disminuye, concordante con la inhibición de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y IL-12 para casos clásicos de tolerancia. Adicionalmente, reportaron que con larvas *Odysseus* mutantes al gen CXCR4 (receptor de quimiocina), y en larvas silvestres tratadas con un inhibidor farmacéutico específico de CXCR4 expuestas a LPS, se obtenía una respuesta inflamatoria aguda y una reversión de tolerancia a LPS, por lo que infirieron que el receptor CXCR4 es parte funcional del complejo sensible a LPS y pudiese tener un papel en la inhibición de la cascada de señalización iniciada por Toll-like receptor (TLR4).

Aunado a lo anterior, uno de los principales mecanismos implicados en inducción y mantenimiento de tolerancia inmunológica es la anergia, en la cual se da un estado de débil respuesta específica a un antígeno, pero con respuesta normal frente a otros antígenos. Durante la anergia es de fundamental importancia la interrupción de la sinapsis entre células presentadoras de antígeno, en especial células dendríticas y células T; pues durante el contacto de estas dos células se dictan las señales para una adecuada activación de células T o para el inicio de un estado de débil respuesta de estas mismas con respecto a un antígeno específico (Morelli y Thomson, 2007).

Por otra parte, la inmunosupresión es una condición caracterizada por disfunción inmune, ya sea celular o humoral (Auphan et al., 1995). Los niveles celulares defectuosos incluyen

alteraciones en neutrófilos, monocitos/macrófagos y células asesinas naturales (NK), (inmunidad innata), o alteraciones en linfocitos B o T (inmunidad adaptativa). La disfunción inmune a nivel humoral es en gran parte debida a alteración de factores solubles mediados por complemento o quimiocinas de inmunidad innata o a la alteración en los anticuerpos o citocinas de inmunidad adaptativa. La mayoría de estas alteraciones son congénitas en la naturaleza, como se evidencia en pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia primaria. El comportamiento defectuoso del sistema inmune determina la tendencia de los patógenos invasores y la infección contraída generalmente se difunde (Elfaki et al., 2012).

La descripción de los mecanismos relacionados con tolerancia y/o inmunosupresión en peces inmunológicamente maduros, son abordados con frecuencia para generar opciones que permitan evitar sus efectos negativos. Lo que aún no queda claro es el impacto que tienen los agentes inmunoestimulantes o vacunas en el desarrollo del sistema inmune en etapas tempranas de desarrollo de los peces. Algunos investigadores consideran que el efecto es mínimo y que los AI se pueden incluir al alimentar larvas vía el alimento vivo (tabla 2) o tan pronto como el juvenil pueda ser destetado con una dieta balanceada (Bricknell y Dalmo, 2005). Otros mencionan que el riesgo de inducir tolerancia en lugar de una respuesta inmune por vacunación se puede incrementar en peces inmaduros (Van Loon et al., 1982). También se señala que cuando se inmuniza o estimula a un pez antes de su capacidad para generar una respuesta inmune humoral, se induce a tolerancia y se demuestra por la falta de respuesta a la estimulación posterior (Bowden et al., 2005; Magnadóttir et al., 2005; Petrie-Hanson y Ainsworth, 2001; Rombout et al., 1993; Zapata et al., 1997).

Lo anterior pudo haber marcado las pautas para el nacimiento de la escuela del pensamiento anti-inmunomodulación (EPAI), la cual considera que es perjudicial la administración de un compuesto inmunomodulador potencialmente poderoso a un pez que todavía necesita someterse a los principales eventos de desarrollo, que permiten la maduración del sistema inmune, tales como la maduración del timo (Bowden et al., 2005). Esta hipótesis, que aún no ha sido comprobada; se basa en la suposición de que las larvas de peces tienen un número finito de células inmunológicas maduras o potencialmente maduras, y que el encuentro con una molécula que engaña al sistema inmunitario en el montaje de una respuesta inmune impactará negativamente a estas poblaciones de células ya sea por el sesgo del sistema

inmune en desarrollo, posiblemente de manera irreversible, para responder a estos estímulos o para regular a la baja si se induce tolerancia (Bricknell y Dalmo, 2005). Sin embargo, lo anterior parece estar más relacionado con efectos no deseados por inmunización, que por inmuoestimulación.

En inmunización temprana de teleósteos, la dificultad se encuentra en que la madurez inmunológica no se alcanza por igual entre especies, y el consenso señala que su aparición depende principalmente del grado de desarrollo del organismo y no de su edad (Mulero et al. 2007). Por otro lado, se ha establecido que la secuencia general de aparición de órganos linfoides en peces marinos es riñón, bazo y timo (Mulero et al., 2007). Sin embargo, funcionalmente, el timo es el primer órgano en volverse linfoide seguido por el riñón y bazo (Bowden et al., 2005; Scapigliati et al., 1999). Es importante mencionar que la respuesta inmune adaptativa en teleósteos es filogenética y ontogenéticamente conservada (Mulero et al., 2007). Sin embargo, la capacidad de desarrollar una respuesta de anticuerpos no se correlaciona necesariamente con la primera detección de células IgM positivas. Aunque lo anterior, no se ha estudiado en muchas especies, en general se observa un lapso de tiempo entre la detección de IgM celular y la capacidad inmunológica completa tanto en especies de agua dulce como marinas (Magnadóttir et al., 2005; Petrie-Hanson y Ainsworth, 2001).

Por otra parte, la definición de inmunocompetencia ha sido referida como la capacidad de montar una respuesta inmune completa, por aparición de linfocitos funcionales más que por la existencia de órganos linfoides (Zapata et al., 1997). Aunque es importante mencionar que en etapas anteriores al estado de completa madurez de la respuesta inmune de teleósteos que contemplan estadios tempranos (días post eclosión), la parte innata del sistema inmune puede ser suficiente defensa, o definirse como inmunocompetente, ya que es provista de los elementos suficientes para montar una respuesta que puede ser exitosa ante patógenos (Magnadóttir, 2010), por lo tanto el término inmunocompetencia debe ser usado para ambos casos y no exclusivo de la respuesta inmune completa.

Sin embargo, de acuerdo a Zapata et al., (1997) es importante vacunar a los peces tan pronto como sea posible ya que esto proporciona una protección prematura contra enfermedades que afectan en etapas tempranas. Por otra parte, es posible que en general, la edad más temprana a la cual un pez puede ser vacunado con eficacia difiere entre especies y entre

vacunas (Mulero et al., 2007; Sakai, 1999; Zapata et al., 1997). Respecto a la inmunoestimulación en etapas tempranas de peces, existen menos restricciones, ya que pueden ser sumergidas en una solución de AI (Piaget et al., 2007; Strand y Dalmo, 1997; Vadstein y Skjemo, 1993) o se pueden incorporar en su dieta (Skjermo et al., 2002; Størseth et al., 2006) para proporcionar una mejor protección a través de los períodos de crisis como lo es el final del saco vitelino/primer alimentación o metamorfosis (Bricknell y Dalmo, 2005).

### **1.1.3 Entrenamiento temprano de la inmunidad en larvicultura de peces marinos**

Los AI aumentan la resistencia de los peces a las enfermedades infecciosas, no por mejorar su respuesta inmune específica, sino por la mejora de los mecanismos de defensa no específicos. No obstante, se ha considerado que no existe un componente de memoria (Sakai, 1999) y que la respuesta es probable sea de corta duración (Bricknell y Dalmo, 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto que existe un tipo de memoria no específica. Netea et al. (2011) enfatizan que la definición de memoria utilizada en el contexto de respuesta no específica es diferente a la memoria inmunológica adaptativa clásica, la cual implica un alto grado de especificidad y amplificación. Por consiguiente, la memoria no específica la definen como una respuesta aumentada a una infección secundaria que se puede ejercer tanto hacia el mismo microorganismo como a otro diferente (protección cruzada). Este tipo de respuesta inmune no puede definirse como innata (ya que se induce secundariamente en los hospedadores que han encontrado previamente una infección primaria) o adaptativa (ya que esto implica la especificidad dada por la diversificación somática, por ejemplo, en respuestas de células T/B). Por lo tanto, Netea et al. (2011) propusieron el término "Inmunidad Entrenada" (Trained Immunity) para describir este tipo de reacción inmune cuando se produce una segunda infección.

La inmunidad entrenada se origina como consecuencia de que la respuesta innata puede variar ante diferentes agentes infecciosos dependiendo del tipo de interacción PAMP-PRR, (Takeda y Akira, 2004). En inmunología de plantas, es un hecho aceptado que las respuestas inmunes innatas muestran características de memoria después del primer encuentro con un patógeno (efecto de entrenamiento) y se sugiere fuertemente que también exista en

invertebrados (Arala-Chaves y Sequeira, 2000). Aunque esta suposición todavía está por establecerse en inmunología de los vertebrados, observaciones bien documentadas proporcionan pistas de que tal vez sea el caso (Netea et al., 2011). En el revisado de Kurtz (2005) se presenta un número creciente de estudios que demuestran una mayor resistencia a las infecciones secundarias inducidas por un primer encuentro con un patógeno, sin embargo, un conjunto aún más intrigante de estudios demuestran una clara especificidad para el tipo de infección para la que se confiere la protección. Por ejemplo en el revisado de Petit y Wiegertjes (2016) mencionan que los  $\beta$ -glucanos son potentes inductores de inmunidad entrenada en monocitos de mamíferos, y al examinar literatura encontraron indicios de este fenómeno en peces; reportaron que los efectos de  $\beta$ -glucanos en peces inmunológicamente maduros cumplen con al menos uno de los tres criterios básicos de inmunidad entrenada y que es posible que los efectos por estos AI sean de larga duración.

La inmunidad entrenada tiene una serie de características distintivas (Netea et al., 2011), que pueden ser evaluadas en larvas de peces para entender los mecanismos que permiten inmunidad entrenada, y su importancia en el salto evolutivo del sistema inmunológico en vertebrados:

1. Se induce después de una infección primaria o vacunación y confiere protección contra infección secundaria a través de mecanismos independientes de respuestas adaptativas de células T/B: las larvas de peces pueden ser un modelo potencial para el estudio de mecanismos del fenómeno de inmunidad entrenada, debido a que todas sus respuestas contra infecciones son independientes de respuestas adaptativas; desarrollar una respuesta inmunológica completa significa un periodo de larvicultura de dos a tres meses post eclosión (Magnadóttir, 2006).

2. Aumenta la resistencia del huésped a reinfección, pero es menos específica que la inmunidad adaptativa y por lo tanto puede proporcionar protección cruzada a otras infecciones: como los problemas microbianos en larvicultura son debido más probablemente a bacterias oportunistas en lugar de patógenos específicos (Vadstein, 1997; Vadstein et al., 2013), la protección cruzada por efecto de inmunidad entrenada tendría mayores posibilidades de éxito al brindar protección en un entorno de cultivo larvario, donde el agente etiológico no suele ser específico y las larvas sólo cuentan con respuesta inmune inespecífica.

3. Los mecanismos que median el estado de activación aumentando la inmunidad entrenada implican células tales como macrófagos y células NK, e implican un mejor reconocimiento de patógenos por los PRRs y una respuesta inflamatoria protectora mejorada: Este punto es concordante, porque las células clave del sistema inmune innato de peces son las células fagocíticas [granulocitos (neutrófilos), monocitos/macrófagos] y las células citotóxicas no específicas (Frøystad et al., 1998; Neumann et al., 2001). Curiosamente, una aparición temprana de los macrófagos se ha descrito en tres especies marinas: *Seriola quinqueradiata*, *Pagrus major* y *Paralichthys olivaceus* (Chantanachookhin et al., 1991). Aunque también las células epiteliales y dendríticas participan en la defensa innata de los peces (Magnadóttir, 2006).

Con base en lo anterior, se propone que los peces marinos, en especial durante las etapas tempranas, pueden ser idóneas para incrementar las evidencias sobre el fenómeno de inmunidad entrenada en vertebrados. Por lo tanto, se puede usar el término de Entrenamiento Temprano de la Inmunidad (ETI); para hacer referencias a las estrategias que se basen en el entrenamiento de la inmunidad durante las etapas iniciales de la ontogenia de vertebrados, para nuestro caso peces.

Por otra parte, las bases moleculares de inmunidad entrenada han sido descritas por van der Meer et al. (2015) quienes reportaron que tanto por vacuna BCG (a través de la señalización NOD2) como por  $\alpha/\beta$  glucano (vía Dectina-1) se logra inducir reprogramación epigenética en monocitos y macrófagos; en particular generando cambios estables en la trimetilación de histonas en H3K4. Estos cambios epigenéticos conducen a la activación celular, producción mejorada de citocinas y a un cambio en la ruta metabólico celular cambiando de fosforilación oxidativa a glicólisis aeróbica. Lo último es para proporcionar la energía necesaria para funcionar correctamente, ya que los procesos metabólicos de las células del sistema inmunológico están regulados con precisión, pasan de un estado de reposo a recuperar su energía a través de cambios en su mecanismo metabólico (*efecto Warburg*) cuando se exponen a estímulos inflamatorios (O'Neill et al., 2013). Este cambio se asocia con una reducción de la tasa de respiración basal, aumento del consumo de glucosa, producción de lactato y un aumento de la proporción de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) a su forma reducida (NADH) (van der Meer et al., 2015).



Nuevas evidencias han demostrado que después de la infección o la vacunación, las células inmunes innatas prototípicas (tales como monocitos, macrófagos o células agresoras naturales) muestran cambios a largo plazo en sus programas funcionales (Netea, 2013; Netea et al., 2016, 2011; Petit y Wiegertjes, 2016; van der Meer et al., 2015). Estos cambios conducen a una mayor capacidad de respuesta a la estimulación secundaria por patógenos microbianos, al aumentar la producción de mediadores inflamatorios y a una mayor capacidad para eliminar la infección. También, es probable que la inmunidad entrenada juegue un papel importante en la ontogenia, permitiendo la maduración del sistema inmune innato del recién nacido, un proceso en el cual la microbiota juega un papel importante (Netea et al., 2016).

En acuicultura, un efecto similar a inmunidad entrenada se ha reportado en la aplicación de  $\beta$ -glucanos en larvas de peces (tabla 2) y post larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, mostrando un incremento en crecimiento y resistencia contra *Vibrio alginolyticus* (Cheng et al., 2005). El potencial de los AI como son los  $\beta$ -glucanos parece estar en su capacidad para mejorar el cultivo de larvas, mediante entrenamiento temprano de la inmunidad, antes de que el sistema inmune específico madure y los organismos puedan ser vacunados, siendo estos capaces de mejorar la función inmune no específica contra un amplio espectro de patógenos (Barman et al., 2013).

## 2. Referencias

- Akbary, P., Mirvaghefi, A.R., Akhlaghi, M., Amiri, B.M., 2015. The effects of letrozole in transfer of maternal immunity against lactococcosis to eggs and larvae in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum ). *Food Nutr. Sci.* 6, 254–264.
- Anderson, D.P., 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.* 281–307.
- Arala-Chaves, M., Sequeira, T., 2000. Is there any kind of adaptative immunity in invertebrates ? *Aquaculture* 191, 247–258. doi:10.1016/s0044-8486(00)00430-0
- Arboleda, J.F., García, L.F., Álvarez, C.M., 2011. La Respuesta Inmunitaria a Trasplante De Órganos Y Tejidos. *Biomedica* 31, 281–295.

- Auphan, N., DiDonato, J., Rosette, C., Helmberg, A., Karin, M., 1995. Immunosuppression by Glucocorticoids : Inhibition of NF-KB Activity Through IKB Synthesis. *Science* (80-. ). 270, 286–290.
- Balon, E.K., 2002. Reminiscing Briefly about Environmental Biology of Fishes [1976-2002]. *Environ. Biol. Fishes* 367–371.
- Balon, E.K., 1975. Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Board Canada* 32, 1663–1670.
- Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C., Kumar, V., 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. *Mar. Sci Res Dev* 3, 1–11. doi:10.4172/2155-9910.1000134
- Bergh, Ø., 2000. Bacterial pathogens associated with early life stages of marine fish. *Microb. Biosyst. new Front. Proc. 8th Int. Symp. Microb. Ecol. Atl. Canada Soc. Microb. Ecol. Halifax* 221–228.
- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., d'Orbcastel, E.R., Vadstein, O., 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquac. Eng.* 53, 30–39. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.11.009
- Bowden, T., Cook, P., Rombout, J., 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 413–427. doi:10.1016/j.fsi.2005.02.003
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 457–472. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.008
- Chantanachookhin, C., Seikai, T., Tanaka, M., 1991. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture* 99, 143–155. doi:10.1016/0044-8486(91)90294-H
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C., 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 1–12. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.002
- Conceição, L.E.C., Skjermo, J., Verreth, J.A.J., 2001. Effect of an immunostimulating alginate on protein turnover of turbot ( *Scophthalmus maximus* L .) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 207–212.

- Couso, N., Castro, R., Magariños, B., Obach, A., Lamas, J., 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture* 219, 99–109. doi:10.1016/S0044-8486(03)00019-X
- Dalmo, R., 1996. Accumulation of immunomodulatory laminaran ( $\beta$  (1, 3)-D-glucan) in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish ...* 8, 129–136. doi:10.1111/j.1365-2761.1996.tb00691.x
- Dalmo, R.A., 1994. Intestinal absorption of immunomodulatory laminaran and derivatives in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. 579–589.
- Dalmo, R.A., Bøggwald, J., 2008.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 384–396. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.008
- Dixon, B., Heath, G., Semple, S.L., 2016. The immune system of bony fish. *Encycl. Immunol.*
- Efthimiou, S., 1996. Dietary intake of  $\beta$ -1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. *J. Appl. Ichthyol.* 12, 1–7. doi:10.1111/j.1439-0426.1996.tb00051.x
- Elfaki, M., Al-Hokail, A., Kambal., A., 2012. Microbial Immunosuppression. *Immunosuppr. - Role Heal. Dis.* doi:10.5772/28841
- Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 397–412. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.006
- Flegler-Balon, C., 1989. Alternative Life-History Styles of Animals, in: Bruton, M.N. (Ed.), . Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 71–100. doi:10.1007/978-94-009-2605-9\_5
- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K. a., Lievens, B., Rediers, H., 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *J. Fish Dis.* 34, 643–661. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–17. doi:10.1084/jem.20021787
- Grindstaff, J.L., Brodie, E.D., Ketterson, E.D., 2003. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc. Biol. Sci.* 270, 2309–2319. doi:10.1098/rspb.2003.2485

- Hadden, J.W., 1993. Immunomodulation. *TiPS* 14, 169:174.
- Haeckel, E., 1866. *Generelle Morphologie der Organismen: Allgemein Grundzuge der Organischen Formen-Wissenschaft, Mechanisch Bergrundet durch die von Charles Darwin Reformite Descendenz-Theorie*. Georg. Reimer, Berlin 2.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Dimitriadis, G.J., 2004. Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 411–435. doi:10.1016/j.fsi.2004.04.013
- Johannsdottir, J., Heimisdottir, H.L., Hakonardottir, K., Hrolfsdottir, L., Steinarsson, A., Imsland, A.K., Thorarensen, H., Bergsson, A.B., Bjornsdottir, R., 2013. Improved performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae following enhancement of live feed using a fish protein hydrolysate. *Aquac. Nutr.* 20, 314–323. doi:10.1111/anu.12080
- Kahan, B.D., 2003. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 831–838. doi:10.1038/nri1204
- Kjørsvik, E., Galloway, T.F., Estevez, A., Sæle, Ø., Moren, M., 2011. Effects of larval nutrition on development, in: *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell, pp. 219–248. doi:10.1002/9780470959862.ch7
- Knappskog, D.H., Rodseth, O.M., Slinde, E., Endresen, C., 1993. Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis. *J. Fish Dis.* 16, 327–338. doi:10.1111/j.1365-2761.1993.tb00866.x
- Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26, 186–192. doi:10.1016/j.it.2005.02.001
- López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C., 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary  $\beta$  1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224, 223–243. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00214-X
- Magnadóttir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.* 12, 361–379. doi:10.1007/s10126-010-9279-x
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006

- Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, a. K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, a. K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 39, 431–457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5
- Mor, A., Avtalion, R.R., 1990. Transfer of antibody activity from immunised mother to embryos in tilapias. *J. Fish Biol.* 249–255.
- Morelli, A.E., Thomson, A.W., 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 610–621. doi:10.1038/nri2132
- Mulero, I., García-Ayala, A., Meseguer, J., Mulero, V., 2007. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture* 268, 244–250. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.046
- Netea, M., 2013. Training innate immunity: The changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur. J. Clin. Invest.* doi:10.1111/eci.12132
- Netea, M., Joosten, L., Latz, E., Mills, K., Natoli, G., Stunnenberg, H., O'Neill, L., Xavier, R., 2016. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science (80-. )*. 352, aaf1098-aaf1098. doi:10.1126/science.aaf1098
- Netea, M., Quintin, J., Van Der Meer, J., 2011. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. doi:10.1016/j.chom.2011.04.006
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 807–825. doi:10.1016/S0145-305X(01)00037-4
- Novák, M., Vetvicka, V., 2009. Glucans as biological response modifiers. *Endocrine, Metab. Immune Disord.* 9, 67–75.
- Novoa, B., Bowman, T. V., Zon, L., Figueras, A., 2009. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 26, 326–331. doi:10.1016/j.fsi.2008.12.004
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., Bowie, A.G., 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–60. doi:10.1038/nri3446

- Oshima, S.I., Hata, J.I., Segawa, C., Yamashita, S., 1996. Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious haematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout. *J. Gen. Virol.* 77, 2441–2445. doi:10.1099/0022-1317-77-10-2441
- Petit, J., Wiegertjes, G.F., 2016. Long-lived effects of administering  $\beta$ -glucans: Indications for trained immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 64, 93–102. doi:10.1016/j.dci.2016.03.003
- Petrie-Hanson, L., Ainsworth, A.J., 2001. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 113–127. doi:10.1016/S0165-2427(01)00331-2
- Piaget, N., Vega, A., Silva, A., Toledo, P., Marina, D.B., Ciencias, F. De, Católica, U., 2007. Effect of the application of  $\beta$ -glucans and mannan-oligosaccharides (  $\beta$ G MOS ) in an intensive larval rearing system of *Paralichthys adspersus* ( *Paralichthyidae* ). *Investig. Mar.* 35, 35–43. doi:10.4067/S0717-71782007000200004
- Ringø, E., Erik Olsen, R., Gonzalez Vecino, J.L., Wadsworth, S., 2011. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* 02, 1–22. doi:10.4172/2155-9910.1000104
- Robertsen, B., Engstad, R., Departments, J.R.A.A., 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls 9, 391–400.
- Rombout, J., Taverne-Thiele, J., Villena, M., 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical study. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 55–66.
- Sahoo, P.K., 2007. Role of immunostimulants in disease resistance of fish. doi:10.1079/PAVSNNR20072045
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulant. *Aquaculture* 172, 63–92.
- Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N.C.M., Pardo, M.A., Hernandez, I., Almeida, A., 2014. Phage Therapy as an Approach to Prevent *Vibrio anguillarum* Infections in Fish Larvae Production. *PLoS One* 9, e114197. doi:10.1371/journal.pone.0114197

- Sin, Y.M., Ling, K.H., Lam, T.J., 1994. Passive transfer of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapias, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 120, 229–237. doi:10.1016/0044-8486(94)90081-7
- Siwicki, A.K., Korwin-Kossakowski, M., 1988. The influence of levamisole on the growth of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *J. Appl. Ichthyol.* 4, 178–181.
- Skjermo, J., Bergh, 2004. High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using *Artemia* for delivery, increases resistance against vibriosis. *Aquaculture* 238, 107–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.05.038
- Skjermo, J., Defoort, T., Dehasque, M., Espevik, T., Olsen, Y., Skjak-briek, G., Sorgeloo, P., Vadstein, O., 1995. Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism *Artemia*. *Fish Shellfish Immunol.* 531–534. doi:10.1016/S1050-4648(95)80053-0
- Skjermo, J., Rokstad, A.M., Salvesen, I., Skjåk-bræk, G., 2002. Immunostimulation in marine larval rearing. *In Vivo* (Brooklyn). 1–6.
- Skjermo, J., Størseth, T.R., Hansen, K., Handå, A., Øie, G., 2006. Evaluation of  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261, 1088–1101. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.07.035
- Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333–343. doi:10.1016/S0044-8486(99)00096-4
- Strand K, H., Dalmo A, R., 1997. Absorption of immunomodulating beta(1,3)-glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal.of.Fish.Diseases*.20(1):.41.49. 41–49.
- Swain, P., Nayak, S.K., 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 89–99. doi:10.1016/j.fsi.2009.04.008
- Swain, P., Nayak, S.K., Sahu, A., Mohapatra, B.C., Meher, P.K., 2002. Bath immunisation of spawn, fry and fingerlings of Indian major carps using a particulate bacterial

- antigen. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 133–140.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1006/fsim.2001.0388>
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9.  
doi:10.1016/j.smim.2003.10.003
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet. Med. (Praha).* 56, 486–503.
- Vadstein, O., 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 401–417.
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.-J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., De Schryver, P., Bossier, P., 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. *Rev. Aquac.* 5, S1–S25. doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., 1993. Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Rotifer Symp. VI* 261–267. doi:10.1007/BF00025847
- van der Meer, J.W.M., Joosten, L.A.B., Riksen, N., Netea, M.G., 2015. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol. Immunol.* 68, 40–44.  
doi:10.1016/j.molimm.2015.06.019
- van Loo, J., Secombes, C., Egberts, E., Muiswinkel, W., 1982. Ontogeny of the immune system in fish-role of the thymus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 149. doi:10.1007/978-1-4684-9066-4
- Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P., 2013. The effects of  $\beta$ -Glucan on fish immunity. *N. Am. J. Med. Sci.* 5, 580–588. doi:10.4103/1947-2714.120792
- Whyte, S.K., 2007. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1127–1151. doi:10.1016/j.fsi.2007.06.005
- Zapata, A.G., M, T., A, V., E, J., 1997. Immunity in fish larvae, in: R, G., Lillehaug, A., Midtlyng PJ, F, B. (Eds.), *Fish Vaccinology*. pp. 23–32.
- Zhang, S., Wang, Z., Wang, H., 2013. Maternal immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 72–78. doi:10.1016/j.dci.2012.02.009



## 2. Cuantificación y caracterización molecular parcial de $\beta$ -glucanos de *Nannochloropsis* sp.

---

Publicado en:

Rojo-Cebreros, A.H., Morales-Plascencia, M.E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J.M., Medina-Jasso, M.A., 2016. Floculación de *Nannochloropsis* sp. inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44, 662–670. doi:10.3856/vol44-issue4-fulltext-1

Rojo-Cebreros, A.H., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J., Velasco Blanco, G., Martínez-Téllez, M., Medina-Jasso, A., Nieves-Soto, M., Quintana-Zavala, D., 2017. Potential of *Nannochloropsis* in beta glucan production, in: Jan, M., Kazik, P. (Eds.), *Nannochloropsis: Biology, Biotechnological Potential and Challenges*. Nova Science, New York, pp. 181–225

## **2.1 Floculación de *Nannochloropsis* sp. inducida por hidróxido de sodio: eficiencia de floculación, efecto sobre la viabilidad microalgal y su uso como alimento para rotíferos**

### **2.1.1 Introducción**

Por su alto valor nutricional, las microalgas han sido ampliamente usadas en acuicultura como alimento de moluscos, zooplancton y larvas de crustáceos y peces (Hemaiswarja et al., 2011). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) es uno de los géneros de microalgas extensamente utilizados en la industria acuícola (Apt y Behrens, 1999). Este grupo taxonómico está constituido por especies unicelulares, cocoides, con diámetros menores a 5 µm, que habitan sistemas marinos y dulceacuícolas (Fawley y Fawley, 2007). Crecen en amplios intervalos de salinidad (Boussiba et al., 1987) y presentan alto contenido de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido eicosapentaenoico (Tonon et al., 2002). En los sistemas de producción de larvas de peces marinos, *Nannochloropsis* sp. se usa tradicionalmente en el protocolo de cultivo denominado “agua verde” (Skiftesvik et al., 2003) y como alimento de rotíferos (Dhert et al., 2001; Hagiwara et al., 2001; Lubzens et al., 2001). Los costos operativos del cultivo de microalgas en los sistemas de producción de larvas de peces marinos pueden representar el 30% (Coutteau y Sorgeloos, 1992). Debido a lo anterior, el uso de concentrados microalgales comerciales puede ser una opción técnica más eficiente (Heasman et al., 2000), especialmente para laboratorios en localidades remotas, donde no sea posible instalar sistemas de producción masivo de microalgas *in situ* (Knuckey et al., 2006). No obstante, los altos costos de importación en países en subdesarrollo provocan que el uso de concentrados microalgales sea económicamente inviable. Tal situación ha impulsado a que los laboratorios de producción (moluscos, peces y crustáceos) generen su propio concentrado de microalgas. Entre los beneficios obtenidos por esta estrategia se encuentran: a) producción de concentrados durante periodos improductivos de la temporada, b) mejor administración para cubrir las necesidades de microalgas, y c) reducción de los costos de producción (Knuckey et al., 2006).

A la fecha se han empleado distintos métodos para producir concentrados de microalgas: centrifugación (Molina et al., 2003), biopolímeros floculantes (Singh et al., 2000), electrofloculación (Vandamme et al., 2011), flotación (Wiley et al., 2009) y filtración (Molina et

al., 2003). Sin embargo, se ha demostrado que con la floculación producida por agentes alcalinos (e.g.,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  y  $\text{NaOH}$ ), aplicada en la producción de concentrados microalgales, se obtiene mayor eficiencia, menor costo y garantiza la inocuidad (Folkman y Wachs, 1973; Horiuchi et al., 2003; Schlesinger et al., 2012; Besson y Guiraud, 2013). Además, el alto pH de este método reduce eficazmente la carga bacteriana de la biomasa de microalgas y del agua del proceso (Huo et al., 2014). El proceso de floculación de células microalgales ocurre cuando cambios de pH provocados por agentes altamente alcalinos, desestabilizan la carga superficial de las células (debida a grupos funcionales amino, carboxílico protón-activo, fosfórico, fosfodiéster e hidroxilo), permitiendo que éstas se adhieran unas a otras y formen aglomeraciones que floculan (Bratby, 2006; Henderson et al., 2008; Hadjoudja et al., 2010). Como consecuencia de lo anterior, la cantidad de floculante alcalino requerido es una función logarítmica de la densidad celular (Schlesinger et al., 2012). Así, las cosechas más densas requieren menos agente floculante que las cosechas de baja densidad y por consiguiente, la floculación ocurre a un pH menor.

El hidróxido de sodio es uno de los agentes alcalinos más ampliamente usados en la floculación de microalgas (Schlesinger et al., 2012). No obstante, es usual que sea aplicado junto con polisacáridos (Pestan<sup>®</sup>; Lee et al., 1998), almidón catiónico (Vandamme et al., 2010), quitosano (Guevara et al., 2011), polielectrolitos (Magnafloc<sup>®</sup>; Knuckey et al., 2006; Harith et al., 2009), polímeros orgánicos (Flopam<sup>®</sup>; Sales y Abreu, 2015); sulfato de aluminio (Shen et al., 2013) y cloruro férrico (Knuckey et al., 2006). La combinación con alguno de estos compuestos incrementa el pH y mejora el proceso de floculación. Sin embargo, poco se ha documentado sobre el uso de  $\text{NaOH}$  como agente único de floculación para la microalga *Nannochloropsis* sp. (Nava-Gómez, 2014).

Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la eficiencia del  $\text{NaOH}$  0.5N como floculante y determinar la cantidad que se requiere para lograr el punto isoeléctrico o pH óptimo de floculación de la microalga *Nannochloropsis* sp., cosechada al inicio de la fase estacionaria ( $>50 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) generada en un sistema por lotes. Los resultados de este trabajo permiten obtener concentrados microalgales adecuados para aplicaciones en larvicultura (técnica de “agua verde”), en el cultivo de rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) y como inóculos de microalgas.

### **2.1.2 Hipótesis**

Debido a que la dosis requerida de hidróxido de sodio está en función del logaritmo de la densidad celular, entonces a menor dosis de la concentración de NaOH 0.5N (17, 25.5 y 34 ml L<sup>-1</sup>) mayor eficiencia de floculación para biomasa de *Nannochloropsis* sp. poscosecha en fase estacionaria desde un sistema por lotes.

### **2.1.3 Objetivos**

#### **Objetivo general**

Evaluar la eficiencia de floculación del hidróxido de sodio al 0.5N (17, 25.5 y 34 ml L<sup>-1</sup>) para biomasa en fase estacionaria de la microalga marina de importancia acuícola *Nannochloropsis* sp. cultivada en sistema por lotes.

#### **Objetivos particulares**

- I. Establecer el tiempo y dosis requerida de hidróxido de sodio 0.5N (17, 25.5 y 34 ml L<sup>-1</sup>) para flocular biomasa de *Nannochloropsis* sp. a alta densidad celular
- II. Determinar la eficiencia de floculación de una dosis determinada de hidróxido de sodio 0.5N en biomasa de la especie *Nannochloropsis* sp.
- III. Evaluar las condiciones de la biomasa que se produce al aplicar el floculante y el uso del sobrenadante como inóculo.
- IV. Evaluar la disociación del floculado de biomasa de microalga y su aplicación en el cultivo de rotíferos

#### **2.1.4 Materiales y métodos**

##### **Cultivo de microalgas**

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán. Se utilizó la cepa NN-X-1 obtenida de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, en Baja California, México. Se realizaron cultivos por lotes en envases de policarbonato de 16 L. Se empleó el medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962), preparado con agua de mar (salinidad 35), filtrada (1  $\mu$ ) y desinfectada por cloración. Las condiciones de cultivo fueron:  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 4000 lux y aireación continua (Helm et al., 2004). Los cultivos de microalgas fueron cosechados al inicio de la fase de crecimiento estacionario, cuando se obtuvo una densidad celular mayor que  $50 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>. La concentración celular se determinó diariamente con un hematocitómetro (0.1 mm de profundidad, con reglilla de Neubauer mejorada, Brighline Optik Labor) y un microscopio compuesto (Leica modelo CME) de acuerdo con Guillard y Sieracki (2005).

##### **Efecto del NaOH sobre la floculación microalgal**

Las microalgas cosechadas se colocaron en conos Imhoff graduados de 1 L. Como tratamientos se aplicaron en una sola ocasión, alícuotas de 34; 25.5 y 17 mL de NaOH 0.5N por cada litro del cultivo de microalgas; 0.5N de NaOH que es la concentración mínima recomendada por Nava-Gómez (2014) para obtener mejores tiempos y porcentajes de floculación con *Nannochloropsis* sp. Los tratamientos se realizaron en triplicado. Cada 10 minutos, durante 2.5 horas, se midió el pH (potenciómetro Hanna, modelo HI98127) y el porcentaje del volumen floculado. Después de las 2.5 horas, se evaluó la concentración celular en el sobrenadante y en el precipitado como se mencionó en el apartado anterior. La tasa de floculación se calculó con la siguiente ecuación:

$$TF = \frac{\frac{VFi - VFf}{VFi} * 100}{t}$$

donde TF es la tasa de floculación (%); VFi es el volumen del flóculo inicial; VFf es el volumen del flóculo final; y t es el tiempo post-tratamiento en minutos.

### **Eficiencia de floculación**

Con base en los resultados obtenidos en el experimento anterior, se seleccionó el tratamiento de 17 mL de NaOH 0.5N para evaluar la eficiencia de floculación en una cosecha con alta densidad microalgal. Se usó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. Se midió el pH y la concentración celular antes de aplicar el tratamiento; luego se realizaron las mismas determinaciones en el sobrenadante y el precipitado cada 10 minutos, durante 1 hora. Adicionalmente, se tomaron muestras de la biomasa de microalgas antes y después de la aplicación del tratamiento para determinar el peso seco, mediante el método propuesto por Sorokin (1973). Para calcular la eficiencia de floculación se utilizó la ecuación propuesta por Harith et al. (2009):

$$EF = \frac{Ci - Cf}{Ci} x 100$$

donde EF es la eficiencia de floculación en porcentaje; Cf es la concentración final de células en suspensión; Ci es la concentración de células en suspensión antes del tratamiento.

### **Viabilidad de las microalgas contenidas en el sobrenadante**

Después de efectuarse el proceso de floculación, se recuperó el sobrenadante y se sembró en matraces de vidrio de 5 L por triplicado. Se emplearon los métodos de cultivo y de determinación del crecimiento de microalgas descritos con anterioridad. La tasa de crecimiento específico (incremento del número de células por día) se usó como indicador para evaluar la viabilidad de los cultivos, calculada con la siguiente ecuación (Odum y Barrett, 2006):

$$TCE = \frac{\ln Nt - \ln N0}{t}$$

donde TCE es la tasa de crecimiento específico;  $\ln Nt$  es el logaritmo natural del número de células a un tiempo  $t$ ;  $\ln N0$  es el logaritmo natural del número de células al tiempo 0 (inoculación);  $t$  es la edad del cultivo en días.

### **Cultivo de rotíferos con el concentrado microalgal**

Se usó un concentrado de *Nannochloropsis* sp. producido mediante la floculación inducida con 17 mL de NaOH 0.5N por litro de cultivo de microalga. Para neutralizar el pH y disgregar los flóculos microalgales, se inyectó CO<sub>2</sub> a un flujo 5 L min<sup>-1</sup> durante 1.5 minutos (Nava-Gómez, 2014). Antes de utilizarse como alimento en el cultivo de rotíferos, el concentrado se refrigeró por tres semanas a 2.5 ± 1.5 °C. El inóculo de una cepa local del rotífero *Brachionus rotundiformis* (tipo S, 140 y 110 µm, de largo y ancho de lórica), se obtuvo del Laboratorio de Alimento Vivo del CIAD-Mazatlán. Esta cepa fue aislada de la eclosión de huevos en diapausa presentes en el sedimento de los estanques de una granja de camarón al sur de Sinaloa, México (23° 9' 10.54" N, 106° 18' 22.84" W); con el método descrito por Román-Reyes et al. (2014). Para el cultivo de rotíferos se aplicó la técnica por lotes (Hirata, 1980; Lubzens, 1987), que se realizó por triplicado en envases de 15 L a 29 °C y 35 ups de salinidad. La densidad inicial fue de 100 rotíferos mL<sup>-1</sup>. Diariamente se determinó la densidad de rotíferos mediante conteos con una cámara Sedgwick-Rafter de 1 mL y un microscopio compuesto (Leica modelo CME). Además, se contaron los rotíferos con huevos para calcular el porcentaje de fertilidad diario de la población. La alimentación fue a saciedad, con la aplicación de 6x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup> por día, por cada 100 rotíferos mL<sup>-1</sup> (Hino et al., 1997). La ración de alimentación diaria se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$RDA = \frac{TO \times V}{DC}$$

donde RDA es la ración diaria de alimento (mL del concentrado); TO es la tasa óptima para 100 rotíferos mL<sup>-1</sup> (6x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>); V es el volumen del cultivo (15 L); DC es la densidad celular del concentrado microalgal.

## **Análisis estadísticos**

Para comparar las tasas de floculación obtenidas en los tres tratamientos de hidróxido de sodio en cada tiempo de exposición, los porcentajes del volumen de floculación se transformaron mediante la función raíz arcoseno (Steel y Torrie, 1980). Posteriormente, se probó la homogeneidad de varianzas y normalidad mediante las técnicas de Levine y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Debido a que los datos no fueron homocedásticos, se aplicó la prueba por rangos de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn (Zar, 2010). Los análisis estadísticos y las funciones de crecimiento se realizaron con el programa SigmaPlot v11.

### **2.1.5 Resultados**

#### **Evaluación del efecto de NaOH como floculante**

Los tratamientos de 17 y 34 mL de NaOH 0.5N presentaron diferencias significativas entre sí en las tasas de floculación desde los primeros 10 minutos posteriores a la aplicación del floculante (Figura 1). No obstante, ambos tratamientos no presentaron diferencias significativas con el de 25.5 mL de NaOH 0.5N. El pH incrementó de 7.6 (en los tres tratamientos) a  $9.9 \pm 0.1$ ;  $9.8 \pm 0.2$  y  $9.6 \pm 0.2$ ; para los tratamientos de 17; 25.5 y 34 mL NaOH 0.5N, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Todos los tratamientos presentaron alta eficiencia de floculación (80 a 90%) al cumplirse 2.5 h de ser aplicado el floculante. En todos los casos, los porcentajes de floculación se ajustaron al modelo logarítmico (17 mL NaOH 0.5N:  $y = 8.7362 \ln(x) + 50.688$ ,  $r^2 = 0.8$ ; 25.5 mL NaOH 0.5N:  $y = 10.631 \ln(x) + 35.143$ ,  $r^2 = 0.9$ ; 34 mL NaOH 0.5N:  $y = 12.983 \ln(x) + 17.468$ ,  $r^2 = 0.9$ ). Las densidades finales de los flóculos fueron  $582.6 \pm 44.1$ ;  $387.3 \pm 68.3$  y  $220.8 \pm 13.8 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ , para los tratamientos de 17, 25.5 y 34 mL de NaOH 0.5N, respectivamente. Sin embargo, durante los primeros 60 minutos se acumuló más del 70% de la biomasa floculada para los tres tratamientos. No obstante, en el tratamiento de 17 mL de NaOH 0.5N se registró la mayor eficiencia de floculación durante el periodo de observación ( $91 \pm 1\%$ ).



