

**INFLUENCIA DE ALIMENTO ENRIQUECIDO CON AISLADO DE BACTERIAS
PROBIÓTICAS NATIVAS DE TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) EN LA
EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE ESTA MISMA ESPECIE**

LINA MARÍA MEJÍA QUIÑONES

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
SANTA MARTA, D.T.C.H**

2010

**INFLUENCIA DE ALIMENTO ENRIQUECIDO CON AISLADO DE BACTERIAS
PROBIÓTICAS NATIVAS DE TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) EN LA
EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE ESTA MISMA ESPECIE**

LINA MARÍA MEJÍA QUIÑONES
Trabajo de grado para optar al título de Biólogo Marino

Director
LUISA MARCELA VILLAMIL DÍAZ
Bióloga Marina, PhD
Profesor Titular Programa de Biología Marina
**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CULTIVO
Y MANEJO DE ORGANISMOS ACUÁTICOS**

Asesor
MARIA ANGÉLICA MARTÍNEZ
Biólogo Marino
UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
SANTA MARTA, D.T.C.H

2010

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Santa Marta, D.T.C.H. 08 de Septiembre de 2010

***Este trabajo está dedicado a dos personas muy importantes en mi vida,
personas que han estado conmigo desde el principio y que durante
mi recorrido siempre me apoyaron con su amor incondicional,
me aconsejaron con sabiduría, mucha paciencia
y siempre con una sonrisa... Papá, Mamá:
Este logro es para ustedes!!***

***A mi hermano Camilo que siempre ha sido mi
ejemplo a seguir y mi guía en la vida.***

***Y a todas las personas que hicieron posible este logro
acompañándome en todo momento.***

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios porque llegué hasta acá y pude terminar esta etapa de la vida.

A mi papá, por su cariño y apoyo en todos los buenos y malos momentos de este camino, y sobre todo por entenderme y apoyarme en mis decisiones con todo el amor que un padre puede dar. A mi mamá, la mejor de todas, por sus sabios consejos, su compañía, por su interés y preocupación, y sobre todo por su infinito amor y comprensión. A ustedes que siempre creyeron en mí y siempre se mostraron orgullosos.

A Diego Manrique y Carla Peña quienes de una u otra forma han colaborado con mi educación y han puesto su granito de arena.

A Luisa Villamil, mi directora, quien siempre estuvo ahí para mí porque creyó y confió en mis aptitudes; porque me tendió su mano dándome las herramientas para ser una mejor profesional, ofreciéndome la oportunidad de pertenecer al Grupo de Investigación en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos para compartir sus conocimientos. A mis compañeros de grupo Carolina Noguera (mi guía espiritual) e Iván Murillo quienes aportaron sus ideas y compartieron su tiempo conmigo en el laboratorio. Muy especialmente quiero agradecer a María Angélica Martínez (Yiya) por su trabajo a mi lado, por su carisma, por su sonrisa y por brindarme la fuerza que siempre necesité en esta prueba superada.

A Diego Ardila por su apoyo incondicional, por esas palabras dulces y alentadoras que necesité oír cuando me sentí caer, pero principalmente por el amor tan puro y sincero que me brinda.

A mis amigas de biología Natalia Hurtado, Alejandra Martínez, Vanessa Carrillo y María Parra con quienes compartí momentos muy alegres, difíciles y tristes, amigas que me acompañaron a lo largo de la carrera haciendo de este camino algo menos solitario y más divertido. Salud!. A mis amigas no biólogas Connie, Ivonne, Nana, Mafe y Johanna gracias por su apoyo y sus palabras. Y finalmente pero no menos importantes a mis compañeros Nicolás Daza, Mauricio Beltrán y Cristina Cedeño.

A la Universidad Jorge Tadeo Lozano y sus profesores, gracias por sus conocimientos, rigurosidad y experiencias de vida tan enriquecedoras. A todos y cada uno de ellos que desde el principio inculcó en mí el respeto, el valor y el amor por la ciencia.

RESÚMEN

Las bacterias nativas de peces que presentan propiedades probióticas, son microorganismos vivos que producen efectos benéficos en el hospedero por medio de distintos mecanismos de acción como la modificación de la microbiota intestinal y el desplazamiento de bacterias potencialmente patógenas; además de poseer la facultad de potenciar las respuestas de los genes implicados en la defensa innata. En el presente estudio se evaluó la capacidad de una bacteria aislada de branquia (*Exiguobacterium* sp. B16) de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) seleccionada *in vitro* por su actividad antimicrobiana, para modular la expresión de algunos genes de defensa como transferrina y la citoquina Interleuquina-1 β (IL-1 β), asimismo se evaluó el efecto de esta bacteria probiótica sobre la expresión del gen codificante para la hormona de crecimiento (GH). Las tilapias fueron alimentadas durante quince días con alimento comercial suplementado con la bacteria probiótica a una concentración de 1×10^6 UFC/g y se tomaron muestras de bazo y riñón a las 24 horas y 15 días del tratamiento. El ARN total se extrajo (RNAqueus Kit, Ambion) y se obtuvo el cADN (RETROscript Kit, Ambion) para realizar una PCR semi-cuantitativa usando primers o cebadores diseñados específicamente para cada gen. Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de los genes transferrina, IL-1 β y hormona de crecimiento en riñón y bazo, con leves aumentos no significativos para este último gen en los peces alimentados con la bacteria. Los resultados obtenidos sugieren que la bacteria probiótica aislada de branquia (*Exiguobacterium* sp. B16), no modula la expresión de los genes de estudio, sin embargo es posible que por su actividad proteolítica, sea capaz de generar un incremento en peso y talla de los organismos, lo que la hace un buen candidato de probiótico para administrar en juveniles y peces que aún no desarrollen su sistema inmune ya que evita la sobreestimulación de los genes del sistema inmune. Es importante tener en cuenta que las bacterias probióticas utilizan diferentes vías y mecanismos de acción aparte de la estimulación del sistema inmune por lo que es imprescindible establecer los mecanismos de acción propios de cada bacteria probiótica seleccionada.

ABSTRACT

Fish native bacteria that have probiotic properties are live microorganisms that can produce benefits to the host by modifying the intestinal microbiota and elimination of potential pathogens; as well as the ability to increase the expression of the innate immune responses genes. In this study we evaluated the probiotic properties of a native bacteria isolated from gills (*Exiguobacterium* sp. B16) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) selected based on antimicrobial activity *in vitro*, to increase the gene expression of some genes like transferrin and the cytokine Interleukin-1 β (IL-1 β); we also evaluated the effects produced by this bacteria on the growth hormone expression (GH). Fish were fed with a commercial diet supplemented with the bacteria at a final concentration of 1×10^6 CFU/g for 2 weeks, samples of spleen and kidney were collected 24 hours and 15 days after treatment. Extraction of RNA was made with the RNAqueus Kit, Ambion and cDNA was obtained with RETROscript Kit, Ambion; RT-PCR was performed using specific primers to selected genes. Results showed statistically differences in transferrin, IL-1 β and GH gene expression in fish kidney and spleen, with slight increases not statistically significant in this last gene of fish with supplemented diet. This findings, suggests that *Exiguobacterium* sp. B16, doesn't modulate the expression of the study genes, however it is possible that it generates increases in weight and size due to its proteolytic activity, making it a good probiotic candidate for larval and juvenile administration since it prevents death due to an excess of immune genes stimulation. It is important to note that probiotic bacteria use different pathways and mechanisms of action other than stimulation of the immune system that are still unknown, which is why is important to establish the mechanisms of action unique for each selected bacteria.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN JUSTIFICADA	1
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	4
2.1 CULTIVO DE TILAPIA EN COLOMBIA.....	4
2.2 EL SISTEMA INMUNE DE LOS PECES.....	6
2.3 PROBIÓTICOS COMO ESTRATEGIA IMPLEMENTADA PARA MEJORAR LA SALUD EN ACUICULTURA.....	14
2.4 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES.....	18
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5. HIPÓTESIS.....	24
6. METODOLOGÍA.....	25
6.1 ELECCIÓN DE INDIVIDUOS.....	25
6.2 PROBIÓTICOS Y CEPAS BACTERIANAS.....	25
6.3 ENRIQUECIMIENTO DEL ALIMENTO COMERCIAL.....	25
6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS.....	26
6.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLÉICO (ARN).....	26
6.6 OBTENCIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO (cDNA).....	27
6.7 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA PCR DE CADA GEN.....	28
6.8 NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES.....	29
6.9 ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS EN GEL DE AGAROSA.....	31
6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
7. RESULTADOS.....	32
7.1 DISEÑO DE RPIMERS.....	32
7.2 ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA PCR.....	33
7.3 EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA.....	33
7.3.1 Expresión del gen transferrina.....	33
7.3.2 Expresión del gen IL-1 β	35

7.3.3 Expresión del gen regulador de la Hormona de Crecimiento (GH).....	36
8. DISCUSIÓN.....	37
9. CONCLUSIONES.....	42
10. RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	57

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reactivos para PCR.....	19
Tabla 2. Componentes necesarios para preparación de mezcla de reacción para obtención de cDNA.....	28
Tabla 3. Componentes preparación mezcla de reacción de PCR para genes actina, transferrina y GH.....	30
Tabla 4. Parámetros de PCR.....	30
Tabla 5. Primers obtenidos a partir de las secuencias ADN de tilapia nilótica <i>O. niloticus</i>	32