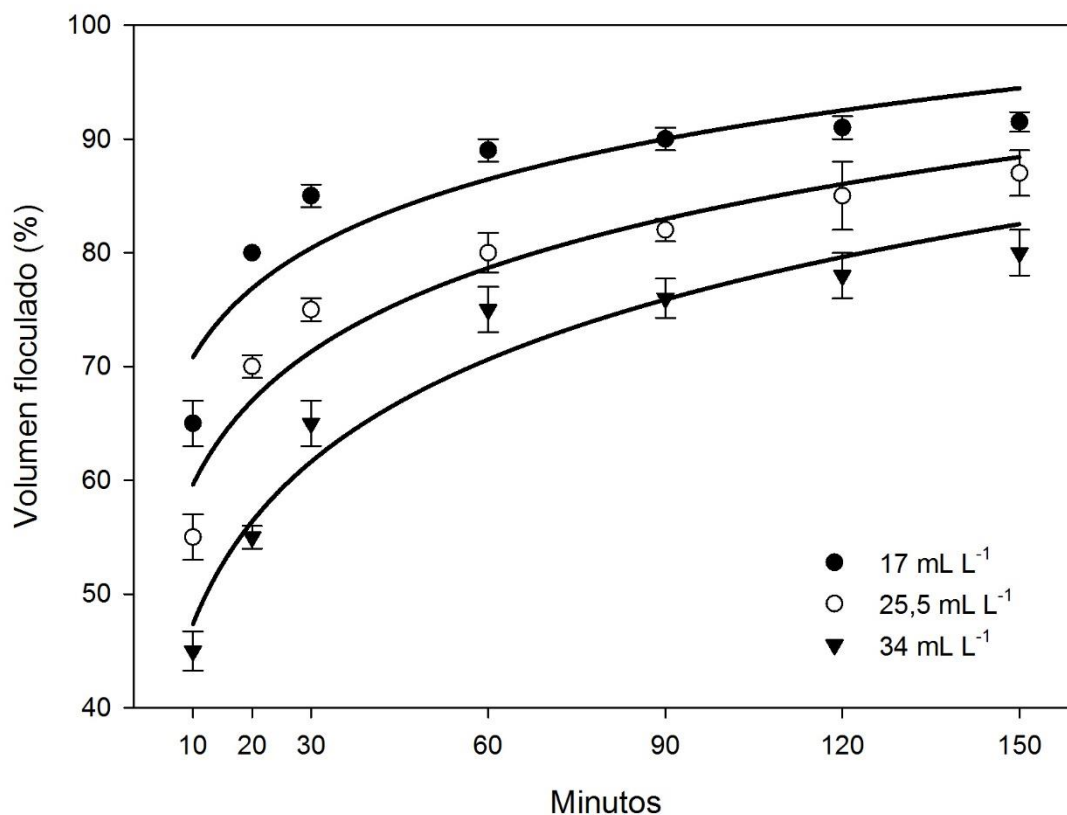


Figura 1. Tasa de floculación (promedio  $\pm$  DE) de *Nannochloropsis* sp. por efecto de tres tratamientos de NaOH 0.5N en diferentes tiempos de exposición.

### Eficiencia de floculación del tratamiento de 17 mL de NaOH 0.5N

La eficiencia de floculación presentó una tendencia lineal con respecto al tiempo ( $y = 1.3256x + 86.873$ ,  $r^2 = 0.9$ ) (Figura 2). En los primeros 10 minutos floculó el 87.4% (densidad del flóculo:  $235.5 \pm 9.29 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) y a los 60 minutos se obtuvo el 94.9% ( $528.1 \pm 19.17 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>). Después de los primeros 10 minutos posteriores a la aplicación del floculante, se incrementó el pH hasta 9.7 y la temperatura a 23.3°C. Durante los 50 minutos siguientes, las células continuaron floculando, aunque a un ritmo menor de  $1.5 \pm 0.9\%$  cada 10 minutos; asimismo, se presentaron cambios menores de pH ( $0.01 \pm 0.02$ ) y temperatura ( $0.10 \pm 0.13$

°C). El peso seco de la fracción floculada a 24 horas después del tratamiento fue de 11,94 g L<sup>-1</sup>, que corresponde a la densidad de 1166.1x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>.

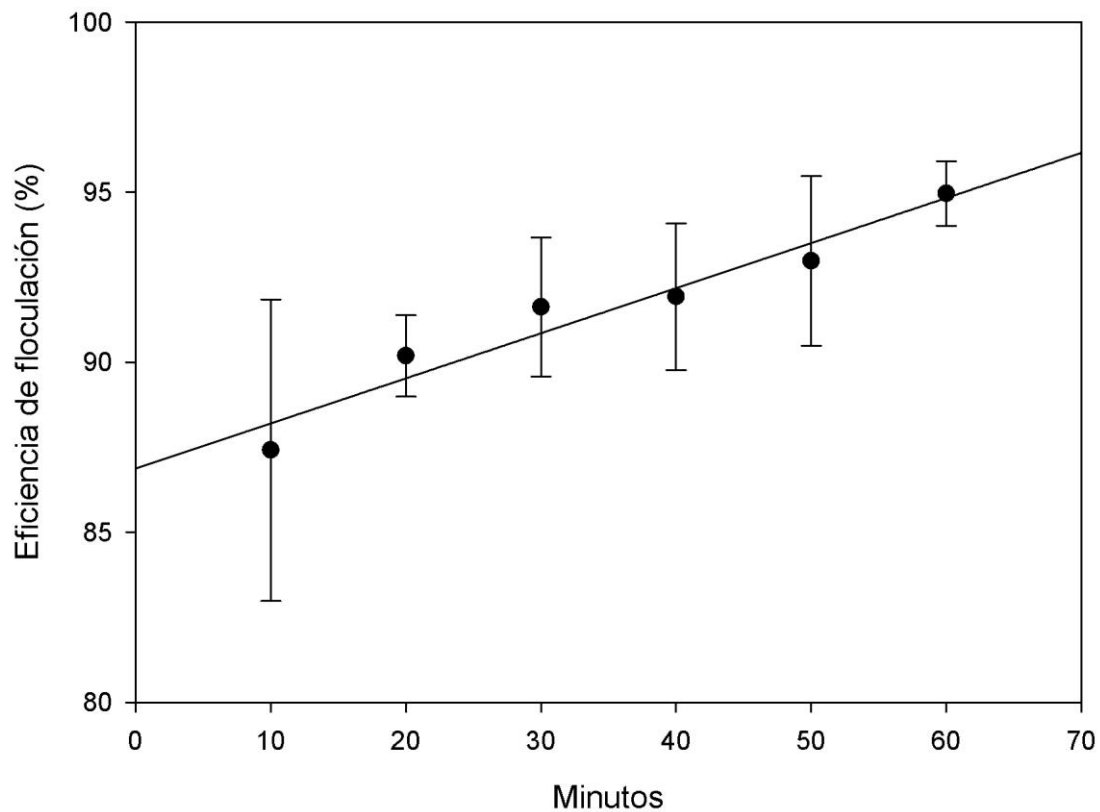


Figura 2. Eficiencia de floculación con el tratamiento 17 mL de NaOH 0.5N para cada litro de cosecha de *Nannochloropsis* sp. a alta densidad (promedio ± DE; n = 3).

### Viabilidad microalgal del sobrenadante

Los cultivos iniciados con un inóculo obtenido del sobrenadante fueron viables y presentaron un crecimiento exponencial en su concentración celular ( $y = 1.2938 e^{0.342x}$ ,  $r^2 = 0.9$ ). Al finalizar los 9 días de cultivo se alcanzó una densidad de  $24.15 \pm 3.19 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> (Figura 3).

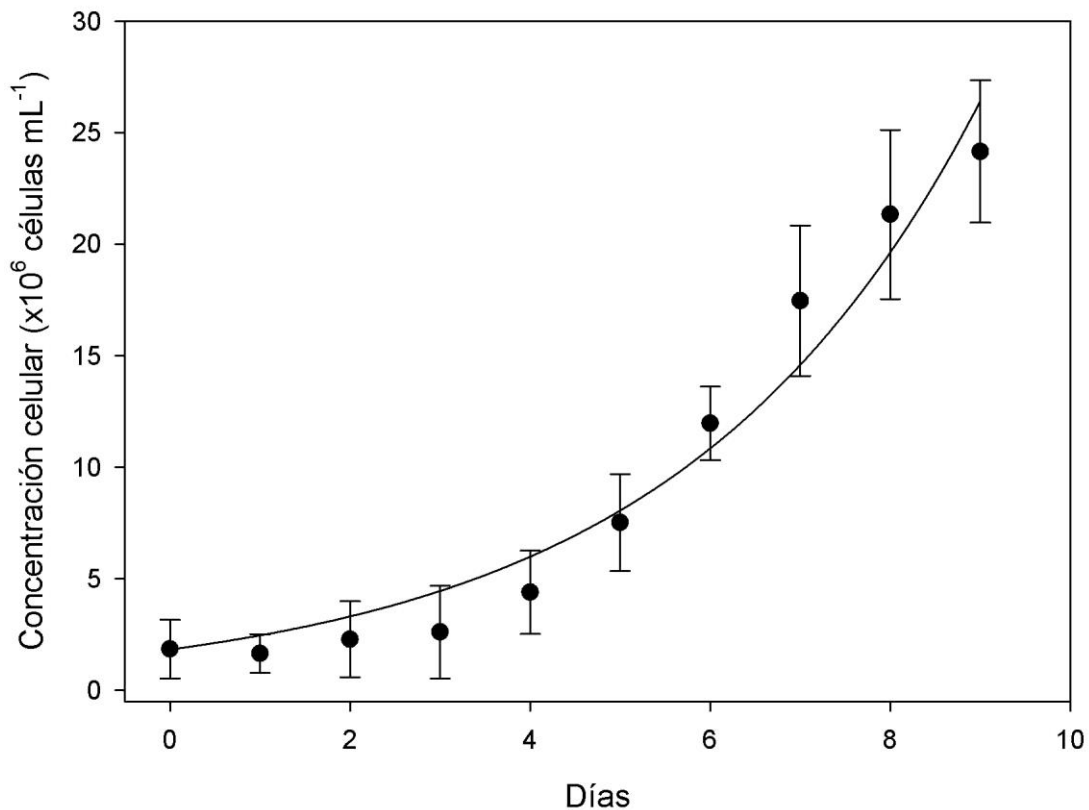


Figura 3. Crecimiento poblacional de *Nannochloropsis* sp. en cultivos iniciados con inóculo obtenido del sobrenadante (promedio  $\pm$  DE; n = 3).

### Crecimiento poblacional de rotíferos

El concentrado de *Nannochloropsis* sp. tuvo una densidad de  $355.7 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  y un peso seco de  $2.03 \text{ g L}^{-1}$ . El concentrado no presentó grumos después de la neutralización y disgregación. Los rotíferos alimentados con la biomasa concentrada por floculación duplicaron la población inicial al cuarto día de cultivo. Al sexto día, se alcanzó una densidad de  $250.2 \pm 12.9$  rotíferos  $\text{mL}^{-1}$ . La fertilidad alcanzó valores máximos cercanos al 30% en el primer día y un promedio de  $13.5 \pm 5.8\%$  durante los seis días de cultivo. El crecimiento poblacional del cultivo de rotíferos fue exponencial ( $y = 104.7 e^{0.1595x}$ ,  $r^2 = 0.9$ ) (Figura 4).

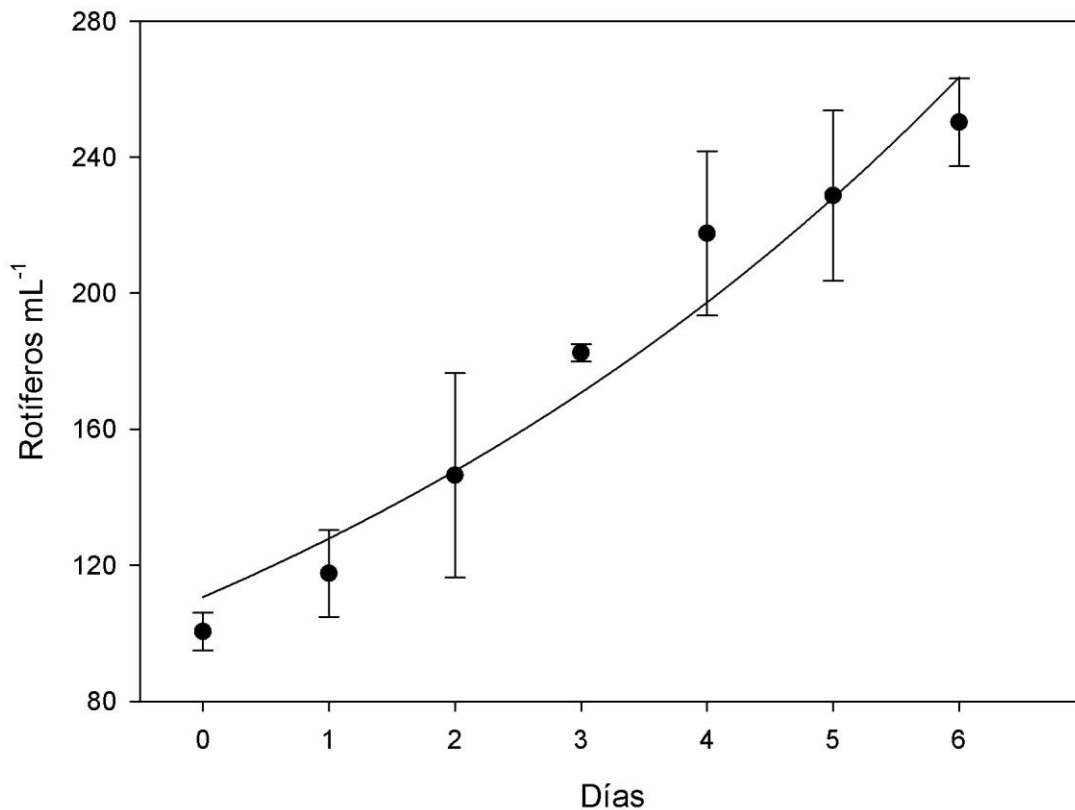


Figura 4. Crecimiento poblacional de *B. rotundiformis* alimentado con biomasa concentrada de *Nannochloropsis* sp. obtenida mediante floculación inducida por NaOH 0.5N (promedio  $\pm$  DE; n = 3).

### 2.1.6 Discusión

En general, los ensayos para evaluar la floculación de microalgas se realizan con bajas densidades celulares (*e.g.*, con *Nannochloropsis* sp.: Knuckey et al., 2006 [ $10\text{-}20 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>]; Nava-Gómez, 2014 [ $39.66 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>]; Low y Toledo, 2015 [ $4.55 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>]). En el presente trabajo se utilizaron cosechas con  $55.1$  y  $52.3 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> (experimentos 1 y 2, respectivamente), que son concentraciones habituales de *Nannochloropsis* sp. en producciones comerciales. Los resultados del primer experimento muestran que a mayor cantidad de NaOH 0.5N, menor fue el efecto floculante en una cosecha densa de

*Nannochloropsis* sp. De las tres cantidades de NaOH probadas (34; 25.5 y 17 mL NaOH 0.5N), 17 mL NaOH presentó el mayor porcentaje de floculación (90%). Por lo tanto, para una cosecha densa de *Nannochloropsis* sp., 17 mL de NaOH 0.5N es suficiente para lograr un punto isoeléctrico (pH 9.9) en menor tiempo (60 minutos).

Esto permite confirmar que el efecto del floculante está en función de la densidad celular, como fue establecido por Schlesinger et al. (2012). En todos los casos, el proceso de floculación se efectuó a pH menor de 10. Lo anterior contrasta con lo establecido por Folkman y Wachs (1973), quienes señalaron que la floculación de microalgas por agentes alcalinos se inicia a valores de pH >10 y que sólo se completa a pH 11. Por otra parte, Nava-Gómez (2014) logró altos porcentajes de floculación (>90%) de *Nannochloropsis* sp. con NaOH 0.5N, a pH entre 9.74 y 9.94; aunque no se especificó la cantidad de NaOH utilizada. De la misma forma, Vandamme et al. (2012) indujeron floculación de *Chlorella vulgaris* con 22 mg L<sup>-1</sup> de NaOH y un pH = 10.5.

Los resultados del segundo experimento, muestran que la aplicación de 17 mL de NaOH 0.5N incrementó el pH a 9.7 en una cosecha densa de *Nannochloropsis* sp. y generó un floculación del 94.9%. Este resultado se debió a una disminución en el potencial zeta por aumento del pH, lo que produce la neutralización de la carga superficial de las células y por consecuencia su floculación (Wu et al., 2012; Shen et al., 2013). Resultados similares fueron reportados por Horiuchi et al. (2003) con *Dunaliella tertiolecta*. Estos autores obtuvieron una rápida floculación al adicionar NaOH al medio de cultivo, entre valores de pH 8.6 y 10.5 e indicaron una recuperación de la biomasa celular mayor al 90%. También, Besson y Guiraud (2013) señalan que inducir un incremento de pH por adición de NaOH en el cultivo de *Dunaliella salina* permite obtener alta eficiencia de recuperación (>90%). Mientras que, Ghidini et al. (2009) sugieren que el incremento de pH en el medio de cultivo de *N. oculata* y *Phaeodactylum tricornutum* es un método adecuado para recuperar la biomasa celular en suspensión.

Los resultados de la presente investigación sugieren que el tiempo de exposición al agente floculante afecta la eficiencia de floculación. El tiempo requerido para una alta eficiencia de floculación de *Nannochloropsis* sp. con 17 mL de NaOH 0.5N fue tres veces menor que el tiempo reportado por Surendhiran y Vijay (2013) para alcanzar la máxima floculación

(93.80%) de *N. oculata* con  $\text{FeCl}_3$  como floculante. En resumen, los resultados de los dos experimentos de floculación permiten demostrar que el NaOH usado como floculante único puede ser un agente de floculación eficaz de la biomasa de *Nannochloropsis* sp., como lo propone Schlesinger et al. (2012).

Por otra parte, se registró un crecimiento exponencial en la concentración de los cultivos de microalgas inoculados con en el sobrenadante obtenido como subproducto de floculación de *Nannochloropsis* sp. Lo anterior fue también señalado por Wu et al. (2012) quienes propusieron que el uso del sobrenadante puede contribuir a la reducción de los costos de producción de microalgas para biodiesel. Por su parte, Besson y Guiraud (2013) plantearon aprovechar el sobrenadante como inóculo para iniciar nuevos cultivos. No obstante, esta medida no siempre es posible. Brown y Robert (2002) mencionan que los cambios de pH por efecto de floculación pueden provocar estrés químico en las células de microalgas volviéndose perjudicial para algunas especies. Por ejemplo, Surendhiran y Vijay (2013) observaron lisis en *N. oculata* al aplicar sulfato de aluminio a  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  como floculante, en incubación por 480 minutos. Igualmente, Blanchemain y Grizeau (1999) notaron un cambio de marrón a verde en la biomasa de *Skeletonema costatum* después de 1 hora de incubación a pH 10.2, ajustado con HCl o NaOH (0.5 M). Esto probablemente está relacionado con el tipo de floculante, tiempo de exposición y características celulares de cada especie de microalga.

Con respecto al uso como alimento para rotíferos del concentrado de *Nannochloropsis* sp. obtenido por floculación, se logró un cultivo de *B. rotundiformis* que alcanzó una densidad de  $250.2 \pm 12.9$  rotíferos  $\text{mL}^{-1}$  al sexto día. La fertilidad alcanzó valores máximos cercanos al 30% en el primer día, con un promedio de  $13.5 \pm 5.8\%$ . El concentrado de *Nannochloropsis* sp. fue conservado adecuadamente por tres semanas a temperatura de  $2.5 \pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$  antes de utilizarse como alimento para rotíferos. Esto confirma lo mencionado por Low y Toledo (2015), quienes concluyeron que los concentrados de *N. oculata* almacenados entre 0 y  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 16 semanas, permanecen viables para su aplicación como alimento, “agua verde” y otros usos en laboratorios acuícolas de larvas de moluscos y peces.

La viabilidad como alimento de los concentrados microalgales, sujetos a procesos de floculación y conservación a bajas temperaturas es atribuido a que no se modifica su composición bioquímica (Heasman et al., 2000; Guevara et al., 2011). Sin embargo, de

acuerdo con Brown y Robert (2002), esto parece depender de la especie, ya que en cinco especies de microalgas (ninguna *Nannochloropsis* sp.) se encontró aproximadamente la mitad del porcentaje de carbohidratos en comparación con la microalga fresca. La disminución de carbohidratos ocurrió rápidamente después de almacenar los concentrados en oscuridad. Brown y Robert (2002) atribuyen esta disminución a la respiración en fase oscura de las células. Sin embargo, en las aplicaciones acuícolas la importancia de la reducción de los carbohidratos es limitada debido a que estos compuestos no revisten mayor interés nutricional para la alimentación de rotíferos. La información sobre la composición bioquímica de los concentrados de *Nannochloropsis* sp. por efecto de floculación para fines acuícolas es escasa (Low y Toledo, 2015), en comparación con lo realizado para obtención de biodiesel (Malakootian et al., 2015).

Respecto al cultivo de rotíferos con concentrados microalgales, un concentrado de *Nannochloropsis* sp. cultivado con medio f/2 fue comparado por Nava-Gómez (2014) con concentrados de la misma cepa cultivados con fertilizantes agrícolas. Este autor obtuvo la mayor densidad ( $226 \text{ rotíferos mL}^{-1}$ ) e índice de fertilidad ( $1.15 \pm 0.18$ ) de *Brachionus plicatilis* al utilizar el concentrado de *Nannochloropsis* sp. cultivada con medio f/2. No obstante, la tasa de alimentación suministrada por Nava-Gómez (2014) fue de  $150 \times 10^3$  células por rotífero por día, lo cual es más del doble de la ración proporcionada en la presente investigación con la misma microalga ( $60 \times 10^3$  rotífero día<sup>-1</sup>). Por otra parte, Guevara et al. (2011) no encontraron diferencias entre el crecimiento de cultivos de rotíferos (*B. plicatilis*) con pasta de *Rhodomonas salina* ( $320 \text{ rotíferos mL}^{-1}$ ) generadas por centrifugación o floculación con quitosano.

Otras ventajas, para las aplicaciones acuícolas de los concentrados obtenidos por este método es que el alto pH de la floculación alcalina, minimiza la carga bacteriana de la biomasa de microalgas, así como la del agua del proceso (Huo et al., 2014). Además, al descartar el agua del proceso se minimiza la carga de compuestos y materia orgánica que afectan los cultivos de rotíferos (Yoshimura et al., 1997). También, el uso de CO<sub>2</sub> para neutralizar el efecto en el pH por la adición de NaOH evita la aplicación de ácidos en el concentrado microalgal para el mismo fin como se señala en otros trabajos (Brown y Robert, 2002; Knuckey et al., 2006; Guevara et al., 2011).

### 2.1.7 Conclusiones

Las cantidades probadas de NaOH 0.5N (17, 25,5 y 34 mL) presentaron porcentajes de floculación mayores al 80%. Sin embargo, con 17 mL de NaOH 0.5N aplicados en cosechas densas de *Nannochloropsis* sp., se puede lograr alta eficiencia en la recuperación de la biomasa celular (94.9%) a bajo pH (9.7) y en un lapso corto (<60 minutos). Esto pone en evidencia que la dosis requerida de hidróxido de sodio estuvo en función de la densidad celular, por lo tanto, se confirma la hipótesis planteada. La viabilidad de las microalgas en el sobrenadante y la utilidad del concentrado para la alimentación de rotíferos, confirman que como agente floculante único, el NaOH 0.5N es conveniente para producir concentrados de *Nannochloropsis* sp.

### 2.1.8 Referencias

- Apt, K.E. y P.W. Behrens. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.*, 35(2): 215-226.
- Blanchemain, A. y D. Grizeau. 1999. Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature. *Biotechnol. Tech.*, 13(7): 497-501.
- Bratby, J. 2006. Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment. IW Publishing, London, pp. 50-68.
- Besson, A. y P. Guiraud. 2013. High-pH-induced flocculation–flotation of the hypersaline microalga *Dunaliella salina*. *Bioresour. Technol.*, 147: 464-470.
- Boussiba, S., A. Vonshak, Z. Cohen, Y. Avissar y A. Richmond. 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Bio-mass*, 12(1): 37-47.
- Brown, M. y R. Robert. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207(3-4): 289-309.
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The requirement for live algae and their replacement by artificial diets in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.*, 11(2): 467-476.
- Dhert, P.G., G. Rombaut, P. Suantika y P. Sorgeloos. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200(1-2): 129-146.
- Fawley, K.P. y M.W. Fawley. 2007. Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protista*, 158(3): 325-336.
- Folkman, Y. y A.M. Wachs. 1973. Removal of algae from stabilization pond effluent by lime treatment. *Water Res.*, 7(3): 419-435.



- Guevara, M., L. Bastardo, R. Cortez, B. Arredondo-Vega, L. Romero y P. Gómez. 2011. Pastas de Rhodomonas salina (Cryptophyta) como alimento para *Brachionus plicatilis* (Rotífera) *Rev. Biol. Trop.*, 59(4): 1503-1515.
- Ghidini, L.F.C., J.V.C. Vargas, L.F.L. Luz Jr., A.B. Mariano y V. Locatelli Jr. 2009. Change of culture broth pH for microalgae separation from the growth solution. 20th International Congress of Mechanical Engineering, Proceedings of COBEM, 15-20 November 2009, Gramado, RS, Brazil, 5 pp.
- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.*, 8(2): 229-239.
- Guillard, R.R.L. y M. Sieracki. 2005. Counting cells in cultures with the light microscope. In: R. Andersen (ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier, London, 578 pp.
- Hadjoudja, S., V. Deluchat y M. Baudu. 2010. Cell surface characterization of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *J. Colloid. Interface Sci.*, 342(2): 293-299.
- Hagiwara, A., W.G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani y A.B. Araujo. 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, 200(1-2): 111-127.
- Harith, Z., Y. Fatimah, M. Mohd, D. Mohamed y A. Arbakariya. 2009. Effect of different flocculants on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans* cells. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(21): 5971-5978.
- Heasman, M., J. Diemar, W.O' Connor, T. Sushames, L. Foulkes y J.A. Nell. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs a summary. *Aquacult. Res.*, 31(8-9): 637-659.
- Hemaiswarja, S., R. Raja, R.R. Kumar, V. Ganesan y C. Anbazhagan. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol. Bio-technol.*, 27: 1737-1746.
- Henderson, R.K., S.A. Parsons y B. Jefferson. 2008. Successful removal of algae through control of the zeta potential. *Separ. Sci. Technol.*, 43(7): 1653-1666.
- Helm, M.M., N. Bourne y A. Lovatelli. 2004. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 471: 200 pp.
- Hino, A., S. Aoki y M. Ushiro. 1997. Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus rotundiformis* and its significance in mass cultures. *Hydrobiologia*, 358(1): 77-82.
- Hirata, H. 1980. Culture methods of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Min. Rev. Data File Fish. Res. Kagoshima Univ.*, 1: 27-46.
- Horiuchi, J., I. Ohba, K. Tada, M. Kobayashi, T. Kanno y M. Kishimoto. 2003. Effective cell harvesting of the halotolerant microalga *Dunaliella* with pH control. *J. Biosci. Bioeng.*, 95(4): 412-415.
- Huo, S., Z. Wang, S. Zhu, F. Cui, B. Zou, W. You, Z. Yuan y R. Dong. 2014. Optimization of alkaline flocculation for harvesting of *Scenedesmus quadricauda* n°507 and *Chaetoceros muelleri* n°862. *Energies*, 7(9): 6186-6195.
- Knuckey, R., M. Brown, R. Robert y D. Frampton. 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacult. Eng.*, 35(3): 300-313.
- Lee, J.S., S. Kim, J. Kim, G. Kwon, B. Yoon y H. Oh. 1998. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27(1): 14-18.

- Low, C. y M.I. Toledo. 2015. Assessment of the shelf-life of *Nannochloropsis oculata* flocculates stored at different temperatures. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(2): 315-321.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147(1): 245-255.
- Lubzens, E., O. Zmora y Y. Barr. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia*, 446/447: 337-353.
- Malakootian, M, B. Hatami, S. Dowlatshahi y A. Rajabizadeh. 2015. Optimization of culture media for lipid production by *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. *Environ. Health Eng. Manage.*, 2(3): 141-147.
- Molina-Grima, E., E.H. Belarbi, F.G. Ación-Fernández, A. Robles-Medina y Y. Chisti. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.*, 20(7-8): 491-515.
- Nava-Gómez, B. 2014. Cultivo de *Nannochloropsis* sp. con fertilizantes agrícolas y evaluación de floculados como alimento para *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, 33 pp.
- Odum, E. y G. Barrett. 2006. Fundamentos de ecología. Editora Thompson, Santa Fe, 598 pp.
- Román-Reyes, J.C., D.O. Castañeda-Rodríguez, H. Castillo-Ureta, R. Bojórquez-Domínguez, G.A y Rodríguez-Montes de Oca. 2014. Dinámica poblacional del rotífero *Brachionus ibericus* aislado de estanques para camarón, alimentado con diferentes dietas. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(5): 1159-1168.
- Sales, R. y P.A. Abreu. 2015. Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175(4): 2012-2019.
- Schlesinger, A., D. Eisenstadt, A. Bar-Gil, H. Carmely, S. Einbinder y J. Gressel. 2012. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnol. Adv.*, 30(5): 1023-1030.
- Shen, Y., Y. Cui y W. Yuan. 2013. Flocculation optimization of microalga *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 169(7): 2049-2063.
- Singh, R.P., T. Tripathy, G.P. Karmakar, S.K. Rath, N.C. Karmakar, S.R. Pandey, K. Kannan, S.K. Jain, y N.T. Lan. 2000. Novel biodegradable flocculants based on polysaccharides. *Curr. Sci.*, 78(7): 798-803.
- Skiftesvik, A.B, H.I. Browman y J.F. St-Pierre. 2003. Life in green water: the effect of microalgae on the behaviour of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. In: H.I. Browman & A.B. Skiftesvik (eds.). *Big fish bang*. Institute of Marine Research, Bergen, pp. 97-103.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed volume and optical density. In: J.R. Stein (ed.). *Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.
- Steel, R.G.D. y J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo, 633 pp.
- Surendhiran, D. y M. Vijay. 2013. Study on flocculation efficiency for harvesting *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 5(4): 1761-1769.

- Tonon, T., D. Harvey, T.R. Larson y I.A. Graham. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61(1): 15-24.
- Vandamme, D., I. Foubert, B. Meesschaert y K. Muylaert. 2010. Flocculation of microalgae using cationic starch. *J. Appl. Phycol.*, 22(4): 525-530.
- Vandamme, D., I. Foubert, I. Fraeye y K. Muylaert. 2012. Influence of organic matter generated by *Chlorella vulgaris* on five different modes of flocculation. *Bioresour. Technol.*, 124: 508-511.
- Vandamme, D., S. Pontes, K. Goiris, I. Foubert, L. Pinoy y K. Muylaert. 2011. Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. *Biotechnol. Bioeng.*, 108(10): 2320-2329.
- Wiley, P.E., K.J. Brennenman y A.E. Jacobson. 2009. Improved algal harvesting using suspended air flotation. *Water Environ. Res.*, 81(7): 702-708.
- Wu, Z., Y. Zhu, W. Huang, C. Zhang, T. Li, Y. Zhang y A. Li . 2012. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresour. Technol.*, 110: 496-502.
- Yoshimura, K., K. Usuki, T. Yoshimatsu, C. Kitajima y A. Hagiwara. 1997. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Hydrobiologia*, 358: 139-144.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 944 pp.

## **2.2 Caracterización cuantitativa y cualitativa de carbohidratos de *Nannochloropsis* sp.**

De acuerdo con Markou *et al.* (2012), los microorganismos fotosintéticos, como son las microalgas eucariotas y las cianobacterias, capturan la energía solar y la convierten en energía química a través de una serie de reacciones complejas llamadas fotosíntesis. Hay dos tipos principales de reacciones fotosintéticas, las claras y las oscuras. En las reacciones claras, la energía solar es absorbida por los pigmentos de las antenas fotosintéticas y se utiliza para dividir el agua en protones, electrones y oxígeno. Los electrones y protones se utilizan a continuación para generar portadores de energía (NADPH y ATP), que soportan las necesidades metabólicas del organismo. En las reacciones oscuras, el dióxido de carbono se reduce a carbohidratos vía Ciclo de Calvin, utilizando la energía derivada de NADPH y ATP (Masojidek *et al.*, 2004).

En el Ciclo de Calvin, el primer paso es la asimilación de dióxido de carbono, que es catalizada por ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). El dióxido de carbono se utiliza para la carboxilación de un compuesto de cinco carbonos (ribulosa-1,5-bisfosfato) en dos compuestos de tres carbonos (3-fosfoglicerato), uno de los cuales se utiliza como sustrato para la formación de hidratos de carbono, mientras que el otro se utiliza para lograr el siguiente ciclo. Los carbohidratos se forman en el interior del cloroplasto, pero en el caso de procariotas se sintetizan en el citosol. Markou *et al.*, (2012), enumeraron los principales carbohidratos de microalgas, los más abundantes son glucosa, ramnosa, xilosa y manosa.

La producción de carbohidratos tiene dos propósitos principales para las algas, actúan como componentes estructurales en las paredes celulares, y como componentes de almacenamiento dentro de la célula. Los carbohidratos, como compuestos de almacenamiento de las algas, proporcionan la energía necesaria para los procesos metabólicos de los organismos y permiten, si es requerido, la supervivencia temporal en condiciones adversas (Geider *et al.*, 2002). Los carbohidratos de reserva son dependientes de las especies, las algas rojas sintetizan el almidón florideano (un híbrido de almidón y glucógeno) y las algas verdes sintetizan polisacáridos tipo amilopectina (almidón) (Sekharam *et al.*, 1989).

Actualmente se sabe que el cultivo y las condiciones ambientales afectan significativamente a la composición de la biomasa microalgal. Además, el control de algunas de las condiciones

de cultivo o ambientales parece ser un abordaje factible para la manipulación de la composición de biomasa de microalgas, con el fin de incrementar o maximizar la acumulación de carbohidratos en la biomasa (Dragone *et al.*, 2011). Los factores de cultivo y ambientales más frecuentemente reportados, que afectan el contenido de carbohidratos, son la inanición/limitación de nutrientes, el estrés salino, la intensidad de la luz y la temperatura. Además, los tipos de metabolismos (autotrófico, heterotrófico y mixotrófico) afectan la composición de la biomasa (Markou *et al.*, 2012).

El proceso de polimerización de los biopolímeros implica tres etapas: iniciación, elongación y terminación de la cadena. Los  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanos derivados de hongos son sintetizados por la enzima GLS, una proteína de membrana compleja que usa uridina difosfato de glucosa (UDPGlc) como donante de glucosa (Dalonso *et al.*, 2015). Respecto a la biosíntesis de  $\beta$ -glucanos en microalgas, en las células de la diatomea marina *Skeletonema costatum*, los carbohidratos producidos por el Ciclo de Calvin se convierten rápidamente en glucosa-1-fosfato y son polimerizados en glucano por la UDP-glucosa pirofosforilasa y glicosiltransferasa; para posteriormente ser almacenadas en vacuolas celulares. La síntesis de  $\beta$  (1,3)-D glucanos en las diatomeas es directamente influenciada durante la fotosíntesis por las concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo; y se ha reportado que el metabolismo de carbohidrato es muy activo tanto en limitaciones de nitrógeno como en condiciones de suficiente nitrógeno (Granum y Myklestad, 2002).

### **2.2.1 Hipótesis**

Los carbohidratos de *Nannochloropsis* sp. representan del 10 al 15 % de su composición orgánica, siendo glucosa el principal monosacárido constituyente.

### **2.2.2 Objetivos**

#### **Objetivo general**

Caracterizar cuantitativa y cualitativamente carbohidratos extraídos desde *Nannochloropsis* sp.

### **Objetivos particulares**

- I. Análisis proximal de la biomasa de *Nannochloropsis* sp.
- II. Extracción de carbohidratos totales desde biomasa microalgal de *Nannochloropsis* sp. mediante la técnica de etanol-agua caliente.
- III. Caracterización cuantitativa y cualitativamente del extracto de carbohidratos de *Nannochloropsis* sp.

### **2.2.3 Materiales y métodos**

#### **Cultivo y producción de biomasa liofilizada de microalgas**

Se utilizó la cepa *Nannochloropsis* sp. (NN-X-1) de la Colección de microalgas CICESE, la cual se mantiene en la colección del Laboratorio de Microalgas de la Planta Piloto de Peces Marinos de CIAD-Mazatlán. Su cultivo se realizó por sistema de lotes y para la preparación del medio de cultivo se aplicó la formulación F/2 (Guillard y Ryther, 1962) con agua de mar a 35 ups y esterilizada. Además, como control se liofilizó pasta microalgal Nanno 3600™, la cual está compuesta de células de *Nannochloropsis oculata* (cepa CCMP 525).

Fue determinada la carga máxima ( $\mu$ ) del cultivo de *Nannochloropsis* sp. para conocer el inicio de la fase estacionario (Nieves et al. 1998) y a partir de este punto se procedió a la cosecha de los cultivos para realizar la concentración microalgas mediante centrifugación (5000 g por 5 minutos). El concentrado de biomasa microalgal fueron colocados a congelación (-60 °C) para posteriormente pasar a secado mediante liofilización (0.018 mBar y -52 °C).

#### **Determinación de la composición orgánica**

La determinación de la composición orgánica de la biomasa de *Nannochloropsis* sp. se realizó con base al protocolo establecido por el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La determinación de proteínas se realizó empleando la metodología de Lowry et al., (1951) que consisten en la extracción en calor empleando hidróxido de sodio al 0.5N. Por otra parte, la extracción y determinación de carbohidratos se hizo por el método

propuesto por Dubois et al. (1956) empleando ácido sulfúrico a 1M y fenol al 5%. Con respecto a la obtención de lípidos totales se empleó el método de Bligh y Dyer (1959). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g cel}^{-1}$  (n=5).

### **Extractación y purificación de carbohidratos totales**

La biomasa microalgal liofilizada (1 gramo) se sumergió en etanol al 85 % por 10 minutos, posteriormente (30 minutos) se decantó la solución de etanol y se agregó una porción nueva de etanol al 85 % y fué homogenizado (8000 g /10 minutos, ultra-turrax T25), y se dejó en reposo toda la noche a temperatura ambiente. Después, se colocó en “baño maría” a 70 °C por 10 minutos. Las células se colectaron por centrifugación (3000 g/10 minutos). El sedimento se resuspendió en medio acuoso con  $\text{CaCl}_2$  2% y se repitió el “baño maría” en ebullición con agitación por 1 hora. Después se enfrió la mezcla, centrifugó y colectó el sobrenadante. La extracción se repitió dos veces con  $\text{CaCl}_2$  2%. El sobrenadante se enfrió y fué tratado con fenol al 90 % para hacer extracción liquido-liquido. Posteriormente una extracción similar con cloroformo. Después la fase acuosa se dializó (12,000-14,000 MWCO, Spectrum Spectra/Por<sup>®</sup> 4) y por último se secó por liofilización para dar un extracto crudo de carbohidratos microalgales. Protocolo con modificaciones a Bobadilla et al. (2013) y Sadovskaya et al. (2014) (Figura 5).

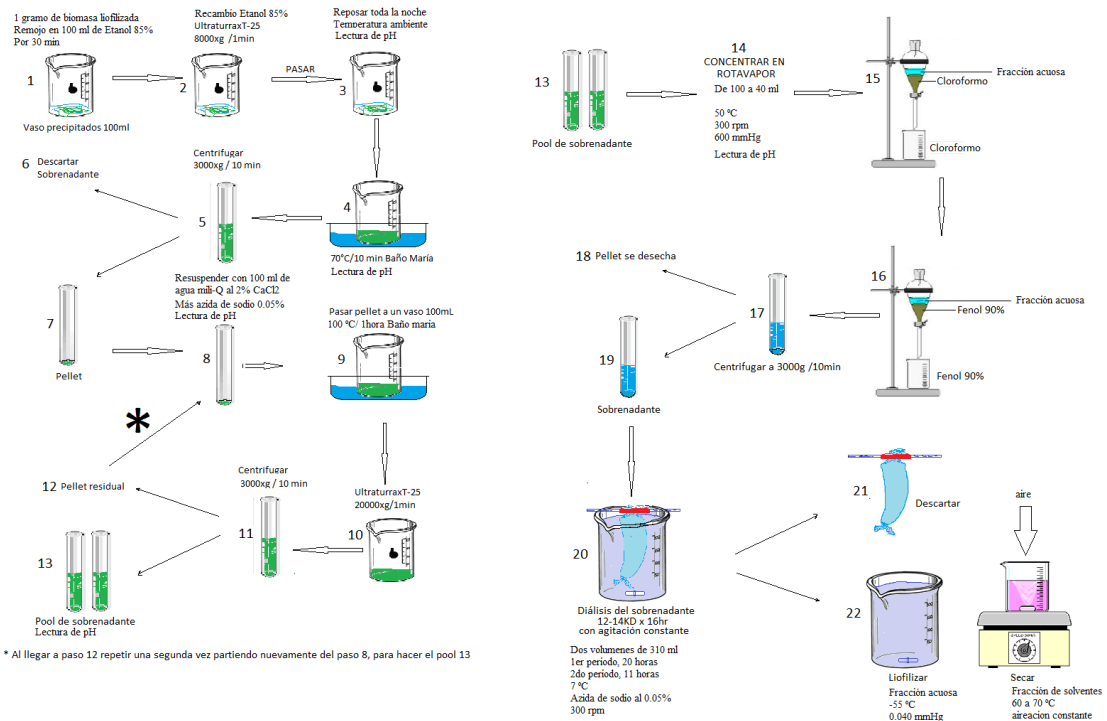


Figura 5. Protocolo de extracción de carbohidratos de *Nannochloropsis* sp. Modificado de Bobadilla *et al.* (2013) y Sadovskaya *et al.* (2014). Esquema elaborado con el apoyo de Q.B. Francisco Javier Soto Córdoba

### Análisis cualitativo y cuantitativo de carbohidratos totales extraídos de *Nannochloropsis* sp. por HPLC - Dionex.

A partir de la biomasa liofilizada de *Nannochloropsis* sp. se realizó la producción de un extracto de carbohidratos con el protocolo modificado de Bobadilla *et al.* (2013) y Sadovskaya *et al.* (2014). Para la determinación de los carbohidratos se aplicó la metodología establecida en la ISO 11292 de 1995, de tal manera que las muestras de microalgas (10 mg peso seco) se hidrolizaron en HCl 1 M (150 min, 100 °C), filtradas a través de un Sep Pack C-18 (Waters, Massachusetts, EE.UU.), secadas (35 a 40 °C), lavadas (dos veces) y nuevamente secadas. El residuo se disolvió en agua (0.5 ml) y se filtró a través de una membrana con tamaño poro 0.45 µm antes de ser inyectadas (20 µl) en una cromatografía líquida DIONEX DX 600 de alto resolución (HPLC, Dionex Corp., Nueva York, EE.UU.), equipado con un detector electroquímico ED50 y una columna CarboPac



PA1 (4 x 250 mm; Dionex Corp.). La fase móvil fue agua de grado HPLC con una velocidad de flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> y 300 mM de NaOH post columna a 0.6 mlmin<sup>-1</sup>. Las reacciones enzimáticas de la β-glucanasa se detuvieron por calentamiento durante dos minutos en un baño de agua hirviendo, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente (Dubois et al., 1956). Los monosacáridos en las muestras analíticas de las microalgas fueron identificados y cuantificados usando compuestos estándar (Espino-Díaz et al., 2010), utilizando spiking para corroborar la identificación del carbohidrato encontrado. Se usaron estándares al 99 % de arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa y manosa (Sigma-Aldrich). Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como partes por millo (ppm).

## 2.2.4 Resultados

### Producción de biomasa liofilizada y composición orgánica

Se generaron 27.64 g de biomasa liofilizada de *Nannochloropsis* sp., y de la biomasa de pasta se obtuvieron 24.26 g los cuales se utilizaron para realizar los análisis descritos (Figura 6). Respecto a la composición orgánica de las células *Nannochloropsis* sp., las células presentaron un peso seco 5.02 pg cel<sup>-1</sup>, de los cuales 0.44 pg cel<sup>-1</sup> fueron carbohidratos, que representan el 17% del peso total orgánico celular, ver tabla 3. De acuerdo con el proveedor de la pasta microalgal, ésta presenta 20 % del peso orgánico en forma de carbohidratos.

Tabla 3.- Composición orgánica de *Nannochloropsis* sp.

	pg cel <sup>-1</sup>	d. e.
Peso seco	5.02	0.13
Lípidos	1.05	0.07
Proteínas	0.81	0.05
Carbohidratos	0.44	0.02
Cenizas	0.29	0.13

d.e. = desviación estandar

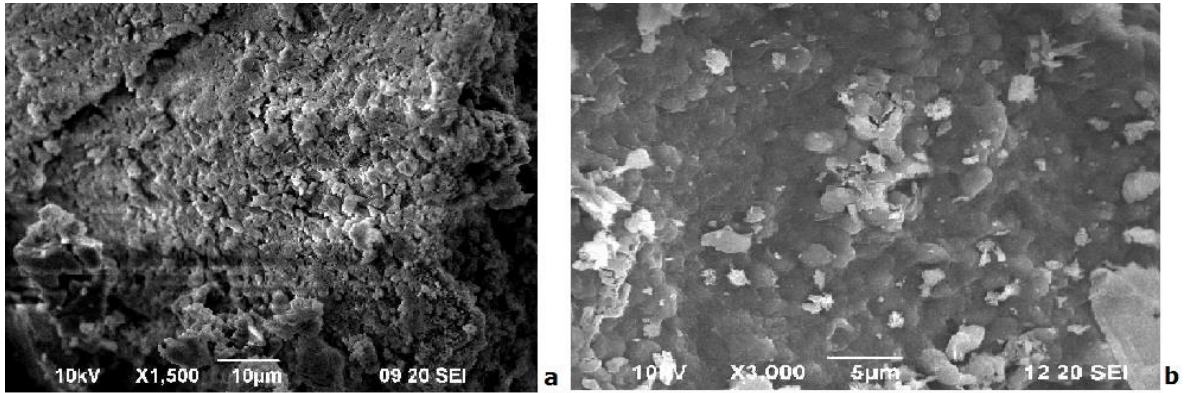


Figura 6. Imágenes de biomasa liofilizada de *Nannochloropsis* sp. (a) y pasta comercial (b) por microscopía electrónica de barrido (MEB).

### Análisis cualitativo de carbohidratos

Los resultados muestran que las concentraciones en las muestras son casi indetectables, tal como se pueden observar en las Figuras 7, 8 y 9.

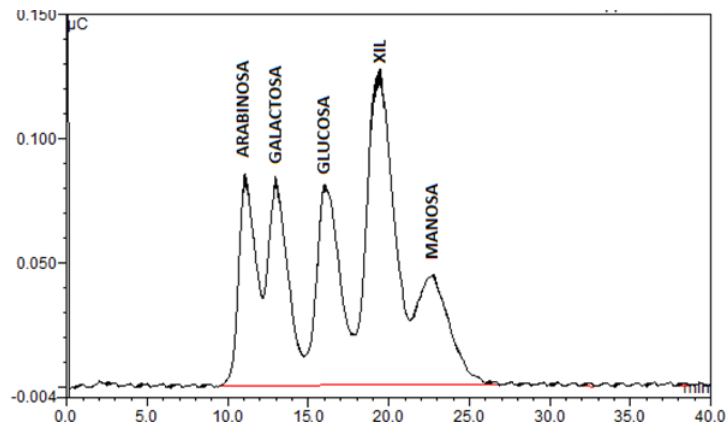


Figura 7.- Cromatograma con cinco estándares de carbohidratos (99 %, Sigma-Aldrich).

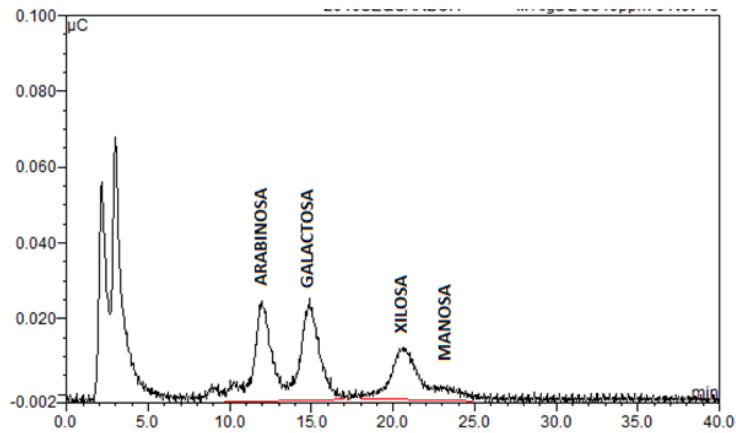


Figura8.- Cromatograma de carbohidratos presentes en una muestra representativa de *Nannochloropsis* sp. en 3340 ppm

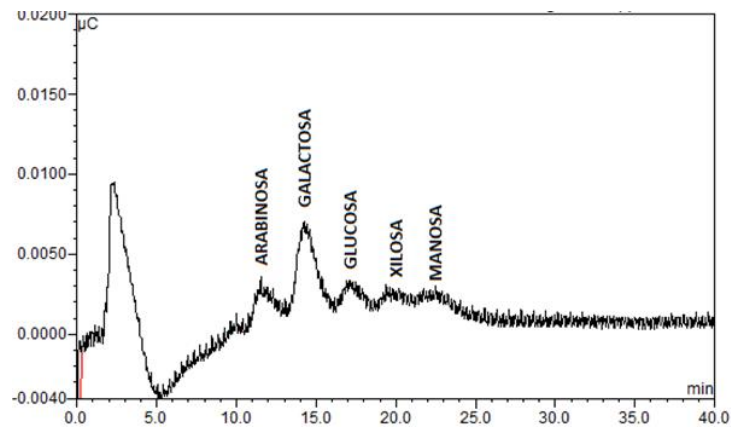


Figura 9.- Cromatograma de carbohidratos de pasta microalgal (*N. oculata*) en 9485 ppm

### **Análisis cuantitativo de carbohidratos**

Para cuantificar los carbohidratos totales de las muestras se realizaron curvas de calibración de cada carbohidrato con  $r^2$  de Arabinosa= 1, Galactosa= 0.9982, Glucosa= 0.9994, Xilosa= 0.9960 y Manosa= 0.9974. En las tablas 4 y 5 se pueden observar los resultados finales del análisis cuantitativo de carbohidratos.

Los resultados pudieron verse afectados por las características propias de la muestra, ya que la columna se saturaba constantemente, provocando se incrementara la presión y dificultaba en exceso la fluidez del trabajo

Tabla 4.- Concentración de monosacáridos por cada 100 mg de peso seco en biomasa de *Nannochloropsis* sp.

Carbohidrato	Promedio mg	Varianza $\sigma^2$	Desv. Std $\sigma$	coef. Var $\frac{\sigma}{\bar{x}}$
Arabinosa	0.009	0.013053	0.11425	0.131814
Galactosa	0.016	0.003417	0.058455	0.038115
Glucosa	0.0047	0.018985	0.137788	0.309035
Xilosa	0.0008	0.000163	0.012784	0.164683
Manosa	0.0027	0.011542	0.107436	0.421954

Tabla 5.- Concentración de monosacáridos por cada 100 mg de peso seco en biomasa de pasta microalgal.

Carbohidrato	Promedio mg	Varianza $\sigma^2$	Desv. Std $\sigma$	coef. Var $\frac{\sigma}{\bar{x}}$
Arabinosa	0.209	0.039750	0.199375	0.028530
Galactosa	0.2070	0.018804	0.137128	0.019746
Glucosa	-	-	-	-
Xilosa	0.049	0.069707	0.264021	0.158477
Manosa	0.025	0.019564	0.139872	0.164183

### 2.2.5 Conclusiones

Los carbohidratos de *Nannochloropsis* sp. representaron hasta el 17 % de su composición orgánica, lo que confirma la primera parte de la hipótesis plantada. Sin embargo las bajas concentraciones de monosacáridos registradas, en especial los valores de glucosa permitieron inferir que la metodología de extracción no fue eficiente y que es necesario realizar modificaciones a este proceso. Posiblemente en el paso de lisis celular se requiera la mayor atención. Es necesario realizar modificaciones y repetir la extracción de los carbohidratos para obtener un mejor análisis cuantitativo y cualitativo de los carbohidratos.

### 2.2.6 Bibliografía

- Bligh E G., Dyer W.M., 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Rev.Biochem. Physiol.*, 37: 911-917
- Bobadilla, F., Rodriguez-Tirado, C., Imarai, M., Galotto, M.J., Andersson, R., 2013. Soluble  $\beta$ -1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. *Carbohydr. Polym.* 92, 241–248. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.071
- Dalonso, N., Goldman, G.H., Gern, R.M.M., 2015.  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7893–7906. doi:10.1007/s00253-015-6849-x
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy* 88, 3331–3335. doi:10.1016/j.apenergy.2011.03.012
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28: 350-356
- Espino-Díaz, M., Ornelas-Paz, J., Martínez-Télez, M., Santillán, C., V Barbosa-Cánovas, G., Zamudio-Flores, P., Olivas, G., 2010. Development and Characterization of Edible Films Based on Mucilage of *Opuntia ficus-indica* (L.), *Journal of food science*. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01661.x
- Granum, E., Myklestad, S.M., 2002. A simple combined method for determination of. *Sci. Technol.* 155–161
- Geider, R., Roche, J. La, Geider, R.J., 2002. European Journal of Phycology Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis Redfield revisited : variability of C : N : P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol. Eur. J. Phycol. Br. Phycol. Soc.* 371, 1–17. doi:10.1017/S0967026201003456
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonul confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(1140), 229–239. doi:10.1139/m62-029
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin

phenol reagent. *Rev. Biol. Chem.*, 193: 265-275

- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 631–645. doi:10.1007/s00253-012-4398-0
- Masojidek, J., Koblížek, M., Torzillo, G., 2004. Photosynthesis in microalgae, in: Publishing, B., Ltd (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, pp. 20–39
- Sekharam, K.M., Venkataraman, L. V., Salimath, P. V., 1989. Structural studies of a glucan isolated from blue-green alga *Spirulina platensis*. *Food Chem.* 31, 85–91. doi:10.1016/0308-8146(89)90019-8
- Nieves, M., Voltolina, D., & Barrera, A. (1998). A new parameter for comparison of microalgae growth. *Revista Italiana di Acquacoltura*, 33, 177–184
- Sadovskayaa, I., Souissi, A., Souissi, S., Grarda, T., Lencel, P., Greenec, C., Duinc, S., Dmitrenok, P. S., Chizhove, O., Shashkove, A. y Usov, A. (2014). Chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)-D-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers*, 111:139-148

## **2.3 Caracterización parcial de la molécula de $\beta$ -glucanos aislados de *Nannochloropsis* sp. y otras microalgas**

### **2.3.1 Introducción**

Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos, constituidos por un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa. Poseen una estructura química que contiene un esqueleto conformado por unidades repetidas (ramas) de  $\beta$ -D-glucopiranosil unidas por enlaces glicosídicos de tipo  $\beta$ -(1,3) y/o  $\beta$ -(1,6) enlazados a cadenas de tamaño, distribución y longitud variable. Esta forma es el principal constituyente de la pared celular de algunas plantas, hongos, bacterias, levaduras y algas marinas (Brown et al., 2003). Poseen diferentes pesos moleculares y grados de ramificaciones. En las microalgas los  $\beta$ -glucanos se pueden encontrar tanto en la pared celular como en las vacuolas citoplasmáticas (Granum y Myklestad, 2001). Actualmente se cuenta con conocimientos importantes sobre la presencia de  $\beta$ -glucanos en especies de microalgas diatomeas, por ejemplo: *Chaetoceros debilis* de la cual se ha descrito posee una estructura  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos con peso molecular de 4.9 kDa y un valor de polimerización de 30 (Størseth et al., 2006). En *Chaetoceros mulleri* se ha encontrado y caracterizado la molécula como estructura de configuración  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos con grado de polimerización de 19 y ramificación de 0.005 (Størseth et al., 2004). Størseth et al. (2006) reportaron un contenido de 15.8 pg cel<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glucanos de la microalga *C. debilis* cosechada en la fase estacionaria del cultivo. También en *Isochrysis galvana* se reportó el aislamiento y caracterización de  $\beta$ -glucanos con estructura  $\beta$ -1,3/1,6 (Sadovskaya et al., 2014). A pesar de estos antecedentes, aún se desconoce la caracterización de las moléculas de  $\beta$ -glucanos de muchas especies de importancia acuícola, como lo son las especies del género *Nannochloropsis*; que podrían tener importantes aplicaciones en estrategias inmunológicas futuras.

### **Comparación de diferentes fuentes de $\beta$ -glucanos**

Los  $\beta$ -glucanos tienen diferentes estructuras dependiendo de su origen y el proceso de extracción (Bohn y BeMiller, 1995; Kollar et al., 1997). El peso molecular y la solubilidad en agua de los  $\beta$ -glucanos dependen del grado de ramificación y de su estructura química,

propiedades críticas que les confieren su uso como modificaciones de la respuesta biológica (Williams et al., 1991; Suzuki et al., 1990). El peso molecular más eficaz de los  $\beta$ -glucanos clínicamente útil varía entre 100 y 200 kDa, con un grado de ramificación comprendido entre 0.2 y 0.5 (Bohn y BeMiller, 1995). Sin embargo, los  $\beta$ -glucanos con efectos inmunoestimulantes que se han reportado en acuicultura son principalmente aislados de levadura, hongos o algas, y tienen pesos moleculares que van desde 5 kDa (alga marina, *Laminaria digitata*) a 200 kDa (Levadura, *Saccharomyces cerevisiae*) (Dalmo et al 1997.; Bagni et al., 2005). Otros autores (McConville et al., 1986) mencionan que los  $\beta$ -glucanos extraídos de diatomeas, tienen pesos moleculares de 1 a 10 kDa con diferentes grados de ramificación en posiciones  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 2) y  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6).

Las características moleculares de los  $\beta$  (1,3)-D glucanos extraídos de microalgas no corresponden con las intervalos de las características de  $\beta$ -glucanos clínicamente validadas o de uso como inmunoestimulantes en acuicultura. Sin embargo, trabajos recientes han propuesto a los  $\beta$ -glucanos extraídos de microalgas como potenciales inmunoestimuladores de larvas de peces marinos (Skjermo et al., 2006), aún cuando su peso molecular, grados de polimerización y ramificación son bajos; pero cuenta con rasgos similares a los ya validados; además de que pueden ser extraídos mediante técnicas menos complicadas y costosas (Størseth et al., 2005). Sin embargo, se ha reportado que los  $\beta$ -glucanos de bajo peso molecular tienen menos efectos celulares, mientras que los  $\beta$ -glucanos muy cortos son considerados como inactivos (Akramiene et al. 2007), por lo que se considera importante realizar investigaciones que brinden evidencias claras del verdadero efecto y potencial de los  $\beta$ -glucanos microalgales.

### **2.3.2 Objetivos**

#### **Objetivo general**

Caracterizar parcialmente la molécula de  $\beta$ -glucanos aislados de *Nannochloropsis* sp.



### **Objetivos particulares**

- I. Procesar los extractos crudos de carbohidratos de *Nannochloropsis* sp. para el análisis de resonancia magnética nuclear.
- II. Caracterizar la molécula de  $\beta$ -glucanos de la microalga *Nannochloropsis* sp. por medio de análisis de espectros de infrarrojo y determinación de espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ ).

### **2.3.3 Materiales y métodos**

#### **Extracción, purificación y tratamiento previo**

La extracción y purificación de los carbohidratos de *Nannochloropsis* sp. se realizaron con un protocolo con modificaciones mínimas a Bobadilla et al. (2013) y Sadovskaya et al. (2014), que se describe en la sección 2.2.3. Los extractos fueron procesados de acuerdo a la metodología descrita por Kim et al. (2000) para el análisis de  $\beta$ -glucano extraídos de microalgas.

#### **Estimación de pureza de $\beta$ -glucanos aislados**

Cada extracto se sometió al análisis de azúcares totales por fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956). Posteriormente, a una solución de los extractos se les realizó una prueba de UV (Espectrofotometro, Multiskan G0. Thermo Scientific) para obtener absorbancia a 260 (detección de ácidos nucleicos) y 280 nm (detección de proteínas) para descartar la presencia de otras moléculas, que no fueran carbohidratos.

#### **Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón**

Para la caracterización parcial de la estructura de la molécula de  $\beta$ -glucano se aplicó la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón ( $^1\text{H}$ ). Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en un Espectrómetro JEOL modelo GSX-270 para  $^1\text{H}$  a 270 MHz. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Para indicar multiplicidad de las señales en  $^1\text{H}$  se utilizaron las siguientes

abreviaturas: (s) simple, doble (d), triple (t), múltiple (m), los valores de los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se presentan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se describirán en Hertz (Hz).

### 2.3.3 Resultados

#### Análisis de espectros de infrarrojo y RMN de $^1\text{H}$

Respecto al análisis en infrarrojo se detectan cuatro señales importantes: grupos hidroxilos (O-H,  $3351\text{ cm}^{-1}$ ), grupos carbonilos (C=O,  $1624\text{ cm}^{-1}$  y C-O,  $1300\text{ cm}^{-1}$ ) y enlace carbono-carbono (C-C,  $1140\text{ cm}^{-1}$ ); como se puede observar en la Figura 10.

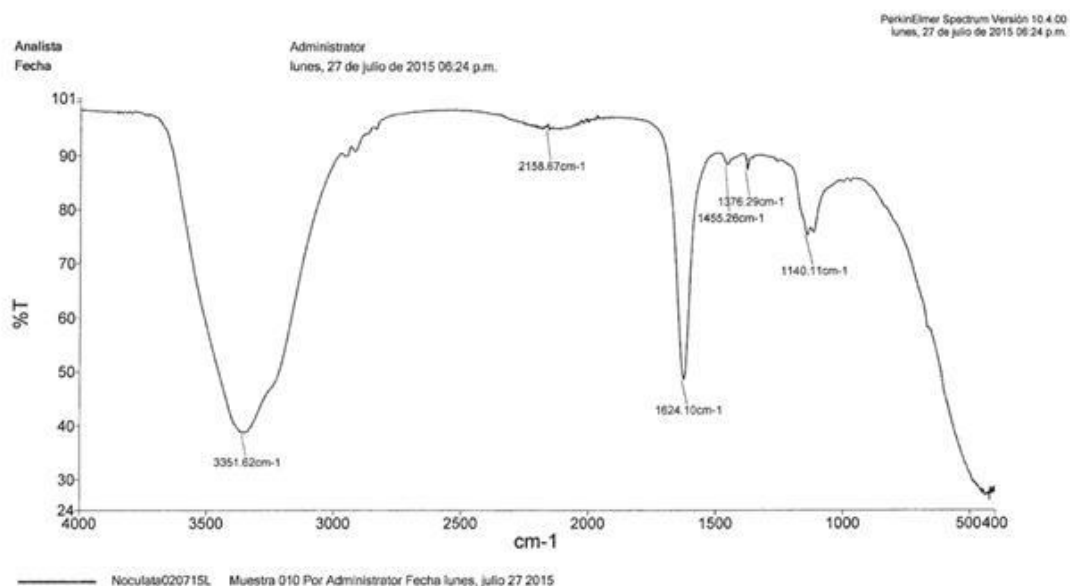


Figura 10. Espectro de infrarrojo del extracto de carbohidratos desde *Nannochloropsis* sp.

Con respecto al análisis de RMN de  $^1\text{H}$ , se encontró un cambio de valor entre los 4.5 y 5 ppm, dando tres señales repetidas al lado derecho de la señal del agua deuterada. Esto nos indica protones juntos y en posición de ramificaciones (Figura 11).

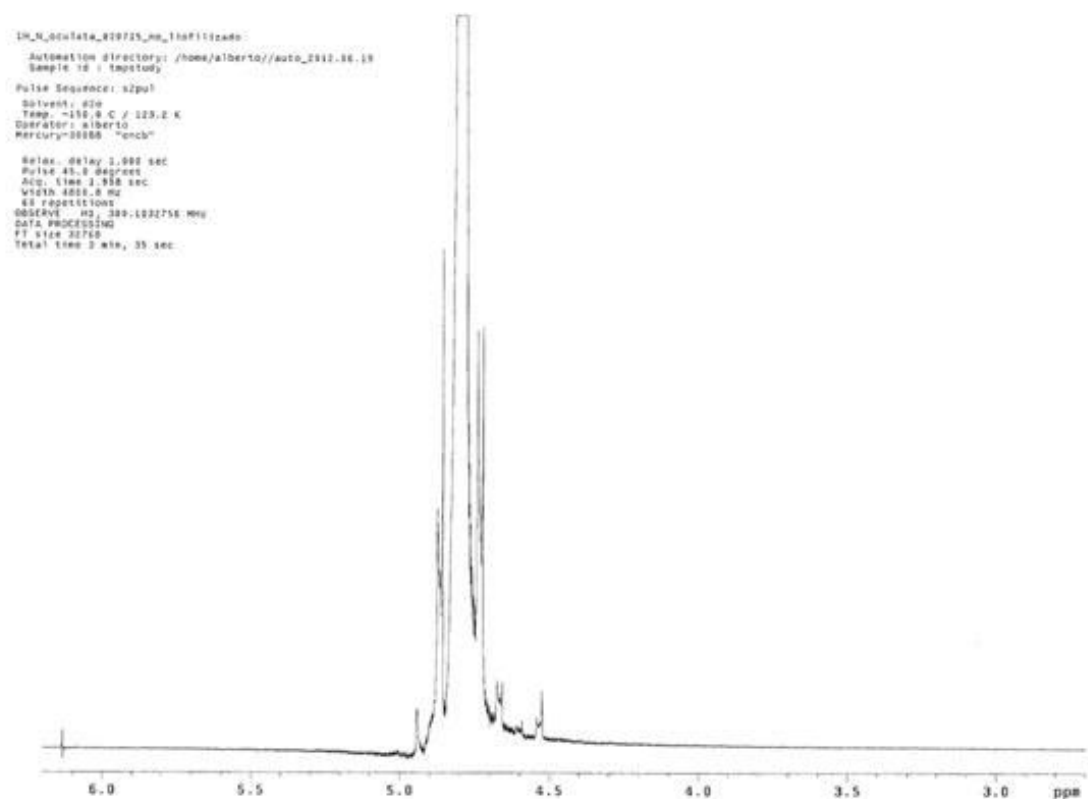


Figura 11. Espectro de protón del extracto de carbohidratos desde *Nannochloropsis* sp.

### 2.3.4 Conclusiones

El espectro de infrarrojo indica que el extracto posee gran cantidad de grupos funcionales que pertenecen a compuestos orgánicos tipo glucosa.

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón para el extracto de carbohidratos muestra un cambio de entre los 4.5 y 5 ppm. Esto indica protones juntos y en posición de ramificaciones indicios de polisacáridos tipo  $\beta$ -glucanos.

### 2.3.5 Referencias

- Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. 2007. Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system. *Medicina*, 43: 597-606.
- Bagni M, Romano N, Finioia MG, Abelli L, Scapigliati G, Tiscar PG, Sarti M, Marino G. 2005. Short- and long term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic

- acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish Immunology*, 18 (4): 311–325.
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. 2006. *Algae. Anatomy, biochemistry and biotechnology*. CTC, Taylor & Francis, Boca Ratón, Florida. 301 pp.
- Bobadilla, F., Rodriguez-Tirado, C., Imarai, M., Galotto, M.J., Andersson, R., 2013. Soluble  $\beta$ -1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. *Carbohydr. Polym.* 92, 241–248. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.071
- Bohn JA y BeMiller JN. 1995. (1-3)-Beta-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*. 28:3-14.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ & Gordon S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of  $\beta$ -glucans. *J Exp Med* 197:1119–1124.
- Dalmo R, Ingebrigtsen K & Bogwald J. 1997. Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular reference to reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis*.20:241-273.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28: 350-356
- Granum E & Myklestad SM. 2001. Mobilization of  $\beta$ -1,3-glucan and biosynthesis of amino acids induced by  $\text{NH}_4^+$  addition to N-limited cells of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 37:772-82.
- Kim, Y.-T.; Kim, E.-H.; Cheong, C.; Williams, D. L.; Kim, C.-W.; Lim, S.-T. *Carbohydr. Res.* 2000, 328, 331–341.
- Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, Kaptein JC, Klis FM y Cabib E.1997. Architecture of the yeast cell wall  $\beta$ -(1-6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ -(1-3) glucan and chitin, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272 (No. 28): 17762-17775.
- McConville, M.J., Bacic, A., Clarke, A.E., 1986. Structural studies of chrysolaminaran from the ice diatom *Stauroneis amphioxys* (Gregory). *Carbohydr. Res.* 153, 330–333. doi:10.1016/S0008-6215(00)90276-3

- Størseth, T. R., Hansen K., Skjermoa J. & Kraneb J. 2004. Characterization of a beta-D-(1->3)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros mulleri* by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. *Carbohydrate Research* 339(2): 421-424.
- Størseth T.R., Kirkvold S., Skjermo J., Reitan K.I. 2006. A branched b-D-(1-3,1-6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydr Res* 341: 2108–14.
- Sadovskayaa, I., Souissi, A., Souissi, S., Grarda, T., Lencel, P., Greenec, C., Duinc, S., Dmitrenok, P. S., Chizhove, O., Shashkove, A. y Usov, A. 2014. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)-D-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers*, 111:139-148.
- Suzuki T, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M y Yadomae T. 1990. Effect of orally administered beta-glucan in macrophage function in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 12:675-684.
- Williams DL, Mcnamee RB, Jones EL, Pretus HA, Ensley HE, Browder IW y DiLuzio NR 1991. A method for the solubilization of a (1→3)-β-D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Res* 219:203-213.

## 2.4 Potencial de *Nannochloropsis* en la producción de $\beta$ -glucanos

### 2.4.1 Introducción

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, altamente diversos que desarrollan una importante función como productores primarios en las cadenas tróficas acuáticas. Se caracterizan por su gran potencial como fuentes naturales de componentes que son aprovechados por biotecnologías y aplicaciones terapéuticas (Borowitzka, 2013; Enzing et al., 2014; Vigani et al., 2015). Estos organismos convierten sustancias inorgánicas en materia orgánica rica en lípidos, proteínas, carbohidratos y otras moléculas.

Un grupo importante de microalgas son las especies del género *Nannochloropsis*, que pertenecen a la clase Eustigmatophyceae, división Ochrophyta, orden Eustigamatales; en la actualidad están registradas 12 especies y subespecies, de los cuales 5 son aceptadas taxonómicamente: *Nannochloropsis australis*, *Nannochloropsis granulata*, *Nannochloropsis limnetica*, *Nannochloropsis oceanica* y *Nannochloropsis oculata*. Son eucariotas unicelulares de libre flotación del picoplancton marino y de agua dulce. Sus células son esféricas o ligeramente ovaladas (2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro) y también de forma cilíndricas (3-4 x 1.5  $\mu\text{m}$ ); con cloroplasto de color verde-amarillo (Guiry y Guiry, 2017). La clorofila a es la única clorofila que poseen las especies de *Nannochloropsis*, y su principal pigmento accesorio es violaxantina (Van den Hoek et al., 1995).

Las principales cualidades de *Nannochloropsis* son su crecimiento aceptable en amplios intervalos de salinidad (Khatoon et al., 2014) y que presentan significativo valor nutricional debido a su alto contenido de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido eicosapentaenoico (Brown et al., 1997; Tonon et al., 2002), por lo que son extensamente aprovechadas por la industria (Borowitzka, 2013; Yaakob et al., 2014). Por ejemplo, en acuicultura han sido ampliamente usadas como alimento de moluscos, zooplancton y para etapas tempranas de vida de crustáceos y peces (Hemaiswarya et al., 2011).

Sin embargo, aunque el aprovechamiento nutricional de los carbohidratos de la biomasa microalgal de *Nannochloropsis* (y aplica a microalgas en general) no han sido tan esencial, si se han considerado como el sustrato preferido para producciones significativas de biocombustibles (tales como bioetanol, biobutanol, biohidrógeno, etc.) mediante tecnologías de conversión biotecnológica (Markou et al., 2012a). Pero el mayor potencial de los

carbohidratos microalgales radica en su aplicación como inmunoestimulantes (Skjermo et al., 2006; Yaakob et al., 2014), ya que se presentan en su mayoría como  $\beta$ -1,3 glucanos que se pueden encontrar tanto en la pared celular (Granum y Myklestad, 2002) como en las vacuolas citoplasmáticas (Chiovitti et al., 2004). Se considera que beta glucanos ( $\beta$ -glucanos) similares actúan como reservas en varias clases de microalgas; por ejemplo en Eustigmatophyceae a la cual pertenece *Nannochloropsis* (Granum y Myklestad, 2002).

Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos constituidos por un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa que poseen diferentes pesos moleculares y grados de ramificaciones (Dalmo y Bøggwald, 2008). El nombre de los  $\beta$ -glucanos proviene de su estructura, el uso del sufijo “an” describe a una estructura molecular que consiste de un solo carbohidrato (Glucosa); mientras que el prefijo “Gluc” significa poliglucosa. Así, una poli-glucosa (poli-glucopiranososa) se denomina "glucano". Por otra parte, los  $\beta$ -1,3-D glucanos, es el término más común para los homopolisacáridos que tienen enlaces  $\beta$ -1,3-D en su cadena principal, pero también pueden poseer enlaces  $\beta$ -D glucosídicas en posición 6 y 4 (Dalmo y Bøggwald, 2008; Lazaridou y Biliaderis, 2007). Estos polisacáridos también se pueden encontrar en gran variedad de plantas, hongos, levaduras y algas (Synytsya y Novak, 2014).

Tal capacidad como inmunoestimulantes se debe a que las estructuras moleculares de los  $\beta$ -glucanos son característicos de comunidades microbianas, por lo que son llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) (Dalmo y Bøggwald, 2008; Meena et al., 2012). Éstos juegan un papel como moléculas de alarma que activan el sistema inmune, debido a que son identificados por receptores específicos que reconocen patrones (PRRs), tales como Dectin-1, TLR2, C3 y scavengers; presentes en macrófagos, neutrófilos y células asesinas (Chan et al., 2009). Los  $\beta$ -glucanos pueden iniciar la respuesta inflamatoria a través de la unión a sus receptores, que activan vías de señalización que culminan en la transducción de señales intracelulares y factores de transcripción (Cunha et al., 2012). Este fenómeno es decisivo para la transcripción de genes, síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias, así como para la activación de diferentes respuestas inmunológicas asociadas a la presencia de patógenos (Dalmo y Bøggwald, 2008).

## **Metabolismo de carbohidratos en microalgas**

La producción de carbohidratos tiene dos propósitos principales para las microalgas, actúan como componentes estructurales en las paredes celulares y como componentes de almacenamiento dentro de la célula. Los carbohidratos, como compuestos de almacenamiento, proporcionan energía necesaria para los procesos metabólicos y permiten, si es requerido, la supervivencia temporal en condiciones adversas (Geider et al., 2002).

Las microalgas capturan la energía solar y la convierten en energía química a través de una serie de reacciones complejas llamadas fotosíntesis (Torzillo y Vonshak, 2003). Hay dos tipos principales de reacciones fotosintéticas, las claras y las oscuras. En las reacciones claras, la energía solar es absorbida por los pigmentos de las antenas fotosintéticas y se utiliza para dividir el agua en protones, electrones y oxígeno (Markou et al., 2012a). Los electrones y protones se utilizan para generar portadores de energía (NADPH y ATP), que soportan las necesidades metabólicas del organismo. En las reacciones oscuras, el dióxido de carbono se reduce a carbohidratos vía Ciclo de Calvin en el interior del cloroplasto, utilizando la energía derivada de NADPH y ATP (Masojidek et al., 2004). En el Ciclo de Calvin, el primer paso es la asimilación de dióxido de carbono, que es catalizada por ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). El dióxido de carbono se utiliza para la carboxilación de un compuesto de cinco carbonos (ribulosa-1,5-bisfosfato) en dos compuestos de tres carbonos (3-fosfoglicerato), uno de los cuales se utiliza como sustrato para la formación de carbohidratos, mientras que el otro se utiliza para lograr el siguiente ciclo (Markou et al., 2012a).

Los perfiles de carbohidratos de las microalgas pueden variar en gran medida, pero sus principales monosacáridos son glucosa, galactosa, manosa y ribosa, con otros en proporciones variables (Whyte, 1987). Aunque en *Nannochloropsis* se ha encontrado que su perfil de monosacáridos son predominantes glucosa y manosa; además de galactosa ramosa, ribosa y fucosa en menor proporción (Templeton et al., 2012). Brown et al., (1997) reportaron que los polisacáridos de *N. oculata* representaron ~88 de los carbohidrato total; de los cuales el 68.2 % es glucosa y alrededor de 4 a 8 % de ramosa, manosa, ribosa, xilosa, fucosa y galactosa. Recientemente, Jia et al., (2015) demostraron la presencia de ocho monosacáridos



en *N. oceanica*: glucosa, galactosa, manitol, fucosa, ramnosa, manosa, ribosa y glucosamina; siendo los tres primeros los componentes principales.

Como se mencionó anteriormente los polisacáridos de microalgas son de tipo 1,3- $\beta$ -glucanos; pero lo más importantes son crisolaminarina (ramificado,  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos) y paramilón (lineal,  $\beta$ -1,3 glucanos) (Lee, 2008).

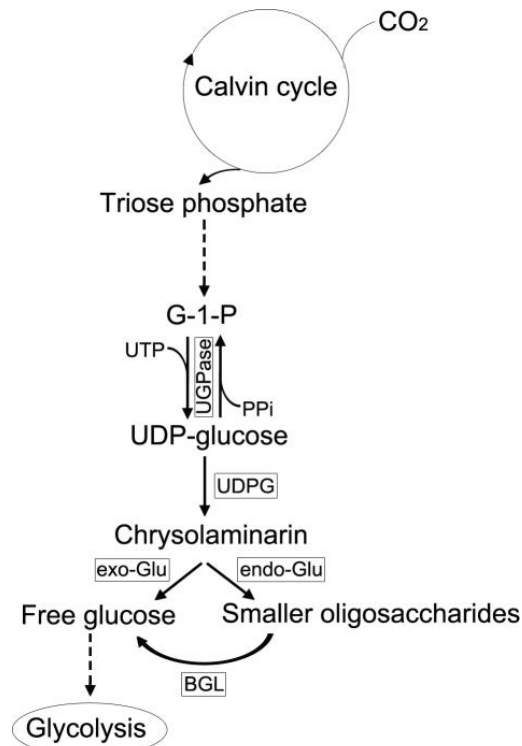


Figura 12. La ruta de biosíntesis y degradación de crisolaminarina reconstruida sobre la base del ensamblaje de *novo* y anotación transcriptómica de *E. cf. Polipem*. Las enzimas identificadas se muestran en cajas e incluyen: UGPasa, UDP glucosa pirofosforilasa; UDPG, crisolaminarina sintasa; Exo-Glu, exo 1,3- $\beta$ -glucanasa; Endo Glu, endo-1,3- $\beta$ -glucanasa y BGL,  $\beta$ -glucosidasas. G-1-P, glucosa-1-fosfato; PPi, pirofosfato (Tomado de Wan et al., 2012).

Al igual que el proceso de polimerización de cualquier biopolímero, la generación de polisacáridos implica tres etapas: iniciación, elongación y terminación de la cadena. En el caso de diatomeas marinas (*Skeletonema costatum*), los carbohidratos producidos por el Ciclo de Calvin se convierten rápidamente en glucosa-1-fosfato y son polimerizados en

glucano por la UDP-glucosa pirofosforilasa y glicosiltransferasa (Stoddart, 1984). Cabe mencionar que las especies de *Nannochloropsis* no sintetizan almidón (Van den Hoek et al., 1995). Por la otra parte, la actividad de la exo-1,3- $\beta$ -glucanasa (exo-Glu) se detectó en varias diatomeas y la sobrerregulación de esta actividad coincidió con la degradación de  $\beta$ -glucanos en *S. costatum* (Vårum et al., 1986). Por lo que se ha propuesto que exo-Glu y endo-1,3- $\beta$ -glucanasa (endo-Glu), y  $\beta$ -glucosidasa (BGL) son las principales enzimas involucradas en la degradación de  $\beta$ -glucanos, como se muestra en la Figura 12 con *Eustigamotos* cf. *Polyphem*; microalga unicelular de suelo (Wan et al., 2012).

### **Factores y estrategias para mejorar la producción de $\beta$ -glucanos en *Nannochloropsis***

Se conoce que el medio de cultivo y las condiciones ambientales afectan significativamente la composición de la biomasa microalgal (Richmond y Hu, 2013). Por lo que el control de algunas de las condiciones de cultivo o ambientales parece ser un vía factible para la manipulación de la composición de la biomasa microalgal, con el fin de incrementar o maximizar la acumulación de carbohidratos (Dragone et al., 2011). Los factores más frecuentemente reportados, que influyen el contenido de carbohidratos en biomasa microalgal son la inanición ó limitación de nutrientes, estrés salino, intensidad de luz, temperatura y los tipos de metabolismos (Markou et al., 2012a). A continuación se describen los efectos de estos factores y las estrategias reportadas:

#### **Tipo de metabolismo**

Con relación al tipo de metabolismo, existen cuatro formas principales de cultivar microalgas, nombradas cultivos fotoautotróficos, heterotróficos y mixotróficos (Wang et al., 2014). Por lo general, las microalgas (Ej. *Nannochloropsis*) se cultivan mediante la fijación de carbono inorgánico disuelto y absorción de energía luminosa. Al igual que muchas plantas superiores, las microalgas realizan fotosíntesis y por lo tanto son fotoautotrófas. Pero a la vez, algunas especies de microalgas también son heterotróficas, por su capacidad de utilizar componentes orgánicos como fuentes de carbono y energía para su crecimiento; con la diferencia que éstas no necesitan luz como fuente de energía (Chen, 1996). Por otra parte, los cultivos mixotróficos consisten en el crecimiento microalgal usando simultáneamente

fuentes de carbono inorgánico y orgánico en presencia de luz (Kang et al., 2004) es decir, el metabolismo fotoautotrófico y heterotrófico ocurren simultáneamente.