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Oreochromis niloticus</i>	4
Figura 2. Producción mundial de acuicultura en el año 2004.....	5
Figura 3. Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR).....	20
Figura 4. Obtención de ADN complementario (cDNA).....	21
Figura 5. Cuantificación y comparación de la expresión del gen transferrina (ARNm) en riñón (a) y bazo (b) de <i>O. niloticus</i> en el grupo control y el grupo suplementado con <i>Exiguobacterium</i> sp. B16, a las 24 horas y 15 días de tratamiento.....	34
Figura 6. Cuantificación y comparación de la expresión del gen IL-1 β (ARNm) en en riñón (a) y bazo (b) de <i>O. niloticus</i> en el grupo control y el grupo suplementado con <i>Exiguobacterium</i> sp. B16, a las 24 horas y 15 días de tratamiento.....	35
Figura 7. Cuantificación y comparación de la expresión del gen regulador de la hormona de crecimiento (GH) (ARNm) en riñón (a) y bazo (b) de <i>O. niloticus</i> en el grupo control y el grupo suplementado con <i>Exiguobacterium</i> sp. B16, a las 24 horas y 15 días de tratamiento.....	36

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Expresión del gen actina en riñón (a) y bazo (b) de <i>Oreochromis niloticus</i> en el grupo control y el grupo suplementado con <i>Exiguobacterium</i> sp. B16, a las 24 horas y 15 días del tratamiento.....	57
ANEXO B. Expresión del gen transferrina en riñón (a) y bazo (b) de <i>Oreochromis niloticus</i> en el grupo control y el grupo suplementado con <i>Exiguobacterium</i> sp. B16, a las 24 horas y 15 días del tratamiento.....	58
ANEXO C. Expresión del gen regulador de la hormona de crecimiento (GH) en riñón (a) y bazo (b) de <i>Oreochromis niloticus</i> en el grupo control y el grupo suplementado con <i>Exiguobacterium</i> sp. B16, a las 24 horas y 15 días del tratamiento.....	59
ANEXO D. Expresión del gen IL-1 β en riñón (a) y bazo (b) de <i>Oreochromis niloticus</i> en el grupo control y el grupo suplementado con <i>Exiguobacterium</i> sp. B16, a las 24 horas y 15 días del tratamiento.....	60

1. INTRODUCCIÓN JUSTIFICADA

La acuicultura se ha caracterizado por ser una técnica de producción que integra la generación de empleo, exportación, contribución a la seguridad alimentaria, entre otros factores. Ha tenido un crecimiento considerable en los últimos 20 años y sigue apoderándose del mercado más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, mostrando una tasa de incremento mundial de un 8,8% al año desde 1970. Hasta la fecha, con desarrollos progresivos aunque relativamente lentos, la actividad de la acuicultura se ha visto frenada por algunas deficiencias tecnológicas, problemas de asistencia técnica, altos costos de producción, así como la incidencia de enfermedades que atacan a los peces disminuyendo notablemente la calidad y seguridad del producto, aplacando el avance económico del sector en muchos países (FAO, 2006).

Para combatir las enfermedades en los peces, tradicionalmente se han utilizado herramientas como vacunas y antibióticos; sin embargo su uso es controvertido y debe ser restringido en animales destinados al consumo humano, como es el caso de la acuicultura. Una excelente opción recientemente introducida a la actividad acuícola ha sido el enriquecimiento del alimento comercial con probióticos, ya que se ha demostrado que mejoran el medio intestinal, disminuyen el estrés en los animales y generan alguna protección frente a la infección por parásitos y/o bacterias patógenas (Tavares-Días *et al.*, 2001; Nayak, 2010).

El término probiótico viene del griego “pro” y “bios” que traduce “para la vida” (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Nayak, 2010), sin embargo la definición más citada para este término fue propuesta por Fuller (1989) quien definió probiótico como un suplemento alimenticio microbiano vivo, que produce un efecto beneficioso en el organismo que lo ingiere, mejorando su equilibrio intestinal y fomentando su balance (Rosmini *et al.*, 2004; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Por otra parte, es posible estudiar el efecto benéfico de los probióticos con ayuda de la biología molecular, según Gatesoupe (1999), las pruebas moleculares son hoy en día

instrumentos útiles y necesarios para verificar si las respuestas de los mecanismos inmunes aumentan para ofrecer una mayor resistencia a enfermedades por efecto de los inmunoestimulantes.

En la acuicultura, se requiere información actualizada y métodos rápidos y sensibles de diagnóstico para detectar de forma eficaz las distintas afecciones en peces (Wasko *et al.*, 2007). Los diagnósticos basados en reacciones inmunológicas tienen la particularidad de detectar casos de enfermedades en poblaciones de peces aparentemente sanos, permitiendo así la prevención de la transmisión y difusión de las enfermedades (Olabuenaga, 2000). Al mismo tiempo, el estudio de los niveles de transcripción de algunos genes, permite entender con mayor profundidad algunos procesos fisiológicos como los mecanismos de defensa que se hacen efectivos en un pez, ya sea durante una infección bacteriana o durante estimulación con inmunomoduladores tales como los probióticos (Chistiakov *et al.*, 2007; Nayak, 2010).

La biología molecular es una ciencia que hoy en día permite analizar procesos tanto evolutivos como fisiológicos y de desarrollo; además es una herramienta que facilita la observación del efecto del alimento enriquecido con una bacteria nativa probiótica seleccionada, en la expresión de los genes de defensa de la tilapia nilótica *O. niloticus* (Corvalán, 2002; Velasco, 2004).

Por esta razón, el objetivo principal del estudio fue evaluar la influencia de la administración de una bacteria aislada (B16) de tilapia con propiedades probióticas identificada *Exiguobacterium* sp. como suplemento en el alimento, sobre la expresión de algunos genes claves en la defensa de *O. niloticus*, tales como transferrina e interleuquina (IL-1 β) (Stafford y Belosevic, 2003; Lee *et al.*, 2006; Covello, 2009); también se estudió el gen que regula la hormona de crecimiento (GH), ya que modula funciones fisiológicas esenciales como osmorregulación, crecimiento y metabolismo (Pierce *et al.*, 2007). Como gen conservador se utilizó el gen actina, pues es una proteína altamente conservada y un componente clave de las células eucariotas ya que juega un importante rol en el mantenimiento de la estructura citoesquelética, movilidad y división celular, y se expresa

constitutivamente en los tejidos de estudio; (Wasko *et al.*, 2007), permitiendo así poder realizar un análisis semi-cuantitativo de los genes.

El presente trabajo se realizó con el fin de optar al título de Biólogo Marino y se encuentra enmarcado dentro del proyecto “Búsqueda de Nuevos Aislados Microbianos con Actividad Antibacteriana, Inmunopotenciadora y Estimulante de Crecimiento para su Aplicación en el Cultivo de Tilapia Nilótica (*O. niloticus*)” desarrollado por el Grupo de Investigación en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos (GICMOA) de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Cultivo de tilapia en Colombia

La tilapia nilótica (*O. niloticus*) es un pez cíclido de origen Africano y nativo de Sudán (Figura 1); sin embargo hoy en día presenta una distribución que abarca todos los países cálidos del mundo. Se caracteriza por ser una especie de alto valor comercial ya que fue introducida fuera de su medio junto con *Oreochromis mossambicus* y es comúnmente cultivada (Elbassuony, 2005).

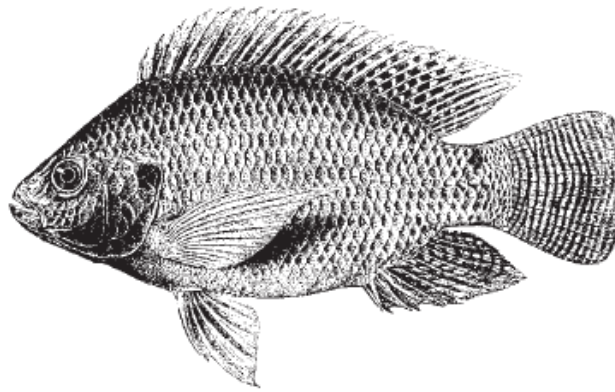


Figura 1. *Oreochromis niloticus* (Tomado de FAO, 2002)

La acuicultura de la tilapia se remonta al antiguo Egipto donde era representada con un jeroglífico determinado que significa “una tilapia del Nilo” y esto indica que eran peces importantes para el comercio del pescado (Elbassuony, 2005).

Es un organismo que se puede utilizar como control de malas hierbas acuáticas debido a sus hábitos alimenticios omnívoros, sin embargo puede convertirse en una especie invasora ya que tiene un tiempo mínimo de duplicación de la población de 1,4 años con un máximo de 4,4 años ($K = 0.14-0.41$; $t_m = 1-2$; $t_{max} = 9$) (Leonce y Defeo, 1997).

Las tilapias son características por su construcción de nidos, crianza de huevos en la boca e incluso cuidado parental después de eclosionados. Tienen un sólo nóstril en la cabeza y una única aleta dorsal compuesta de 8 – 19 espinas y 10 – 16 radios; su aleta anal tiene 3 espinas y 7 – 12 radios suaves (FAO, 2002). Es una especie resistente que tolera altas temperaturas y bajas concentraciones de oxígeno junto con aguas salobres; su temperatura ideal de cultivo se da entre 30 y 35° C siendo letal las temperaturas debajo de 11°C (Elbassuony, 2005).

Debido a su gran tolerancia y adaptabilidad, soportando grandes cambios sin sufrir mayores daños, la tilapia se ha consolidado en el mercado y se ha posicionado como una especie de interés comercial; convirtiéndose en el segundo pez más popular del mundo (en cuanto a crianza comercial) después de la carpa. Su producción global excede los 1.5 millones de toneladas para el año 2003, evaluadas alrededor de 2 billones de dólares (Eknath *et al.*, 2007).

Colombia es uno de los países que tiene un gran aporte a los 15 millones de toneladas de productos acuáticos cultivados en el mundo, ya que aporta tanto del pacífico como del atlántico (Figura 2).

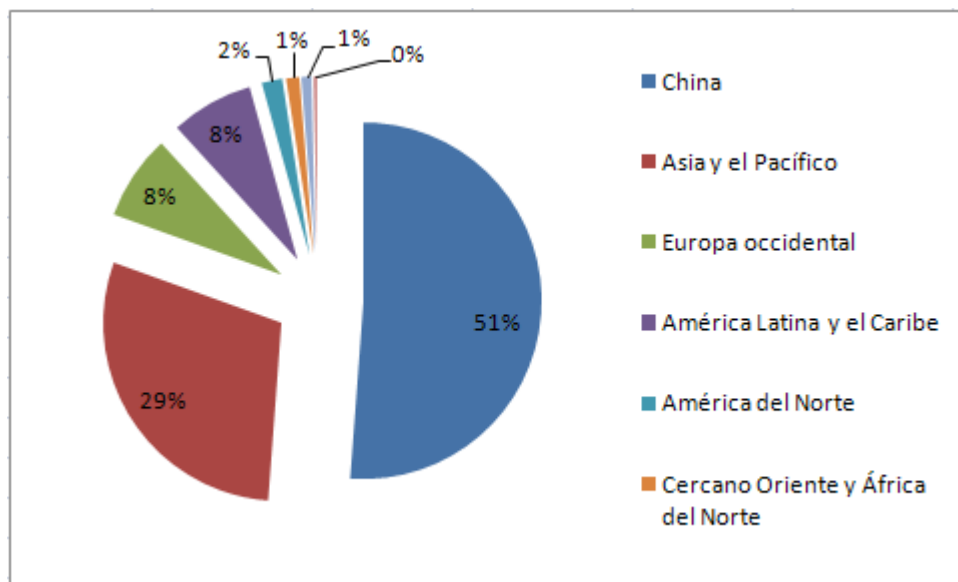


Figura 2. Producción mundial de acuicultura en el año 2004.

Dentro de toda la producción mundial de organismos para el consumo humano por parte de la acuicultura, se debe tener en cuenta a la tilapia, que aporta un gran porcentaje de producto exportado a Estados Unidos. Según la FAO (2006), el año 2000 produjo 1'265.800 toneladas de cíclidos para consumir, y esta cantidad sigue creciendo entre los productores centroamericanos (Costa Rica, Ecuador y Colombia). Actualmente Colombia ocupa el décimo lugar en producción de filetes frescos de tilapia a nivel mundial, pues en Estados Unidos, la tilapia es el tercer producto de la acuicultura más importado (56.000 ton., en 2001) después del camarón y el salmón (FAO, 2006).

2.2 El sistema inmune de los peces

Es común dividir el sistema inmune de los peces en dos componentes: el **sistema inmune innato** (no específico) y el **sistema inmune adquirido** (específico). Aunque se nombren por separado, estos dos sistemas suelen combinarse, ya que ambos poseen un componente celular y uno humoral; además la respuesta innata precede a la adquirida, activando y determinando la naturaleza de ésta a la vez que coopera manteniendo la homeostasis (Magnadóttir, 2006).

Básicamente, la respuesta inmune es un mecanismo de defensa inducido por un agente extraño: **antígeno**, y compuesto por células encargadas del reconocimiento inicial de este antígeno específico que pertenecen a las líneas celulares T y B. También se compone de **citoquinas**, que son las responsables del procesamiento y presentación del antígeno; y también son mediadores fisiológicos para la proliferación, interacción y regulación de otros factores (Olabuenaga, 2000).

El sistema inmune innato se compone de **barreras físicas, factores celulares y factores humorales**. Dentro del primero se encuentra el mucus, la piel, las escamas y las branquias, y juntos conforman la primera barrera de defensa de un pez. El mucus y su importante rol en la defensa se ha estudiado en varias especies de peces (Hjelmeland et al., 1983; Fast et al., 2002), ya que tiene una función protectora previniendo la colonización de parásitos, bacterias y hongos, a través de una continua pérdida y

reemplazo. Además de la mucina, el mucus también contiene enzimas del sistema inmune tales como lectinas, aglutininas, proteínas complementarias, lisozimas, entre otras que forman la defensa química primaria (Olabuenaga, 2000; Magnadóttir, 2006).

El factor celular se compone de las células citotóxicas inespecíficas y las células fagocíticas. Las células citotóxicas juegan un papel similar al de las NK (“Natural Killer”) de los mamíferos, produciendo toxicidad en diferentes células diana sin reconocimiento alguno. Se han encontrado células citotóxicas en el riñón, bazo, sangre y timo de los peces (Evans *et al.*, 2001; Girón *et al.*, 2007) y actúan mediante la citólisis (contacto célula con célula) (Olabuenaga, 2000); pudiendo también inducir a las citoquinas (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001).

Por otro lado, las células fagocíticas actúan mediante ingestión y digestión de material extraño particulado por medio de la emisión de pseudópodos y liberación de compuestos intracelulares. Las más comunes son los granulocitos y los agranulocitos; los primeros son móviles y fagocíticamente activos, de los cuales se derivan los eosinófilos y neutrófilos (leucocitos específicos), mientras que los agranulocitos se componen de monocitos/macrófagos quienes poseen movilidad, son fagocíticos y normalmente más grandes que otras células fagocíticas, por lo tanto pueden fagocitar partículas de mayor tamaño (Olabuenaga, 2000). Abundan en el bazo de los peces teleósteos y en el tejido renal, además poseen la capacidad de aumentar la actividad para producir especies reactivas del oxígeno, es decir, cuando los macrófagos están fagocitando, se reduce el oxígeno aumentando el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y radicales libres de hidroxilo (Gómez y Balcázar, 2007).

Los fluidos corporales de un pez contienen proteínas y péptidos que reaccionan contra una gran variedad de microorganismos y productos microbianos. Estos fluidos y proteínas hacen parte del factor humoral, y se compone de péptidos antimicrobianos, lectinas, antiproteasas, lisozima, el sistema complementario y la transferrina (Ellis, 2001). La lisozima es una enzima mucolítica con propiedades antimicrobianas y ha sido detectada en el suero, el mucus y en otros tejidos ricos en leucocitos, como el riñón, el

bazo y el intestino (Fast *et al.*, 2002; Panigrahi *et al.*, 2004). Tiene la capacidad de degradar la pared celular bacteriana, causando lisis y protegiendo la principal entrada de microorganismos patógenos (Ellis 2001).

Por su parte, el complemento está compuesto por 35 proteínas solubles en el plasma y tiene un rol en el proceso inflamatorio, produciendo proteínas plasmáticas sintetizadas como precursores inactivos. Su activación inicia una cascada de reacciones bioquímicas junto con la generación de mediadores biológicamente activos que resultan en la eliminación del antígeno, lisando la membrana celular y activando mediadores de inflamación (Gómez y Balcázar, 2007).

Otra proteína con actividad antibacteriana importante es la transferrina; específicamente es una glicoproteína globular bilobulada de aproximadamente 70-80 kDa que carece del grupo hemo pero que puede unirse al hierro, por lo tanto es la responsable del transporte y entrega de éste a las células (Olabuenaga, 2000; Stafford y Belosevic, 2003). Los dos glóbulos homólogos contienen profundas hendiduras capaces de unirse al hierro y están conectadas por una pequeña región péptida llamada puente interdominante, que varía en longitud según la especie (Stafford y Belosevic, 2003).

La transferrina se involucra en varias funciones biológicas en una amplia gama de organismos, pero principalmente como transportador de hierro (Rengmark y Lingaas, 2007). Tiene un importante rol en el sistema inmune de los peces, ya que cuando no está totalmente saturada presenta propiedades antimicrobianas creando un ambiente bacteriostático, limitando la cantidad de hierro disponible para los patógenos invasores y por ende, su capacidad de reproducción (Stafford y Belosevic, 2003; Rengmark y Lingaas, 2007). Esta proteína se expresa primariamente en hígado y es transportada por el plasma, surtiendo de hierro a la mayoría de los tejidos, pero también se encuentra en muchos otros órganos cumpliendo con diversas funciones (Rengmark y Lingaas, 2007); como inducir la última etapa de maduración de neutrófilos, ayudar a la activación de la enzima que regula el crecimiento celular, regular positivamente la síntesis de

quimioquinas, y haciendo parte del suero inflamatorio que modula la producción de macrófagos en peces (Stafford y Belosevic, 2003).

La transferrina actúa como una proteína de fase aguda; quiere decir que es producida durante un período breve en la respuesta inflamatoria para remover el hierro del tejido afectado y activar los macrófagos y granulocitos (Magnadóttir, 2006).

El **sistema inmune adquirido** está basado en cambios adaptativos de las poblaciones linfoides: **linfocitos B** encargados de la respuesta humoral; y **linfocitos T** encargados de la respuesta celular; sin embargo ambas poblaciones trabajan juntas para modular la respuesta del sistema inmune adquirido (Pancer y Cooper, 2006). Esta inmunidad adquirida también se caracteriza por su especificidad y capacidad de memoria, representada por glicoproteínas también conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas (Olabuena, 2000).