Perez-Garcia y Bashan (2015) señalan que suplementar fuentes de carbono orgánico al cultivo de microalgas provoca un incremento en la producción de biomasa y contenido de lípidos/carbohidratos en las células. En general, las moléculas de almacenamiento de energía, tales como lípidos y carbohidratos (almidón y glucógeno) se acumulan en condiciones heterotróficas y mixotróficas; por lo tanto, el contenido en biomasa de estos compuestos es mayor que en condiciones fotoautotróficas (Choix et al., 2014). Sin embargo, los estudios sobre el efecto de la mixotrofía o heterotrofía en el contenido de carbohidratos de reserva específicos en microalgas, por ejemplo  $\beta$ -glucanos, son limitados.

A pesar de ello, el potencial de esta estrategia radica en que *Nannochloropsis* es capaz de crecer de manera mixotrófica en presencia de fuentes de carbono orgánicas como glucosa y glicerol (Hu y Gaol, 2003; Wan et al., 2011; Xu et al., 2004). Algunas de estas fuentes de carbono orgánicas son subproductos industriales, como es el caso del glicerol, que llega a representar el 10 % de los productos generados en la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales dentro de la producción de biocombustibles (da Silva et al., 2009); y también el ensilado de pescado ya que *N. oculata* alcanza altas concentraciones celulares en cultivo mixotrófico con este subproducto de pequerías, descrito por los autores como rico en ácido láctico como fuente de carbono orgánico (Sánchez-Torres et al., 2008). Incluso, el cultivo mixotrófico de *Nannochloropsis* con glicerol alcanzó mayor densidad de biomasa y producción de lípidos que los cultivos fotoautotróficos (Das et al., 2011).

### **Temperatura**

Respecto a temperatura, Renaud et al., (2002) no observaron diferencias significativas en la composición bioquímica de microalgas tropicales bajo estrés por variaciones de temperatura. Sin embargo, otras investigaciones señalan que el efecto de la temperatura es potencialmente capaz de cambiar la composición bioquímica de las microalgas; por ejemplo, en cultivos de *Spirulina* sp. un aumento en la temperatura de 25 a 40 °C resultó en un incremento de carbohidratos de 14 a 21 % (Ogbonda et al., 2007) y se considera que esta respuesta es generada por marcadas disminuciones en el contenido de proteínas, mientras la síntesis de

carbohidratos muestra ser estimulada (De Oliveira et al., 1999). Mientras que en la diatomea *Chaetoceros* cf. *wighamii* los carbohidratos fueron mayores cuando se expusieron a las menores temperaturas probadas (Araújo y Garcia, 2005). Por lo tanto, el efecto de la temperatura sobre la acumulación de carbohidratos en las microalgas parece ser altamente dependiente de las cepas de microalgas utilizadas (Chen et al., 2013), pero se desconoce si existen estudios de este tipo con *Nannochloropsis*.

### **Estrés osmótico**

Las variaciones en la salinidad también influyen en el crecimiento y la composición proximal de las microalgas marinas, éstas responden al estrés osmótico acumulando carbohidratos de bajo peso molecular, los cuales actúan como agentes osmóticos; por lo tanto el incremento en el contenido de carbohidratos es un mecanismo de protección contra daño salino (Reed et al., 1984; Warr et al., 1985).

Así, la disminución de la salinidad es propuesta como una forma única para cambiar la composición bioquímica de las microalgas marinas (Yao et al., 2013), pero el papel de la salinidad en el metabolismo de carbohidratos es variable y dependiente de la naturaleza específica de la especie y de las condición de cultivo. De acuerdo con Rao et al. (2007), la adaptabilidad a la salinidad difiere entre las microalgas y se agrupan como halófilas (requieren salinidad específicas para un crecimiento óptimo) y halotolerantes (con mecanismo de respuesta para sobrevivir en medio salino).

Yao et al., (2013) reportaron que *Tetraselmis subcordiformis* en limitación de nitrógeno y disminución de la salinidad (20% de salinidad normal); fortaleció la biomasa y acumulación de carbohidratos, independientemente de la irradiancia. El contenido de carbohidratos más alto fue de 58.2 % de peso seco. Los autores argumentan que la disminución de la salinidad combinada con limitación de nitrógeno generan estrés moderado para facilitar la acumulación de carbohidratos. Por lo que proponen que la manipulación de la salinidad puede aplicarse eficazmente para una producción mejorada de carbohidratos en microalgas marinas.

### **Illuminación, tipo e intensidad**

La alta intensidad de luz tiende a incrementar la producción de polisacáridos en microalgas (Hu, 2013). En diatomeas, los  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos son sintetizados durante el día y degradados durante la noche (Granum et al., 2002; Vårum et al., 1986). Por otra parte, Tredici et al., (1991) demostraron que el contenido de carbohidratos en *Spiulina platensis* cultivada en interperie, fue significativamente más alto en días soleados que en días nublados. Friedman et al., (1991) reportaron un incremento de 0.6 a 3 veces de polisacáridos obtenidos en cultivos de *Porphyridium* sp. y *Porphyridium aerugineum*, respectivamente, cuando la intensidad de luz incrementó de 75 a 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Resultados similares se obtuvieron con *Odontella aurita*, donde una intensidad lumínica de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  otorga un contenido en crisolaminarina de casi el doble en porcentaje de biomasa seca de este polisacárido en comparación a una intensidad lumínica de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Xia et al. 2014).

Contrariamente, el tipo de espectro de iluminación (longitud de onda azul y/o roja) disminuyó el contenido de carbohidratos en *Isochrysis* y *Chaetoceros* (Marchetti et al., 2013; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2006). Sin embargo, la exposición de *Nannochloropsis* a una fuente de luz azul monocromática resultó en una mayor productividad de biomasa que la exposición a la luz verde o roja, así como a luz blanca LED (Das et al., 2011); aunque resta por conocer el efecto de luz monocromática sobre la producción de  $\beta$ -glucanos en *Nannochloropsis*.

### **Limitación de nutrientes**

La estrategia de limitación de nutrientes (Dragone et al., 2011) se considera un enfoque factible para la producción de microalgas ricas en carbohidratos. Esta técnica es prácticamente accesible porque es relativamente fácil controlar los nutrientes en el medio de cultivo. De acuerdo con Markou et al., (2012a) la mayoría de los estudios que discuten la limitación de nutrientes como una estrategia eficaz para modificar la composición de las microalgas, omiten al nutriente de interés desde el inicio de los cultivos microalgales. Así que los resultados de la omisión de nutrientes son bajas tasas de crecimiento y baja producción de biomasa. Por lo tanto, la optimización de la concentración de nutrientes es muy importante (Markou et al., 2012b). La optimización del nutriente limitado tiene un doble

alcance: por un lado apoyar una producción adecuada de biomasa, y por otro lado actuar como factor limitante para controlar la composición de la biomasa (Markou et al., 2012a). Aunque son varios los nutrientes en un medio de cultivo, los más estudiados por su efecto como limitantes son nitrógeno y fósforo. En diatomeas la falta de nitrógeno produce un aumento significativo en la acumulación de crisolaminarina, llegando a representar valores ~80 % del carbono orgánico total de las células (Granum et al., 2002). De forma opuesta, cuando el nitrógeno es abundante, la crisolaminarina es degradada para apoyar la síntesis proteica (Myklestad y Granum, 2009).

En el trabajo de Jia et al. (2015), el contenido de carbohidratos totales en *N. oceanica* aumentó de un 5.8 a un 17.9 % de su biomasa seca durante los primeros 4 días luego del agotamiento abrupto del nitrógeno en el medio, para posteriormente aumentar a un 19,1 % al día 14. En este mismo trabajo, se evidenció que el contenido de 1,3- $\beta$ -glucanos, expresado como glucosa polimérica y sugerida como laminarina por los autores, aumentó de un 1.63 a un 7.87 % al día 8, luego del estrés por ausencia de nitrógeno, para finalmente decaer a un 6.28 % al día 14. Los autores concluyeron que en condiciones de nitrógeno abundante la laminarina puede ser el principal almacenamiento de carbono en estas células; que sirve como almacenamiento temporal del mismo y probablemente compite por fuentes de carbono con el triacilglicerol. Contrariamente, en condiciones de nitrógeno agotado, la regulación positiva de las vías metabólicas de  $\beta$ -1,3-glucano junto con la síntesis de acetil-CoA mediada por piruvato deshidrogenasa y la rotación/degradación de lípidos de membrana contribuyó a la síntesis aumentada de triacilglicerol.

De manera similar, el efecto de la inanición del fósforo sobre la composición de la biomasa de microalgas resulta en la acumulación simultánea de carbohidratos y lípidos, adicionalmente con la disminución de la síntesis de proteínas (Dean et al., 2008; Lynn et al., 2000). Los carbohidratos son significativamente promovidos por la inanición de fósforo y su acumulación es más notable que la de lípidos (Fuhs, 1969). Sin embargo, en algunos estudios, se observó que la inanición de fósforo causó sólo acumulación de lípidos; por ejemplo en cultivos de *Nannochloropsis* F&M-M24, los lípidos se incrementaron hasta el 50 % (Rodolfi et al., 2009) y en cultivos de *Scenedesmus* LX1 hasta el 53% (Xin et al., 2010).

### **Suministrar carbono inorgánico**

El suministro de carbono inorgánico se adiciona al cultivo de microalgas ya sea en la forma de bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) o dióxido de carbono gaseoso ( $\text{CO}_2$ ). Se ha observado que la adición de estos compuestos promueven tanto la producción de biomasa, como también la de lípidos y carbohidratos, además de mejorar la asimilación de nitrógeno (Chiu et al., 2009; Lin et al., 2012).

Hsueh et al., (2009) observaron en *N. oculata* una acumulación de carbohidratos totales de 29 % de su biomasa seca, al suministrar  $\text{CO}_2$  al 5 % en la aireación, mientras que al utilizar un 8 % de  $\text{CO}_2$  se obtuvo un 37 % de carbohidratos totales. Esto sugiere que el contenido de carbohidratos, al igual que el de lípidos, se relaciona proporcionalmente con el suministro de  $\text{CO}_2$ .

### **Producción de $\beta$ -glucanos en proceso de dos etapas**

Algunos autores sugieren que la mejor opción para obtener biomasa microalga con alto contenido de carbohidratos es el proceso de dos etapas; la primer etapa del proceso consiste en producir la biomasa bajo las condiciones óptimas de cultivo y en el segundo, las cosechas microalgas son expuestas a condiciones de estrés, con el fin de alterar su composición bioquímica (Markou et al., 2012a). Por lo cual los fotobioreactores deberían ser sistemas eficaces para esta estrategia, ya que se puede obtener biomasa de manera masiva (Carvalho et al., 2006) y son idóneos para el control de factores (Pulz, 2001; Singh y Sharma, 2012) que pueden ser estresantes para *Nannochloropsis* como se describieron anteriormente; provocando así la producción de biomasa rica en  $\beta$ -glucanos.

### **Estructura molecular de $\beta$ -glucanos y su capacidad como inmunoestimulantes**

Los  $\beta$ -glucanos presentan diferentes estructuras moleculares que por lo general depende de su origen, por ejemplo; los  $\beta$ -glucanos de la avena y cebada cuentan con estructuras lineales con tramos cortos de enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 (Pizarro et al., 2014); mientras que la estructura de los  $\beta$ -glucanos de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y basidiomicetos (*Schizophyllum commune*), que al parecer corresponde a la forma más activa de los  $\beta$ -glucanos (Barman et al., 2013; Bricknell y Dalmo, 2005; Meena et al., 2013), están compuestas por enlaces  $\beta$ -1,3

glucanos con ramificaciones  $\beta$ -1,6 que en levaduras son largas y en hongos cortas ( $\beta$ -1,3/1,6 glucanos; Volman et al., 2008). En cambio, los  $\beta$ -glucanos de bacterias presentan un grupo variado de estructuras como  $\beta$ -1,3 glucanos,  $\beta$ -1,3 glucanos ciclicos,  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos ciclicos y  $\beta$ -1,3/1,2 glucanos (McIntosh et al., 2005).

Respecto a  $\beta$ -glucanos microalgales las estructuras reportadas son  $\beta$ -1,3 glucanos,  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos y  $\beta$ -1,6/1,3; tabla 6 y figura 13. Los  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos de diatomeas marinas reciben el nombre genérico de crisolaminarina (Størseth et al., 2006, 2005, 2004) y el  $\beta$ -1,3 glucanos de la dulceacuícola *Euglena gracilis* es nombrado paramilón (Gottlieb, 1850). Actualmente se cuenta con conocimientos importantes sobre la cuantificación y caracterización de  $\beta$ -glucanos en especies de microalgas. Por ejemplo, los  $\beta$ -glucanos de *Chaetoceros debilis* presentan estructura molecular  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos con peso molecular de 4.9 kDa y un valor de polimerización de 30 (Størseth et al., 2006). En *Chaetoceros mulleri* se ha encontrado y caracterizado la molécula como estructura de configuración  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos con grado de polimerización de 19 y ramificación 0.005 (Størseth et al., 2004). Por otra parte, de *Odontella aurita* se reportó la configuración  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos con peso molecular de 7.75 kDa (Xia et al., 2014). Además, también se reportó el aislamiento y caracterización de un  $\beta$ -glucanos de *Isochrysis galvana* con estructura molecular con enlaces inversos a los de diatomeas;  $\beta$ -1,6/1,3 (Sadovskaya et al., 2014).

Sin embargo, aún no se ha realizado la caracterización molecular de  $\beta$ -glucanos del linaje de Eustigmatofitas, y tampoco se cuenta con estudios relacionados con la ubicación de almacenamiento de sus carbohidratos de reserva, aun cuando a este grupo pertenecen microalgas importantes para aplicaciones industriales como lo es *Nannochloropsis* (Hildebrand et al., 2013).



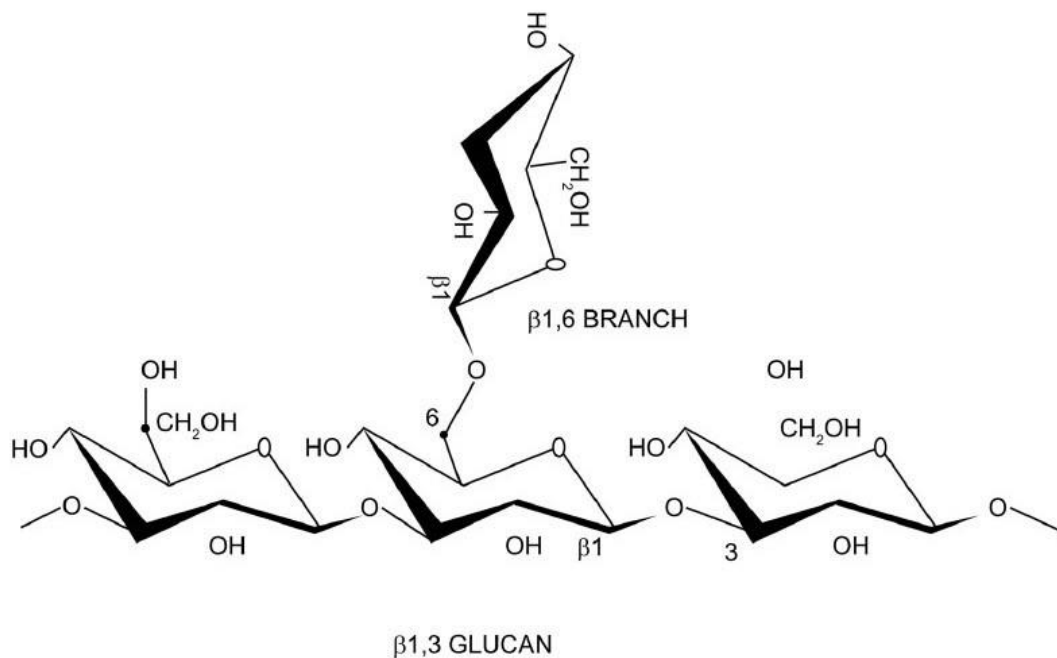


Figura 13. Configuración molecular de los β-1,3/1,6 glucanos (Modificado de Chan et al., 2009).

Una variedad de éstos β-glucanos tienen la capacidad de estimular al sistema inmunológico. Por lo cual, farmacológicamente se les clasifica como modificadores de la respuesta biológica (Bohn y BeMiller, 1995). También, los β-glucanos son considerados compuestos nutraceuticos, debido a que su consumo se ha relacionado con la prevención y/o el tratamiento de enfermedades (Veverka et al., 2014), o como aditivos para el manejo de la salud de animales acuáticos (Kumar et al., 2013).

El efecto inmunoestimulante de los β-glucanos es dependiente de varios factores relacionados con su estructura molecular (Sletmoen y Stokke, 2008). El peso molecular más eficaz de los β-glucanos clínicamente útil varía entre 100 y 200 kDa, con un grado de ramificación comprendido entre 0.2 y 0.5 (Bohn & BeMiller, 1995). Por otra parte, los β-glucanos con efectos inmunoestimulantes reportados en acuicultura son principalmente aislados de levadura, hongos o microalgas, y tienen pesos moleculares más bajos que van desde 5 kDa de la alga marina *Laminaria digitata* (Dalmo, 1996, 1994) a 200 kDa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Bagni et al., 2005). El intervalo de pesos moleculares del principal β-glucanos microalgal, crisolaminarina, es de 4-40 kDa (tabla 6).

Tabla 6.- Relación de características y estructuras moleculares  $\beta$ -glucanos de microalgas.

Especie	Estructura	PM (kDa)	GP	GR	Referencia
Diatomeas					
<i>Chaetoceros debilis</i>	$\beta$ -1,3/1,6	4.9	30	-	Størseth et al., 2006
<i>Chaetoceros mulleri</i>	$\beta$ -1,3/1,6		19	0.005	Størseth et al., 2004
<i>Odontella aurita</i>	$\beta$ -1,3/1,6	7.75		-	Xia et al., 2014
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	-	29	-	Chiovitti et al., 2004
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	-	-	5 - 13	-	Størseth et al., 2005
<i>Stauroneis amphioxys</i>	-	4	24	-	McConville et al., 1986
<i>Skeletonema costatum</i>	(1,2) y (1,6)	6.2	35	-	Paulsen & Myklestad, 1978
<i>Stephanodiscus meyeri</i>	-	40	-	-	Alekseeva et al., 2005
No diatomeas					
<i>Euglena gracilis</i>	$\beta$ -1,3	-	-	-	Barras & Stone, 1968
<i>Isochrysis galbana</i>	$\beta$ -1,6/1,3	1.2-5.2	7-29	-	Sadovskaya et al., 2014
<i>Chorella pyrenoidosa</i>	$\beta$ -1,2, y $\beta$ -1,4/1,6	-	-	-	Reyes-Suárez et al., 2008

Por lo tanto, ante importantes escenarios de enfermedades infecciosas en acuicultura (Lafferty et al., 2015), una alternativa denominada inmunoestimulación, ha realizado la aplicación de compuestos para aumentar o activar al sistema inmunológico de organismos en cultivo, tal estrategia tiene la finalidad de potenciar el sistema inmunológico y aumentar la resistencia del hospedero frente a las enfermedades infecciosas (Barman et al., 2013; Bricknell y Dalmo, 2005; Hadden, 1993; Vadstein, 1997). El eje central de estas estrategias son los agentes inmunoestimulantes, definidos como aquellos compuestos naturales que modulan el sistema inmunitario mediante el aumento de la resistencia del huésped frente a enfermedades que en la mayoría de circunstancias son causadas por patógenos (Bricknell y Dalmo, 2005). El resultado, es un cambio en el número y/o función de las células que participan en la respuesta inmune. El efecto más probado de los inmunoestimulantes es el incremento de la función de las células fagocíticas y aumentar sus actividades bactericida y fungicidas, pero no son los únicos efectos (Sakai, 1999).

Los inmunoestimulantes más prometedores son los  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos, ya que han sido ampliamente estudiados en diferentes especies de vertebrados e invertebrados (Meena et al.,

2012); gracias a que cuentan con una estructura química bien definida y su modo de acción genera efectos benéficos a los organismos (Dalmo y Bøggwald, 2008; Novák y Vetvicka, 2009; Sakai, 1999). Además, por su grado de inocuidad han sido reconocidos como productos generalmente seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la agencia de drogas y alimentos de EUA (Veverka et al., 2014).

Los  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos, reciben el nombre común de zymosan cuando son aislados de *S. cerevisiae* y se componen de  $\beta$ -glucanos y manosa, y en menor cantidad lípidos y proteínas (Freimund et al., 2003). Éstos  $\beta$ -glucanos de levadura se pueden encontrar comercialmente como MacroGard® (Sych et al., 2013). Pero se debe de considerar la advertencia que existe sobre los problemas que generan las impurezas de zymosan cuando se intenta describir los mecanismos moleculares de las respuestas inmunológicas. Cuando zymosan se suministra en animales induce una amplia gama de respuestas (Meena et al., 2012; Novák y Vetvicka, 2009; Sakai, 1999), y es muy difícil identificar qué componente o estructura de este compuesto está induciendo qué efecto (Sletmoen y Stokke, 2008). Aunque existen otros  $\beta$ -glucanos de diferentes fuentes que presentan la misma estructura como lentinan, schizophyllan y crisolaminaran, y podrían no presentar la misma problemática.

Debido a su estructura, se ha señalado que zymosan puede inducir simultáneamente a dos de los principales tipos de PRRs durante la inducción a respuesta inflamatoria: receptores de lectina de tipo-C (Dectin-1) y receptores tipo Toll (TLR2) (Gantner et al., 2003), además se ha demostrado la unión preferencial de los  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos de origen fúngico a esos mismos receptores (Brown y Gordon, 2001) generando respuestas mediadores de inflamación (Brown et al., 2003). Con base en la anterior, se podría obtener respuestas inmunológicas similares con  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos microalgales.

La activación de Dectin-1 por su unión a  $\beta$ -glucanos aumenta la activación de NF- $\kappa$ B, mediante el efecto sinérgico de TLR2 y estos receptores actúan en conjunto incrementando la producción de citocinas tales como IL-12 y TNF- $\alpha$  (Brown et al., 2003). Se ha reportado que Dectin-1 se expresa a niveles mayores en macrófagos y neutrófilos, pero en menor medida en células dendríticas y en una subpoblación de células T (Willment et al., 2001). Además, se demostró que Dectin-1 en unión con zymosan desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y por su cooperación con TLRs, los  $\beta$ -glucanos pueden

promover respuestas asociadas con la inmunidad Th1 (inmunidad mediada por células: activación de macrófagos y de células B para producir anticuerpos opsonizantes) incluyendo la producción de IL-12 (Gantner et al., 2003). Tales respuestas son críticas para la defensa contra muchos patógenos (Bricknell y Dalmo, 2005).

Aunque son escasas las investigaciones sobre el efecto inmunoestimulante de  $\beta$ -glucanos microalgales, se les considera como potenciales agentes inmunoestimulantes. Por ejemplo, el  $\beta$ -1,3/1,6 glucano de *C. mulleri* fue evaluado como inmunoestimulantes de larvas de bacalao del atlántico (*Gadus morhua*), obteniendo un incremento en supervivencia y crecimiento de larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con éstos  $\beta$ -glucanos microalgal durante la primera alimentación, en comparación a larvas alimentadas con rotíferos con y sin zymosan. Los autores argumentan que los resultados se deben al bajo peso molecular y el alto grado de ramificación de los  $\beta$ -glucanos microalgales que generan una mejor respuesta inmunológica. Por otra parte, en experimentos de actividad biológica del  $\beta$ -1,6/1,3 de *I. galvana* se demostró que el polisacárido inhibe directamente la proliferación de células de linfoma humano de monocitos leucemicos U937, por lo tanto se pronostica tener un alto potencial de actividad anti-tumor (Sadovskaya et al., 2014).

Sletmoen y Stokke (2008) sugieren que la estructura primaria, conformación en solución, y/o carga electrónica del polímero pueden desempeñar un papel determinante en la afinidad de los  $\beta$ -glucanos para unirse al receptor(es) y modular la función inmunológica.

Hasta ahora, la mayoría de los reportes relacionados al efecto del  $\beta$ -glucanos en peces, han propuesto a este polisacárido como un potente, valioso y prometedor inmunoestimulante, sin embargo sus efectos sobre el crecimiento y la modulación del sistema inmune son dependientes de su estructura, dosis empleada, modo, duración o tiempo de administración, temperatura ambiental y las especies bajo estudio (Meena et al., 2012; Vetvicka et al., 2013).

### **Caracterización de $\beta$ G microalgales**

El primer paso para lograr la caracterización de  $\beta$ -glucanos de microalgas, es la extracción adecuada de un extracto de carbohidratos totales. Este primer paso es relevante debido a que la elección del método de extracción más adecuado depende de la fuente y la estructura molecular de los  $\beta$ -glucanos que se espera producir (Zhu et al., 2016), esto debido a que la

naturaleza del procedimiento de extracción tiene un efecto importante sobre la estructura y el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos generados (Zhu et al., 2015). Por ejemplo, las diferencias en las estimaciones del peso molecular de  $\beta$ -glucanos pueden provenir, no sólo de su fuente como puede ser *Nannochloropsis*, sino también de la influencia de los métodos utilizados para la extracción y purificación. Comúnmente durante la etapa de extracción se presentan los fenómenos de agregación y despolimerización (Lazaridou y Biliaderis, 2007). Por lo tanto, para determinar las características estructurales de las moleculares de  $\beta$ -glucanos aislados, los procedimientos de extracción necesitan asegurar la integridad de las moléculas de origen, y optimizar el rendimiento y pureza del  $\beta$ -glucanos (Brennan y Cleary, 2005). Actualmente, la extracción por ácido sulfúrico para diatomeas y por agua caliente-etanol para no-diatomeas son los método más utilizados para extraer carbohidratos microalgales (Tabla 7). Otros métodos reportados para diferentes fuentes son la extracción alcalina (Kao et al., 2012), extracción asistida por ultrasonido (Du et al., 2014), extracción asistida por microondas (Ookushi et al., 2006), enzimas como desencadenante de la extracción (Park et al., 2014) y extracción ácida (Park et al., 2001). Sin embargo, existen algunos inconvenientes con los métodos de extracción; que tienen que ver con la demanda de largos periodos de tiempo por proceso, altos costos y poca sostenibilidad ambiental (Zhu et al., 2016). Sin embargo, algunos de los nuevos métodos de extracción, como por ejemplo la extracción acelerada de disolventes (Du et al., 2014) y la extracción por agua sobrecalentada (Adachi et al., 2013), son útiles para mediar con los problemas actuales de extracción señalados, junto con mayores rendimientos.

De acuerdo con Synytsya y Novak (2014), post-extracción y antes de realizar rigurosos análisis estructurales de  $\beta$ -glucanos, es necesario estimar su pureza. Es decir, conocer la proporción del componente polisacárido y la presencia de impurezas. Los ensayos de carbohidratos totales y/o reductores, así como los análisis para otros compuestos, se suelen utilizar para resolver esta tarea. El término "carbohidratos totales" cubre a todo el mono-, oligo- y polisacáridos en comparación con los que no son hidratos de carbono (proteínas, lípidos, compuestos aromáticos, compuestos minerales, etc.) que pueden estar presentes en los extractos de carbohidratos. En un polisacárido puro, la concentración de azúcares reductores (aquellas que tiene un grupo carbonilo libre en los extremos reductores)

representan la cantidad de grupos terminales reductores, dependiendo de los grados de polimerización y ramificación. La siguiente tarea analítica es la estimación de enlaces y estructuras, que son típicos para polisacáridos que no son objetivo, incluyendo algunos glucanos.

Posteriormente se requieren análisis estructurales más rigurosos de los polisacáridos purificados para clarificar su estructura. Para ello se emplea un conjunto de métodos espectroscópicos, químicos y de separación. Entre ellos a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), se le reconoce como una herramienta poderosa en el análisis estructural de glucanos tanto en solución como en estado sólido. Junto con los métodos quimiolíticos (análisis de metilación, oxidación del periodato, hidrólisis química o enzimática parcial, etc.), los experimentos de RMN de correlación son capaces de determinar la estructura exacta de los polisacáridos probados. En la tabla 7 se muestran los experimentos y análisis de RMN reportados para la caracterización de  $\beta$ -glucanos de microalgas. Por otra parte, los métodos espectroscópicos de vibración de infrarrojo son sensibles a la estructura anomérica de los glucanos y también pueden utilizarse para el control de la pureza. La distribución del peso molecular, homogeneidad y ramificación de glucanos puede estimarse mediante cromatografía de exclusión de tamaño, dispersión de luz láser y viscometría (Synytsya y Novak, 2014).

Finalmente, no se han cuantificado ni caracterizado los  $\beta$ -glucanos de *Nannochloropsis*, que es una especie importante para la industria y ampliamente utilizada en acuicultura. Por lo tanto se considera de gran importancia evaluar el efecto de  $\beta$ -glucanos obtenidos a partir de estas microalgas sobre la modulación de la respuesta inmune de vertebrados e invertebrados. Con base en lo anterior, el presente capítulo tiene como objetivo cuantificar la concentración de  $\beta$ -glucanos en biomasa cosechas de tres cepas de *Nannochloropsis*; y describir las cualidades y posibilidades que proyectan a las especies de este género como potenciales en la producción de  $\beta$ -glucanos.

Tabla 7. Métodos utilizados para extracción, purificación y caracterización de  $\beta$ -glucanos de microalgas.

Especie	Extracción	Diálisis (kDa)*	Fraccionamiento	Métodos RMN	Referencia
<i>Chaetoceros mulleri</i>	Ácido sulfúrico	1	-	$^1\text{H}$ -MAS $^{13}\text{C}$ $^1\text{H}$ HETCOR COSY	Størseth et al., 2004
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Ácido sulfúrico	1	-	$^1\text{H}$ COSY	Størseth et al., 2005
<i>Chaetoceros debilis</i>	Ácido sulfúrico	1	-	$^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ -DEPT135 TOCSY $^1\text{H}$ -COSY NOESY $^{13}\text{C}$ -HMQC	Skjermo et al., 2006
<i>Odontella aurita</i>	Ácido sulfúrico	-	Columna Sephadex G-200  DEAE-52	$^{13}\text{C}$ y $^1\text{H}$	Xia et al., 2014
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Agua caliente	3.5	-	$^1\text{H}$	Chiovitti et al., 2004
<i>Stephanodiscus meyeri</i>	Ácido sulfúrico	1	-	$^{13}\text{C}$	Alekseeva et al., 2005
<i>Isochrysis galvana</i>	Agua caliente- Etanol	12-14	Spectrum spectra/por 4  Columna Q-Sepharosa  Columna Sephadex G-50	$^{13}\text{C}$ y $^1\text{H}$ (30 y 80 °C) $^1\text{H}$ $^1\text{H}$ -COSY, TOCSY, ROESY $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC, HSQC- TOCSY, HMBC	Sadovskaya et al., 2014
<i>Chorella pyrenoidosa</i>	Agua caliente- Etanol	12	Columna Sephadex G-100	HRESIMS	Reyes-Suárez et al., 2008
<i>Durvillaea antarctica</i>	Agua caliente- Etanol	12-14	Spectrum spectra/por 4	$^1\text{H}$	Bobadilla et al., 2013

## 2.4.2 Materiales y métodos

### Cepas y cultivos

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán. Se utilizaron tres cepas de *Nannochloropsis* que se conservan con las claves: NN-X-1, CIB76 y NpUNAM. La cepa NN-X-1 se obtuvo de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California Norte, México. CIB76 es caracterizada como *Nannochloropsis oculata* y pertenece a la colección de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Baja California Sur, México. NpUNAM pertenece a la colección de microalgas del Laboratorio de Biotoxinas Marinas, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM), Sinaloa, México.

Los cultivos en lotes se realizaron por triplicado ( $n=9$ ) en garrafones de polycarbonato de 16 litros. Se empleó el medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962), preparado con agua de mar (34 ups), filtrada ( $1\ \mu$ ) y clorada. Las condiciones de cultivo fueron:  $19.2 \pm 1.8\ ^\circ\text{C}$ ,  $8.6 \pm 0.5$  pH, iluminación fluorescente y aireación continua (Helm et al., 2004). La concentración celular se determinó diariamente con un hematocitómetro (0,1 mm de profundidad, con reglilla de Neubauer mejorada, Brighline Optik Labor) y un microscopio compuesto (Leica modelo CME) de acuerdo con Guillard y Sieracki (2005). La tasa de división celular ( $\mu$ ) de cada una de las cepas se calculó de acuerdo a Nieves et al., (1998). Los cultivos fueron muestreados en la fase estacionario de la curva de crecimiento determinada por el máximo valor de la  $\Sigma\mu$ ; considerando ha esta etapa del cultivo como una condición de agotamiento de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, y una acumulación de carbohidratos.

Donde:

$C_{t+1}$ =Concentración celular al tiempo  $t+1$

$C_t$ = Concentración celular al tiempo  $t$

### Determinación de carbohidratos totales

Los carbohidratos totales se determinaron mediante el método colorimétrico de fenol-sulfúrico por Dubois et al. (1956), se analizaron muestras de la fase estacionaria por triplicado de cada réplica ( $n = 27$ ).



### **Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico**

Adicionalmente, se tomaron muestras de microalgas por triplicado (n=27) en la etapa estacionario para determinar el peso seco, y contenido orgánico e inorgánico de las tres cepas mediante el método de incineración propuesto por Sorokin (1973).

### **Determinación de carbohidratos totales**

Los carbohidratos totales fueron determinados por el método colorimétrico fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), partiendo de muestras de los cultivos en etapa estacionaria por triplicado de cada repetición (n=27).

### **Cuantificación enzimática de $\beta$ -glucanos**

Se utilizó el kit enzimático Megazyme<sup>®</sup> desarrollado para la medición adecuado de  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos y  $\alpha$ -glucano en productos de hongos y levaduras (CAT # K-YBGL, 12/16; Lote: 161124-3); se desconoce la existencia de un método exclusivo para microalgas. Se analizaron muestras por triplicado de biomasa liofilizada de cultivos en fase estacionaria. Además, se realizó la cuantificación en biomasa liofilizada de una pasta comercial compuesta de *Nannochloropsis oculata* no viable (cepa CCMP 525; Nanno3600<sup>®</sup>, Lote: 16267; Reed Mariculture Inc.) y como control se cuantificaron los  $\beta$ -glucanos de levadura con 49 % de pureza suministrados por el kit (Lote: 130905b). Los glucanos totales se determinaron usando hidrólisis ácida controlada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y glucosa liberada se determinó usando un reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (GOPOD). Los  $\alpha$ -glucanos se midieron después de la hidrólisis de almidón/glucógeno, a glucosa; y de glucoamilasa y sacarosa a glucosa más fructosa con invertasa; posteriormente la glucosa fue medida con reactivo GOPOD. Los  $\beta$ -glucanos se determinaron por la diferencia entre glucanos totales y  $\alpha$ -glucanos (McCleary y Draga, 2016).

### **Productividad volumétrica de $\beta$ -glucanos**

Mediante una revisión bibliográfica se obtuvieron datos de concentración celular de  $\beta$ -glucanos (pg cel<sup>-1</sup>) y productividad volumétrica de  $\beta$ -glucanos (mg l<sup>-1</sup>) de varias especies de

microalgas. Los mismos datos se calcularon para las cepas del presente estudio, usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración celular } \beta\text{-glucanos} = (\% \beta\text{G} \cdot \text{PS}) / \text{DC}$$

$$\text{Productividad volumétrica } \beta\text{-glucanos} = \% \beta\text{G} \cdot \text{PS} \cdot \text{DC} \cdot \text{V}$$

Donde,

%  $\beta$ G= Porcentaje de  $\beta$ G obtenido por determinación enzimática

PS= Peso seco

DC= Densidad celular al momento de la toma de muestra

V= Volumen

### **Análisis estadísticos**

Para comparar los carbohidratos totales obtenidos en las cepas *Nannochloropsis*, los porcentajes se transformaron utilizando la función arcoseno de la raíz cuadrada (McCleary y Draga, 2016). Posteriormente, la normalidad y la homogeneidad de la varianza para todas las variables se probaron mediante las técnicas Levines y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Como los datos fueron homoscedásticos, se realizaron pruebas de análisis de varianza y comparaciones múltiples de Tukey (Steel y Torrie, 1980). Los análisis estadísticos y las funciones de crecimiento se realizaron con el programa SigamPlot v11.

### **2.4.3 Resultados**

#### **Curva de crecimiento**

La mayor densidad celular y tasa de división celular fueron registradas en diferentes días de cultivo para las tres cepas. CIB76 presentó la mayor densidad celular ( $64.5 \text{ cel ml}^{-1} \times 10^6$ , d15), seguido de NN-X-1 ( $63.3 \text{ cel ml}^{-1} \times 10^6$ , d13) y NpUNAM ( $63.2 \text{ cel ml}^{-1} \times 10^6$ , d22). Los valores de la tasa de división celular ( $\mu$ ) fueron 1.05, 1 y 0.98, para CIB76, NN-X-1 y NpUNAM, respectivamente. Por lo tanto, el inicio de la fase estacionario, y por consecuencia la toma de muestras, también se registró en diferentes días de cultivo: NN-X-1, d17; CIB76, d19 y NpUNAM, d25 (Figura 14).

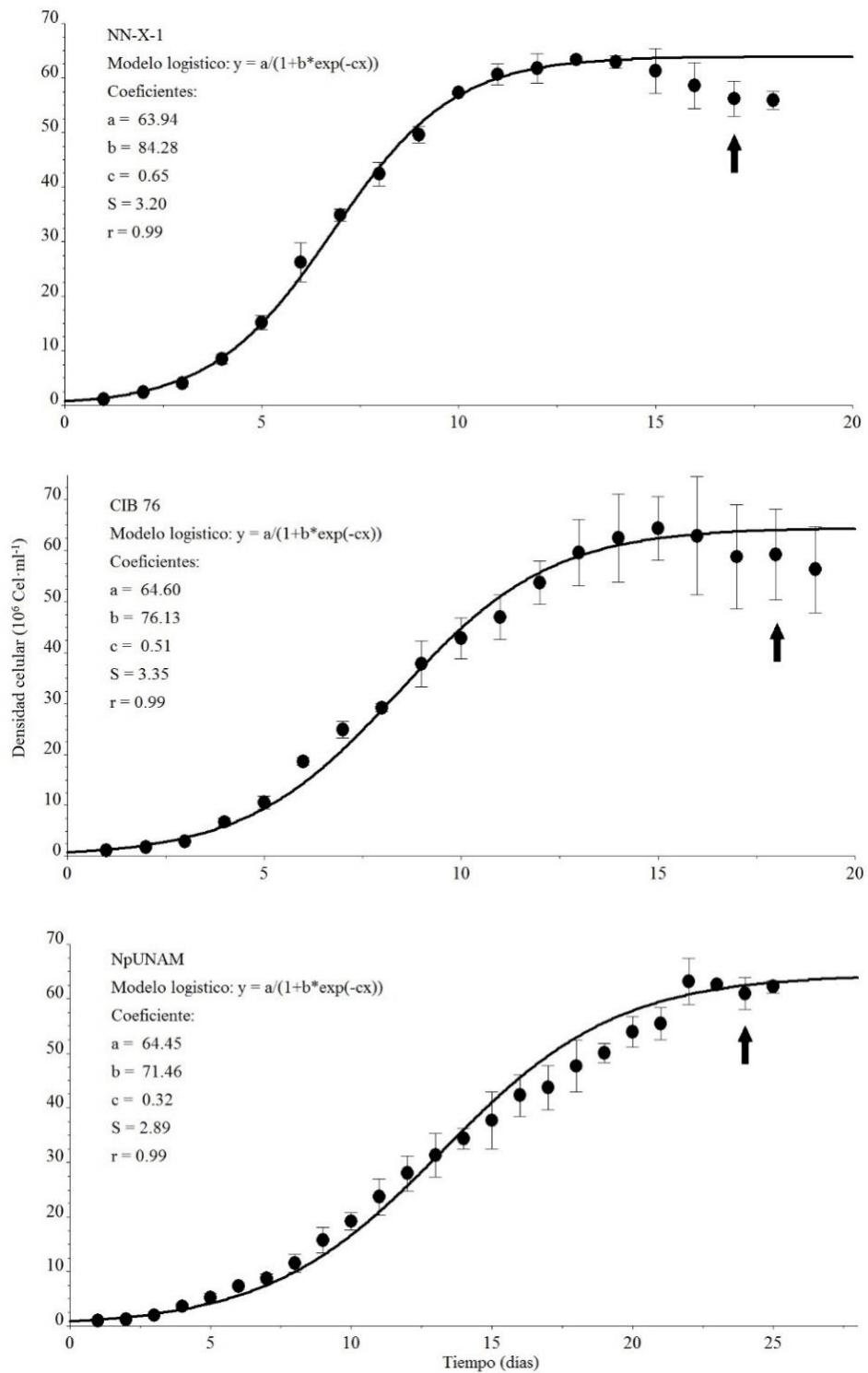


Figura 14. Curvas de crecimiento de tres cepas de *Nannochloropsis* en sistema por lotes con medio F/2. Las flechas indican el inicio de la fase estacionaria de los cultivos.