Dentro de su componente humoral, los linfocitos B interactúan con el antígeno transformándose en células plasmáticas, que a su vez son las células encargadas de producir anticuerpos. Estas células pueden estar unidas a las membranas de los linfocitos B o de forma soluble; estando unidas a los receptores activan a los linfocitos, mientras que estando libres neutralizan y colaboran en la destrucción de los antígenos circulando por la sangre y llevándolos a su eliminación en el bazo o hígado del pez (Hamel y Anderson, 2002). Cuando un fagocito ingiere una bacteria, los antígenos migran a la membrana de éste mostrándolo a unas células llamadas "**células colaboradoras**", que en presencia del antígeno se activan y producen un receptor capaz de reconocerlo; posteriormente esta célula colaboradora se divide para producir proteínas que activan a los linfocitos B, T y otras células inmunes (Olabuena, 2000; Pancer y Cooper, 2006).

El componente celular posee los linfocitos T (acción intracelular), células inmunocompetentes que constituyen la base de las reacciones inmunes. La mayoría de estas células se producen en el timo y riñón anterior, pues es en este último donde se diferencian los eritrocitos, granulocitos, y macrófagos (Olabuena, 2000).

Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad mediada por células ya que tienen la capacidad de reclutar otras células como los macrófagos para dar una respuesta más

eficiente. Además de esto, los linfocitos T se pueden diferenciar en células citotóxicas, células supresoras (regulan producción de anticuerpos y linfoquinas) y células colaboradoras que como lo dice su nombre, ayudan a las células productoras de anticuerpos liberando factores solubles o linfoquinas para aumentar la capacidad de defensa (Olabuenaga, 2000).

Dentro del sistema inmune de los peces, las **citoquinas** son una familia de moléculas reguladoras y secretoras (Giuseppe *et al.*, 2006). Se presentan en los primeros instantes de la activación celular y su producción se limita al lapso de tiempo que dura el estímulo, es decir la presencia de un antígeno (Roitt, 1998). Las citoquinas se producen localmente, y actúan de una manera paracrina/autocrina de manera equivalente a las hormonas del sistema inmune y aunque actúan a bajas concentraciones, pueden hacerlo sobre varios tipos celulares a la vez con una alta afinidad a los receptores de superficie de membrana específicos para cada citoquina (Roitt, 1998; Giuseppe *et al.*, 2006). Regulan la duración y amplitud de la respuesta inmune innata y específica; activando los macrófagos, otros fagocitos, las células citotóxicas y las células B (Olabuenaga, 2000).

Considerando que existen varias citoquinas, éstas presentan cualidades distintas como **pleiotropía**: múltiples efectos sobre diferentes células; **redundancia**: varias citoquinas ejerciendo el mismo efecto; **sinergismo**: dos o más citoquinas produciendo un efecto que se potencia mutuamente; y **antagonismo**: inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos (Roitt, 1998).

Aunque existen muchos tipos de células productoras de citoquinas, hay sólo tres categorías de citoquinas: 1) las que regulan la respuesta del **sistema inmune innato**, donde los **macrófagos** son las células encargadas de la síntesis de citoquinas; 2) las que regulan la respuesta del **sistema inmune adquirido**, donde **las células T colaboradoras** se encargan de producir, ya que sus citoquinas son esenciales para que se dé la respuesta inmune una vez activadas por el contacto con las correspondientes células presentadoras de antígeno; y 3) las que estimulan la hematopoyesis (Secombes *et al.*, 1999; Gómez y Balcázar, 2007).

Dentro de las tres categorías de las citoquinas, hay dos grupos en las cuales se pueden dividir: las que promueven la inflamación (**pro-inflamatorias**) y las que la anulan (**anti-inflamatorias**). Las citoquinas pro-inflamatorias son esenciales en la respuesta inflamatoria de un pez: la reacción biológica más importante y compleja que se da en respuesta a cualquier tipo de agresión (Giuseppe *et al.*, 2006; Covello *et al.*, 2009). Dentro del grupo de las citoquinas pro-inflamatorias, se encuentran dos excelentes marcadores de una respuesta inflamatoria: TNF α e IL1- β (Covello *et al.*, 2009).

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), tiene un importante rol en el sistema inmunitario de los peces, ya que se conoce por ser un mediador de la inflamación local. Es una citoquina producida por macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T, entre otros, como una respuesta propia del hospedero ante infecciones producidas por bacterias (Secombes *et al.*, 1996; Praveen *et al.*, 2006). Es un importante activador de macrófagos cuando es producido por leucocitos (Tanekhy *et al.*, 2010) y además posee la habilidad de provocar apoptosis y necrosis (Covello *et al.*, 2009), es por esta razón que la expresión de esta citoquina se encuentra delicadamente controlada, pues una sobreproducción, activa respuestas inflamatorias a infecciones y heridas que lleva a hipotensión, coagulación difusa y esparcimiento del daño del tejido (Thompson y Lotze, 2003).

La liberación de TNF α produce una activación local del endotelio vascular con vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular, liberación de óxido nitroso y aumento de fagocitosis y quimiotaxis en los leucocitos del riñón anterior. Todo esto lleva al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y otras citoquinas, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión de plaquetas y, probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre (Plouffe *et al.*, 2005).

Por otra parte, las interleuquinas son moléculas que regulan interacciones entre leucocitos. Son las encargadas de activar macrófagos, linfocitos T y células B, quienes a su vez se encargan de desarrollar la respuesta inmunitaria dirigida a la generación de anticuerpos. La Interleuquina 1- β (IL-1 β) pertenece a la familia de las citoquinas pro-

inflamatorias que estimulan la expresión de los genes asociados con la inflamación y las enfermedades autoinmunes (Thompson y Lotze, 2003). Es el mayor mediador de inflamación que estimula los genes que se expresan específicamente durante este proceso (Lee *et al.*, 2006), porque potencia la función de células inmuno-efectoras y produce efectos citotóxicos en células tumorales; a su vez activa células inmunes no adaptativas afectando la secreción de otras citoquinas que sirven como señal para la activación de células T (Thompson y Lotze, 2003).

Las fuentes celulares de IL-1 β son los monocitos en la sangre, los macrófagos de los tejidos y las células dendríticas; al igual que linfocitos B y células citotóxicas. Dependiendo del tipo de estimulante (en este caso *Nocardia seriolae*), los niveles de mRNA de IL-1 β en *Paralichthys olivaceus* aumentan en cuestión de 15 minutos, y comienza a decaer después de cuatro horas (Thompson y Lotze, 2003; Tanekhy *et al.*, 2010). Su producción es importante en la respuesta ante invasión microbiana, daño del tejido y reacciones inmunológicas por parte del hospedero, ya que tiene la habilidad de mejorar la actividad fagocítica (Covello *et al.*, 2009).

IL-1 β se produce más que todo en bazo e hígado; y al igual que TNF α es una molécula precursora inactiva, que necesita ser procesada por una enzima convertidora como IL-1P (Caspasa 1) que le permite activarse, pues la secuencia que codifica para ICE (enzima convertidora en mamíferos) que normalmente es la que activa esta citoquina, carece en los peces (Giuseppe *et al.*, 2006).

En cuanto a la hormona de crecimiento (GH), se sabe que es un polipéptido producido por la glándula pituitaria de la adenohipófisis, involucrada en el crecimiento somático post-natal (Harris y Bird, 2000).

Aunque su función, como lo dice su nombre, es fomentar el crecimiento de las células, se ha demostrado que también se encarga de activar los fagocitos y estimular la maduración de uno de los mayores y primeros órganos linfoides en teleósteos: el timo. Es una hormona capaz de activar las células citotóxicas, la respiración de leucocitos e inducir la mitogénesis en leucocitos y fagocitos bloqueando la cortisona y promoviendo la proliferación de linfocitos T (Harris y Bird, 2000).

Poder relacionar el sistema inmune con las hormonas es una tarea difícil, ya que la secreción de muchas de éstas afecta la síntesis de otras hormonas y se vuelve todo muy complejo (Harris y Bird, 2000). Sin embargo, ya se demostró que las respuestas inmunológicas al estrés dependen de varias hormonas, de las interacciones entre ellas y con células inmunocompetentes como las citoquinas.

Estas interacciones GH-citoquinas, se producen debido a la similaridad entre la GH y un variado número de citoquinas, entre ellas algunas interleuquinas; ya que ambas tienen receptores muy similares expresados en las células linfoides (Harris y Bird, 2000; Yada, 2007). Lo anterior revela una asociación evolutiva y funcional entre el sistema inmune y la GH, que a su vez indica que esto es lo que le permite actuar como citoquina accesoria de manera autocrina/paracrina (Jeay *et al.*, 2002). Además la regulación de esta última en la secreción de GH en leucocitos, es fundamental en la defensa contra patógenos en los sitios de infección (Yada, 2007).

Existe evidencia que indica que las hormonas son potentes inmunomoduladores bajo condiciones de estrés, participando en varios aspectos de la función del sistema inmune en individuos tanto enfermos como saludables (Jeay *et al.*, 2002). Un claro ejemplo de esto ocurre en los peces eurihalinos que presentan un alto nivel de GH circulando en el plasma, cuando se adaptan de agua dulce a agua de mar. Esta actividad está correlacionada con la activación del sistema inmune, pues la hormona de crecimiento en el plasma aumenta la actividad fagocítica de macrófagos en el riñón anterior y la adaptabilidad al agua marina mediante la diferenciación de mecanismos secretores de sal (Harris y Bird, 2000; Yada, 2007); además regula la supervivencia de células T en condiciones estresantes (Jeay *et al.*, 2002). Esto permite concluir que muchos de los cambios en los niveles de las hormonas en el plasma corresponden a cambios en el status del sistema inmune (Yada, 2007).

2.3 Probióticos como estrategia implementada para mejorar la salud en acuicultura

Es bien sabido que los organismos acuáticos tienen una relación muy estrecha con su medio ambiente, ya que están íntimamente en contacto con una gran variedad de microorganismos, dentro de los cuales se encuentran patógenos potenciales y bacterias oportunistas que circundan muy cerca de su cuerpo proliferando independientemente (Verschuere *et al.*, 2000; Ellis, 2001; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). Estos patógenos son ingeridos constantemente por parte de los peces mediante la osmorregulación y su alimentación, y son estos factores externos los que alteran la microbiota intestinal de los peces (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008); sin embargo se establece que una microbiota protectora es un componente clave cuando se trata de excluir invasores potenciales y mantener la buena salud (Balcázar *et al.*, 2006).

La alteración negativa de la microbiota es uno de los mayores problemas existentes en un cultivo, además el aumento de la productividad en la acuicultura siempre ha estado acompañado por impactos ecológicos, incluyendo la aparición de una gran variedad de bacterias multiresistentes a antibióticos (Gómez y Balcázar, 2007). Estos impactos, se dan en parte, gracias al uso indiscriminado de agentes quimioterapéuticos como una solución al manejo práctico de los ciclos de producción, logrando únicamente la creación de cepas resistentes a estos tratamientos (Balcázar *et al.*, 2006). La microbiota es un componente importante de la barrera de la mucosa intestinal, propia del organismo y natural, es por esta razón que hoy en día se está promoviendo cada vez más el uso de bacterias benéficas con propiedades probióticas como una alternativa a las sustancias químicas (Gómez y Balcázar, 2007).

El concepto de administrar microorganismos vivos, con el fin de modificar la microbiota y mejorar la salud intestinal y el bienestar general de un organismo, nace a principios del siglo XX (Gómez y Balcázar, 2007). Actualmente, los probióticos como suplemento alimenticio se encuentran sujetos a investigaciones exhaustivas, para comprobar sus efectos contra bacterias patógenas y su mecanismo de acción como moduladores en la expresión de los genes de defensa implicados (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Las organizaciones World Health Organization y Food and Agriculture Organization definen los probióticos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios en la salud del hospedero” (FAO/WHO, 2001). La mayoría de estos microorganismos pertenecen a la familia de los *Bacillus* sp. (Salinas et al., 2005; Panigrahi et al., 2007; Kesarcodi-Watson et al., 2008), *Carnobacterium* sp. (Robertson et al., 2000; Irianto y Austin, 2002; Kim y Austin, 2006) y *Lactobacillus* sp. (Nikoskelainen et al., 2001, 2003; Panigrahi et al., 2004; Balcázar et al., 2007b), aunque el uso de otras especies como *Aeromonas* sp. y *Vibrio* sp. han sido evaluados en diversos estudios (Austin et al., 1995; Irianto y Austin, 2002; Brunt y Austin, 2005).

Se ha demostrado que la ingestión de probióticos modifica la composición de la microbiota, y de hecho ayuda a restablecer la composición normal benéfica de la microbiota que ha sido modificada por el uso de antibióticos y otros quimioterapéuticos. Esto se debe a los mecanismos de acción que utilizan las bacteria probióticas tales como producción de sustancias como ácidos orgánicos o bacteriocinas (Balcázar et al., 2007a, 2007b), competencia por nutrientes o exclusión competitiva por adhesión a receptores (Nikoskelainen et al., 2001; Vine et al., 2004; Balcázar et al., 2006; 2007a), inhibición de la expresión genética virulenta y mejoramiento de la respuesta inmune (Nikoskelainen et al., 2003; Kim y Austin, 2006; Balcázar et al., 2007b; Kesarcodi-Watson et al., 2008). Estos mecanismos de acción se pueden presentar individualmente o en conjunto, sin embargo, las consecuencias en el hospedero serán la supresión de patógenos, alteración del metabolismo bacteriano y estimulación del sistema inmunológico (Escobar et al., 2006).

Todos los días aumenta la evidencia que algunos probióticos pueden estimular la resistencia innata del hospedero contra bacterias patógenas (Kesarcodi-Watson et al., 2008; Nayak 2010). Las bacterias probióticas, al colonizar de manera adecuada a los organismos y contrarrestar la proliferación de microorganismos patógenos en el intestino, contribuyen a estimular el sistema inmunológico del hospedero manteniendo un ambiente de cultivo adecuado (Nikoskelainen et al., 2001). Los hallazgos de Irianto y Austin (2002) demuestran que después de alimentar organismos con probióticos que

contenían *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Carnobacterium* sp. y *Micrococcus luteus* durante dos semanas, se evidenció un incremento en la actividad de la lisozima y en el número de eritrocitos, macrófagos y linfocitos; demostrando que existe una habilidad, por parte de las especies de microorganismos no patogénicos, para modular el funcionamiento inmunológico del hospedero. Por su parte Villamil *et al.* (2003a) inyectaron nisina en *Scophthalmus maximus*, encontrando que después de una semana, la respuesta del sistema inmune en cuanto a actividad de macrófagos evidenció un leve aumento, mientras que la lisozima presente en el suero, se incrementó significativamente, lo cual demuestra modulación del sistema inmune pro parte de la nisina.

Otros ejemplos se pueden observar en estudios realizados por Panigrahi *et al.* (2004) quienes alimentaron trucha con una dieta que contenía *Lactobacillus rhamnosus*, evidenciando un incremento en los niveles de lisozima en el suero y comprobando así una estimulación del sistema inmune innato. Por otra parte Balcázar *et al.* (2007b) observaron un efecto positivo en la respuesta inmune humoral administrando *Lactococcus lactis* ssp., *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* en trucha arcoíris (*O. mykiss*), pues la actividad fagocítica de los leucocitos en el riñón anterior, aumentó significativamente en todos los organismos alimentados con bacterias y la supervivencia contra *Aeromonas salmonicida* fue de 97.8 a 100% en los peces con alimento suplementado.

Para el caso de Tilapia nilótica (*O. niloticus*), Pirarat *et al.* (2006) mostraron que luego de haber alimentado con *Lactobacillus rhamnosus* durante dos semanas, se detecta un estímulo en la inmunidad celular, pues la actividad fagocítica aumenta significativamente. De manera similar, Ferguson *et al.*, (2010) encontraron que la actividad de la lisozima en *O. niloticus*, aumentó después de 14 días de alimento suplementado con *Pediococcus acidilactici*; sin embargo los niveles de leucocitos en el intestino no se vieron afectados por la administración de probióticos ya que se encontró un antagonismo del probiótico con bacterias endógenas del tracto gastrointestinal. Por su parte, Wang *et al.* (2008) alimentaron tilapia nilótica con *Enterococcus faecium* durante 40 días y encontraron un aumento en el peso de los peces, más no hubo diferencias significativas en la actividad de

la lisozima; muy distinto a los resultados obtenidos por Aly *et al.* (2008c) quienes probaron 8 meses con el probiótico *Bacillus pumilus* en la misma especie, encontrando aumento en leucocitos, monocitos y linfocitos del suero, además de supervivencia contra *Aeromonas hydrophila*.

Los probióticos, aparte de otorgar beneficios al organismo, también pueden modificar la respuesta inmune del hospedero, interactuando con las células epiteliales y modulando la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, que da como resultado una reducción en la inflamación (Gómez y Balcázar, 2007). Sin embargo, se debe tener en cuenta que aunque los probióticos han dado como resultado una tecnología global que es la solución para sustituir las terapias con antibióticos por métodos menos agresivos, es importante saber que en muchos casos el uso de probióticos en dosis inadecuadas, tiempos muy prolongados o muy cortos, pueden dar como resultado muy baja o nula eficiencia en el aumento de la producción (Rosmini *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008).

En el estudio realizado por Noguera (2010), se aisló una bacteria de branquia de tilapia nilótica (*Exiguobacterium* sp. B16) y se probó su actividad antimicrobiana *in vitro*, demostrando una inhibición de los patógenos *Aeromonas hydrophila* y *Streptococcus agalactiae*.

Por su parte, Ardila (2010) prueba *Exiguobacterium* sp. B16 como posible probiótico en juveniles de tilapia nilótica, obteniendo resultados positivos que se evidenciaron en aumento de peso y talla en los organismos que consumieron alimento enriquecido con la bacteria aislada, además que presentaron una mayor supervivencia frente a *Streptococcus agalactiae*.

La bacteria *Exiguobacterium* sp. ha sido aislada repetidamente del antiguo suelo siberiano permafrost; sin embargo también se ha encontrado en plantas de *Rhizophora* y en plantas procesadoras de alimento, lo que amplía su rango térmico de -12°C a 55°C (Vishnivetskaya *et al.*, 2009). La gran mayoría de las cepas de *Exiguobacterium* sp. que han sido analizadas y caracterizadas biológica, morfológica y molecularmente, se han posicionado muy cerca del género *Bacillus* en la cadena evolutiva, pues genómicamente

su contenido GC es muy similar al de muchos organismos de esta especie (Rodrigues et al., 2006).

Exiguobacterium sp. es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa y con enzimas de degradación de polímeros de carbohidratos. Algunas cepas poseen propiedades únicas de interés para la aplicación de biotecnología, biorremediación, industria y agricultura; también tienen gran cantidad de enzimas dentro de las cuales se pueden encontrar proteasas alcalinas, catalasas, guanosinquinasa, ATPasas, deshidrogenasas, esterasas y la posibilidad que algunas especies pueden producir energía por reducción de nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) utilizando respiración anaeróbica (Rodrigues et al., 2006; Vishnivetskaya et al., 2009).