### Producción volumétrica de biomasa y acumulación de carbohidratos

La producción de biomasa en peso seco fue similar entre las tres cepas, la mayor producción de  $0.40 \text{ g l}^{-1}$  se obtuvo con NN-X-1. La composición orgánica, en términos de peso seco individual, peso seco orgánico e inorgánico, y carbohidratos totales de NpUNAM son significativamente mayores que el resto de las cepas (Tabla, 8). El porcentaje de carbohidratos totales de NpUNAM con  $30.9 \pm 3.0$ , fue significativamente mayor a CIB76 con  $23.5 \pm 7.1$  % y a NN-X-1 con  $22.7 \pm 4.3$  %.

Tabla 8. Producción de biomasa de los cultivos de tres cepas de *Nannochloropsis*.

Cepa	Peso seco total	Peso seco	Peso seco orgánico	Peso seco inorgánico	Carbohidratos totales	Carbohidratos totales
	( $\text{g l}^{-1} \pm \text{d.e.}$ )		(pg cel <sup>-1</sup> $\pm$ d.e.)			(% $\pm$ d.e.)
NN-X-1	$0.40 \pm 0.04$	$6.6 \pm 1.1$	$5.7 \pm 0.8$	$0.9 \pm 0.4$	$1.3 \pm 0.2$	$22.7 \pm 4.3$
CIB76	$0.39 \pm 0.03$	$6.7 \pm 0.9$	$5.7 \pm 0.9$	$0.9 \pm 0.5$	$1.3 \pm 0.4$	$23.5 \pm 7.1$
NpUNAM	$0.38 \pm 0.04$	$6.0 \pm 0.3$	$5.5 \pm 0.3$	$0.5 \pm 0.2$	$1.8 \pm 0.2$	$30.9 \pm 3.0$

### $\beta$ -glucano celular y productividad volumétrica de $\beta$ -glucanos

El control de  $\beta$ -glucanos de levadura presentó valores aproximados ( $48.8 \pm 1.4$  %) a los especificados por el kit ( $\sim 49$  %). Los menores porcentajes de  $\beta$ -glucanos se registraron en la pasta comercial ( $6.2 \pm 0.1$  %). Con respecto a las cepas, NpUNAM presentó un porcentaje significativamente mayor ( $21.7 \pm 0.7$  %) a las cepas CIB 76 ( $15.4 \pm 0.5$  %) y NN-X-1 ( $14.3 \pm 0.9$  %).

Tabla 9. Contenido celular de  $\beta$ -glucanos en tres cepas de *Nannochloropsis* por determinación enzimática.

Muestra	Glucano total	$\alpha$ -Glucano	$\beta$ -Glucano
	(% $\pm$ d.e.)		
$\beta$ G Levadura*	48.8 $\pm$ 1.4		
Nanno 3600**	7.5 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 0.1
NN-X-1	15.8 $\pm$ 0.9	1.7 $\pm$ 0.1	14.3 $\pm$ 0.9
CIB76	16.8 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.1	15.4 $\pm$ 0.5
NpUNAM	23.4 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.0	21.7 $\pm$ 0.7

\* Control,  $\beta$ -glucanos de levaduras

\*\* Pasta comercial, Reed Mariculture®

En la tabla 10 se pueden observar los altos contenidos de  $\beta$ -glucanos en células de diatomeas reportados en bibliografía, hasta 411.9 pg cel<sup>-1</sup> en *Thalassiosira weissflogii*. En comparación, las cepas de *Nannochloropsis* presentaron bajas concentraciones; 1.1, 1.0 y 0.9 pg cel<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glucanos en CIB76, NpUNAM y NN-X-1; respectivamente. Sin embargo, la productividad volumétrica depende también de la densidad celular cosechada. Por lo tanto, la diatomea que mayor productividad presenta en cultivo por lotes es *Chaetoceros mulleri*, con 71.57 mg l<sup>-1</sup>. En cambio, las cepas de *Nannochloropsis* mostraron productividad volumétrica semejante, NN-X-1: 57.63 mg l<sup>-1</sup> y CIB76: 60.50 mg l<sup>-1</sup>; pero cabe resaltar que NpUNAM presenta una productividad volumétrica de 81.55 mg l<sup>-1</sup>, lo cual es mayor a las diatomeas reportadas en cultivos por lotes. Aunque el record de producción volumétrica con 306 mg l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> se reportó en un sistema de fotobioreactor con la diatomea marina *Odontella aurita*.

Tabla 10.  $\beta$ -glucano celular y productividad volumetrica de  $\beta$ -glucanos en microalgas.

Especie/Cepa	$\beta$ -glucano (pg cel <sup>-1</sup> )	Productividad $\beta$ G (mg l <sup>-1</sup> )	Referencia
Eustigmatales			
NN-X-1	0.9	57.63	Presente estudio
CIB76	1.1	60.50	Presente estudio
NpUNAM	1.0	81.55	Presente estudio
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3.6	64.80	Mohammady et al., 2005
Diatomeas			
<i>Odontella aurita</i>	-	306*	Xia et al., 2014
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	411.9	31.72	Størseth et al., 2005
<i>Chaetoceros mulleri</i>	18.2	71.57	Størseth et al., 2005
<i>Skeletonema costatum</i>	17	-	Granum et al., 2002
<i>Chaetoceros debilis</i>	15.8	17.5	Størseth et al., 2006

\*Producción en fotobioreactor, mg l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

#### 2.4.4 Discusión

Este es el primer estudio sobre la determinación enzimática (K-YBGL 12/16; Megazyme®) del contenido de  $\beta$ -glucanos en células de microalgas, en especial de *Nannochloropsis*.

Los resultados obtenidos de carbohidratos totales en fase estacionaria de tres cepas de *Nannochloropsis* fueron 30.9, 23.5 y 22.7%; para NpUNAM, CIB76 y NN-X-1; respectivamente. De forma natural algunas microalgas pueden contener más de 50% de su peso como carbohidratos (Chen et al., 2013). En casos particulares, como es el mutante no fotosintético de *E. gracilis*, el paramilón se acumula hasta un 90% del peso seco celular en condiciones oscuras con glucosa como fuente de carbono, por lo tanto los carbohidratos totales son un porcentaje mayor (Barsanti et al., 2001). En *I. galbana*, los carbohidratados representan alrededor del 13% del peso seco (Sadovskaya et al., 2014).

Respecto a *Nannochloropsis*, en algunos casos se ha reportado como una de las especies que menor porcentaje de carbohidratos presenta; Templeton et al., (2012) reportaron un valor menor al 10%, sin embargo, Hsueh et al. (2009) observaron en *N. oculata* una acumulación

de carbohidratos totales de 29% de su biomasa seca, al suministrar CO<sub>2</sub> a 5% en la aireación, mientras que al utilizar un 8% de CO<sub>2</sub> se obtuvo un 37% de carbohidratos totales. Por otra parte, Jia et al. (2015), reportaron que el contenido de carbohidratos totales en *N. oceanica* aumentó de un 5.8 a un 17.9% de su biomasa seca durante los primeros 4 días debido al agotamiento abrupto del nitrógeno en el medio, para posteriormente aumentar a un 19.1% al día 14.

Lo anterior indica que los carbohidratos totales de la biomasa de *Nannochloropsis* puede variar de 10 a 40% de su peso seco, dependiendo de las condiciones de cultivo y momento de cosecha; pero aún puede ser de hasta 60% cuando se cultiva en condiciones de limitación de nutrientes (Dr. Piña-Valdez, consulta en enero del 2016. Datos no publicados). Evidentemente, *Nannochloropsis* cuenta con un alto potencial como fuente de carbohidratos para un amplio aprovechamiento industrial.

Los  $\beta$ -glucanos representaron el 21.7, 15.4, 14.3 y 6.2% de biomasa seca de NpUNAM, CIB76, NN-X-1 y Nanno3600<sup>®</sup>; respectivamente. En diatomeas se ha reportado que crisolaminarina tiene una representación de hasta 64.86% del peso seco (Xia et al., 2014). Cabe señalar que con Nanno3600<sup>®</sup> se registró 6.2% de  $\beta$ -glucanos y CIB76 presentó 15.4% de  $\beta$ -glucanos aún cuando ambas fuentes se consideran ser *Nannochloropsis oculata*, esto puede indicar que otros monosacáridos, no glucosa, son representativos en biomasa de la pasta, lo cual se evidencia en el porcentaje que representan los glucanos totales del total de los carbohidratos para cada fuente: Nanno3600<sup>®</sup>, 62.5%; NN-X-1, 69.5%; CIB76, 71.5% y NpUNAM, 75.8%.

Sin embargo, el parámetro más importante para determinar el potencial de microalgas como fuente de  $\beta$ -glucanos es la productividad volumétrica. El record de 306 mg l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> se obtuvo con *O. aurita* en un sistema de fotobioreactor bajo limitación de nitrógeno; en el cual registraron un producción de 6.36 g l<sup>-1</sup> de biomasa. Otra producción importante de  $\beta$ -glucanos se logró con *Chaetoceros mulleri* en cultivo por lotes, 71.57 mg l<sup>-1</sup> (Størseth et al., 2005).

En el presente estudio, las cepas de *Nannochloropsis* mostraron productividad volumétrica semejante, NN-X-1: 57.63 mg l<sup>-1</sup> y CIB76: 60.50 mg l<sup>-1</sup>; pero cabe resaltar que NpUNAM presenta una productividad volumétrica de 81.55 mg l<sup>-1</sup>, lo cual es mayor a las diatomeas reportadas en cultivos por lotes. Sin embargo, al considerar que la producción de biomasa

seca de *Nannochloropsis* (cepa 211/78) en sistemas de fotobioreactor de placa plana se ha reportado de 4.7 g l<sup>-1</sup> (Hulatt et al., 2017) podemos especular un alto rendimiento en la producción de  $\beta$ -glucanos desde biomasa de cepas de *Nannochloropsis*, por ejemplo NpUNAM, en sistemas de fotobioreactor.

Por otra parte, el peso molecular (PM) de los  $\beta$ -glucanos podrían estar directamente relacionados con el tamaño celular de las microalgas. Por ejemplo, la diatomea *O. aurita* presenta el mayor PM molecular de 7.75 kDa (Xia et al., 2014) y mayor tamaño celular de 10-95 micras ( $\mu$ m); de manera opuesta con *C. debilis* se registró el menor PM 4.9 kDa (Størseth et al., 2006) y menor tamaño celular de 10-40  $\mu$ m. De *Isochrysis galbana* se reportó un PM de 1.2 a 5.2 (Sadovskaya et al., 2014) y tamaño celular de 4-8  $\mu$ m. Por lo tanto podría esperarse que por el tamaño celular de *Nannochloropsis* que de 1-2  $\mu$ m el peso molecular de su  $\beta$ -glucanos sea menor al de diatomeas e *I. galvana*. Esto puede ser determinante en sus características moleculares como puede ser bajo grado de polimerización y alto grado de ramificación; por lo que se propone nombrarlo **Nanoglucan**.

En resumen, las ventajas de *Nannochloropsis* como fuente potencial de  $\beta$ -glucanos son las siguientes: I) no se requiere agua dulce para cultivar a la mayoría de sus especies, sólo una es dulceacuícola (Espinoza-Gallardo et al., 2017), II) se puede obtener biomasa a escala industrial desde fotobioreactores (Hulatt et al., 2017), III) es posible modificar la composición bioquímica de su biomasa incrementando la fracción de carbohidratos (Dragone et al., 2011), IV) alta productividad volumétrica de  $\beta$ -glucanos de hasta de 81.55 mg l<sup>-1</sup> en cultivos por lotes, V) los  $\beta$ -glucanos microalgales pueden ser obtenidos mediante técnicas de extracción sencillas (Størseth et al., 2005) por el hecho de no estar unidos por enlaces covalentes a otros componentes estructurales de la célula, facilitando la purificación de estos polisacáridos desde la biomasa (Espinoza-Gallardo et al., 2017) y VI) posiblemente presenten estructura molecular similar a sus homólogos de levaduras y diatomeas (Granum y Myklestad, 2002; Størseth et al., 2006).



#### 2.4.5 Conclusiones

Las cepas de *Nannochloropsis* (NN-X-1, CIB76 y NpUNAM) presentan del 23 al 31% de peso seco en forma de carbohidratos, de los cuales del 14 al 21% son  $\beta$ -glucanos, desde fase estacionaria en cultivos por lotes. El contenido individual de  $\beta$ -glucanos es  $\sim 1 \text{ pg cel}^{-1}$ , con una productividad volumétrica máxima de  $81.55 \text{ mg l}^{-1}$ . *Nannochloropsis* (particularmente NpUNAM), tiene un gran potencial para la producción industrializada de  $\beta$ -glucanos y debido a sus posibles características moleculares, se estima que existen posibles aplicaciones como inmunoestimulantes. La investigación futura es necesaria para caracterizar  $\beta$ -glucanos aislados de *Nannochloropsis*, optimizar su producción y evaluar su capacidad como inmunoestimulante.

#### 2.4.6 Referencias

- Adachi, M., Kowhakul, W., Masamoto, H., Shigematsu, M., 2013. Bioactivities of b-glucan and tannin extracted with superheated water by using a macchinetta extractor, in: IACSI, P. (Ed.), 4th International Conference on Biology, Environment and Chemistry. Singapore, pp. 71–76.
- Alekseeva, S. a., Shevchenko, N.M., Kusaykin, M.I., Ponomorenko, L.P., Isakov, V. V., Zvyagintseva, T.N., Likhoshvai, E. V., 2005. Polysaccharides of diatoms occurring in Lake Baikal. *Appl. Biochem. Microbiol.* 41, 185–191. doi:10.1007/s10438-005-0033-5
- Araújo, S.D.C., Garcia, V.M.T., 2005. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture* 246, 405–412. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.051
- Bagni, M., Romano, N., Finoia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G., Sarti, M., Marino, G., 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass

- (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* 18, 311–25. doi:10.1016/j.fsi.2004.08.003
- Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C., Kumar, V., 2013. Immunostimulants for Aquaculture Health Management. *Mar. Sci Res Dev* 3, 1–11. doi:10.4172/2155-9910.1000134
- Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V., Gualtieri, P., 2001. Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *J. Appl. Phycol.* 13, 59–65. doi:10.1023/A:1008105416065
- Bobadilla, F., Rodriguez-Tirado, C., Imarai, M., Galotto, M.J., Andersson, R., 2013. Soluble  $\beta$ -1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. *Carbohydr. Polym.* 92, 241–248. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.071
- Bohn, J. a., BeMiller, J.N., 1995. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 28, 3–14. doi:10.1016/0144-8617(95)00076-3
- Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25, 743–756. doi:10.1007/s10811-013-9983-9
- Brennan, C.S., Cleary, L.J., 2005. The potential use of cereal (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -d-glucans as functional food ingredients. *J. Cereal Sci.* 42, 1–13. doi:10.1016/j.jcs.2005.01.002
- Bricknell, I., Dalmo, R. a., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 457–472. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.008
- Brown, G.D., Gordon, S., 2001. A new receptor for B-glucans. *nature, Br. Commun.* 413, 36–37.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S.J., Gordon, S., 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 197, 1119–1124. doi:10.1084/jem.20021890
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331.
- Carvalho, A.P., Meireles, L. a, Malcata, F.X., 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490–1506. doi:10.1021/bp060065r

- Chan, G.C.-F., Chan, W.K., Sze, D.M.-Y., 2009. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* 2, 25. doi:10.1186/1756-8722-2-25
- Chen, C.Y., Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S.H., Cheng, C.L., Lee, D.J., Bai, F.W., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1–10. doi:10.1016/j.bej.2013.03.006
- Chen, F., 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol.* 14, 421–426. doi:10.1016/0167-7799(96)10060-3
- Chiovitti, A., Molino, P., Crawford, S. a, Teng, R., Spurck, T., Wetherbee, R., 2004. The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *Eur. J. Phycol.* 39, 117–128. doi:10.1080/0967026042000201885
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H., Lin, C.S., 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresour. Technol.* 100, 833–838. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.061
- Choix, F.J., Bashan, Y., Mendoza, A., De-Bashan, L.E., 2014. Enhanced activity of ADP glucose pyrophosphorylase and formation of starch induced by *Azospirillum brasilense* in *Chlorella vulgaris*. *J. Biotechnol.* 177, 22–34. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.02.014
- Cunha, C., Carvalho, A., Esposito, A., Bistoni, F., Romani, L., 2012. DAMP signaling in fungal infections and diseases. *Front. Immunol.* 3, 1–6. doi:10.3389/fimmu.2012.00286
- da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27, 30–39. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006
- Dalmo, R., 1996. Accumulation of immunomodulatory laminaran ( $\beta$  (1, 3)-D-glucan) in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish ...* 8, 129–136.
- Dalmo, R.A., 1994. Intestinal absorption of immunomodulatory laminaran and derivatives in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. 579–589.
- Dalmo, R.A., Bøggwald, J., 2008.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 384–396. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.008

- Das, P., Lei, W., Aziz, S.S., Obbard, J.P., 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour. Technol.* 102, 3883–3887. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.102
- Dean, A.P., Estrada, B., Nicholson, J.M., Sigeo, D.C., 2008. Molecular response of *Anabaena flos-aquae* to differing concentrations of phosphorus: A combined Fourier transform infrared and X-ray microanalytical study. *Phycol. Res.* 56, 193–201. doi:10.1111/j.1440-1835.2008.00501.x
- De Oliveira, M.A.C.L., Monteiro, M.P.C., Robbs, P.G., Leite, S.G.F., 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquac. Int.* 7, 261–275. doi:10.1023/A:1009233230706
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy* 88, 3331–3335. doi:10.1016/j.apenergy.2011.03.012
- Du, B., Zhu, F., Xu, B., 2014. B-Glucan extraction from bran of hull-less barley by accelerated solvent extraction combined with response surface methodology. *J. Cereal Sci.* 59, 95–100. doi:10.1016/j.jcs.2013.11.004
- Dubois, M., Gilles, K. a, Ton, J.K.H., Rebers, P. a, Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., Sijtsma, L., 2014. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe, JRC Scientific and Policy Reports. European Commission. doi:10.2791/3339
- Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcia, L., Ehrenfeld, N., 2017.  $\beta$ -glucanos, su producci?n y propiedades en microalgas con ?nfasis en el g?nero *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Rev. Biol. Mar. y Oceanogr.* 52, 33–49. doi:10.4067/S0718-19572017000100003
- Freimund S, Sauter M, Kappeli O, D.H., 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3-b-glucan of high purity from bakers yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Polym* 159–171.

- Friedman, O., Dubinsky, Z., Arad, S. (Malis), 1991. Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green rhodophyta unicells. *Bioresour. Technol.* 38, 105–110. doi:10.1016/0960-8524(91)90139-B
- Fuhs, G.W., 1969. Phosphorus Content and Rate of Growth in the Diatoms *Cyclotella Nana* and *Thalassiosira Fluviatilis*. *J. Phycol.* 5, 312–321. doi:10.1111/j.1529-8817.1969.tb02620.x
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–17. doi:10.1084/jem.20021787
- Geider, R., Roche, J. La, Geider, R.J., 2002. European Journal of Phycology Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis Redfield revisited : variability of C : N : P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* *Eur. J. Phycol. Br. Phycol. Soc.* 371, 1–17. doi:10.1017/S0967026201003456
- Gottlieb, J., 1850. Über eine neue, mit Stärkmehl isomere Substanz. *Ann. der Chemie und Pharm.* 75, 51–61.
- Granum, E., Kirkvold, S., Mykkestad, S.M., 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: Diel variations and effects of N depletion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242, 83–94. doi:10.3354/meps242083
- Granum, E., Mykkestad, S.M., 2002. A simple combined method for determination of. *Sci. Technol.* 155–161.
- Guillard, R.R.L., Sieracki, M., 2005. Counting cells in cultures with the light microscope, in: Andersen, R. (Ed.), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier, London, p. 578.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2017. *AlgaeBase* [WWW Document]. World-wide Electron. Publ. Natl. Univ. Ireland, Galw. URL <http://www.algaebase.org> (accessed 7.5.17).
- Hadden, J.W., 1993. John W. Hadden. *Immunomulation* 14, 169:174.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. *Hatchery culture of bivalves: a practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper Number 471, Rome, Italy.

- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R.R., Ganesan, V., Anbazhagan, C., 2011. Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1737–1746. doi:10.1007/s11274-010-0632-z
- Hildebrand, M., Abbriano, R.M., Polle, J.E.W., Traller, J.C., Trentacoste, E.M., Smith, S.R., Davis, A.K., 2013. Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 506–514. doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.027
- Hsueh, H.T., Li, W.J., Chen, H.H., Chu, H., 2009. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 95, 33–39. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.11.010
- Hu, H., Gaol, K., 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnol. Lett.* 25, 421–425. doi:10.1023/A:1022489108980
- Hu, Q., 2013. Environmental Effects on Cell Composition, in: Wiley-Blackwell, O. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. pp. 114–122.
- Hulatt, C.J., Wijffels, R.H., Bolla, S., Kiron, V., 2017. Production of fatty acids and protein by *nannochloropsis* in flat-plate photobioreactors. *PLoS One* 12, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0170440
- Jia, J., Han, D., Gerken, H.G., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., Xu, J., 2015. Molecular mechanisms for photosynthetic carbon partitioning into storage neutral lipids in *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen-depletion conditions. *Algal Res.* 7, 66–77. doi:10.1016/j.algal.2014.11.005
- Kang, R., Wang, J., Shi, D., Cong, W., Cai, Z., Ouyang, F., 2004. Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus* sp. *Biotechnol. Lett.* 26, 1429–1432. doi:10.1023/B:BILE.0000045646.23832.a5
- Kao, P.F., Wang, S.H., Hung, W.T., Liao, Y.H., Lin, C.M., Yang, W. Bin, 2012. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan

- from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. doi:10.1155/2012/673764
- Khatoon, H., Abdu Rahman, N., Banerjee, S., Harun, N., Suleiman, S.S., Zakaria, N.H., Lananan, F., Abdul Hamid, S.H., Endut, A., 2014. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 95, 11–18. doi:10.1016/j.ibiod.2014.06.022
- Kumar, P., Jain, K.K., Munilkumar, S., Chalal, R.S., 2013. Beta Glucan : A valuable Nutraceutical for Promoting Health in Aquaculture ( *Short Review* ) 5, 220–227. doi:10.5829/idosi.ajbas.2013.5.5.7625
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M., 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 7, 471–496. doi:10.1146/annurev-marine-010814-015646
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., 2007. Molecular aspects of cereal B-glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *J. Cereal Sci.* 46, 101–118. doi:10.1016/j.jcs.2007.05.003
- Lee, R.E., 2008. Basic characteristics of the algae, in: *Phycology*. pp. 3–29.
- Lin, Q., Gu, N., Li, G., Lin, J., Huang, L., Tan, L., 2012. Effects of inorganic carbon concentration on carbon formation, nitrate utilization, biomass and oil accumulation of *Nannochloropsis oculata* CS 179. *Bioresour. Technol.* 111, 353–359. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.008
- Lynn, S.G., Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Interlandi, S.J., 2000. Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 36, 510–522. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.98251.x
- Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Robert, R., Cadoret, J.P., 2013. Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *J. Appl. Phycol.* 25, 109–119. doi:10.1007/s10811-012-9844-y

- Marit Sletmoen, Stokke, B.T., 2008. Higher Order Structure of (1,3)-b-D-Glucans and Its Influence on Their Biological Activities and Complexation Abilities. *Biopolymers* 89.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012a. Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 631–645. doi:10.1007/s00253-012-4398-0
- Markou, G., Chatzipavlidis, I., Georgakakis, D., 2012b. Carbohydrates Production and Bio-flocculation Characteristics in Cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Improvements Through Phosphorus Limitation Process. *Bioenergy Res.* 5, 915–925. doi:10.1007/s12155-012-9205-3
- Masojidek, J., Koblížek, M., Torzillo, G., 2004. Photosynthesis in microalgae, in: Publishing, B., Ltd (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, pp. 20–39.
- McCleary, B. V., Draga, A., 2016. Measurement of  $\beta$ -Glucan in mushrooms and mycelial products. *J. AOAC Int.* 99, 364–373. doi:10.5740/jaoacint.15-0289
- McConville, M.J., Bacic, A., Clarke, A.E., 1986. Structural studies of chrysolaminaran from the ice diatom *Stauroneis amphioxys* (Gregory). *Carbohydr. Res.* 153, 330–333. doi:10.1016/S0008-6215(00)90276-3
- McIntosh, M., Stone, B.A., Stanisich, V.A., 2005. Curdlan and other bacterial (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 163–173. doi:10.1007/s00253-005-1959-5
- Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., 2012. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 39, 431–457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5
- Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, a. K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, a. K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 39, 431–457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5



- Mohammady, N.G.-E.-D., Chen, Y.-C., El-Mahdy, A.-E.-R.A., Mohammad, R.F., 2005. Physiological responses of the eustigmatophycean *Nannochloropsis salina* to aqueous diesel fuel pollution. *Oceanologia* 47, 75–92.
- Myklestad, S.M., Granum, E., 2009. Biology of (1,3)- $\beta$ -glucans and related glucans in protozoans and chromistans, *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-373971-1.00010-8
- Nieves, M., Voltolina, D., Barrera, A., 1998. A new parameter for comparison of microalgae growth. *Rev. Ital. di Acquacolt.* 33, 177–184.
- Novák, M., Vetricka, V., 2009. Glucans as biological response modifiers. *Endocrine, Metab. Immune Disord.*
- Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O., 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresour. Technol.* 98, 2207–2211. doi:10.1016/j.biortech.2006.08.028
- Ookushi, Y., Sakamoto, M., Azuma, J., 2006. Optimization of Microwave-assisted Extraction of Polysaccharides from the Fruiting Body of Mushrooms. *J. Appl. Glycosci.* 53, 267–272. doi:10.5458/jag.53.267
- Park, H., Ka, K.-H., Ryu, S.-R., 2014. Mycobiology Enhancement of  $\beta$ -Glucan Content in the Cultivation of Cauliflower Mushroom ( *Sparassis latifolia* ) by Elicitation. *Mycobiology* 42, 41–45.
- Park, K.M., Park, B.H., So, S., Kim, M.J., Kim, Y.T., Lee, S.G., Lee, D.C., 2001. Composition for external application containing a beta-1,6-branches-beta1,3-glucan. *Pat. Appl. Publ. United States* 1. doi:US 2010/0311130 A1
- Paulsen, B.S., Myklestad, S., 1978. Structural studies of the reserve glucan produced by the marine diatom *Skeletonema costatum* (grev.) Cleve. *Carbohydr. Res.* 62, 386–388. doi:10.1016/S0008-6215(00)80888-5
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y., 2015. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics, in: Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E. (Eds.), *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design*. pp. 61–131. doi:10.1007/978-3-319-20200-6

- Pizarro, S., Ronco, A.M., Gotteland, M., 2014. B-Glucanos : ¿Qué Tipos Existen Y Cuáles Son Sus Beneficios En La Salud? *Rev. Chil. Nutr.* 41, 439–446.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 287–293. doi:10.1007/s002530100702
- Reed, R.H., Richardson, D.L., Warr, S.R.C., Stewart, W.D.P., 1984. Carbohydrate Accumulation and Osmotic Stress in Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130, 1–4.
- Renaud, S.M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G., Parry, D.L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195–214. doi:10.1016/S0044-8486(01)00875-4
- Reyes Suárez, E., Bugden, S.M., Kai, F.B., Kralovec, J.A., Nosedá, M.D., Barrow, C.J., Grindley, T.B., 2008. First isolation and structural determination of cyclic  $\beta$ -(1→2)-glucans from an alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydr. Res.* 343, 2623–2633. doi:10.1016/j.carres.2008.07.009
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112. doi:10.1002/bit.22033
- Sadovskaya, I., Souissi, A., Souissi, S., Grard, T., Lencel, P., Greene, C.M., Duin, S., Dmitrenok, P.S., Chizhov, A.O., Shashkov, A.S., Usov, A.I., 2014. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1→3,1→6)- $\beta$ -D-glucan from *Isochrysis galbana*. *Carbohydr. Polym.* 111, 139–48. doi:10.1016/j.carbpol.2014.04.077
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulant. *Aquaculture* 172, 63–92.
- Sánchez-Saavedra, M. del P., Voltolina, D., 2006. The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. *Aquac. Eng.* 35, 161–165. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.12.001
- Sánchez-Torres, H., Juscamaita-Morales, J., Vargas-Cárdenas, J., Oliveros-Ramos, R., 2008. producción de la microalga *nannochloropsis oculata* ( droop ) hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado production of the microalgae

- nannochloropsis oculata ( droop ) hibberd on media enriched with biological fish ensilage. *ecol. apl.* 7, 149–158.
- Singh, R.N., Sharma, S., 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 2347–2353. doi:10.1016/j.rser.2012.01.026
- Skjermo, J., Størseth, T.R., Hansen, K., Handå, A., Øie, G., 2006. Evaluation of  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261, 1088–1101. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.07.035
- Sorokin, C., 1973. Dry weight, packed volume and optical density, in: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Physiological Methods. Culture Methods and Growth Measurement.* Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurement, Cambridge, p. 448.
- Stoddart, R.W., 1984. *The Biosynthesis of Polysaccharides*, 1st ed. British Library Cataloguing in Publication Data, Croom Helm.
- Størseth, T.R., Hansen, K., Reitan, K.I., Skjermo, J., 2005. Structural characterization of  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mülleri* and *Thalassiosira weissflogii*. *Carbohydr. Res.* 340, 1159–1164. doi:10.1016/j.carres.2004.12.036
- Størseth, T.R., Hansen, K., Skjermo, J., Krane, J., 2004. Characterization of a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros mülleri* by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. *Carbohydr. Res.* 339, 421–424. doi:10.1016/j.carres.2003.10.021
- Størseth, T.R., Kirkvold, S., Skjermo, J., Reitan, K.I., 2006. A branched  $\beta$ -d-(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydr. Res.* 341, 2108–2114. doi:10.1016/j.carres.2006.05.005
- Sych, G., Frost, P., Irnazarow, I., 2013. Influence of beta-glucan (MacroGard ) on innate immunity of carp fry. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 57, 219–223. doi:10.2478/bvip-2013-0039

- Synytysya, A., Novak, M., 2014. Structural analysis of glucans. *Ann. Transl. Med.* 2, 17. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07
- Templeton, D.W., Quinn, M., Wychen, S. Van, Hyman, D., Laurens, L.M.L., 2012. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *J. Chromatogr. A* 1270, 225–234. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.034
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A., 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61, 15–24. doi:10.1016/S0031-9422(02)00201-7
- Torzillo, G., Vonshak, A., 2003. Environmental Stress Physiology. *Handb. Microalgal Cult.* 57–82. doi:10.1002/9780470995280.ch4
- Tredici, M.R., Carlozzi, P., Chini Zittelli, G., Materassi, R., 1991. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 38, 153–159. doi:10.1016/0960-8524(91)90147-C
- Vadstein, O., 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155, 401–417.
- Van den Hoek, C., Mann, D., Jahns, H., 1995. *Algae: An introduction to phycology.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Vårum, K.M., Østgaard, K., Grimsrud, K., 1986. Diurnal rhythms in carbohydrate metabolism of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 102, 249–256. doi:10.1016/0022-0981(86)90180-2
- Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P., 2013. The effects of  $\beta$ -Glucan on fish immunity. *N. Am. J. Med. Sci.* 5, 580–588. doi:10.4103/1947-2714.120792
- Veverka, M., Dubaj, T., Gallovič, J., Jorík, V., Veverková, E., Mičušík, M., Šimon, P., 2014. Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: Synthesis, characterization, and stability. *J. Funct. Foods* 8, 309–318. doi:10.1016/j.jff.2014.03.032
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M.J., Sijtsma, L., Ploeg, M., Enzing, C., 2015. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends Food Sci. Technol.* 42, 81–92. doi:10.1016/j.tifs.2014.12.004

- Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J., 2008. Dietary modulation of immune function by ??-glucans, *Physiology and Behavior*. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.045
- Wan, L., Han, J., Sang, M., Li, E., Wu, H., Yin, S., 2012. De Novo Transcriptomic Analysis of an Oleaginous Microalga: Pathway Description and Gene Discovery for Production of Next-Generation Biofuelso. *PLoS One* 7.
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Betenbaugh, M.J., Nie, Z., Qiu, G., 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 835–844. doi:10.1007/s00253-011-3399-8
- Wang, J., Yang, H., Wang, F., 2014. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 3307–3329. doi:10.1007/s12010-014-0729-1
- Warr, S.R.C., Reed, R.H., Stewart, W.D.P., 1985. Carbohydrate Accumulation in Osmotically Stressed Cyanobacteria (Blue-Green Algae): Interactions of Temperature and Salinity. *New Phytol.* doi:10.1111/j.1469-8137.1985.tb02779.x
- Whyte, J.N.C., 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60, 231–241. doi:10.1016/0044-8486(87)90290-0
- Willment, J.A., Gordon, S., Brown, G.D., 2001. Characterization of the Human B-Glucan Receptor and Its Alternatively Spliced Isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 43818–43823. doi:10.1074/jbc.M107715200
- Xia, S., Gao, B., Li, A., Xiong, J., Ao, Z., Zhang, C., 2014. Preliminary Characterization, Antioxidant Properties and Production of Chrysolaminarin from Marine Diatom *Odontella aurita* 4883–4897. doi:10.3390/md12094883
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 5494–5500. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.016

- Xu, F., Hu, H.H., Cong, W., Cai, Z.L., Ouyang, F., 2004. Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions. *Biotechnol. Lett.* 26, 51–53. doi:10.1023/B:BILE.0000009460.81267.cc
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., Takriff, M.S., 2014. An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *J. Biol. Res.* 21, 1–10. doi:10.1186/2241-5793-21-6
- Yao, C.H., Ai, J.N., Cao, X.P., Xue, S., 2013. Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Bioresour. Technol.* 146, 663–671. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.134
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., Xu, B., 2015.  $\beta$ -Glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *J. Food Compos. Anal.* 41, 165–173. doi:10.1016/j.jfca.2015.01.019
- Zhu, F., Du, B., Xu, B., 2016. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocoll.* 52, 275–288. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.07.003

### **3. Ontogenia del sistema inmunológico de *Lutjanus guttatus***

---

Publicado en:

Early and broad window of immunological susceptibility in the tropical marine fish *Lutjanus guttatus*. In process

### 3.1 Introducción

Las especies de teleósteos marinos con desarrollo ontogénico indirecto como lo es el pargo flamenco (*L. guttatus*) presentan una ventana de susceptibilidad inmunológica (Chase et al., 2008) que es cubierta por la respuesta innata. Los marcos son el agotamiento de la IgM transferida por la madre que es un momento muy próximo a la eclosión y al consumo de vitelo, y en el otro extremo de la ventana está el momento inicial de la maduración de la respuesta inmune (Figura 15). Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmune no específica de las larvas, como fagocitosis y producción de compuestos humorales, promovida por inmunoestimulantes, le confieren a la larva resistencia a un amplio espectro de patógenos. El pargo flamenco es de interés acuícola en el noroeste de México por sus cultivos a nivel piloto comercial, por lo tanto se conocen aspectos reproductivos y de larvicultura necesarios para la producción de juveniles (Ibarra Castro et al., 2012). Desafortunadamente, son frecuentes los episodios de mortalidades masivas durante etapas tempranas del desarrollo de pargo flamenco y comprometen la producción de juveniles. Afortunadamente, las estrategias de inmunoestimulación se han propuesto como un método potencial para mejorar la supervivencia y bienestar de larvas y juveniles de peces (Bricknell y Dalmo, 2005). Los elementos que se consideran primordiales para desarrollar una estrategia de este tipo son las características moleculares (ej. estructura y peso molecular) del agente inmunoestimulante (Meena et al., 2013) y las capacidades inmunológicas de los peces en determinada etapa de vida (Magnadóttir et al., 2006).

Durante etapas tempranas en el ciclo de vida de teleósteos se presentan diferentes patrones de desarrollo relacionados con el sistema inmunológico, como son los modelos hematológicos (Zapata et al., 2006), la aparición de órganos linfoides (Swain y Nayak, 2009) e inicio de la producción autóloga de IgM (Magnadóttir et al., 2005). Por tales razones, es relevante describir los patrones de desarrollos que presenta el sistema inmunológico del pargo flamenco para comprender sus mecanismos tempranos de defensa y hacer comparaciones con lo descrito en otras especies.

Además, el estudio del desarrollo del sistema inmune de teleósteos marinos durante las etapas críticas (por ej., los cambios de alimentación larvaria) reviste importancia debido a: (1) los peces teleósteos son un modelo biológico único para estudios sobre el desarrollo del sistema



inmune en especies de vertebrados debido que apartir de su escalon evolutivo se presenta la respuesta adaptativa; (2) en el estado larval sólo poseen respuesta innata lo cual es un criterio esencial para el estudio de inmunidad entrenada (Netea et al., 2016); (3) y el conocimiento sobre la secuencia del desarrollo de la función inmune y monitoreo de los cambios en la expresión de genes asociados a estos procesos biológicos permitirá diseñar medidas preventivas y profilácticas contra enfermedades. En este momento la posibilidad de aplicar herramientas de biología molecular en acuicultura es una realidad, estas herramientas pueden aportar importante información sobre la resistencia innata a enfermedades y proveer nuevos enfoques para mejorar la salud de peces en cultivo.

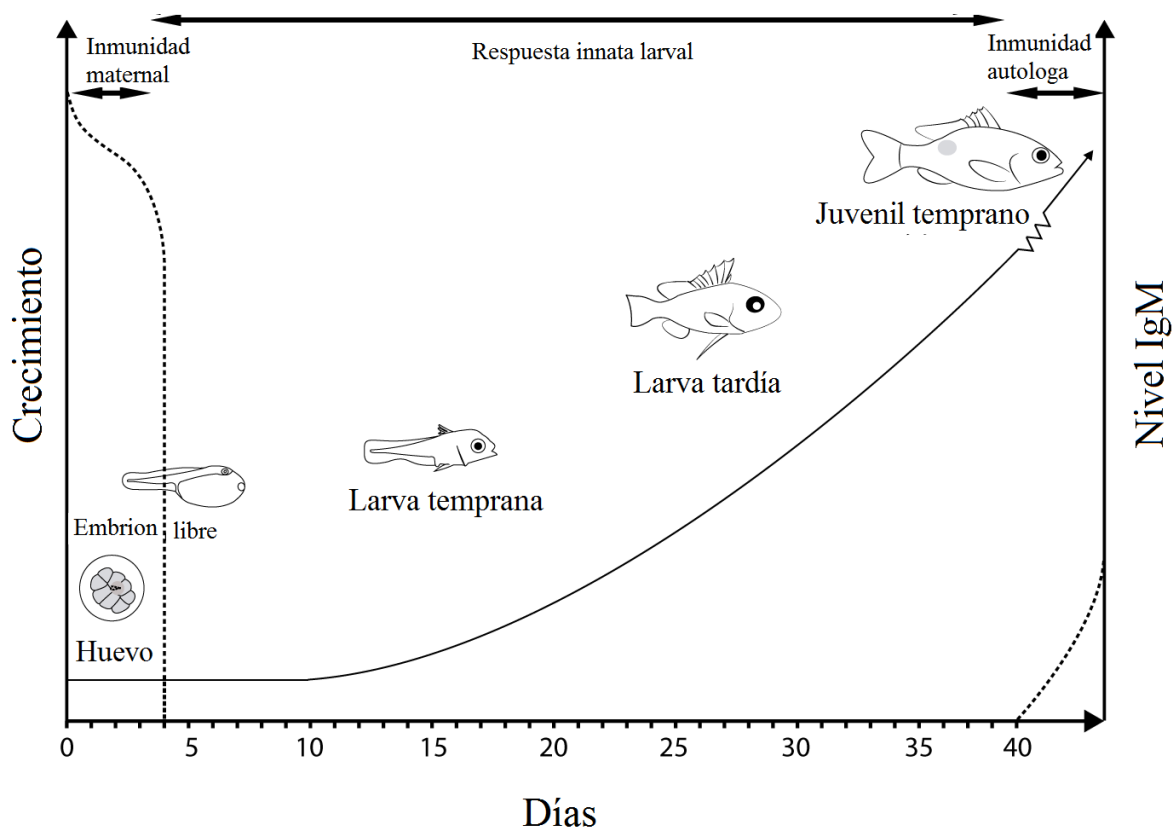


Figure 15.- Ventana de susceptibilidad inmunológica en peces marinos tropicales que presentan desarrollo ontogénico indirecto. Esquema elaborado con el apoyo del Dr. Juan Manuel Martínez Brown.

### **Inmunidad transferida maternalmente**

Los peces marinos de importancia acuícola comparten características reproductivas similares. Por ejemplo, se les denomina ovíparos (Kunz, 2004) porque desovan huevos pelágicos (Balon, 1990), y por la escasa cantidad de vitelo que presenta el huevo, se les clasifica como oligolecitos (Penaz, 2001), que deben sostener el desarrollo embrionario, por lo que típicamente presentan ontogenia indirecta (Balon, 2002). Generalmente, estos peces desovan más de una vez en la temporada reproductiva (desovadores seriales con desarrollo gonadal asincrónico) (Wallce y Selman, 1981). Los cigotos o huevos, posterior a la fertilización son sistemas libres y funcionalmente cerrados, por lo tanto, desde el punto de vista inmunológico, se supone que durante las etapas tempranas de vida (antes de la primera alimentación) de estos peces deben depender del suministro de moléculas inmunes maternas relevantes para la protección contra los patógenos antes de la parcial y/o plena maduración de su propio sistema inmunológico (Zhang et al., 2013). Esta forma de protección es conocida como transferencia de inmunidad materna (TIM).