Estudios recientes como el de Hipólito et al. (2008) y Orozco et al. (2009) demuestran que *Exiguobacterium mexicanum* al ser administrada en *Artemia franciscana*, produce resultados positivos que se reflejan en el desarrollo y crecimiento larval de esta especie; sus mecanismos de acción posiblemente están actuando a nivel intestinal haciendo que los nutrientes de la levadura que se le administró, sean bio-viables para la *Artemia*.

2.4 Técnicas para el estudio de expresión de genes

Hoy en día el desarrollo de nuevas tecnologías en la ciencia, permite y facilita la realización de estudios mejorados con resultados confiables en una investigación. Dentro de estos estudios, uno de los más novedosos ha sido la biología molecular que aparece desde el descubrimiento de la doble hélice de ADN y que continúa desarrollándose y mejorándose cada vez más (Corvalán, 2002).

La PCR (Reacción de Polimerasa en Cadena) y otras técnicas pudieron ser desarrolladas gracias a los descubrimientos acerca de la molécula de ADN, cómo se duplica, cómo se transcribe a un mensajero, cómo se traduce el mensaje y cómo se pliega el polipéptido recién desarrollado; todos estos procesos se engloban en los conocimientos de la Biología molecular (Corvalán, 2002).

El Método de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN, con esta magnitud de amplificación, es posible analizar moléculas de ADN o ARN con pocas cantidades de muestra, como es el caso de la amplificación de una región específica del gen de un pez (Corvalán, 2002).

Para la realización de la PCR se utilizó el Kit RETROscript® (Ambion) y GoTaq® Green Master Mix (Promega) (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos para PCR.

REACTIVOS	CANTIDAD
GoTaq® Green Master Mix	1 - 2 U
cADN	1 - 5 µL
Primers	2,5 µL
Mezcla dNTP	2,5 µL
Buffer 10x PCR	5 µL
Agua sin Nucleasas	50 µL

La PCR comienza con el fragmento de ADN a estudiar y se le añaden los primers (“partidores o cebadores”) que sirven como señal para que la ADN polimerasa comience su trabajo realizando una síntesis exponencial. Cada ciclo de amplificación tiene tres etapas importantes: la denaturación, el alineamiento y la extensión (Figura 3).

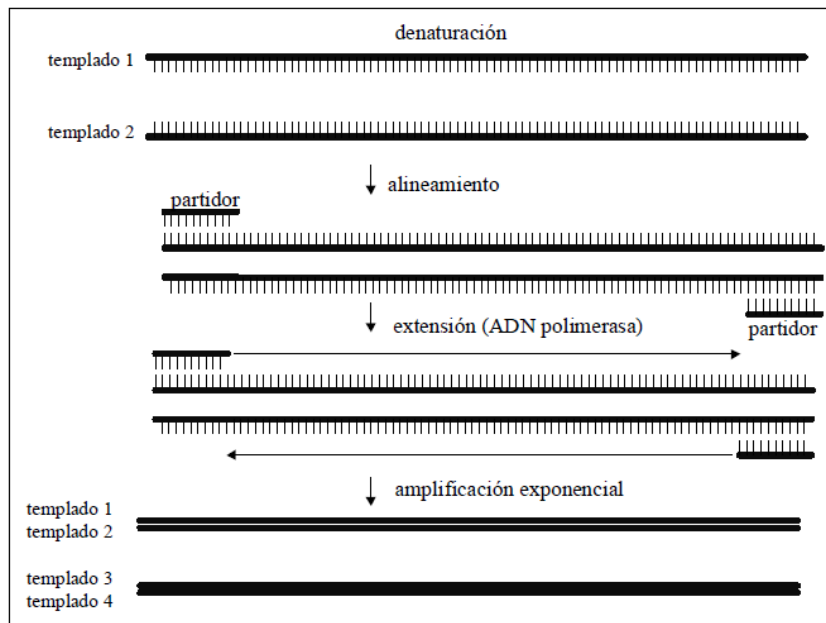


Figura 3. Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) (Tomado de Corvalán 2002).

La denaturación se lleva a cabo a una temperatura de 95°C y como lo dice su nombre, desnatura el ADN y separa las dos hebras de éste para que ambas sirvan de molde para la síntesis de un nuevo ADN; el tiempo de este proceso depende de lo largo de la cadena, pero usualmente toma de 30 segundos a un minuto. Al comienzo de la amplificación es necesario separar todo el ADN, por lo cual se realiza una incubación inicial a 95°C por cinco minutos (Sambrook y Russell, 2001; Corvalán, 2002; Villarroel *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

El siguiente paso, permite el anillamiento de los primers o cebadores con la hebra original; esto ocurre a una temperatura entre 45 y 60°C. En este momento es cuando la ADN polimerasa comienza a unir nucleótidos complementarios a la cadena original (Corvalán, 2002; Xing *et al.*, 2008).

Finalmente la extensión se lleva a cabo a 72°C que es la temperatura de máxima eficiencia de la enzima, y el tiempo que se demore será determinado por la distancia que exista entre los primers. (Corvalán, 2002, Poletto *et al.*, 2008).

Por otra parte, la obtención de ADN complementario (cDNA) para llevar a cabo una PCR de cDNA, es otro proceso que involucra el avance de la biología molecular. El ADN complementario como lo dice su nombre, es una molécula de ADN complementaria a una de ARN mensajero (ARNm). Se crea por acción de la Transcriptasa reversa, una enzima que proviene del retrovirus y utiliza como molde una cadena sencilla de ARN para producir una cadena sencilla de cDNA (Figura 4) que corresponde únicamente a secuencias codificadoras de proteínas, ya que el ARNm que emplea la enzima, es maduro y por lo tanto no contiene intrones (regiones del ADN que no codifican proteínas) (Poletto *et al.*, 2008).

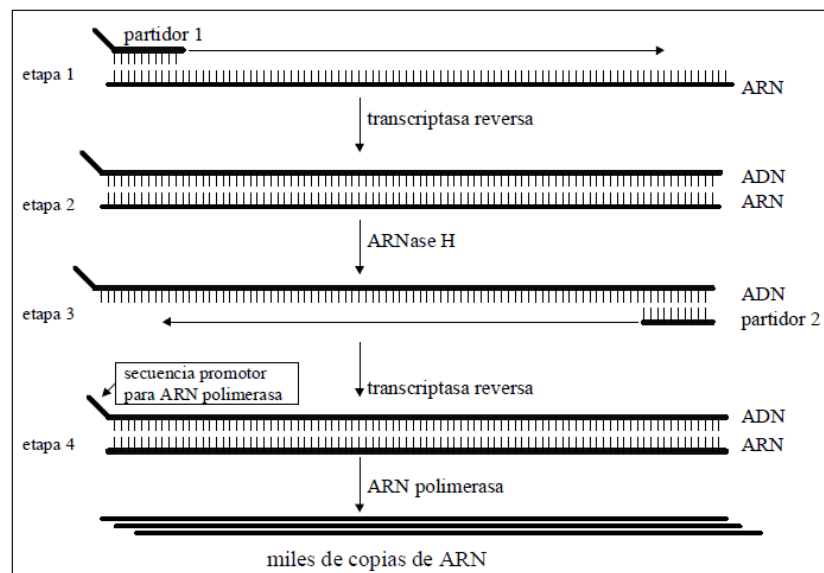


Figura 4. Obtención de ADN complementario (cDNA)

Luego de este proceso se puede realizar la PCR y aunque ésta permite la amplificación de ácidos nucleicos; la visualización del producto amplificado requiere de otras

metodologías posteriores a la amplificación. El método más utilizado es la electroforesis de agarosa, técnica en la cual el producto, sometido a corriente eléctrica, migrará de acuerdo a su tamaño (Corvalán, 2002; Wasko *et al.*, 2007).

La electroforesis separa las moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) dependiendo de la movilidad de éstas en un campo eléctrico; esto provoca una clasificación por tamaños moleculares y carga eléctrica. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa, lo cual facilita que migren hacia el polo positivo; mientras que las proteínas se cargan con sustancias que le proporcionan una carga negativa dependiendo del peso molecular. Las moléculas pequeñas (de bajo peso molecular), migran con mayor velocidad llegando más cerca al polo positivo, mientras que las más pesadas quedan cerca del sitio de partida (Lorenzen, *et al.*, 1990).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El uso de probióticos en acuicultura ha generado polémica, debido a que los mecanismos de acción que utilizan las bacterias probióticas aún no se han establecido en peces. *Exiguobacterium* sp. B16 es una bacteria asilada de branquia de tilapia nilótica que en estudios previos ha mostrado propiedades antimicrobianas con resultados positivos. Por lo tanto, es significativo establecer si estos efectos benéficos de la bacteria, se deben a mecanismos de acción como la modulación de la expresión de algunos genes clave en la defensa de la tilapia nilótica *O. niloticus*, tales como transferrina, interleuquina-1 β (IL-1 β), y la hormona de crecimiento (GH) al ser suplementada en el alimento y evaluada mediante PCR semi-cuantitativa.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Establecer la diferencia de la expresión de los genes transferrina y GH en peces alimentados con alimento enriquecido con la bacteria asilada de branquia (*Exiguobacterium* sp. B16) de *O. niloticus*, en relación con los niveles de expresión de este gen en peces alimentados con pienso comercial.
- ◆ Evaluar el efecto que tiene el alimento enriquecido con la bacteria asilada de branquia (*Exiguobacterium* sp. B16) de *O. niloticus*, sobre la expresión de una de las citoquinas clave en la defensa innata de los peces como IL-1 β , en relación con los niveles de expresión de esta citoquina en tilapia nilótica alimentada con pienso comercial.

5. HIPÓTESIS

- ◆ Los peces que reciban alimento enriquecido con la bacteria *Exiguobacterium* sp. B16 aislada de branquia, evidenciarán un aumento en el nivel de expresión de genes de defensa (transferrina, IL-1 β y GH), con respecto a aquellos individuos alimentados con pienso comercial sin ningún tipo de enriquecimiento.

6. METODOLOGÍA

6.1 Elección de individuos

Los individuos de tilapia nilótica (*O. niloticus*) adquiridos, fueron seleccionados en el SENA agropecuario de Gaira, en buen estado de salud sin ningún indicio de enfermedad o de exposición a microorganismos patógenos.

Se aclimataron igualando la temperatura del agua a 26°C aproximadamente y se situaron en estanques con oxígeno permanente, éstos fueron alimentados tres veces al día con alimento comercial sin ningún tipo de enriquecimiento.

6.2 Probióticos y cepas bacterianas

Para el uso de bacterias probióticas, se utilizó la bacteria *Exiguobacterium* sp. B16 aislada de branquia de tilapia nilótica ya que mostró las mejores propiedades probióticas *in vitro* e *in vivo*. Esta bacteria se cultivó en medio Triptosa Soya Agar (TSA) a temperatura ambiente para luego congelarla a -20°C en TSB + 20% glicerol, con el fin de mantenerla disponible para su posterior uso.

6.3 Enriquecimiento del alimento comercial

Para la preparación del alimento, se descongeló la bacteria aislada y se sembró en TSA a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez crecida la bacteria, se tomaron 10g de alimento comercial y se trituró en la licuadora hasta lograr pedazos pequeños y “algo” de polvo. Al mismo tiempo se realizaron diluciones de la bacteria en PBS (10mM- Na₃PO₄, 150mM-NaCl; pH 7 · 2) y se contaron en el microscopio para lograr una concentración eficiente de 10⁶ UFC/g (Villamil *et al.* 2003b). Cuando la bacteria quedó a la concentración adecuada, se le agregó una gota de Emulsión de Scott para agregar ácidos grasos al igual que al control; posteriormente la dilución fue agregada al alimento triturado y mezclada hasta que todo el alimento quedó húmedo y homogéneo.

6.4 Diseño experimental y toma de muestras

De los acuarios del laboratorio se tomaron al azar, peces pequeños de tilapia nilótica (*O. niloticus*) en buen estado de salud previamente aclimatados y se distribuyeron al azar en dos acuarios plásticos de 20 litros con una densidad aproximada de 15 individuos por tratamiento. Los peces tuvieron un flujo de agua estático con recambio diario del 25% de agua previamente dechlorinada, una temperatura de 28°C con aireación continua, fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad.

Los peces se alimentaron tres veces al día durante dos semanas con pienso comercial con 24% de proteína para el tratamiento control y con el mismo concentrado suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16 en una concentración de 1×10^6 UFC/g.

Una vez iniciada la alimentación con pienso comercial enriquecido, se tomaron muestras de ambos tratamientos, retirando 5 peces de cada acuario a las 24h y a los 15 días del experimento. De cada uno de los individuos se extrajo el riñón y el bazo que se colocaron en tubos eppendorf estériles independientes con 500 µl de RNAlater (Ambion), solución que estabiliza y conserva íntegro el ARN presente en las células de la muestra, permitiendo así congelar los órganos a -20°C y no necesariamente en nitrógeno líquido (Applied Biosystems, 2007). Las muestras fueron conservadas para su posterior extracción de ARN en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta.

6.5 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

El ARN es una molécula frágil que puede ser degradada por ARNasas ambientales, para evitar la degradación de esta estructura se utilizó el producto RNAzap y un juego de pipetas estériles bañadas en este mismo producto para evitar contaminaciones. La extracción de ARN se realizó con el kit RNAqueus® (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, de la siguiente manera:

Antes de comenzar con las muestras, se prepararon todos los reactivos que se iban a utilizar en la extracción como el Etanol al 64% y precalentar Elution Solution a 70-80°C. Se limpió toda la zona de trabajo y los materiales con RNAzap (Ambion).

Los órganos se colocaron en un tubo eppendorf estéril con 200µl de Lysis/binding para su posterior maceración con un homogenizador plástico estéril. Ya macerados los órganos, se agregó a cada tubo 200 µl de etanol al 64% y se homogenizó la muestra en el vórtex; esta mezcla se transvasó a un tubo nuevo de colección con filtro.

A continuación se centrifugaron los tubos a 12.000 rpm durante un minuto, se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar el proceso de lavado, el cual consistió en agregar 700 µl de Wash Solution #1 al filtro y repetir el proceso de centrifugado a la misma velocidad y tiempo. Una vez desechado el sobrenadante, se lavó de nuevo el filtro con 500µl de Wash Solution # 2/3 y se llevó a la centrifuga para repetir el proceso. Después de eliminar el sobrenadante, se realizó un último proceso de centrifugación, sin haber agregado nada al filtro, con el fin remover posibles reactivos utilizados en el proceso de lavado y así poder pasar el filtro a un tubo nuevo.

Finalmente, el volumen de Elution Solution está relacionado con la cantidad de ARN requerida, siendo el mínimo 50 µl; cantidad que fue agregada en alícuotas secuenciales de 30 µl, 10 µl y 10 µl a 75°C, separadas cada una por un proceso de centrifugación de 14.000 rpm durante 30 segundos.

6.6 Obtención de ADN complementario (cDNA)

Para la obtención de cDNA, se utilizó el kit RETROscript® (Ambion), el cual contiene la enzima transcriptasa reversa que sintetiza ADN complementario a partir de cadenas molde de ARN. Con el fin de crear un ambiente un poco más específico en la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), se utilizó oligo (dt) debido a su afinidad por las colas poliA propias del ARN mensajero (mARN). La mezcla de los reactivos incluidos en el kit se realizó de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes necesarios para preparación de mezcla de reacción para obtención de cDNA

COMPONENTE	CANTIDAD
Oligo (dt)	2 µl
Buffer 10X RT	2 µl
Mezcla dNTP	4 µl
Inhibidor Placentar ARNse	1 µl
MMLV-RT	1 µl

Los tubos se trabajaron siempre en frío para conservar las enzimas, y a cada uno de ellos se les agregó 10 µl de la mezcla de reacción + 10 µl de ARN de cada muestra. Luego fueron llevados al termociclador para incubar a 44°C durante una hora e inmediatamente a 92°C por 10 minutos, temperatura que inactiva la enzima de la Transcriptasa Reversa MMLV-RT. Esta enzima es ARN-dependiente ya que es codificada por el “*Moloney Murine Leukemia Virus*” que utiliza la síntesis de ADN complementario a partir de una cadena simple de ARN. El ARN se mantiene intacto debido a la baja actividad de la ARNasa H, encargada de eliminar el ARN de un híbrido ADN-ARN pero no una cadena ya sea simple o doble de ADN o ARN (Sambrook y Russell, 2001).

6.7 Estandarización de las condiciones para la PCR de cada gen

Para la realización de la PCR, es necesario el uso de primers o cebadores, ya que juegan un rol importante por ser los segmentos cortos de ADN que se unen de forma complementaria y definen el sitio de acción de la ADN polimerasa (Corvalán, 2002).

El diseño de los primers para los genes actina, transferrina, IL1-β y hormona de crecimiento (GH) se realizó utilizando la secuencia de ADN de tilapia nilótica disponible en la base de datos del GeneBank. Esta secuencia fue introducida en el programa Primer Quest, que ejecutó una simulación virtual de la PCR y arrojó en sus resultados, los

posibles primers útiles para la amplificación de un segmento determinado de acuerdo con las especificaciones introducidas en el programa. Dentro de las descripciones, se tuvieron en cuenta las terminaciones de la cadena, la ubicación del primer dentro de la secuencia, la temperatura de anillamiento, la especificidad de la reacción, la cantidad de ciclos de la PCR, evitar la formación de dímeros y de loops por complementariedad del 3' (Covello *et al.*, 2009).

Por su parte, para la evaluación de los niveles de transcripción de ARNm y la expresión de genes, fue necesario poner a prueba el cADN con cada uno de los primers obtenidos, ajustando la temperatura, cantidad de ciclos y mejores tiempos para estandarizar la mejor amplificación de los genes de estudio (Tabla 4).

6.8 Niveles de transcripción y expresión de genes

Para poder observar los niveles de transcripción y la expresión de los genes, se realizó una PCR, ya que es una técnica empleada para amplificar copias de cADN, y es frecuentemente utilizada para amplificar genes específicos cuando la secuencia es parcialmente conocida (Griffiths *et al.*, 2002).

El cADN obtenido, fue utilizado como la cadena molde para la realización de la PCR con primers diseñados para cada uno de los genes de estudio: transferrina, IL1- β y GH. De igual manera, se realizó una PCR con los primers específicos para amplificar actina ya que fue utilizada como un control debido a que es considerado como un gen conservado o “housekeeping gene” para normalizar los valores obtenidos en los demás genes. Éste es un gen que se expresa en todos los tejidos porque codifica una proteína necesaria para la función celular y cuya expresión es constante; es por esto que este gen es utilizado para estandarizar (Ellis, 2001; De Ferrari, 2005).

La realización de la PCR se llevó a cabo con la preparación de una mezcla de reacción que une todos los ingredientes necesarios usando el reactivo GoTaq® Green Master mix (Promega), que permite, una vez obtenido el producto de PCR, cargar el gel de agarosa

directamente para realizar la electroforesis, sin necesidad de agregar buffers de carga al ADN como el azul de bromofenol (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes preparación mezcla de reacción de PCR para genes actina, transferrina y GH.