En peces, diversos factores inmunitarios relevantes tanto innatos como adaptativos se transfieren de la hembra a la descendencia. De acuerdo con Zhang et al., (2013) estos factores transferidos incluyen inmunoglobulina M (IgM), lisosomas, lectinas, catelicidinas y componentes del complemento principal de histocompatibilidad; además recientemente se ha descubierto que las proteínas de la yema, fosvitina y lipovitelina, son factores maternalmente transferidos que actúan en la defensa de larvas de teleósteos contra patógenos. Por lo tanto, ante adversas condiciones en cautiverio, en peces teleósteos se considera que el estado de inmunidad de los progenitores contribuye de manera significativa en la protección de su descendencia. Por consiguiente, el mantenimiento de un nivel de inmunidad alto en los reproductores durante el proceso de espermatogénesis y ovogénesis es sumamente importante para reducir la mortalidad en estadios larval/post-larval a través de transferencia máxima/óptima de inmunidad materna (Swain y Nayak 2009).

Con frecuencia, el tema de TIM suele hacer referencia sólo a la herencia de inmunoglobulinas, como moléculas que proporcionan inmunidad pasiva (natural), ésta a diferencia de la inmunidad activa (inducida) sólo es transitoria y no genera memoria (Brambell, 1970).

Numerosos estudios sugieren actividad de la inmunoglobulina en huevos y larvas recién eclosionadas (Bly et al, 1986; Mor y Avtalion, 1990; Kawahara et al, 1993; Rombout et al., 1993; Manning, 1994; Kanlis et al., 1995; Lillehaug et al., 1996; Scapigliati et al., 1999; Picchiatti et al., 2004; Akbary et al., 2015), sin embargo, IgM es la única inmunoglobulina autóloga (producida por un organismo inmunológicamente maduro) que es transferida maternalmente y que ha sido registrada en teleósteos (Swain y Nayak, 2009; Zhang et al., 2013). IgM es generalmente transferida a la descendencia, ya sea como un producto reducido (Swain y Nayak 2009) o en forma monomérica (Fuda et al., 1992; Mor y Avtalion, 1990; Parker et al., 2012). De acuerdo con Magnadóttir et al., (2005), la primera vez que la IgM se expresa es en peces de 20 a 30 mm. Sin embargo, algunas especies no transfieren IgM, por ejemplo el bacalao del atlántico, *Godus morhua* (Magnadóttir et al., 2004). Por lo tanto, como la producción autóloga de inmunoglobulinas son ausentes o tardías (Schrøder et al., 1998), entonces reviste importancia generar conocimiento sobre el sistema inmune innato en etapas tempranas, en especial de especies marinas con importancia comercial (Magnadóttir et al., 2005; Magnadóttir, 2006).

Respecto a factores humorales innatos, los huevos de peces teleósteos basan su protección en sustancias inhibidoras de patógenos que tienen efectos antimicrobianos no específicos (Ingram, 1980; Yousif et al., 1994a; 1994b; Hanif et al., 2004); como las lisinas y aglutininas (Fletcher, 1982). Además, algunos trabajos de investigación reportaron la presencia de inhibidores de la proteasa (Choi et al., 2002; Yamashita y Konogaya, 1996), componentes del complemento como C3 (Magnadóttir et al., 2005), lisosomas (Yousif et al., 1991; 1994) y lectinas (Jung et al., 2003), las cuales promueven la activación de macrófagos. También se presentan factores humorales antivirales como interferones y proteína Mx (Ellis, 2001).

Con base en lo anterior, se han realizado investigaciones para conocer los mecanismos de la transferencia de inmunidad materna (Swain y Nayak 2009; Zhang et al. 2013). En hembras inmunizadas se ha obtenido un incremento significativo de niveles de IgM en huevos comparado con las hembras control (Mor y Avtalion, 1990; Sin et al., 1994; Oshima et al., 1996; Hanif et al., 2004; Akbary et al., 2015). La tabla 11 muestra investigaciones relacionados con TIM en peces marinos. A pesar del amplio acuerdo de la literatura que realiza la posibilidad de que las hembras de peces puedan ser vacunadas para proveer a sus

crías protección contra patógenos específicos, aún se cuestiona que la transferencia maternal confiera protección contra infecciones específicas (Kawahara et al., 1993; Sin et al., 1994; Lillehaug et al., 1996; Oshima et al., 1996).

Tabla 11.- Inmunización de huevos y embriones de peces marinos por inmunidad transferida maternalmente.

Especies	Inmunidad	Factor	Protección	Referencia
	---	IgM	Si	Kanlis et al. 1995
<i>Sparus aratus</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	IgM	Si	Hanif et al. 2004
<i>Pagrus major</i>	<i>Vibrio</i> sp	IgM	No	Tanaka et al. 1999
	---	IgM	Si	Kanlis et al. 1995
<i>Dicentrarchus labrax</i>	---	IgM	---	Scapigliati et al. 1999

Respecto a lo anterior, en los casos en los cuales se ha presentado la transferencia de inmunidad pero no se confiere la protección específica, el razonamiento de algunos autores es que probablemente la función principal de los anticuerpos maternos es proteger huevos y/o embriones contra transferencia vertical de ciertos patógenos sin especificidad, o que IgM materna puede ayudar a la activación de la fagocitosis o de vías del complemento principal de compatibilidad en primeras fases de desarrollo (Akbari et al., 2015). Por otra parte, está establecido que la IgM derivada maternalmente generalmente permanece por un corto tiempo, agotándose en la finalización del proceso de absorción del vitelo (Breuil et al., 1997), para terminar desapareciendo por completo a partir de etapas larvales (Takemura y Takano, 1997; Scapigliati et al., 1999). Por lo tanto, Magnadottir et al. (2005) propusieron que a IgM maternal se le debe atribuir un rol diferente o adicional, incluyendo una posible función como proteína nutricional del vitelo, lo anterior pudiera ser aplicado a la IgM vía TIM.

Sin embargo, Hanif et al. (2004) concluyeron que la vacunación de los reproductores de dorada (*Sparus aurata*) antes del desove puede servir para reducir la mortalidad temprana de larvas sometidas a un reto con un patógeno específico (*Photobacterium damsela*); reportaron la detección de inmunoglobulina al octavo día post eclosión, mientras que la descendencia

no inmunizada no presentó inmunoglobulina a partir del cuarto día post eclosión. No obstante, los autores señalan que aún se necesitan estudios adicionales sobre los mecanismos subyacentes a la transferencia de inmunidad y a la protección materna de la descendencia por ejemplo, el mecanismo de absorción de IgM y su almacenamiento dentro de los huevos (Picchietti et al., 2004). Adicionalmente, Mulero et al. (2007) menciona que son necesarios más estudios para determinar la contribución relativa de los componentes innatos o adaptativos a la protección. Además, se debe estudiar el efecto de factores relacionados con los reproductores, como edad, estado de madurez, comportamiento reproductivo y nutrición (micro y macro nutrientes), ya que pueden afectar la inmunidad de la descendencia. Además, otros factores que afectan a la inmunidad en etapas de vida temprana de teleósteos son los cambios estacionales como el fotoperiodo, temperatura, ambiente adverso de mantenimiento, condiciones de estrés por manejo, hacinamiento y contaminación del agua (Swain y Nayak 2009).

### **Desarrollo temprano de los órganos linfoides en peces marinos**

Se ha establecido que la secuencia general de aparición de órganos linfoides en peces marinos es riñón, bazo y timo (Mulero et al., 2007). Sin embargo, funcionalmente, el timo es el primer órgano en volverse linfoide seguido por el riñón y bazo (Bowden et al., 2005; Scapigliati et al., 1999). No obstante, es importante mencionar que la respuesta inmune adaptativa en teleósteos es filogenética y ontogenéticamente conservada (Mulero et al., 2007), pero la capacidad de desarrollar una respuesta de anticuerpos no se correlaciona necesariamente con la primera detección de células IgM positivas. Aunque lo anterior no se ha estudiado en muchas especies, en general se observa un lapso de tiempo entre la detección de IgM celular y la capacidad inmunológica completa tanto en especies de agua dulce como marinas (Magnadóttir et al., 2005; Petrie-Hanson y Ainsworth, 2001).

Tabla 12.- Aparición de órganos linfoides y primer detección de linfocitos en peces marinos

Especies	Riñón cefálico		Bazo		Timo		Referencias
	DPE						
	O	L	O	L	O	L	
<i>Pagrus major</i>	<1	31	3	36	11	22	Chantanachookhin et al. 1991
<i>Seriola quinqueradiata</i>	1	26	3	30	11	20	Chantanachookhin et al. 1991
<i>Paralichthys olivaceus</i>	7	28	8	30	10	21	Chantanachookhin et al. 1991
<i>Paralichthys olivaceus</i>	0		8		15		Liu et al. 2001
<i>Thunnus orientalis</i>	<1	7	2	>30	5	7	Watts et al. 2003
<i>Lates calcarifer</i>	2		2		2		Azad et al. 2009
<i>Poyprion oxygeneios</i>		6		16		20	Parker et al. 2012
<i>Gadus morhua</i>	0		5		28		Schroder et al 1998
<i>Scophthalmus maximus</i>	0		5-6		3-4		Padros & Crespo 1996
<i>Epinephelus bruneus</i>	<1	30	6	33	12	21	Kato et al. 2004
<i>Harpagifer antarticus</i>	1		3		3		O`neil 1989

DPE: Días post eclosión

L: Linfocitos

O: Órgano

### 3.2 Hipótesis

La inmunidad por transferencia materna dependiente de IgM es corta en el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* debido a su breve desarrollo embrionario, por lo que el inicio de la ventana de susceptibilidad inmunológica se presenta a la primera alimentación, momento en el que riñón y bazo tienen actividad inmunológica (no linfoides) evidenciada por su madurez estructural.

### 3.3 Objetivos

#### Objetivo general

Describir el desarrollo temprano del sistema inmune del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

### **Objetivos particulares**

- I. Describir el desarrollo temprano de los órganos linfoides del pargo flamenco
- II. Detectar IgM de transferencia materna en huevos fertilizados y embriones de pargo flamenco e identificar la primera expresión autóloga de IgM.

### **3.4 Materiales y métodos**

#### **Cultivo larvario**

Muestras de huevos, larvas y juveniles de pargo flamenco fueron obtenidos durante la temporada reproductiva 2017 (Abril-Junio) en la Planta de Peces Marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán. Se colectó un desove (70 ml) con huevos fertilizados con tamaño de  $782 \pm 23 \mu\text{m}$  de diámetro (gota de aceite,  $123 \pm 9.9 \mu\text{m}$ ), para ser incubados a densidad de 48 huevos por litro a  $27^\circ\text{C}$ .

El protocolo de cultivo desarrollado fue descrito por Ibarra-Castro et al. (2012), el cual consiste en técnica de “agua verde” (microalgas, *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp.) y co-alimentación, con ajustes mínimos; los rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) fueron suministrados desde el 2 día post eclosión (dpe), nauplios de *Artemia* sp. desde el 18 dpe y metanauplio de *Artemia* enriquecido desde el 23 dpe. Microdietas balanceadas (A2-B2, Otohime<sup>®</sup>) se suministraron desde el 20 dpe.

La cantidad de larvas por muestra varió dependiendo del tamaño de las mismas, 50 larvas diarias por muestra del 0-40 dpe; de 40 juveniles cada tercer día del 41-85 dpe y 20 juveniles cada cinco días del 90-100 dpe. Obteniendo dos grupos de muestras fijadas en paraformaldehído 4% para ser destinadas a los análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

#### **Crecimiento larvario**

Semanalmente se tomaron fotografías de embriones libres, larvas y juveniles de pargo flamenco con cámara Olympus DP27 de 5 megapíxeles adaptada al estereomicroscopio Olympus SZX16, para determinar longitud total (Lt) de las peces (n=25) con el paquete de análisis de imágenes SigmaScan Pro5.

### **Procesamiento histológico**

Se realizaron muestreos de larvas y juveniles para la descripción histológica de la aparición de órganos linfoides. El diseño de muestreo cubrió eventos importantes del desarrollo temprano (huevos fertilizados, embrión libre, larva y juvenil); por ejemplo huevo, eclosión (0 dpe), apertura de la boca (2 dpe), primer alimentación exógena con rotíferos (3 dpe), alimentación con metanauplios de *Artemia* (23 dpe), metamorfosis (30 dpe) y deshabitación alimentaria (40 dpe). Los análisis histológicos se realizaron a la moda de la muestra diaria y consistieron en técnicas convencionales de inclusión en parafina, cortes 5  $\mu\text{m}$  y de tinción hematoxilina-eosina (Sheehan y Hrapchak, 1980). Previamente, las muestras a partir del 20 dpe se descalcificaron utilizando la solución descrita por Luna (1968) con el objetivo de facilitar los cortes.

### **Procesamiento inmunohistiquímico**

Para identificar el momento en el cual se inicia la producción autóloga de IgM, y el órgano u órganos donde sucede; se obtuvieron muestras de larvas y juveniles, además de muestras de huevos fertilizados y al momento del consumo del vitelo para conocer el agotamiento de IgM transferida maternalmente. Las muestras se fijaron en paraformaldehído 4% y se seleccionó la moda de la muestra diaria para ser procesados. Posteriormente, en cortes 5  $\mu\text{m}$  teñidos con hematoxilina-eosina (Sheehan y Hrapchak, 1980), se realizaron pruebas de inmunohistoquímica para detectar la presencia y regionalización de IgM, utilizando el anticuerpo monoclonal anti IgM para peces generando en ratón (V53P3H2/B2, NOVUS) y un segundo anticuerpo anti IgG-HRP para ratón generado en conejo (SIGMA A9044). Ambos anticuerpos fueron aplicados en dilución 1:100 en PBS de acuerdo a la metodología descrita por Ventura-Juárez et al. (2003).

## **3.5 Resultados**

### **Crecimiento larval**

La Figura 16 muestra la tasa de crecimiento de las larvas en términos de longitud total, la primer medición se realizó 3 dpe, presentando una talla de  $2.8 \pm 0.08$  mm. Al final de la



etapa larval (35 dpe) se registró una talla de  $14.9 \pm 3.8$  mm. Se observó un incremento en la tasa de crecimiento seguido de la etapa de co-alimentación con metanauplios enriquecidos más microdieta balanceada (alrededor de los 23 dpe). Los valores de longitud total de las larvas se ajustaron al modelo de crecimiento exponencial ( $y = 7.8877e^{0.0253}$ ,  $R = 0.9278$ ).

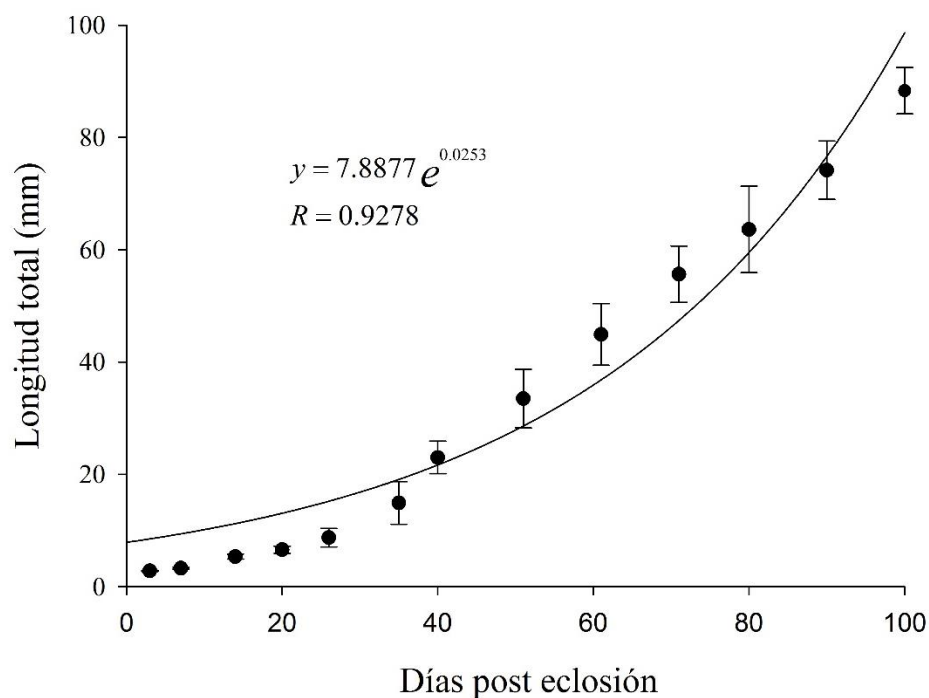


Figura 16.- Longitud total promedio (mm  $\pm$  DE, n=25) en el desarrollo temprano del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

En la figura 17 se muestran fotografías en fresco de eventos importantes en el desarrollo temprano del pargo flamenco. Particularmente, eventos relacionados con la respuesta inmunológica; I) se detectó el consumo del vitelo y por consecuencia el agotamiento de IgM maternal (2 dpe, 7.1 mm) II) estructura funcional del bazo (8 dpe, 8.3 mm) y III) producción de mucus y células globosas en el pliegue de la aleta (11 dpe, 9.7 mm).

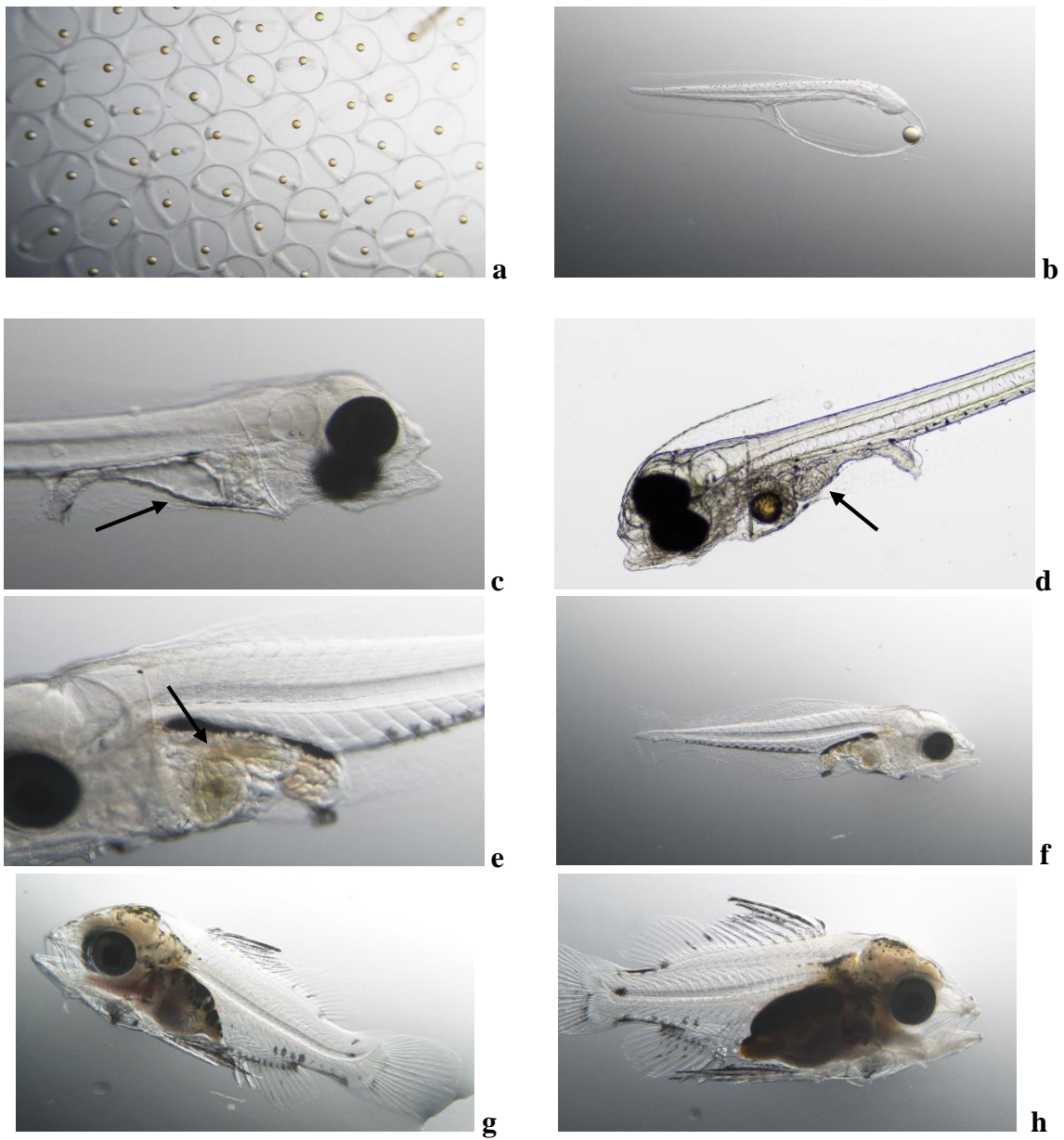


Figura 17.- Desarrollo temprano del pargo flamenco. a: embriones en somitogénesis 0 dpe. b: embrión libre 0 dpe. c: consumo de vitelo 2 dpe. d: primera alimentación 3 dpe. e: bazo 8 dpe. f: producción de mucus y células globosas en el pliegue de la aleta 11 dpe. g: alimentación nauplio de *Artemia* 20 dpe. h: alimentación metanauplio *Artemia* 26 dpe.

### **Desarrollo temprano de los órganos linfoides: riñón cefálico, bazo y timo**

El primer esbozo del riñón cefálico apareció como un simple tubo excretor a los 2 dpe (7.1 mm). Células indiferenciadas se notaron a los 3 dpe ( $2.80 \pm 0.08$  mm), entre los túbulos excretores del riñón cefálico. Se notó una gran cantidad de linfoblastos que se tiñeron oscuramente a los 6 dpe (8 mm) y en esta etapa, el número de túbulos fue mayor que los observados en etapa inicial. (Figura 18).

La primera evidencia de la aparición del bazo se registró a los 3 dpe ( $2.80 \pm 0.08$  mm). En esta etapa, el bazo apareció como un pequeño grupo de células hematopoyéticas teñidas de color oscuro. A los 8 dpe (8.3 mm), el bazo apareció con una cápsula distinta y con zonas de células teñidas de forma variable. El bazo completamente desarrollado (26 dpe,  $8.73 \pm 1.65$  mm) se caracterizó por la presencia de pulpa roja y blanca, y elipsoides (Figura 19).

El timo es un órgano pareado situado dorso-posterior en la cavidad orofaríngea en el ángulo entre el hueso opercular y la cabeza del pargo flamenco. El esbozo del timo apareció a los 9 dpe (8.9 mm) compuesto de varias células de aspecto linfoblasto oscuro. El timo a los 40 dpe ( $23.0 \pm 2.89$  mm) se observó con evidentes zonas de células claras y oscuras. Una capa delgada de epitelio, compuesta de muchas células mucosas, separó el timo de la cámara branquial. En esta etapa del desarrollo se observaron orgánulos con márgenes reticulares, similares a los del corpúsculo de Hassal. Las células mioides se notaron en el timo a 30 dpe (16.5 mm, Figura 20).

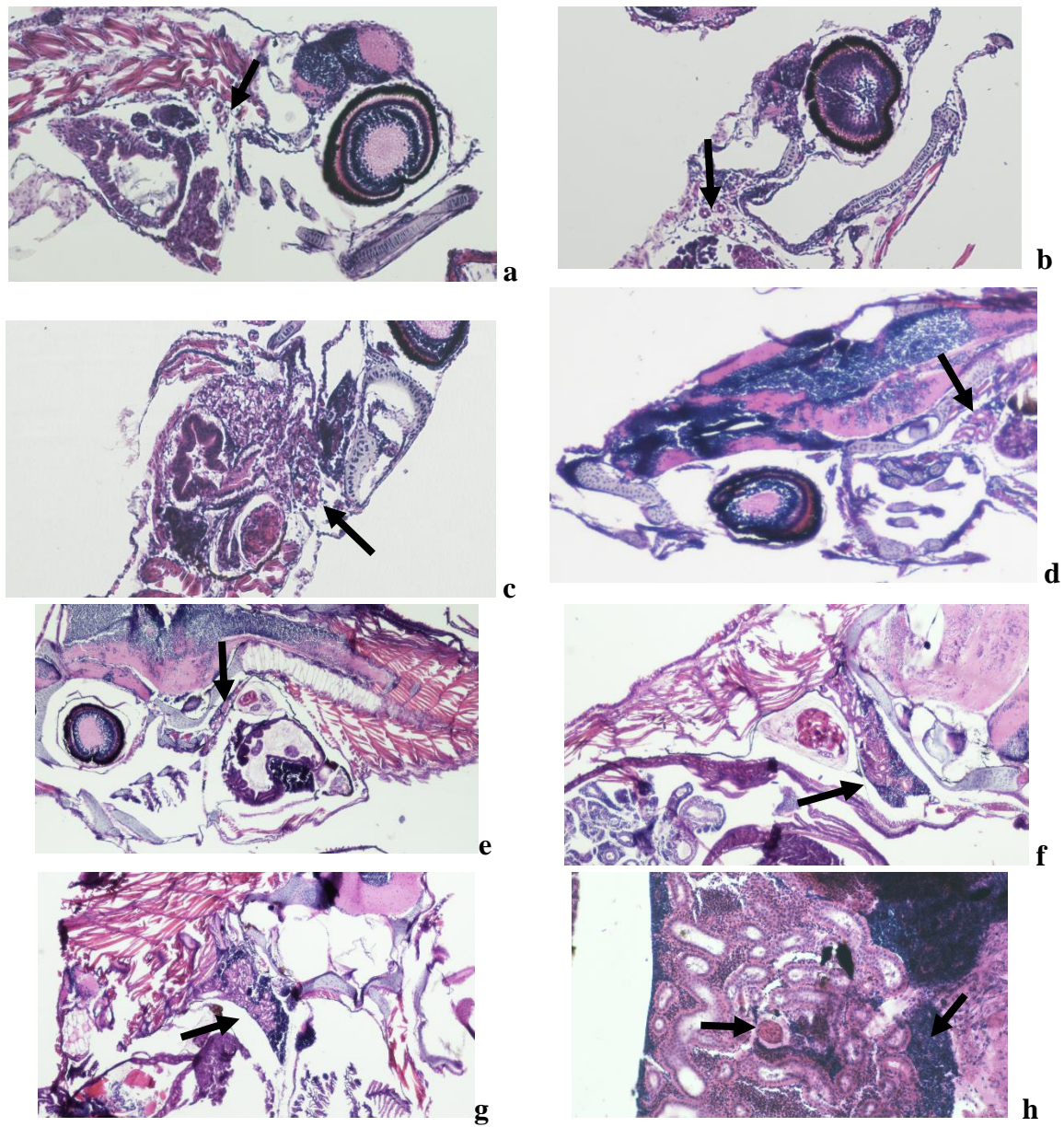


Figura 18.- Descripción histológica de la maduración estructural del riñón cefálico de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes longitudinales de 5  $\mu$ m, tinción H&E). a: 40x, 6 dpe. b: 40x, 8 dpe. c: vista ventral, 40x, 10 dpe. d: 40x, 12 dpe. e: 40x, 18 dpe. f: 40x, 25 dpe. g: 100x, 29 dpe. h: 100x, 40 dpe. Las flechas indican la ubicación del riñón cefálico.

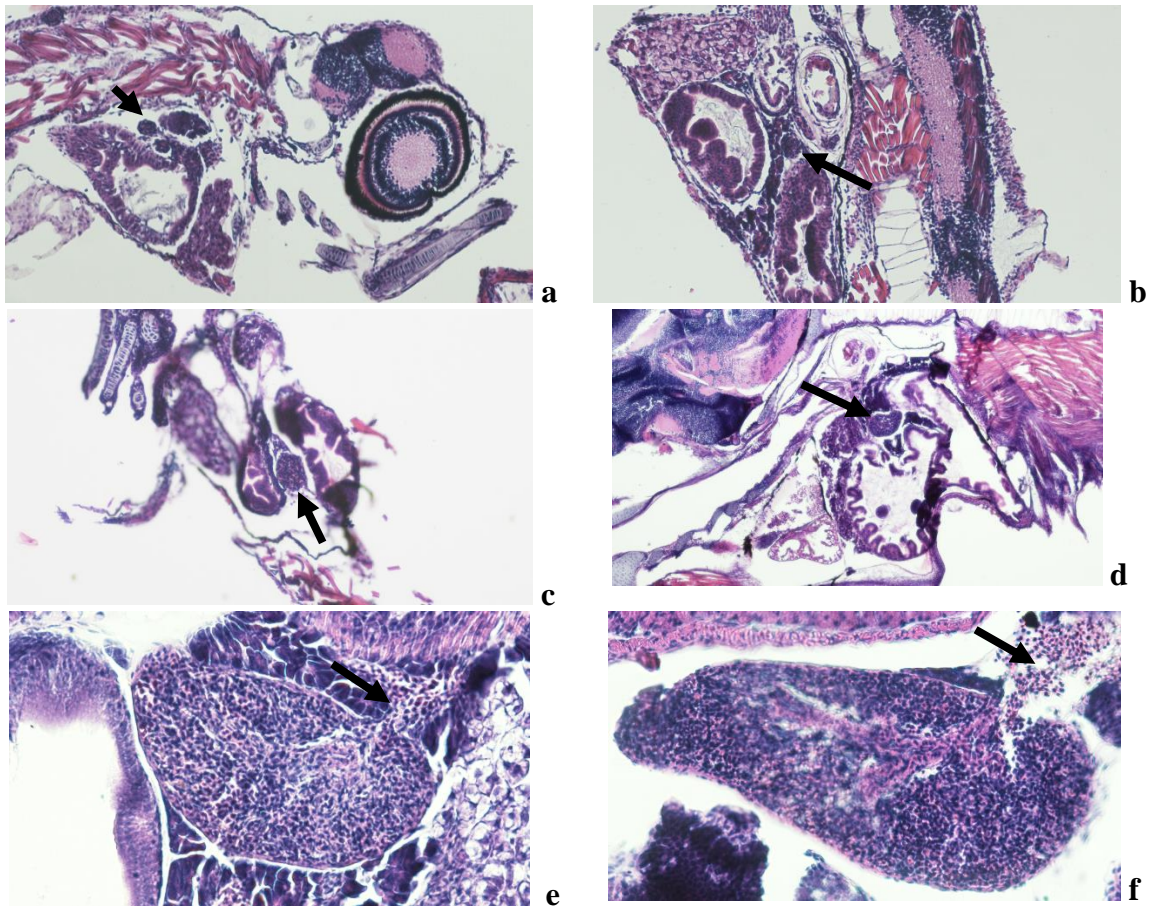


Figura 19.- Descripción histológica de la maduración estructural del bazo de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes longitudinales de 5  $\mu$ m, tinción H&E). a: 40x, 6 dpe. b: 40x, 8 dpe. c: 40x, 13 dpe. d: 40x, 12 dpe. e: 100x, 23 dpe. f: 100x, 32 dpe. Las flechas indican la ubicación del bazo.

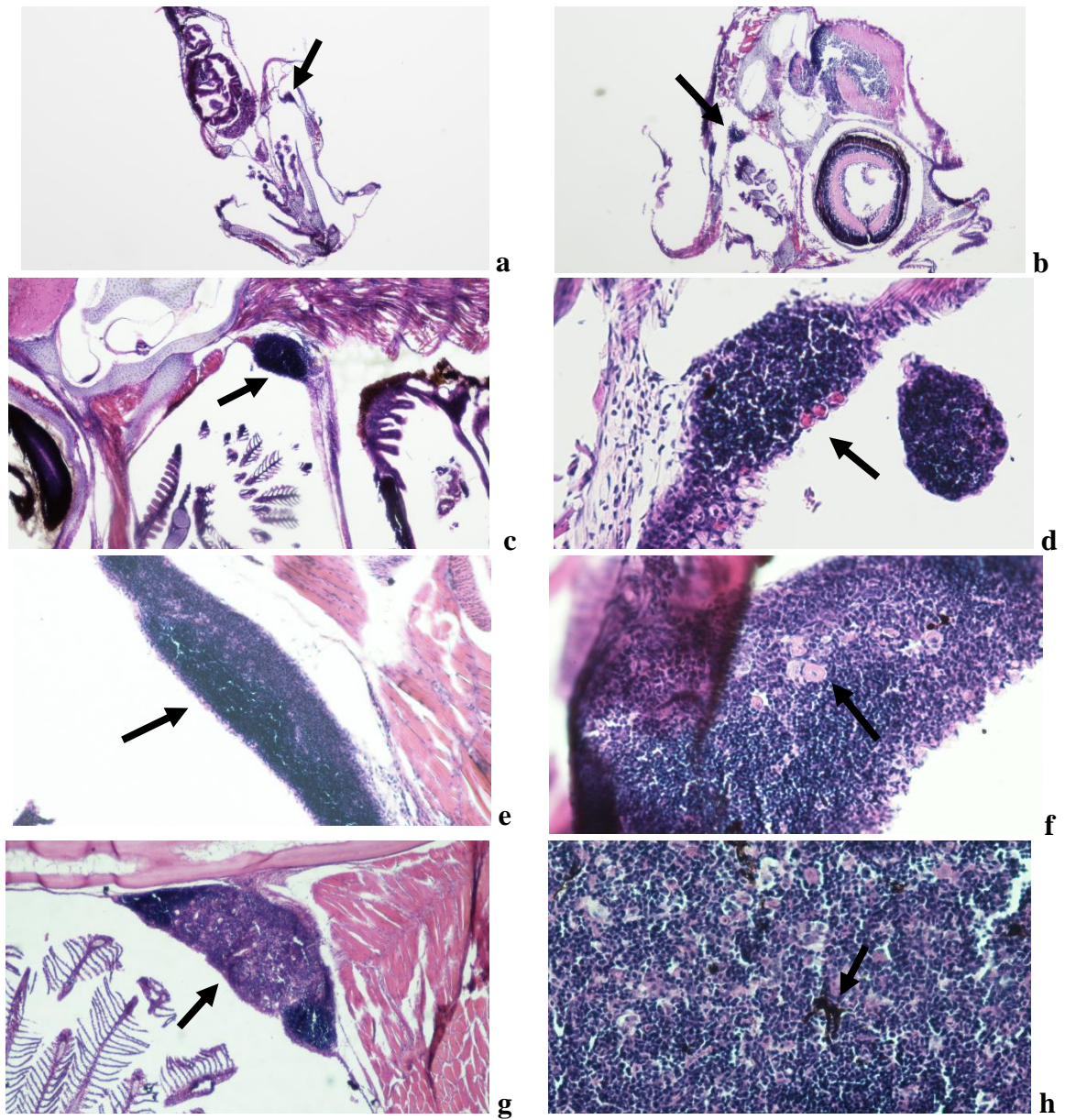


Figura 20.- Descripción histológica de la maduración estructural del timo de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes longitudinales de 5  $\mu$ m, tinción H&E). a: 40x, 13 dpe, b: 40x, 18 dpe, c: 40x, 32 dpe, d: 100x 12 dpe, e: 40x, 40 dpe, f: 100x, 51 dpe, g: 40x, 61 dpe, h: 100x, 71 dpe. Las flechas indican la ubicación del timo.

### Detección de IgM de transferencia materna e IgM autóloga

Se registró la detección de IgM de transferencia materna en huevos de pargo flamenco. IgM no fue detectada en larvas post consumo de vitelo (0 dpe). Por otra parte, la detección de producción autóloga de IgM se registró desde los 35 dpe ( $14.92 \pm 3.80$  mm), sin embargo, la detección representativa de IgM en riñón, hígado e intestino fue en juveniles de 40 dpe ( $23.0 \pm 2.89$  mm).

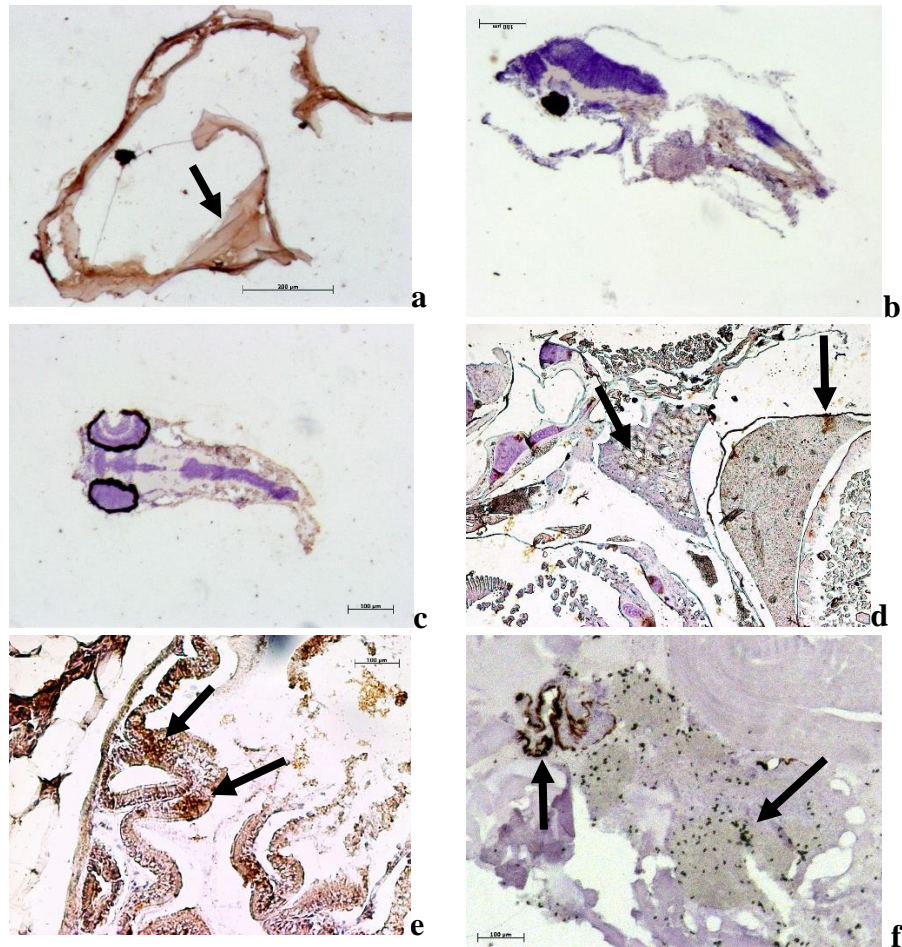


Figura 21.- Detección de IgM de transferencia materna y autóloga en etapas tempranas de pargo flamenco (fijación en PFA 4%, cortes 5 µm, tinción H&E). a: eclosión (detección positiva, 0 dpe), b: consumo de vitelo (detección negativa, 0 dpe), c: larva (detección negativa, 5 dpe), d: juvenil (detección positiva en riñón e hígado, 40 dpe), e: juvenil (detección positiva en intestino, 40 dpe), f: juvenil (detección positiva en zona oscura de timo, 100 dpe). Las flechas indican inmunodetección.

### 3.6 Discusión

El desarrollo temprano de los órganos linfoides de *Lutjanus guttatus* presenta una secuencia de aparición igual a la reportada en otros peces marinos (Mulero et al., 2007); es decir lo hacen en siguiente orden: riñón, bazo y timo. Además, el riñón cefálico y bazo aparecen durante la primer semana post eclosión ( $3.28 \pm 0.17$  mm) al igual que en otras especies de peces marinos, por ejemplo: *Pagrus major* (Chantanachookhin et al. 1991), *Seriola quinqueradiata* (Chantanachookhin et al. 1991), *Paralichthys olivaceus* (Liu et al. 2001), *Thunnus orientalis* (Watts et al. 2003), *Lates calcarifer* (Azad et al. 2009), *Gadus morhua* (Schroder et al 1998), *Scophthalmus maximus* (Padros & Crespo 1996), *Epinephelus bruneus* (Kato et al. 2004) y *Harpagifer antarcticus* (O`neil 1989; Ver tabla 12).

El esbozo del timo apareció a los 9 dpe (8.9 mm) y su aparición se evidenció desde la segunda semana post eclosión. En la tabla 12 se muestran reportes similares con otras especies de peces marinos. Sin embargo, el desarrollo estructural y funcional del timo del pargo flamenco fue más tardía que lo reportado en *Pagrus major* (Chantanachookhin et al. 1991), *Seriola quinqueradiata* (Chantanachookhin et al. 1991), *Paralichthys olivaceus* (Liu et al. 2001), *Thunnus orientalis* (Watts et al. 2003), *Lates calcarifer* (Azad et al. 2009), *Gadus morhua* (Schroder et al 1998), *Scophthalmus maximus* (Padros & Crespo 1996), *Epinephelus bruneus* (Kato et al. 2004) y *Harpagifer antarcticus* (O`neil 1989; Ver tabla 12). En general, en las especies anteriormente mencionadas, la detección de linfocitos positivos a anticuerpos se presentó partir del 20 dpe, mientras que en pargo flamenco se detectó la producción autóloga de IgM en timo a partir del día 35 dpe ( $14.92 \pm 3.80$  mm) y fue hasta el día 40 dpe ( $23.0 \pm 2.89$  mm) que se evidencía una detección representativa de IgM en riñón, hígado e intestino. El desarrollo del sistema inmunológico es más relacionado con la talla del pez que con su edad (Mulero et al. 2007), por lo tanto los resultados presentados difieren de lo mencionado por Magnadottir et al., (2005), quienes señalaron que la primera vez que se expresa IgM es en peces de 20 a 30 mm.

En mamíferos, la teoría de la "ventana de susceptibilidad" se define como los períodos en los que los organismos son mayormente propensos a enfermedades debido a diversos factores. Por ejemplo, la ventana de susceptibilidad de neonatos es el periodo en el cual el nivel de



anticuerpos ya no es suficiente para protegerse de una infección natural, pero es lo suficientemente alto como para interactuar con la vacunación (Chase et al., 2008).

Respecto a peces con desarrollo ontogénico indirecto, es evidente que existe una *ventana de susceptibilidad inmunológica* durante la etapa larval y que puede darse el caso que cubrir hasta la etapa de juvenil temprana en varias especies. Por ejemplo, el pargo flamenco presenta una ventana de susceptibilidad inmunológica que es cubierta por la respuesta innata. Los marcos de la ventana son el agotamiento de los anticuerpos transferidos por la madre que es un momento muy próximo a la eclosión y el consumo del vitelo (2 dpe, < 2.80 mm), y en el otro extremo de la ventana está el momento inicial de la maduración de la respuesta inmune representada por la producción autóloga de anticuerpos (35 dpe,  $14.92 \pm 3.80$  mm). Esta última etapa de la ventana de susceptibilidad (35-40 dpe, 15-23 mm) puede ser considerada apropiado en la plenación de los futuros programas de vacunación para el pargo lunarejo, teniendo en cuenta que se desea vacunar lo más pronto posible.

Sin embargo, antes de que se pueda vacunar a juveniles del pargo flamenco en cultivo, es posible que la maduración estructural y funcional (no linfoide) temprana del riñón cefálico y bazo en la etapa larval puedan generar una respuesta inmunológica innata por administración de inmunoestimulantes (Bricknell y Dalmo, 2005) desde la primera semana post eclosión; que coincide con el incremento de consumo de rotíferos que pueden ser utilizados como bioencapsuladores de agentes inmunoestimulantes.

### **3.7 Conclusión**

Se confirmó que la inmunidad por transferencia materna dependiente de IgM es corta en el pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, por lo que presenta una ventana de susceptibilidad inmunológica larvaria que es cubierta por la respuesta innata. La última etapa de la ventana de susceptibilidad inmunológica (35-40 dpe, 15-23 mm) puede ser considerada apropiada en la planeación de los futuros programas de vacunación para esta especie.

### 3.8 Referencias

- Akbary, P., Mirvaghefi, A.R., Akhlaghi, M., Amiri, B.M., 2015. The effects of letrozole in transfer of maternal immunity against lactococcosis to eggs and larvae in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum ). *Food Nutr. Sci.* 6, 254–264.
- Azad, I.S., Thirunavukkarasu, A.R., Kailasam, M., Subburaj, R., 2009. Ontogeny of Lymphoid Organs in the Asian Sea Bass ( *Lates calcarifer* , Bloch ). *Asian Fish. Sci.* 22, 901–913.
- Balon, E.K., 2002. Reminiscing Briefly about Environmental Biology of Fishes [1976-2002]. *Environ. Biol. Fishes* 367–371.
- Balon, E.K., 1990. Epigenesis of an Epigeneticist: the Development of Some Alternative Concepts on the Early Ontogeny and Evolution of Fishes. *Guelph Ichthyol. Rev.* 1–42.
- Bly, J.E., Grimm, A.S., Morris, I.G., 1986. Transfer of passive immunity from mother to young in a teleost fish: haemagglutinating activity in the serum and eggs of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol. A* 309–313.
- Bowden, T., Cook, P., Rombout, J., 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 413–427. doi:10.1016/j.fsi.2005.02.003
- Brambell, F.W.R., 1970. Transmission of immunity in birds, in: Neuberger, A., Tatum, E.L. (Eds.), *The Transmission of Passive Immunity From Mother to Young*. Elsevier, New York, pp. 20–41.
- Breuil, G., 1997. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* 7, 29–43. doi:10.1006/fsim.1996.0061
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 457–472. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.008
- Chantanachookhin, C., Seikai, T., Tanaka, M., 1991. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture* 99, 143–155. doi:10.1016/0044-8486(91)90294-H
- Chase, C.C.L., Hurley, D.J., Reber, A.J., 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 24, 87–104. doi:10.1016/j.cvfa.2007.11.001
- Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 827–839. doi:10.1016/S0145-305X(01)00038-6
- Fuda, H., Hara, A., Yamazaki, F., Kobayashi, K., 1992. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Dev. Comp. Immunol.* 16, 415–423.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Dimitriadis, G.J., 2004. Maternal transfer of humoral specific

- and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 411–435. doi:10.1016/j.fsi.2004.04.013
- Ibarra-Castro, L., Muñoz-Meza, L.E., Álvarez-Lajonchère, L., 2012. Estudios sobre el manejo e incubación de huevos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Pisces, Lutjanidae). *Hidrobiologica* 22, 49–57.
- Ingram, G.A., 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection—A review. *J. Fish Biol.* 16, 23–60. doi:doi:10.1111/j.1095-8649.1980.tb03685.x
- Jung, W.K., Park, P.J., Kim, S.K., 2003. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 255–265. doi:10.1016/S1357-2725(02)00176-0
- Kanlis, G., Suzuki, Y., Tauchi, M., Numata, T., Shirojo, Y., Kawano, K., 1995. Immunoglobulin concentration and specific antibody activity in oocytes and eggs of immunized red sea bream. *Fish. Sci.* 61, 791–795.
- Kato, K., Ishimaru, K., Sawada, Y., Mutsuro, J., Miyashita, S., Murata, O., Kumai, H., 2004. Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory. *Fish. Sci.* 70, 1061–1069. doi:10.1111/j.1444-2906.2004.00906.x
- Kawahara, E., Inarimori, T., Urano, K., Nomura, S., Takahashi, Y., 1993. Transfer of maternal immunity of white spotted char *Salvelinus leucomaenis*. against furunculosis. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 567.
- Kunz, Y.W., 2004. *Developmental biology of teleost fishes*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 9–21. doi:10.1007/978-1-4020-2997-4\_2
- Lillehaug, A., Sevatdal, S., Endal, T., 1996. Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry against yersiniosis. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 521–535. doi:10.1006/fsim.1996.0049
- Luna, L.G., 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3er ed. New York.
- Magnadóttir, B., Gudmundsdóttir, B.K., Lange, S., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Bowden, T., Bricknell, I., Dalmo, R.A., Gudmundsdóttir, S., 2006. Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Dis.* 29, 147–155. doi:10.1111/j.1365-2761.2006.00701.x
- Magnadóttir, B., Lange, S., Gudmundsdóttir, S., Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 429–439. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.010
- Magnadóttir, B., Lange, S., Steinarsson, A., Gudmundsdóttir, S., 2004. The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 217–224. doi:10.1016/j.cbpc.2004.07.009

- Manning, M.J., 1994. Fishes, in: Turner, R.J. (Ed.), *Immunology: A Comparative Approach*. Wiley, Chichester, pp. 69–100.
- Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, a. K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, a. K., Mukherjee, S.C., 2013. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 39, 431–457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5
- Mor, A., Avtalion, R.R., 1990. Transfer of antibody activity from immunised mother to embryos in tilapias. *J. Fish Biol.* 249–255.
- Mulero, I., García-Ayala, A., Meseguer, J., Mulero, V., 2007. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture* 268, 244–250. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.046
- Netea, M., Quintin, J., van der Meer, J., 2016. Trained Immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. doi:10.1016/j.chom.2011.04.006
- Oshima, S.I., Hata, J.I., Segawa, C., Yamashita, S., 1996. Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious haematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout. *J. Gen. Virol.* 77, 2441–2445. doi:10.1099/0022-1317-77-10-2441
- Parker, S., La Flamme, A., Salinas, I., 2012. The ontogeny of New Zealand groper (*Polyprion oxygeneios*) lymphoid organs and IgM. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 215–223. doi:10.1016/j.dci.2012.06.007
- Penaz, M., 2001. A general framework of fish ontology: A review of the ongoing debate. *Folia Zool* 241–256.
- Petrie-Hanson, L., Ainsworth, A.J., 2001. Ontogeny of channel catfish lymphoid organs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 113–127. doi:10.1016/S0165-2427(01)00331-2
- Picchietti, S., Taddei, A.R., Scapigliati, G., Buonocore, F., Fausto, A.M., Romano, N., Mazzini, M., Mastrolia, L., Abelli, L., 2004. Immunoglobulin protein and gene transcripts in ovarian follicles throughout oogenesis in the teleost *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Res.* 315, 259–270. doi:10.1007/s00441-003-0819-9
- Rombout, J., Taverne-Thiele, J., Villena, M., 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical study. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 55–66.
- Scapigliati, G., Romano, N., Abelli, L., 1999. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture* 172, 3–28. doi:10.1016/S0044-8486(98)00440-2
- Schrøder, M.B., Villena, a J., Jørgensen, T.O., 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 22, 507–17. doi:S0145-305X(98)00030-5 [pii]
- Sheehan, D.C., Hrapchak, B.B., 1980. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd ed. The

CV Mosby Company, St Louis.

- Sin, Y.M., Ling, K.H., Lam, T.J., 1994. Passive transfer of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapias, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 120, 229–237. doi:10.1016/0044-8486(94)90081-7
- Swain, P., Nayak, S.K., 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 89–99. doi:10.1016/j.fsi.2009.04.008
- Tanaka, T., Furukawa, K., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Transfer of maternal antibody from mother to egg may have no protective meaning for larvae of red sea bream *Pagrus major*, a marine teleost. *Fish. Sci.* 65, 240–243.
- Ventura-Juárez, J., Jarillo-Luna, R.A., Fuentes-Aguilar, E., Pineda-Vázquez, A., Fernández, L., Madrid-Reyes, J.I., Campos-Rodríguez, R., 2003. Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol.* 25, 503–511. doi:10.1111/j.1365-3024.2003.00661.x
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21, 325–343.
- Watts, M., Kato, K., Munday, B.L., Burke, C.M., 2003. Ontogeny of immune system organs in northern bluefin tuna (*Thunnus orientalis*, Temminck and Schlegel 1844). *Aquac. Res.* 34, 13–21. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00779.x
- Yousif, an, Albright, L., Evelyn, T., 1991. Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Organ.* 10, 45–49. doi:10.3354/dao010045
- Yousif, A., Albright, L., Evelyn, T., 1994. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Organ.* 19, 15–19. doi:10.3354/dao019015
- Zapata, a., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-De Frías, C., Cortés, a., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 126–136. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.005
- Zhang, S., Wang, Z., Wang, H., 2013. Maternal immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 72–78. doi:10.1016/j.dci.2012.02.009

**4. Expresión de genes involucrados en la  
respuesta inmunitaria de larvas de  
*Lutjanus guttatus* por  
inmunoestimulación de diferentes tipos  
de  $\beta$ -glucanos en términos de  
inmunidad entrenada**

---

Publicado en:

Immunostimulation of *Lutjanus guttatus* larvae in terms of trained immunity. In process.

#### **4.1 Introducción**

Los agentes inmunoestimulantes aumentan la resistencia de los peces a las enfermedades infecciosas, no por mejorar su respuesta inmune específica, sino por la mejora de los mecanismos de defensa no específicos. No obstante, se ha considerado que en la respuesta innata no existe un componente de memoria (Sakai, 1999) y probablemente sea de corta duración (Bricknell y Dalmo, 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto la teoría de que existe un tipo de memoria no específica y de mediana duración. Netea et al. (2011) enfatizan que la definición de memoria utilizada en el contexto de respuesta no específica es diferente a la memoria inmunológica adaptativa clásica, la cual implica un alto grado de especificidad y amplificación. Por consiguiente, la memoria no específica la definen como una respuesta aumentada a una infección secundaria que se puede ejercer tanto hacia el mismo microorganismo como a otro diferente (protección cruzada). Este tipo de respuesta inmune no puede definirse como innata (ya que se induce secundariamente en los hospedadores que han encontrado previamente una infección primaria) o adaptativa (ya que esto implica la especificidad dada por la diversificación somática, por ejemplo, en respuestas de células T/B). Por lo tanto, Netea et al. (2011) propusieron el término "Inmunidad Entrenada" (Trained Immunity) para describir este tipo de reacción inmune cuando se produce una segunda infección.

La inmunidad entrenada se origina como consecuencia de que la respuesta innata puede variar ante diferentes agentes infecciosos dependiendo del tipo de interacción entre patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) con receptores de reconocimiento de patrón (Pattern Recognition Receptors, PRR) (Takeda y Akira, 2004). En inmunología de plantas, es un hecho aceptado que las respuestas inmunes innatas muestran características de memoria después del primer encuentro con un patógeno (*efecto de entrenamiento*), y se sugiere fuertemente que también exista en invertebrados (Arala-Chaves y Sequeira, 2000), aunque esta suposición todavía está por establecerse en inmunología de los vertebrados; observaciones bien documentadas proporcionan pistas de que tal vez sea el caso (Netea et al., 2011). En el revisado de Kurtz (2005) se presenta un número creciente de estudios que demuestran una mayor resistencia a las infecciones secundarias inducidas por un primer encuentro con un patógeno. Sin embargo, un conjunto

aún más intrigante de estudios demuestran una clara especificidad para el tipo de infección para la que se confiere la protección. Por ejemplo en el revisado de Petit y Wiegertjes (2016) mencionan que los  $\beta$ -glucanos son potentes inductores de inmunidad entrenada en monocitos de mamíferos, y al examinar literatura encontraron indicios de este fenómeno en peces; reportaron que los efectos de  $\beta$ -glucanos en peces inmunológicamente maduros cumplen con al menos uno de los tres criterios básicos de inmunidad entrenada y que es posible que dichos efectos sean de larga duración.

La inmunidad entrenada tiene una serie de características distintivas (Netea et al., 2011) que pueden ser evaluadas en larvas de peces para entender los mecanismos que la regulan, y su importancia en el salto evolutivo del sistema inmunológico en vertebrados. Dichas características, bases moleculares y ejemplos en acuicultura se describen en introducción general.

### **Bioencapsulación**

La incorporación de medicamentos y/o elementos nutricionales en el alimento vivo denominado bioencapsulación (Imelda, 2013; Robles et al., 1997) es el método más adecuado para terapias en larvicultura, (Duis et al., 1995; Verpraet et al., 1992). Esta técnica ofrece: dosificación regulada de agentes quimioterapéuticos, como son vacunas e inmunoestimulantes; minimiza los riesgos de lixiviación de los medicamentos en el ambiente; no provoca estrés y permite hacer el tratamiento en masa de los organismos de cualquier tamaño (Robles et al., 1997).

En cuanto a larvas de peces marinos, éstas dependen de organismos vivos para su alimentación, los dos más importantes por su uso frecuente en acuicultura son rotíferos (*Brachionus* sp.) y *Artemia franciscana*. Ambos son organismos filtradores (Imelda, 2013) por lo que su valor nutricional como alimento vivo depende directamente de los elementos nutricionales de su medio (Lubzens, 1987; Nhu, 2004) y suelen carecer de importantes nutrientes (Owen et al., 1975; Kissil y Koven, 1990). Por tal razón, antes de ser suministrados a las larvas, los rotíferos y *Artemia* deben ser enriquecidos con vitaminas (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Brown, 1997), proteínas (Oie y Olsen, 1997) y ácidos grasos insaturados (Dhert et al., 2001; Lubzens et al., 2001; Lim et al., 2003); a través de emulsiones de lípidos



en el agua (Dhert y Sorgeloos, 1995). Actualmente, esta técnica es una práctica común y también sirve para proporcionar ingredientes específicos a los cultivos larvarios como son medicamentos y/o tratamientos con probióticos e inmuneestimulantes (Robles et al., 1997).

## **4.2 Hipótesis**

Los  $\beta$ -glucanos administrados oralmente por bioencapsulación a larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* activarán el sistema inmune innato, influyendo en la expresión de genes relacionados a la producción de citocinas pro-inflamatorias.

## **4.3 Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunitaria de larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* asociados a la inmunoestimulación por diferentes tipos de  $\beta$ -glucanos (administrados oralmente por bioencapsulación) en términos de inmunidad entrenada.

### **Objetivos particulares**

- I. Obtener  $\beta$ -glucanos desde *Nannochloropsis oculata* y su bioencapsulación por rotíferos.
- II. Inmunoestimulación de larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* por diferentes  $\beta$ -glucanos en términos de inmunidad entrenada.
- III. Expresión génica asociada a la respuesta inmunitaria de larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* por inmunoestimulación de diferentes  $\beta$ -glucanos en términos de inmunidad entrenada.

## 4.4 Materiales y métodos

### $\beta$ -glucanos microalgales y de levaduras

En el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos y Cultivos de Apoyo para la Acuicultura, de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa se generó un extracto crudo de carbohidratos desde la microalga *Nannochloropsis oculata*, cepa CIB76 (Figura 22) que pertenece a la colección de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Baja California Sur, México. De acuerdo con Rojo-Cebreros et al. (2017) ésta cepa presenta 23 % de su composición orgánica total como carbohidratos, de los cuales más del 91 % son  $\beta$ -glucanos.

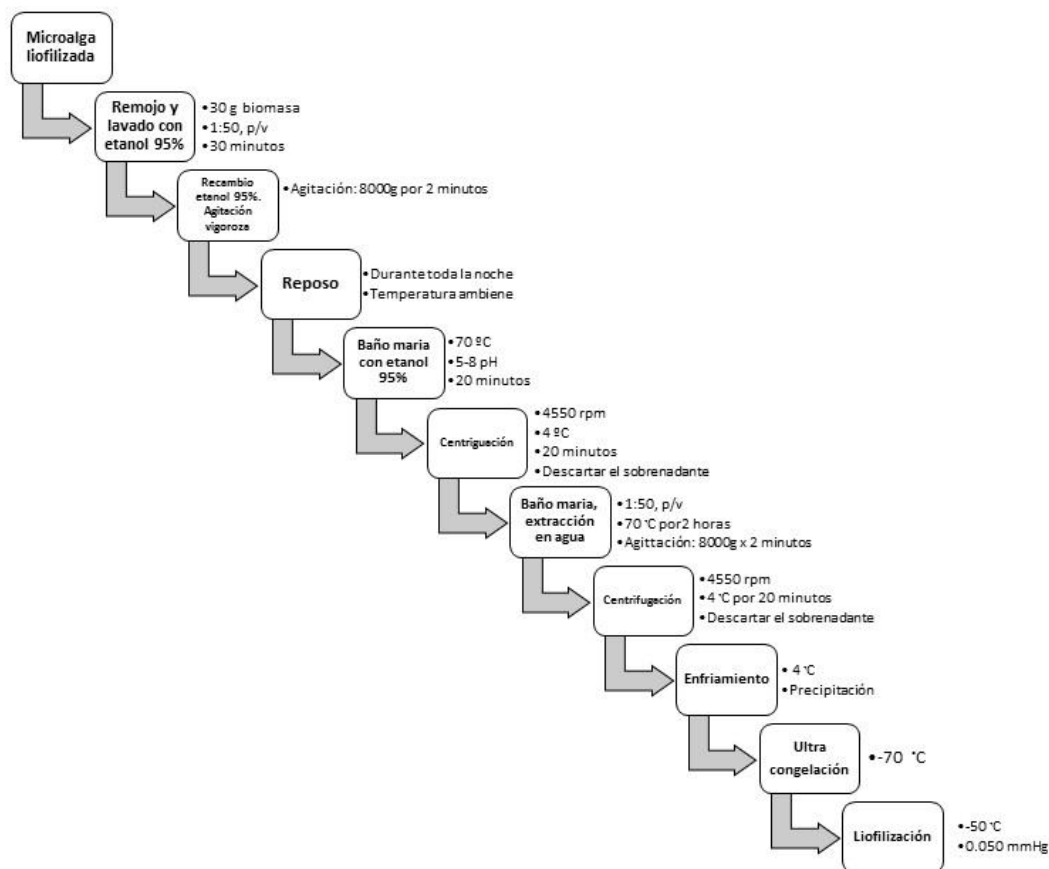


Figura 22.- Protocolo de producción de  $\beta$ -glucanos desde *Nannochloropsis oculata*.

Respecto a los  $\beta$ -glucanos de levaduras (zymosan), aislados de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* fueron amablemente donados por el Dr. Jorge Fonseca Madrigal del Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal (LANMDA), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### **Microencapsulación en inmersión**

Los dos tipos de  $\beta$ -glucanos se microencapsularon en alginato mediante la técnica denominada microencapsulación en emulsión, la cual se define como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa constó de la matriz que incluyó a los  $\beta$ -glucanos (Champagne y Fustier, 2007). La gelificación fue externa y se realizó dispersando la mezcla de  $\beta$ -glucanos-alginato (1.5:7) en la emulsión enriquecedora de rotíferos (DHA protein Selco<sup>®</sup>), seguido de la adición de una fuente de calcio al 2 % que al difundirse a la fase dispersa inició la gelificación permitiendo la microencapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas.

### **Bioencapsulación por rotíferos**

Las microcápsulas generadas fueron bioencapsuladas por rotíferos *Brachionus* sp. (tipo S, 140 y 110  $\mu\text{m}$ , de largo y ancho de lóricas) de acuerdo al protocolo descrito por Skjermo et al. (2006), que consiste en que los  $\beta$ -glucanos protegidos en microencapsulación de alginato son administrados a dosis de 0.5 g l<sup>-1</sup> con densidad de 500 rot ml<sup>-1</sup>. Para lograr dosis de 50-150 ng larva<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (Skjermo y Vadstein, 1999).

### **Cultivo larvario y diseño experimental**

Se desarrolló un cultivo larvario del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* de acuerdo al protocolo de la Planta de Peces Marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán; descrito por Ibarra-Castro et al. (2012). Partiendo de la colecta de un desove (350 ml) con huevos fertilizados con tamaño de  $768. \pm 22.4 \mu\text{m}$  de diámetro (gota de aceite,  $130.5 \pm 9.1 \mu\text{m}$ ), para ser incubados a densidad de 260 huevos por litro a  $27.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $5 \pm 1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de oxígeno. Se realizaron pruebas de eclosión (13 horas post eclosión) y supervivencia a la primera alimentación (60 horas post eclosión). En la

primera prueba se cuantificaron los huevos no eclosionados y los embriones libres, y en la segunda se cuantificaron las larvas vivas y muertas; en ambos casos se los resultados se expresaron en porcentajes (60 organismos L<sup>-1</sup>, n=3).

El protocolo concistió en la técnica de “*agua verde*” (microalgas, *Nannochloropsis* sp. ~40 x10<sup>3</sup> cél·ml<sup>-1</sup> e *Isochrysis* sp. ~20 x10<sup>3</sup> cél·ml<sup>-1</sup>) pero con ajustes requeridos por el diseño experimental. Por ejemplo, durante todo el experimento sólo se utilizó el rotífero *Brachionus* sp. para alimentar e inmunoestimular a las larvas, se suministraron del 2 al 25 dpe. Cada día de cultivo y dos veces por día (mañana y tarde) se registraron los rotíferos en las unidades experimentales, para hacer los ajustes diarios en el suministro de los mismos, en especial previo a la administración de rotíferos enriquecidos con inmunoestimulantes. Lo anterior fue complementado con índices de ingesta realizadas realizados el 5 y 7 dpe.

El día de la administración de β-glucanos se tomaron fotografías de las larvas con la cámara Olympus DP27 de 5 megapíxeles adaptada al estereomicroscopio Olympus SZX16, para determinar longitud total (Lt) de las peces (n=25) con el paquete de análisis de imágenes SigmaScan Pro5.

El diseño experimental consistió en un control y dos tratamientos. Control: protocolo usado en el cultivo larvario de esta especie. Tratamiento 1: mismo protocolo pero con rotíferos enriquecidos con β-glucanos extraídos de levaduras. Tratamiento 2: rotíferos enriquecidos con β-glucanos de microalga. Control y tratamientos se realizaron por triplicado (n=9) en unidades experimentales con capacidad máxima de 600 litros, mientras que el volumen de cultivo incrementó de 300 a 500 litros conforme el desarrollo del cultivo.

La administración de los β-glucanos fué pulsátil (Bricknel and Dalmo, 2005), la primer administración se hizo el 9 dpe posteriormente a efectos de reproducción y primera alimentación, además de ser el inicio del consumo masivo de rotíferos y la segunda administración fue el 16 dpe, después de una semana de reposo a la primera administración, como criterio de Inmunidad Entrenada (Van der Meer et al., 2015).

### **Análisis de expresión genica**

Fueron muestreadas larvas diariamente para expresión de genes (20 larvas por unidad experimental), en especial 24 horas posteriores a la primera inmunoestimulación (10 dpe), 24

horas posterior a la segunda inmuoestimulación (17 dpe) y 6 días después de la segunda inmuoestimulación para evaluar la permanencia del efecto de inmuoestimulación y presencia de inmunidad entrenada.

El RNA total fue extraído de larvas completas con Trizol (Invitrogen) con condiciones establecidas por el fabricante. Para eliminar cualquier contaminación por DNA genómico, las muestras de RNA se trataron con DNAsa I (Promega). Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de cDNA, utilizando random primers, RNAsin y M-MLV (transcriptasa reversa).

Para el diseño de oligos (primers) se emplearon secuencias del transcriptoma de *L. guttatus* (Escalante-Rojas et al., 2018) para los correspondientes transcritos (Anexo I), diseñándose un set de primers sentido y antisentido con el programa PRIMER 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Todos los primers diseñados fueron sintetizados por ADN SINTETICO SA PI de CV (Tabla 13).

Tabla 13. Secuencia de los oligos utilizados en el estudio.

Gen	Abrev.	Número. de contig <sup>1</sup>	Producto (Pb)	Secuencia del oligo (5'-3')
Interleucina-1 $\beta$	IL-1 $\beta$	TRINITY_DN55785_c0_g1_i3	181	AGACCGTGGTGAACCTCATC CGCATAGGTCCCCTCCTGTA
Interleucina-6	IL-6	TRINITY_DN112951_c0_g1_i1	143	GAGGCAATCAGAGGCCATAA GCAAACCTGCGGAGATAAGC
Interleucina-8	IL-8	TRINITY_DN56715_c0_g1_i2	155	CTGGGTGAAGAAGCTGATCC TGGCTCATCATTGCAGAAAG
Interleucina-10	IL-10	TRINITY_DN45558_c0_g2_i1	175	TAGAGGGCTTCCCTGTCAGA CCCAGATAAAAACCCAGGAT
Factor de necrosis tumoral- alfa	TNF- $\alpha$	TRINITY_DN67823_c0_g1_i2	169	AGGATGTGGAAGGTGTCTGC GCGTGTAGTGGGGATCTGTT
Receptor tipo Toll	TLR	TRINITY_DN76449_c0_g1_i4	154	ACCATCACCGCTTGTCTACC GATTAGGGAACAGCCATCCA
Grupo de diferenciación 209	CD209	TRINITY_DN81410_c0_g1_i7	157	GGAGGAAAGGGAGGTGGATA CAGACAGCACAGACCTCCAA
Fosforribosil pirofosfato sintetasa 1	PRPS1	TRINITY_DN15730_c0_g1_i1	167	TGCCTGCTTTGAAGCTGTGG ACAAGGGGACATGGCTGAACA

<sup>1</sup>Datos suplementarios de Escalante-Rojas et al (2018).  
Abrev: Abreviatura.

De los genes seleccionados para evaluar el efecto inmuoestimulante de los  $\beta$ -glucanos en larvas, cinco son citocinas (IL1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$ ) con actividad proinflamatoria y antibacteriana, y dos son proteínas que actúan como receptores y son estimulados por PAMPs (TLR y CD209). Además del gen de referencia fosforribosil pirofosfato sintetasa 1 (PRPS1).

Seleccionado previamente por su estabilidad en diferentes tejidos del pargo flamenco (Escalante-Rojas et al., 2018).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final se llevó a cabo utilizando la polimerasa GoTaq® Flexi de Promega, en un termociclador BioRad, T100. Preparando una mezcla maestra, que se calculó dependiendo del número de muestras que fueron procesadas, llegando a un volumen final de 12.5 µl (Tabla 14). El protocolo de PCR fue un ciclo a 94 °C 2 minutos, 40 ciclos a 94 °C 1 minuto, 60 °C 1 minuto y 72 °C 1 minuto. Posteriormente, se corrieron geles de agarosa al 2% durante 30 minutos, 90 v y 500 mA, utilizando GeneRuler 100 bp Plus como marcadores de peso molecular y visualizado bajo luz ultravioleta.

Tabla 14. Reactivos y cantidades para PCR.

<b>Solución</b>	<b>1x</b>	<b>Concentración final</b>
Agua destilada	8.48	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	1.5 Mm
2.5 Mm de dNTPs	0.66	0.132 Mm
10x Buffer	1.25	1x
Primer F 250 µg ml <sup>-1</sup>	0.13	0.4 µM
Primer R 250 µg ml <sup>-1</sup>	0.13	0.4 µM
Taq polimerasa	0.1	0.5 U

#### 4.5 Resultados

En las pruebas se registró una eclosión promedio de 88.5 % y supervivencia promedio a la primera alimentación de 57.9 %. Las larvas fueron inmunoestimuladas el 9 y 16 dpe, cuando presentaban tallas de  $3.31 \pm 0.23$  mm y  $4.45 \pm 0.23$  mm de longitud total, respectivamente. El porcentaje de larvas con ingesta fue cerca del 100 % al 9 dpe. Al final (27 dpe) se contaron las larvas y se obtuvieron en Controles:  $3,307 \pm 453$ , Tratamiento 1:  $3,297 \pm 267$  y Tratamiento 2:  $2,861 \pm 144$  larvas. En total se obtuvieron 28, 390 larvas.

El análisis de expresión génica por PCR punto final muestra que el transcrito IL-1β presenta expresión aparentemente mayor en el tratamiento de β-glucanos de levadura en comparación

con el control y tratamiento de  $\beta$ -glucanos de microalga en el día 10, mientras que para el día 17 solo se observó expresión en control, disminuyendo en los tratamientos (Figura 23).

Por otro lado, IL-6 al parecer muestra mayor expresión en el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de levadura en el día 10 en comparación con el control y el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de microalga; sin embargo al día 17 la expresión disminuyó en el control y se mantuvo similar en los tratamientos (Figura 23).

El transcrito IL-8 presentó una expresión aparentemente mayor en el tratamiento de  $\beta$ -glucanos de levadura en la primera inmunestimulación, sin embargo para el segundo estímulo la expresión es aparentemente mayor en el tratamiento de  $\beta$ -glucanos de microalgas (Figura 23).

En el caso del transcrito IL-10 en el día 10 presentó mayor expresión en el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de microalga con respecto al control y el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de levadura, en cambio en el día 17 la expresión incrementó en control, y disminuyendo en los tratamientos (Figura 23).

Respecto al transcrito TNF- $\alpha$  muestra una expresión relativamente mayor en el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de levadura al día 10 con respecto al control y tratamiento con  $\beta$ -glucanos de microalga, pero al día 17 la expresión es similar (y altamente variable) en control y tratamientos (Figura 23).

Los transcritos CD2019 y TLR mostraron patrones de bandeo inespecíficos pero en general se observa mayor respuesta en el día 10 que en el día 17, sin aparentes diferencias entre control y tratamientos (Figura 23).

En general se detectó expresión de transcritos en todos los genes el día 10 pero no el día 17 (a excepción de IL-6 e IL-8). En particular, IL-6 (citocina inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  secretada por macrófagos, células T y fibroblastos) parece indicar una respuesta en términos de inmunidad entrenada.

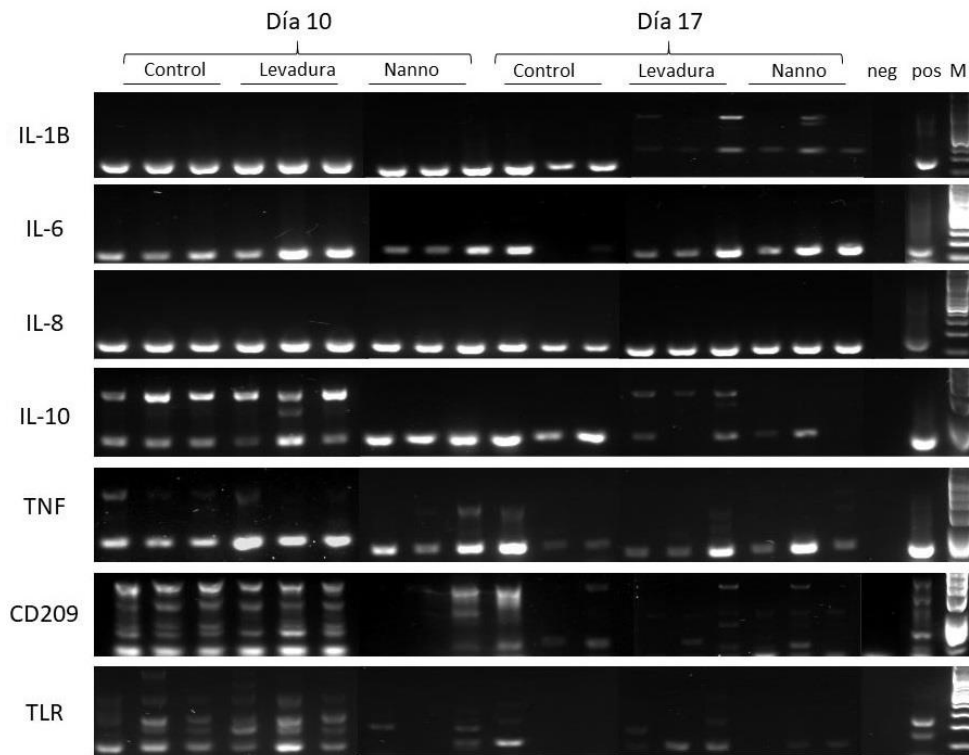


Figura 23.- Muestra las PCR punto final de genes de la respuesta inmunológica de larvas de *L. guttatus* a 24 horas post administración (10 y 17 dpe) de  $\beta$ -glucanos de levadura (T1) y microalga (T2). neg: negativo, pos: positivo, M: marcador molecular.

#### 4.6 Discusión

La etapa larval es más que una vía para que el organismo se vuelva juvenil debido a que se presentan adaptaciones anatómicas para su hábitat y alimentación. Sin embargo, es una etapa altamente vulnerable y especializada, que ha evolucionado para su supervivencia en el hábitat natural pero que se convierte en un desafío en los cultivos larvarios (Kjørsvik et al., 2011). Como por ejemplo, con el pargo flamenco que se busca establecer estrategias de inmunoestimulación durante la etapa larval, con el objetivo de mejorar la respuesta inmunológica ante condiciones adversas de cultivo (brotes de bacterias oportunistas) (Vadstein et al., 2013), ya que en esta etapa las larvas tienen capacidades inmunológicas incipientes (Magnadóttir, 2010) para responder a esta adversidad.

Lo anterior pudo haber marcado las pautas para el nacimiento de la escuela del pensamiento anti-inmunomodulación (EPAI), la cual considera que es perjudicial la administración de un compuesto inmunomodulador potencialmente poderoso a un pez que todavía necesita



someterse a los principales eventos de desarrollo, que permiten la maduración del sistema inmune, tales como la maduración del timo (Bowden et al., 2005). Esta hipótesis, que aún no ha sido comprobada, se basa en la suposición de que las larvas de peces tienen un número finito de células inmunológicas maduras o potencialmente maduras, y que el encuentro con una molécula que engaña al sistema inmunitario en el montaje de una respuesta inmune impactará negativamente a estas poblaciones de células ya sea por el sesgo del sistema inmune en desarrollo, posiblemente de manera irreversible, para responder a estos estímulos o para regular a la baja si se induce tolerancia (Bricknell y Dalmo, 2005). En el presente estudio no se observó algún tipo de interrupción en el desarrollo, alimentación, supervivencia o expresión de genes de la respuesta inmunológica de larvas de pargo flamenco que infieran efectos adversos por inmunoestimulación por  $\beta$ -glucanos de levadura y microalgas.

El suministro de inmunoestimulantes confieren protección ante patógenos, por ejemplo; Skjermo et al. (1995) demostraron como A-RAM (alginato rico en ácido manurónico) fue administrado a larvas de *Scophthalmus maximus* a través del alimento vivo y brindó protección contra *Vibrio anguillarum*, disminuyendo 39 % la mortalidad con respecto al control. Además, Skjermo y Bergh (2004) reportaron que la administración A-RAM en *Artemia* para *H. hippoglossus* por periodos cortos de tiempo incrementa la resistencia contra vibriosis. Además, los estudios realizados *in vitro* en macrófagos de peces adultos han confirmado que el incremento en la producción de superóxido y actividad fagocítica, es estimulada por A-RAM, y por lo tanto los efectos positivos en etapa larval se pueden atribuir a la estimulación del sistema inmune no específico (Strand y Dalmo, 1997). Por otra parte, la administración oral de  $\beta$ -glucanos indujeron resistencia en larvas de *Sparus aurata* ante pasteurolysis, debido a que incrementa la actividad fagocitaria y explosión respiratoria en fagocitos. La dosis óptima de  $\beta$ -glucanos dependió del periodo de administración, las dosis fueron del orden de 10 g kg<sup>-1</sup> de alimento por un periodo corto de tiempo (2 semanas) y de 1 g kg<sup>-1</sup> cuando se administra en periodos largos (Couso et al., 2003).

Sin embargo, la evaluación de la expresión de genes relacionados al sistema inmunológico por efecto de inmunoestimulación en etapa larval de peces marinos es escasa. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó la expresión de genes involucrados en la respuesta

inmunitaria de larvas de pargo flamenco asociados a la inmunoestimulación por diferentes tipos de  $\beta$ -glucanos en términos de inmunidad entrenada.

Uno de los genes pertenece a la IL-1 $\beta$ , la cual es producida por una amplia gama de tipos de células después de la activación de receptores de reconocimiento del patrón del hospedador (PRR) por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados con el peligro (DAMP) (Angosto et al 2012). IL-1 $\beta$  tiene diversas funciones fisiológicas y sus funciones en la regulación del proceso inflamatorio se conservan en los peces (Secombes y Wang, 2011), principalmente como un inductor de esta respuesta. Sin embargo en los resultados del presente estudio el transcrito IL-1 $\beta$  presenta expresión aparentemente mayor en el tratamiento de  $\beta$ -glucanos de levadura en comparación con el control y tratamiento de  $\beta$ -glucanos de microalga en el día 10, mientras que para el día 17 sólo se observó expresión en control, disminuyendo en los tratamientos, indicando ausencia de respuesta de IL-1 $\beta$  en términos de inmunidad entrenada. Es posible que el tiempo de muestreo para el análisis de expresión de IL-1 $\beta$  no haya sido preciso, ya que se sabe que IL-1 $\beta$  induce IL-6, además existen dos formas de IL-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), ambas reconocen el mismo receptor, la diferencia es que la IL-1 $\beta$  se secreta al medio extracelular, mientras que la IL-1 $\alpha$  permanece unida a la membrana celular; en este trabajo sólo se evaluó la expresión de IL-1 $\beta$  y un aspecto importante a considerar es que en algunas especies se ha reportado más de un gen de IL-1 $\beta$  y la variación alélica también es evidente (Wang et al., 2004).

Por otra parte, varios efectos de carácter pro y anti inflamatorio se han atribuido a la señalización mediada por IL-6 (Scheller et al 2011). En la fase inflamatoria aguda, se ha demostrado que IL-6 controla el cambio del reclutamiento de neutrófilos a monocitos en el tejido inflamado suprimiendo la producción de quimiocinas y estimulando la expresión de proteína-1 quimiotáctica de monocitos (Hurst et al., 2001). IL-6 al parecer muestra mayor expresión en el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de levadura en el día 10 en comparación con el control y el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de microalga; sin embargo al día 17 la expresión disminuyó en el control y se mantuvo similar en los tratamientos (Figura 23) indicando una respuesta de IL-6 en términos de inmunidad entrenada.

Respecto a IL-8, se trata de un potente quimioatrayente de neutrófilos pero no de monocitos, y de numerosas maneras induce un estado inflamatorio en este tipo de células (Mukaida et

al., 1998). En el presente estudio, se registró una expresión sostenida de IL-8, la cual fue aparentemente mayor en el tratamiento de  $\beta$ -glucanos de levadura en la primera inmunoestimulación, sin embargo para el segundo estímulo la expresión parece ser mayor en el tratamiento de  $\beta$ -glucanos de microalgas. Dado que IL-8 se expresó en todas las larvas analizadas, tanto controles como tratadas, es posible que la expresión de IL-8 responda a factores adicionales a los  $\beta$ -glucanos.

La IL-10 es una interleucina anti inflamatoria que suprime la respuesta inmune. Existe como un gen de copia única para la mayoría de las especies, pero las copias duplicadas se presentan en algunas especies. En general, la IL-10 en peces, similares a los ortólogos de mamíferos, actúa como un supresor y ejercen un papel conservado en la amortiguación de las respuestas inflamatorias (Zou y Secombes, 2018). IL-10 en el día 10 presentó mayor expresión en el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de microalga con respecto al control y el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de levadura, en cambio en el día 17 la expresión incrementó aparentemente en control, disminuyendo en los tratamientos. Lo anterior indica que en las larvas de 10 dpe alimentadas con  $\beta$ -glucanos de microalga ocurrió una regulación de la respuesta inmune por la aparente sobreexpresión de IL-10. La baja expresión del IL-10 a los 17 dpe en las larvas alimentadas con  $\beta$ -glucanos tanto de levadura como de microalga sugiere que se mantiene una inmunoestimulación ya que como se mencionó anteriormente, la IL-10 es supresora de la respuesta inmune.

En peces teleósteos, se ha notificado la presencia de genes TNF en varias especies (Zou et al., 2003), y la evidencia recopilada hasta la fecha demuestra que existen múltiples homólogos/parálogos de TNF. La citocina proinflamatoria, TNF- $\alpha$  es uno de los primeros genes inmunes expresados en etapa temprana de la respuesta inmunológica en peces y tiene un papel clave en la regulación de la inflamación. Al igual que sus contrapartes de mamíferos, el TNF- $\alpha$  de peces muestra funciones superpuestas con IL-1 $\beta$ . El TNF- $\alpha$  de peces son capaces de activar macrófagos/fagocitos y mejorar su actividad de destrucción microbiana (Zhang et al., 2012). En el presente estudio, la expresión del TNF- $\alpha$  fue relativamente mayor en el tratamiento con  $\beta$ -glucanos de levadura al día 10 con respecto al control y tratamiento con  $\beta$ -glucanos de microalga, pero al día 17 la expresión es similar en control y tratamientos presentando gran variabilidad. Lo anterior sugiere que las larvas (10 dpe) alimentadas con

$\beta$ -glucanos de levadura se encontraron en estado de inmunoestimulación por la aparente sobreexpresión de TNF- $\alpha$  que evidencia un estado pro-inflamatorio antimicrobiano, sin embargo, los resultados a los 17 dpe no permiten identificar con certeza una respuesta en términos de inmunidad entrenada. Además, la sobreexpresión de TNF- $\alpha$  pudo haber influido en los resultados de IL-1 $\beta$  en el presente estudio.

Por otra parte, la molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas no integrinas (DC-SIGN) también conocida como grupo de diferenciación 209 (CD209) es una proteína que en los humanos está codificada por el gen CD209 y que funcionan como moléculas de adhesión celular y receptores de patógenos involucrados en la inmunidad innata y adaptativa (Figdor et al., 2002). Recientemente DC-SIGN/CD209 a sido identificada y caracterizada funcionalmente en pez cebra (*Danio rerio*) (Lin et al., 2008). Respecto al receptor tipo Toll (TLR), sus vías de señalización y consiguientes respuestas inmunitarias son muy distintas y divergentes. Se conocen dos vías principales de señalización de TLR, las vías dependientes e independientes de MyD88. La vía dependiente de MyD88, por ejemplo la señalización del receptor TLR2 de  $\beta$ -glucanos (Gantner et al., 2003), conduce a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo que desencadena la producción de citocinas inflamatorias (Takeda y Akira, 2005). La vía independiente de MyD88 se transduce de TLR3 y TLR4. Esta vía activa la producción de IFN- $\beta$  (Takeda y Akira, 2004). El complejo de estas vías de señalización modula la respuesta inmune adecuada contra patógenos. Sin embargo, en el presente estudio, los transcritos CD209 y TLR mostraron patrones de bandeo múltiple que pueden ser debidos a variantes o isoformas de ambos transcritos, así como a una amplificación inespecífica que requiere mayor análisis. En general se observa mayor expresión en el día 10 que en el día 17, sin aparentes diferencias entre control y tratamientos (Figura 23).

Con base en los resultados de expresión de genes de citocinas clásicas pro y anti inflamatorias del presente estudio podemos sugerir un efecto inmunoestimulante en larvas de pargo flamenco por  $\beta$ -glucanos de levadura y de microalga, siendo la IL-6 y la IL-10 indicadores de una posible inmunidad entrenada. La tabla 15 presenta un resumen de los resultados de expresión génica en términos de inmunoestimulación por  $\beta$ -glucanos e inmunidad entrenada.

Tabla 15. Resultados de la expresión de genes de la respuesta inmune en términos de inmuoestimulación por  $\beta$ -glucanos e inmunidad entrenada.

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Inmuoestimulación inicial por $\beta$ -glucanos sin evidencia de una respuesta en términos de inmunidad entrenada
<b>IL-6</b>	Inmuoestimulación inicial por $\beta$ -glucanos presentando respuesta aparente por inmunidad entrenada
<b>IL-8</b>	Inmuoestimulación sostenida en todas las larvas, probablemente independiente a la administración de $\beta$ -glucanos
<b>IL-10</b>	Inmunosupresión inicial en todas las larvas por regulación negativa de la respuesta inmune, presentando respuesta por inmunidad entrenada
<b>TNF</b>	Inmuoestimulación sin evidencia de inmunidad entrenada por variabilidad individual
<b>CD209 y TLR</b>	Presencia de bandeos múltiples debido a posibles isoformas o amplificación inespecífica

Se recomienda realizar una cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real para hacer una comparación estadística entre tipos de  $\beta$ -glucanos.

Existen argumentos adicionales que pueden explicar los resultados del presente estudio. Primero, se deben considerar los problemas que pudieran generar las impurezas de  $\beta$ -glucanos de levadura cuando se intenta describir los mecanismos moleculares de las respuestas inmunológicas, lo cual no ha sido reportado en  $\beta$ -glucanos microalgales. Cuando los  $\beta$ -glucanos de levadura se suministran en animales inducen una amplia gama de respuestas (Meena et al., 2012; Novák y Vetvicka, 2009; Sakai, 1999), y es difícil identificar qué componente o estructura de este compuesto está induciendo cada efecto (Sletmoen y Stokke, 2008). Segundo, Skjermo et al. (2006) compararon el efecto de  $\beta$ -glucanos de microalgas *versus* levaduras. Los resultados mostraron incremento de supervivencia y crecimiento en larvas del bacalao del atlántico (*G. morhua*) al adicionar rotíferos enriquecidos con  $\beta$ -glucanos aislados de diatomeas durante la primera alimentación, en comparación a larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con  $\beta$ -glucanos extraídos de levadura. De acuerdo con los autores, los resultados obtenidos con  $\beta$ -glucanos extraídos de microalga pudieron deberse al bajo peso molecular y el alto grado de ramificación, los cuales pudieron generar una mejor respuesta inmunológica en larvas. Tercero, los  $\beta$ -glucanos de microalgas en general presentan características particulares como son bajo peso molecular

(4-40 kDa) y alto grado de ramificación (0.005) que les pudieran conferir mayor capacidad inmunoestimulante (Rojo-Cebreros, 2017).

Se espera que tras el desarrollo de herramientas genómicas y proteómicas aplicadas a más especies de peces marinos con importancia comercial, se darán a conocer respuestas adicionales con especial atención a la polarización de la respuesta inmune después de la unión de los inmunoestimulantes a su receptor (Bricknell & Dalmo, 2005).

Además, la secuenciación masiva podría ayudar a entender los mecanismos epigenéticos de la inmunidad entrenada. Por ejemplo, tras la estimulación primaria, en términos de ganancia en accesibilidad a la cromatina, aumenta la acetilación de histonas y reclutamiento de RNA polimerasa II, de manera masiva y con magnitudes que no se observan comúnmente en otras respuestas a cambios microambientales. Estas considerables alteraciones, que en algunos casos resultan en activación de expresión génica, la cual es cientos de veces más alta que los niveles basales, en un corto lapso de tiempo, son impulsadas por el reclutamiento de factores de transcripción que responden a estimulación (por ejemplo NF- $\kappa$ B, AP-1 y miembros de la familia STAT) a potenciadores y promotores de genes, que usualmente son pre-marcados por factores de transcripción determinantes de linaje tales como PU.1. A su vez, los factores de transcripción controlan el reclutamiento de coactivadores (incluyendo histonas acetiltransferasas y remodeladores de cromatina) que modifican localmente la cromatina para hacerla más accesible a la maquinaria transcripcional (Netea et al., 2016).

Con el constante desarrollo de estas herramientas genómicas será posible estandarizar criterios que favorezcan el desarrollo de medidas profilácticas, y a la vez aportar evidencia para un mejor entendimiento de la Inmunidad Entrenada.

#### **4.7 Conclusión**

Los  $\beta$ -glucanos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de la microalga *Nannochloropsis oculata* administrados oralmente a larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* activaron el sistema inmune innato, influyendo en la expresión de genes relacionados a la producción de citocinas pro-inflamatorias. La expresión de IL-6 y de IL-10 indica una posible respuesta en términos de inmunidad entrenada.

#### 4.8 Referencias

- Angosto, D., López-Castejón, G., López-Muñoz, A., Sepulcre, M.P., Arizcun, M., Meseguer, J., Mulero, V., 2012. Evolution of inflammasome functions in vertebrates: Inflammasome and caspase-1 trigger fish macrophage cell death but are dispensable for the processing of IL-1 $\beta$ . *Innate Immun.* 18, 815–824. doi:10.1177/1753425912441956
- Arala-Chaves, M., Sequeira, T., 2000. Is there any kind of adaptative immunity in invertebrates? *Aquaculture* 191, 247–258. doi:10.1016/s0044-8486(00)00430-0
- Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C., Kumar, V., 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. *Mar. Sci Res Dev* 3, 1–11. doi:10.4172/2155-9910.1000134
- Bowden, T., Cook, P., Rombout, J., 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 413–427. doi:10.1016/j.fsi.2005.02.003
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 457–472. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.008
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331.
- Champagne, C.P., Fustier, P., 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 184–190. doi:10.1016/j.copbio.2007.03.001
- Chantanachookhin, C., Seikai, T., Tanaka, M., 1991. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture* 99, 143–155. doi:10.1016/0044-8486(91)90294-H
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C., 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 1–12. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.002
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H., Lin, C.S., 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresour. Technol.* 100, 833–838. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.061
- Couso, N., Castro, R., Magariños, B., Obach, A., Lamas, J., 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture* 219, 99–109. doi:10.1016/S0044-8486(03)00019-X
- Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1992. The requirement for live algae and their replacement by artificial diets in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.* 11, 467–476.

- Duis, K., Hammer, C., Beveridge, M.C.M., Inglis, V., Braum, E., 1995. Delivery of quinolone antibacterials to turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), via bioencapsulation: quantification and efficacy trial. *J. Fish Dis.* 18, 229–238. doi:10.1111/j.1365-2761.1995.tb00298.x
- Escalante-Rojas, M., Peña, E., Hernández, C., Llera-Herrera, R., Garcia-Gasca, A., 2018. De novo transcriptome assembly for the rose spotted snapper *Lutjanus guttatus* and expression analysis of growth/atrophy-related genes. *Aquac. Res.* 49, 1709–1722. doi:10.1111/are.13628
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J., 2002. Lectin receptors on DC cells and related sugars\_Useful. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 77–84. doi:10.1016/j.imbio.2014.09.013
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–17. doi:10.1084/jem.20021787
- Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., Jones, S.A., 2001. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14, 705–714. doi:10.1016/S1074-7613(01)00151-0
- Ibarra Castro, L., Alvarez-Lajonchère, L., García-Aguilar, N., Abdo de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, L.E., 2012. Generation cycle closure of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, in captivity. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 47, 333–337.
- Imelda, J., 2003. Bioencapsulation of live feeds (No. 19). Tatapuran, India.
- Kjørsvik, E., Galloway, T.F., Estevez, A., Sæle, Ø., Moren, M., 2011. Effects of larval nutrition on development, in: *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell, pp. 219–248. doi:10.1002/9780470959862.ch7
- Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26, 186–192. doi:10.1016/j.it.2005.02.001
- Lubzens, E., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 245–255.
- Magnadóttir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.* 12, 361–379. doi:10.1007/s10126-010-9279-x
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Meena, D.K., Das, P., Kumar, S., Mandal, S.C., Prusty, A.K., Singh, S.K., Akhtar, M.S., Behera, B.K., Kumar, K., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., 2012. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 39, 431–457. doi:10.1007/s10695-012-9710-5
- Mukaida, N., Harada, A., Matsushima, K., 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte



chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 9–23. doi:10.1016/S1359-6101(97)00022-1

- Netea, M., 2013. Training innate immunity: The changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur. J. Clin. Invest.* doi:10.1111/eci.12132
- Netea, M., Joosten, L., Latz, E., Mills, K., Natoli, G., Stunnenberg, H., O'Neill, L., Xavier, R., 2016. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* (80-. ). 352, aaf1098-aaf1098. doi:10.1126/science.aaf1098
- Netea, M., Quintin, J., Van Der Meer, J., 2011. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. doi:10.1016/j.chom.2011.04.006
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 807–825. doi:10.1016/S0145-305X(01)00037-4
- Novák, M., Vetvicka, V., 2009. Glucans as biological response modifiers. *Endocrine, Metab. Immune Disord.* 9, 67–75.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., Bowie, A.G., 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–60. doi:10.1038/nri3446
- Petit, J., Wiegertjes, G.F., 2016. Long-lived effects of administering ??-glucans: Indications for trained immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 64, 93–102. doi:10.1016/j.dci.2016.03.003
- Robles, R., Sorgeloos, P., Duffel, V., Nelis, H., 1998. Progress in biomedication using live foods. *J. Appl.* 14, 207–212.
- Rojo-Cebreros, A.H., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J.M., Velasco-Blanco, G., Martínez-Téllez, M.A., Medina-Jasso, M.A., Nieves-Soto, M., Quintana-Zavala, D., 2017. Potential of *Nannochloropsis* in beta glucan production, *Nannochloropsis*: Biology, Biotechnological Potential and Challenges.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. Totowa, NJ. Humana Press 132, 365–386. doi:10.1385/1-59259-192-2:365
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63–92. doi:10.1016/S0044-8486(98)00436-0
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 878–888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Skjermo, J., Bergh, 2004. High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using *Artemia* for delivery, increases resistance against vibriosis. *Aquaculture* 238, 107–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.05.038

- Skjermo, J., Defoortt, T., Dehasque, M., Espevik, T., Olsen, Y., Skjak-briek, G., Sorgeloost, P., Vadstein, O., 1995. Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism Artemi. *Fish Shellfish Immunol.* 531–534. doi:10.1016/S1050-4648(95)80053-0
- Skjermo, J., Størseth, T.R., Hansen, K., Handå, A., Øie, G., 2006. Evaluation of  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261, 1088–1101. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.07.035
- Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333–343. doi:10.1016/S0044-8486(99)00096-4
- Sletmoen, M., Stokke, B.T., 2008. Higher Order Structure of (1,3)-b-D-Glucans and Its Influence on Their Biological Activities and Complexation Abilities. *Biopolymers* 89.
- Sorgeloos, P., Dehasque, M., Dhert, P., Lavens, P., 1995. Review of some aspects of marine fish larviculture. *ICES Mar. Sci. Symp.* 201, 138–142.
- Strand K, H., Dalmo A, R., 1997. Absorption of immunomodulating beta(1,3)-glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal.of.Fish.Diseases.*20(1):.41.49. 41–49.
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003
- Vadstein, O., 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 401–417.
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.-J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., De Schryver, P., Bossier, P., 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. *Rev. Aquac.* 5, S1–S25. doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x
- van der Meer, J.W.M., Joosten, L.A.B., Riksen, N., Netea, M.G., 2015. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol. Immunol.* 68, 40–44. doi:10.1016/j.molimm.2015.06.019
- Verpraet, R., Chair, M., Léger, P., Nelis, H., Sorgeloos, P., De Leenheer, A., 1992. Short Communication Live-Food Mediated Drug Delivery as a Tool for Disease Treatment in Larviculture . The Enrichment of Therapeutics in Rotifers and Artemia Nauplii. *Aquac. Eng.* 11, 133–139.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*, 5th ed. Upper Saddle River, N.J.
- Zhang, A., Chen, D., Wei, H., Du, L., Zhao, T., Wang, X., Zhou, H., 2012. Functional characterization of TNF- $\alpha$  in grass carp head kidney leukocytes: Induction and involvement in the regulation of NF- $\kappa$ B signaling. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1123–

1132. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.029

Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N.C., Ellis, A.E., Secombes, C.J., 2003. Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 813–822. doi:10.1016/S0145-305X(03)00077-6

Zou, J., Secombes, C., 2016. The Function of Fish Cytokines. *Biology (Basel)*. 5, 23. doi:10.3390/biology5020023

## 4.9 Anexos

### Anexo I. Secuencias de oligos.

```
>Interleucina-1b | TRINITY_DN55785_c0_g1_i3 len=1217
CAACACTGACAGCACAGCTGGTGGGATCTAAAACAAACACACTAAAGCAACCTTGAATCT
ACTGACTTTAAGAGCTCTTCATTCAGAAAAAGATGGAATCTGAGATGATGTGCAACATGA
GAGAGATGTGGAGCCCCAAGATGCCCGAGGGGCTGGACATAGAGATTGCCCAGCATCCAC
TGACAATGAAGACCGTGGTGAACCTCATCATCGCCATGGAGAGGCTGAAGGGCAGCACGT
CAGAGTCACCTGCGGGGCACCGAGTTCAGGGATGAAAACCTGCTCAGCATCATGCTGGAGA
GCATCGTGGAAAGAGCAAATGGTGCCTGAATGCCGTTTCAGCGGCAGGTGAGTACAGGAAGG
GACCTATGCG TGAACACAGCGTGACCCGACAGCGAGAACAGGCACCTCGTTCAGGTCCCAA
ACAGCATGGAACTCCACGCAGTGAGGCTGCAGGGAGGCAGTGAAGAATCTAACAAAGTTC
GCCTGAACATGGCGACCTACGCTCACCCCTACACCCGTCACCGACGCCCTGCCTGTGGCTC
TGGGCATCAAGGGCACAATCTCTACTTGTCTTGCCACAAGGAAGGAGACAAAACAACCT
TGCATCTCGAGCGGTGGAGAACAATAGCAGTCTGAGCAACATCAGCTCGACCAGCGACA
TGGTGCATTTCTCTTCTACAAACAGGACAGTGGGCTGAACAACAGCACCCCTGGTGTCTG
TCCCCTACAATGACTGGTACATCAGCACAGCAGAGGATGACAACAGACCCGTTGGAAATGT
GTATGGAGGACAGCGACCCGCCACCGTATCTCCACATGCTGCCAAAGTAATCTCAAGAGT
CGGATCAACCTGCTTCTGGGTGTCAAGTTTGACCCTCTTCGGGTGTTATATACTGCACGT
CAAAAATCAGCGACAAAGATATGTTTTTTAAAAAAGCATTATCACTATTTGCTCAAACCTA
CTTCTATTTACTGTATGTACCAAGTACAGAAAAGTAAAATGTTTTATGTATTGACATAGTC
AAGTAATGCCACAGGGTGGCATCATTTGTGTACCTACTGAGGATCTTGTATTTATTATGC
TGAATGATGTGACACACTGTTAATGCTTTGTCTATTAATTTATTTATCTATTTATACACA
ATTTTAAACATATATATGTTATTTAGAGATCTGCTTACTACCAATTGTGTATTAATGTGCAG
TGAATCTTGAATAAAGC
```

```
>Interleucina 6 | TRINITY_DN112951_c0_g1_i1 len=479
GAAAAGGTCACAGCGCTGACCAGCAGCCAGGAGGAGCAGCTGCTGCAGGACATCGACAGT
CCCATCATTTTCAACAGAAGGATGACAGCACACAGCATTTGTGTACAACCTCCGCAACTTC
CTCGTCGATTGCAAAAAGATTTATAATCAATAAGCTGAGGGCCCCAGAGGAAGTTTGACAA
CTGCCAGTTTCTGTTCCCAAATGCTACAAAGATGAAAGTGTAAAATACAGCTATGAAGG
AATACCTCAGGGAAACTGGTGGTGTAAAGGAGAAAATCATCAAAGAGCATGCTGACTAC
ACGAAGTGAAGGTATTGTGGGTCTAAAGCAATCTATGATCCAGTAAATCTTAACACCCTC
AGGGCTTCAACTGTCCACTATTGAATAATTTATTTAATCTTATATAATCTATTTATACTT
GGTATTTATTAGTCATCGGAGAATCCATGGTTGTGGGTTTCTTGCAATAAAAATTCAT
```

```
>Interleucina 8 | TRINITY_DN56715_c0_g1_i2 len=1054
CAATTACAGAGCATGACCTCTGTACGTGTAATACTGGAGTGCAGAATGTATATAAAC
AGTCACTGTGATGCATGATATCCATCTGGAGAACTGAAGAACTGAAGAATGACAAAGCA
GTTGACTAAACAACATGAAGCTCTGCATCCTGTTGGTGTTTGGGACCCTGTTTCGTCCTCA
TTAATGGTATGCCGCCATCAGCAGGGACTACAACAACCACTGTCGGTGCCTGCAGGTGG
AGTCGAGGATCATCCCTCCAGACAGCCTGAGGAGCATCAAGCTCGTCCCTGAGGGGCCTC
ACTGCCCGAAACAGAAGTCATAGCTGGACTGGCGAGCGGGGAGAAGGTTTGCCTGAACC
```

CAAGGTCTGCCTGGGTGAAGAAGCTGATCCACTTTGTTCTTGAGAAACAACTACATCAGC  
AGGGTGCAGCACTTCCCAAGAACCAAGCATAATATCAACATGCAAATTA AAAACATCTTG  
CAAGCAAAGTATTGAAACTAACCC**CTTTCTGCAATGATGAGCCAT**GCTGTTTTACTTTA  
ATAACAAATAACACAATATTTAACCCGGTTTGCTTAACTTAAAGAACTCTTTTAATTAT  
GTTTATGACTTCTGTTGTTATTTAGCTTTTGTGTTTTCAGAAGTGTATTTCTACTGAA  
TGTTTTCTACACAAACCTTTGAAATAACACTGATTCTGCATTTATATTATGTTGGAAAG  
TGCAATGAATGACTTGGAAGTAAGCAATCAGTGATGTAATGTAAGCTGTGAGAAGACTT  
TGTGTGCACAAGGTATTTAATTATGCTTATACAAAGTCAAGTGAGACATGAAATGTAAT  
CATCTCTGTGCATAGACAGTTTTGTGATGACCTTTGAAAGGAGACACTGTATGAAGCA  
TCGACTATTTAATGTTGTAATATGTAACATATCATTCTATGTAATTGTTCTATTGGTG  
AAGCTTTTCTAACAAATAGCATGACGTGATCCATTGCTTTGTTAAGTGCCTAATGAAGGAC  
TTGAGAAAGAATACTGAAAAATCCAATGTGAGGC

>Interleucina-10 | TRINITY\_DN45558\_c0\_g2\_i1 len=997  
CAAGGTCTACCAACAAGATTTCTCTTGTGTCAGGAGTCAGAGAGCCTCTGCGTCCATTAAG  
CCAGCAAATCCTCTTCATCTTCTTCATCTTCTCTGCCTCCAGTAAGAAGACTTCAGCAG  
CTTGTCTCCACCAGCATCATGACTCCTCGGTCTCTCTCTCTGTGCGTCCGATCAACTTG  
TCTGTCTCTGACTGTGTTGTTGTAATCCCATGTGCAACAATGAGTGTGCGCTTCGTA  
**GAGGGCTTCCCTGCAGACT**CGAGGGCTCAGGGCGGACTACTCACAGATCCGAGGCTAT  
TATGAAGCAAACGACGACTTGACAGAGCGCTTCTAGACCAGACCATCGAGCATTCTCTT  
AAAACGCCGTTTGCCTGCCACGCTATCAACAGC**ATCCTGGGGTTTTATCTGGGT**ACCGTT  
CTGCCAGAAGCCTGGCCGAAGTGACGGAGAACACCAGGCGCTTAAGCCTCACATGGAG  
TCCATACAGCAGATCTTCGACCAGCTGAAGACAGATGTCACCAGATGTAACATTATTTT  
GCCTGCAAGAAACACTTTGACATTACAACGCTAAACTCTACTTATACTCAGATGGAGAGT  
AAAGTCTATATAAGGCCATGGGTGAGCTGAATCTGCTGTTAACTACATTGAAACCTAT  
CTGGCTTCTAAACGACCGAAAAACCATGTGGCCTCTGCTTGAAGACCTCTGATCCTAAT  
CAAAATGTGACCTTGTCTCTCAGGAAAAGGAAAAAGTCACTGAACCTTGCACTCTGTT  
ATATTTAATCCGTTACTTTTCACTGTTACTGCCAGATGCAGATTTTATATTGTGAATCTTC  
TGAAGTGAAGTTTGTGAGACATTGTTTACTTTTTTGTCTGAGGACAAGTCTTTTGACC  
ATATTGCGTCTATTTCATGTGAACCTATAACTCAAAGTGGCTGTGATATTTATTTTTTTA  
TCATTAATATTATGATTTTATAATGAATGAAGGATT

>Factor de necrosis tumoral | TRINITY\_DN67823\_c0\_g1\_i2 len=1317  
GCAACACAAAGAGAGAAGTATCAACACAGCACCCAGCCAAGTCTGACTGGTAGATATT  
TCCAAACAGTAAAGACTGAGATCTGAGCTGTGCACACAGTATGGTGGCATAACAACTGC  
ACCAGGTGATGTAGAGATGGGTGTTGAGAAGAGGACGGTAGTTCTGGTGGAGAAGAAGTC  
ATCTACACGA**AGGATGTGGAAGGTGTCT**GCGGCCCTTCTCTTGTGGCCATTGTGTCCG  
AGGTGCTCTGCTGTTTCGTTTGGTACTGGACTAGAAGACCAGAGATGCAGACACAATCAGG  
CCAAACAGGAGCACAAACCCGGAGGGAAGCTTCTGAGAA**AACAGATCCCCACTACCGCT**  
CAGGCGCATCAGCAGCAAAGCCAAGGCAGCCATCCATTTAGAAGGTAGCTACGACGAAGG  
CGAGAACTCAAATCACCACCTGGAGTGGAAAGTGGTCAAGGCCAGGCGTTTCGCTCAGGG  
TGGCTTCCGACTGGTGAACAACGAGATCATCATCCCGCAAACCGGCCTCTACTTCGTCTA  
CAGCCAGGCGTCTCAGGGTGTCTGCAGCGATGGCGACGCTGATGGAGCGGAAAAGG  
CCTCATGCTCTCAGCCACCGGATCTGGCGCTACTCGGACTCCATCGGCAGCAAAGCCTC  
TCTGATGAGCCGGTGAAGTGGCGTGCCAAAACACTGCTCAGGATGACAGCTACAGAGA  
CGGACACGGCTGGTACAACGCCATTTATCTGGGCGCCGTGTTCCAGCTGAACAAAGGAGA  
CAGACTGTGGACGAAACCAACAGCTGTGAGAGCTGGAGACAGAGGAGGAAAGACTTT  
CTTTGGCGTGTGCACTTTGAAATGACTCTTTGCTGTGATGCTAACAGAGCAGATACAA  
AGCTCTGCACAGTGTCAAGTTTGGACTTTTATTTAAATATATGATGTTTGTGTTT  
CTATTTTTTTTTATTATTTTATTATTTATCTCTCGTGTGATGATGTAAGAAATGTTAAATCT  
CAATGGAGATAAAGCTTTTACCGCATCAGGCGGTGCTGACGTTTAAAAATCCTATAAACT  
GTAACAGTTTGAACATTTTTTAGGCATTTTTGTACATGTTGACCTGAGATTGTAGTAG  
ACCAGACTTCTCTGCTGTATCAGACGACAACAGCTCTTCACTAGAGAGTTTACGTTCAA  
GGATTACGAGGATTAAGTATGTGACAGAACTATTATCGTGTACTATTACAACCTGTATGTA  
TTTATTTGATTTATTTATATTTAAATTTGTCGGATTAGGTGTTAAAGATTATATTT

>Receptor tipo Toll | TRINITY\_DN76449\_c0\_g1\_i4 len=3921  
ATTTGACTGCTTACTTTCAGCCTGCTTCTAAATGATCATATCAGGAGCAGTTGATCAAAT  
TCAAGAGGCCACAGTTTTCTCTGGGAGTATATTTTTCATGCTCACTACCTCTTTTTCAC

GCTGCTCCAGCTCTGAGTTTTTACTTCTCTATATAATCATAAAGACACTCTTGAATTCA  
CTCTCTCGCCTTGTTGAGTTTGTCCCTTGTATTGGGAACCAGCTCTGCACAAATCAGT  
ATGGGACCCCAACCAACCTTTACTTCCACCTCCTCTTCTCCTCTTCTCCATCTGCCGG  
GGTCAGAGGTCAAACCCGGATGGCGAGAGGTCGTCCTGTGATCGCTGTGACCTGCAGCTC  
TCCTGTAACCTCTTATGGCGGATTTGCTCATGTTCCCATGGTAACAGAACATGCCAG  
ACTCTCGATCTCTCCTTCAACAACATCTCCGTGGTGACCGCTGATGATCTGAAAGGCCAC  
AGACAACCTGAAGGCTCTGAGTCTCCAAGGTAACAACTCGCTGTGATCCACCCGTCAGCC  
TTTGACTCTCTGTGGAGCCTGGAGGAGCTCGATCTGTCTGACAATCAGCTGACTGCTCTC  
AACAACAAGTGGTTCAGCAAATTAGCAGCTCTGCAGAACCTCAACCTGCTCAACAACCCA  
TACAGCTGCCTGGGTTCTCCTCCAGTGTTCAGGGTCTGTTCAGGCTGAGGAGGCTGGGC  
TTTGGAGGTCCTGTCTGGAGGAGCTGAAGAGACCAGATCTGTCTGGAGTCACTGAGCTG  
GAGGACTCACTGTGCACGCTAACAATCTCATGAGGTATGAGCCCGGTACTCTAGCAGAT  
ATTTGGCCGTTGGGTGCGCTCACGGTGAAGCCTCCACAATCCATTTTTGACAAACGTAGCC  
TTAGCCTCGGCTATGCTCGGTGACGTGACGTACCCTGAGACGCTCTCGTCTGGAAGGC  
CTCCATCTGATTGGGAATGAGTCTGTTCAGCCCTTCAATGTCTCGCCGGGAGGAGACTC  
AGGGACATAACCTTACGCAACGTTTCTGTGTCCGATGAGGTTATTATTCACTTCTGGAG  
GCTTTTGATGGAGTTCACCTCACCTCCATTTCCGGTGAAGATGCTACGCTGACGGGCGAG  
GGCAGGTGGGAACCCGCAATAAACTGATCTCAAAAGCATCGACAAGTTTATCGTACGA  
AACGTTGTGGTGGTGAACGCTTTTAGGTTTGTCTCATTCTACAGCTGGGATTCTCTGCTG  
AACTATCCCAGGATGGTGGCCGTCATAAATTCTGGGGTAAAGAACATGGTGTCAATTTGTC  
ACAAGTACACAACAACAACATGGTAGCTACTACATCACTTCGATTACCTGTTCTAGTGAC  
ATCTTTTCATCACTCCTTCAATAATGACTGCATTGGAAAGCACAGCTTTTGCATAACAGCT  
GAATAAAGTTGGTCCCAGTGGCACTTCCAGTCCACTTTCTCTTTTCATGCTTCTGTATG  
TGCTATGAGCTTGCCATCATTTTCGTAGATGGACCCGTAAAAGCAACATATTGTCACAT  
CTAGCTAGCTAGCATTGATGTGTATTAGCAAATGATTAAGTAGATTAGCGAGCTTGTG  
AGGTAGCATTAGTTAACTTAATGTGTGACTAATTAATATACACCATTTTGAACACTTACT  
TACTTTTTCAGTAAAGTAAAGTCTACAGCATATCTAGCATATCTAGTACAGGAAAGGTCCC  
ACTTGATAACAAGCTTGCAAATGTTACTGGGGCACAGAGGAAAAGGGTCGATTACAGACA  
CCACATGATTTACATTTTGAACAATTTGGCCCCAAAAGAGAAGAAATAAATGACTAA  
ATTTCCATCCAGTTGATGAACAGTGTGTCATGACCTGGGAGAATAATGTTGTAACCATGT  
TTTTCCCAAATACCCTTTGATTTTGAATTTGTTTCTCCTCGTCCAGAAAAGTATAAGTAATG  
TTAGATCATCACTGAACCACAATGGTACTTGTACTGGGCTTTAAATACTTTGGGTCCCTC  
TGCAGAGATGAGGTACCTTTGCTTTTTTCTGACCTTTGGTTGAACCACTGTACGGTATTA  
TGTTCTCCATGATGAAACCTTCTTCTTGTGCAAATCCTTCATCAGTTACTGCGCACACT  
AAATTTTACCACAATACCTATGCTTTCATTAGGGAACGCTGACTTTTGCCTCAGGTGTT  
TGTGATGCCCTGTCTCACATCCCGTCTGCTAAAGAGCCTGCAGTACTTTGACCAGTCCGA  
CAACCTGCTGACTGACATGACTCTGGCTGAAACACTGTGCTACGGAGATGGAACACTGAA  
GGATGTCAGGTTTAAACCTCAGCGGTAACGCTCTAAAGTCTTTCTCCACAATGACATG  
GCTGGTTGCAAGCTCTTCAAACCTGACCCATCTGGACATCAGCAGGAATGCATACAGCTC  
CATGCCCCAGACCTGCTCTTGGCCCTCCACTTTGCGATACCTCAACATCTCCGGGGCTAA  
ACTTACA**ACCATCACCGCTTGTCTACC**CATAACTCTGGAGGTGTTGGATCTGAGCAACAA  
CGATCTCAAAGACTTCTATCTGCCCTGCCGGCCCTGAGAGAGCTCTACCTCTCTGGGAA  
CAAGTTTCTGAGGCTGCCCCCTGGAT**GGCTGTTCCCTAAT**CTGCAAACACTGACAATGCA  
GTCAAACACTTTGAACATGTTTGGACATTCAGACCTTCAGTCATACCAACGACTCCAGAG  
CCTCCAGAGGGTCCAGAACAAATTCGCTCTGCTCCTGTGACTTTGTCCACTTCTTCCAGTC  
AGGTGTTAAAGGAGGTGGAGCTGTGTATTTAAGGGATGGAGATGTGCAATTAATAGACAG  
AGAGGAGAACTACATCTGCGACTCTCCTCTACCTGCAGGGGAACTGGTGGGTGAGT  
TCAGCTCACCTTGTGAGTGCCATCGGGTTTTGGTTGTGTCTGTTAGCTGTGGGTGGC  
GCTGTTTGTGCCATTGTGTGTCTGTCCCTGCTGTGGCGCCTCCACGCATCTGGTACCT  
CAAGATGACGTGGGCGTGGCTGAAGGCCAAGCGTAGCTCCAGGAAACGGCGGCGACAGAG  
AGATGGAGTGGGTTCAACAGAAGCATTTGCTGTCAATTTGACGCTTTTGTGTCTTACAGCGA  
GAGGATGCCAAGCTGGGTGGAAACTACTTGGTACCTGAGCTGGAAGAGCCAAGGGAGAA  
TGAAGACGGCTCAAGGCACCGACTCTTACCCTGTGCCTCCACAAGCGGGACTTCTTCC  
TGGACAGTGGATTGTGGACAACATCATGAGCGCCATGGAGCGCAGCCGGCGGACCGTCTT  
TGTCTCTCCGAGAATTTTGTCCAGTCTGACTGGTGCCGCTATGAGCTGGACTTCTCCCA  
CTTCTGGCTTTTCGACGGGGATGGCGAAAGAGACGCGCCATCTTGATCTGCTGGAACC  
GCTGGCCAAGGACGATGTCCCCAAACGCTTCTGCAAACCTGCGCAAACCTCATGAGCTCCAC  
CACATCTGGAGTGGCCTCAGGAGGAAGAGAAGATGGGGGAGTTCTGGAGGAGCCTCCG  
CAACGCTGAGAGTAGGAGAGGGCGAGGACTATTGAGAGGGAAAGATAAAGTGATGAAG  
AGAAAGCATCATGAGTAATGGTCTTATCATTGAATTTTCTCAGGAAAGATATAGACTAT

AACCAGACTAAGACTTTTTAAGTTTTTATATGTACAATCTCAATTCCATGAAAGTTACGAT  
GCTGTTTTAAATGTAAATAAAAACAAAATGCAGTGATTTGCAAAATCTTTTGGACCTACA  
CTCAACTGAATACGTTACAAAGACAAGATATTTAATGTTCAAACCTGATCAACTTTATTCT  
TTTTTGTAATATACACTCAT

>Grupo de diferenciación 209 | TRINITY\_DN81410\_c0\_g1\_i7 len=993  
CAGAAACCGCACCAAGAAACACCGACAGCAGCATCCGTGCATCACATCACATCGCTGAGT  
TTATCCACCGTAGTTAGAACGGCTCTACTACACTAGAGCAGATTAAGTTTACTGCAGC  
GTCTCAGTCTCTCAACATGCCTGCGATATTTACGCCAAACCAGATTTGACAAAGAAGG  
TGAGATACAACAGAACGGAGCAAGAAGATGAGGTGGAGT**GGCAGGAAAGGGAGGTGGATA**  
TCTACGAGAGTGCCGACGCTGTTGGACACGATCACACTGATGTTTCAGTCACATGGTGGAG  
GAGCACAGGATGAGAGGCTTTGTGAAGCCGTCTACAGGAGGCCTCTCACTGCTGCTG**TTG**  
**GAGGTCTGTGCTGTCTG**CTGCTGATCGGAATCATCACCTTATTCATATACTTCACTTTGA  
AAATAGACCAGCTCCAGGAAATAAATTCAGCTATAAAAGTCAACAACAGCCAGATGATGA  
ACAGCTATGAAACACTGAGTAAAAATCACAGCCAGCTACAGACAGAAATAAAGCAGCTGA  
CGGACAAAATGTCAGACATGACAGTCAACAACAACAAGCTACAGGATGAAATAAAGCAGC  
TGAAGGACAAAATTGAAGGGAAGTGTCTGAGGGATGGAAGAGATTTGGATGCAGTTGTT  
ACTTTAAATCCACTGAGACGAAAACGTGGTCTGAGAGCAGATCTGACTGTCAGGACAAAG  
GAGCAGATCTGGTGGTCATAAACAACAAAGAAGAACAGAAATTTCTCACTGGGCTGAATG  
CGTATGGACTGTTCTGGATTGGTCTACGGACAAGTTGGAAATCTGGAAAATGGGACTGGG  
AATGGGTGGACGGATCACCGCTGACAGAAATGTTCAAGGAATCAGGACTGTCACTATATT  
CAGCGCAGCAGTACAGAGCAGCAGCATGCTGTGATCGACAAGGACGATGGACACATACAG  
AGAATTATAGTGATTCTACGTAAGTGGATCTGTG

## 5. Conclusión general

---

Las cantidades probadas de NaOH 0.5N (17, 25.5 y 34 mL) presentaron porcentajes de floculación mayores al 80%. Sin embargo, con 17 mL de NaOH 0.5N aplicados en cosechas densas de *Nannochloropsis* sp., se puede lograr alta eficiencia en la recuperación de la biomasa celular (94.9%) a bajo pH (9.7) y en un lapso corto (<60 minutos). Esto pone en evidencia que la dosis requerida de hidróxido de sodio estuvo en función de la densidad celular y que como agente floculante único, el NaOH 0.5N es conveniente para producir concentrados de *Nannochloropsis* sp. en particular para realizar la extracción de compuestos bioactivos como son los  $\beta$ -glucanos. En la caracterización parcial de  $\beta$ -glucanos de *Nannochloropsis* sp. se concluyó que los carbohidratos de *Nannochloropsis* sp. representaron hasta el 17 % de su composición orgánica y el espectro de infrarrojo indica que el extracto posee gran cantidad de grupos funcionales que pertenecen a compuestos orgánicos tipo glucosa. Por otra parte, el espectro de resonancia magnética nuclear de protón para el extracto de carbohidratos muestra un cambio de entre los 4.5 y 5 ppm. Esto indica protones juntos y en posición de ramificaciones, indicios de polisacáridos tipo  $\beta$ -glucanos. Además, como resultado de la cuantificación enzimática de  $\beta$ -glucanos, las cepas de *Nannochloropsis* (NN-X-1, CIB76 y NpUNAM) presentan del 23 al 31% de peso seco en forma de carbohidratos, de los cuales del 14 al 21% son  $\beta$ -glucanos, desde fase estacionaria en cultivos por lotes. El contenido individual de  $\beta$ -glucanos es  $\sim 1$  pg cel<sup>-1</sup>, con una productividad volumétrica máxima de 81.55 mg l<sup>-1</sup>. *Nannochloropsis* (particularmente NpUNAM), tiene un gran potencial para la producción industrializada de  $\beta$ -glucanos y debido a sus posibles características moleculares, se estima que existen posibles aplicaciones como inmunoestimulantes. La investigación futura es necesaria para caracterizar  $\beta$ -glucanos aislados de *Nannochloropsis*, optimizar su producción y evaluar su capacidad como inmunoestimulante. Complementariamente, se confirmó que la inmunidad por transferencia materna dependiente de IgM es corta en el pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, por lo que

presenta una ventana de susceptibilidad inmunológica larvaria que es cubierta por la respuesta innata. La última etapa de la ventana de susceptibilidad inmunológica (35-40 dpe, 15-23 mm) puede ser considerada apropiado en la plenación de los futuros programas de vacunación para esta especie. Finalmente, se concluyó que los  $\beta$ -glucanos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de la microalga *Nannochloropsis oculata* administrados oralmente a larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* activaron el sistema inmune innato, influyendo en la expresión de genes relacionados a la producción de citocinas pro-inflamatorias. La expresión de IL-6 y de IL-10 indica una posible respuesta en términos de inmunidad entrenada.