COMPONENTE	CANTIDAD
Agua Libre de Nucleasas	4,75 µl
GoTaq® Green Master Mix	6,25 µl
Primer Forward	0,25 µl
Primer Reverse	0,25 µl
cDNA	1 µl

Las amplificaciones de cada gen se llevaron a cabo en un termociclador Multigene siguiendo los parámetros indicados en la siguiente tabla:

Tabla 4. Parámetros de PCR.

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO
Denaturación inicial	1	94	2 Minutos
Amplificación	35	94	30 Segundos
		50*	30 Segundos
		72	45 Segundos
Extensión Final	1	72	3 Minutos

* La temperatura de anillamiento se modificó de acuerdo a los resultados de la estandarización de las condiciones para la PCR.

6.9 Electroforesis de productos amplificados en gel de agarosa

Para la realización de la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TBE con 1 μ l de bromuro de etidio para el caso de actina, GH y transferrina, y para IL-1 β se realizó un gel de agarosa al 2%. Este proceso se llevó a cabo utilizando guantes de nitrilo y operando con cuidado debido a que el bromuro de etidio es un compuesto altamente tóxico, mutagénico y cancerígeno (©IPCS y CE, 2007). A cada gel con 15 orificios, se sembraron 10 muestras (cinco del tratamiento Control y cinco del tratamiento con *Exiguobacterium* sp. B16), cada una con un volumen de 10 μ l; al lado se sembraron 7 μ l del Marcador de Peso Molecular 100bp ADN (Promega).

Los productos amplificados se corrieron en una cámara de electroforesis Sub-Cell® GT Bio-Rad, durante 45 minutos a 100V y 115 mA; posteriormente los geles fueron llevados al fotodocumentador de geles Gel Doc XR System Bio-Rad para visualizar las bandas con luz UV.

Cada uno de los geles fue fotografiado y con ayuda del programa Quantity One 4.6.7, se calcularon las intensidades de banda de los genes de estudio. Para obtener la intensidad neta de cada banda, se dividió la intensidad de cada una entre la intensidad de las bandas de actina (Anexo A).

6.10 Análisis estadístico

Se utilizaron las intensidades de banda obtenidas de cada gen para hallar el promedio de cada tratamiento, al igual que la desviación estándar. Con ayuda del programa STATGRAPHICS Centurion XV se realizó una prueba de Mann-Whitney a los datos para determinar diferencias significativas entre tratamientos, teniendo en cuenta un valor $P < 0,05$ y un 95% de confianza.

7. RESULTADOS

7.1 Diseño de primers

En el programa Primer Quest, se realizó el diseño de los primers para los genes actina, transferrina, IL-1 β y GH basados en las secuencias de ADN de *O. niloticus* publicadas en el GeneBank. Cada uno de estos cebadores cumple con unas características propias para su uso tales como el tamaño dado en pares de bases (bp) y la temperatura de anillamiento (Tm), es decir la temperatura a la cual se produce la unión complementaria entre el primer y el fragmento específico de la cadena de cADN que se desea amplificar. Los primers obtenidos luego de la simulación virtual de la PCR se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Primers obtenidos a partir de las secuencias ADN de tilapia nilótica *O. niloticus*.

GEN	“FORWARD”	“REVERSE”	REFERENCIA GENEBANK
Actina	TGTGATGGTGGGTATGGGT CAGAA	TGATGTCACGCACGATTTCCCTC T	EF206801.1
Transferrina	CACTCTGTGACGTTTCATCTC TG	GTAGTAGAGTGGTAGAGTCCAA GG	gi_89475214
IL1- β	TTCCGGGCCATGATTTATTA	GAGGTTTGTGCCTTTGATGC	No publicado
GH	CAACGAATCGCTGAGACAA A	CCACACATCAATGCAACACA	M26916.1

7.2 Estandarización de condiciones para PCR

En la estandarización de las condiciones para la PCR, se probaron cada uno de los primers y su efectividad para amplificar, basada en las pruebas realizadas anteriormente en el estudio de Reyes-Perdomo (2009). Los primeros primers que se estandarizaron fueron los del gen actina, ya que estos eran el control; sin embargo amplificaron algunas bandas inespecíficas a 50°C, razón por la cual la temperatura de anillamiento se aumentó a 60°C para hacer más específico el anillamiento. Lo mismo sucedió para el gen de transferrina y la hormona de crecimiento (GH) para los cuales también se aumentó la temperatura a 60°C. Por su parte IL-1 β se amplificó a una temperatura de 50°C.

7.3 Expresión de genes de defensa

El gen actina se amplificó en todas las muestras al igual que los genes que codifican para transferrina, IL-1 β y GH; sin embargo este primero se utilizó como gen conservado (housekeeping gene) y se empleó como un control positivo en la PCR. Para calcular el grado de inducción de los genes de defensa y la hormona de crecimiento, se calcularon las densidades de las bandas cuantificando la intensidad neta de cada una, y dividiendo esta intensidad entre la intensidad de la banda correspondiente del gen actina.

7.3.1 Expresión del gen transferrina

La Figura 5 muestra la expresión del gen transferrina. En el riñón (Figura 5a) se observa una expresión similar de este gen a las 24 horas, tanto para el control como para el tratamiento suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16. Sin embargo a los 15 días de tratamiento hay una diferencia significativa entre los peces del control y B16, pues la expresión de transferrina en los peces con alimento suplementado es menor con respecto a los peces del control.

En cuanto al bazo (Figura 5b), la diferencia significativa se observa a las 24 horas, siendo mayor la expresión del gen transferrina en los peces alimentados con *Exiguobacterium*

sp. B16. No obstante a los 15 días, la expresión del gen se igualó tanto para el control como para los organismos con alimento suplementado; incluso se puede observar que con respecto a los valores de B16 reportados a las 24 horas, la expresión de transferrina disminuyó en los organismos con *Exiguobacterium* sp. B16 a los 15 días.

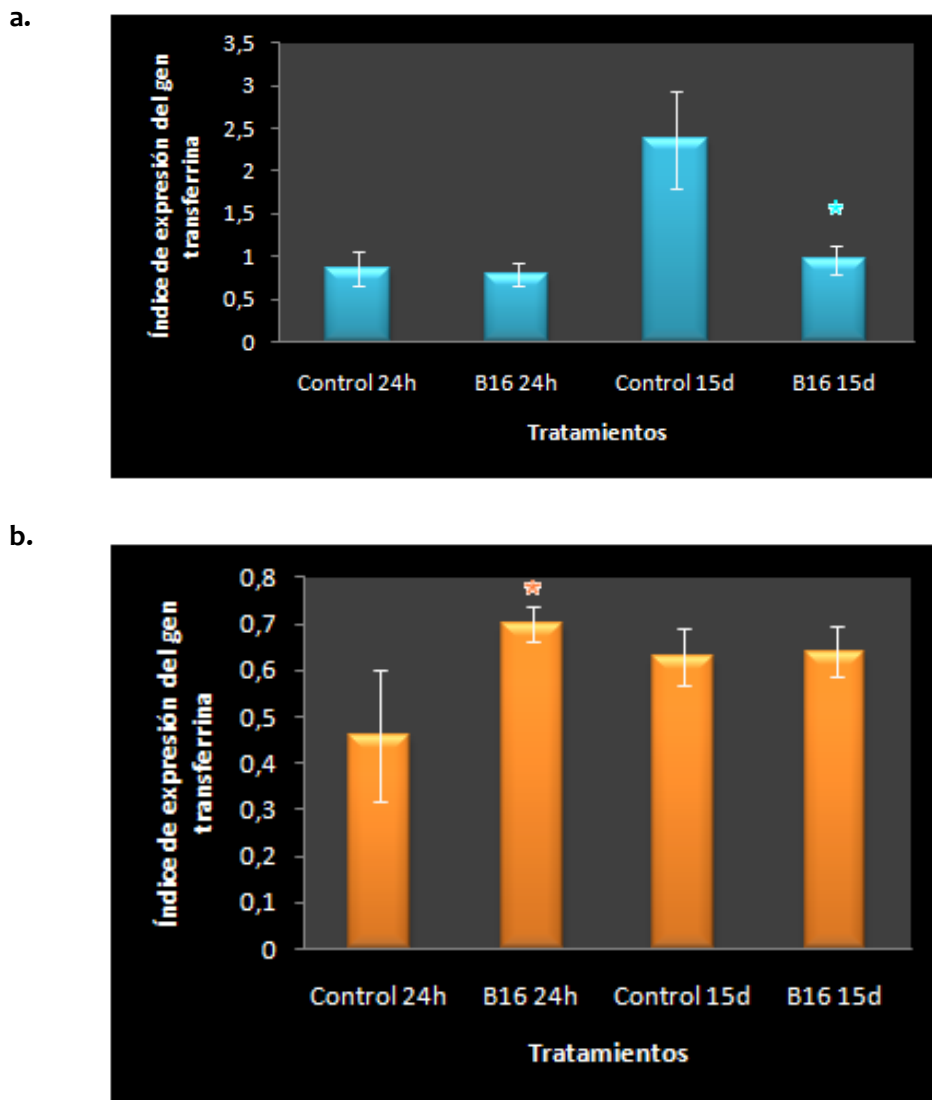


Figura 5. Cuantificación y comparación de la expresión del gen transferrina (ARNm) en riñón (a) y bazo (b) de *O. niloticus* en el grupo control y el grupo suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16, a las 24 horas y 15 días de tratamiento.

7.3.2 Expresión del gen IL-1 β

La Figura 6 muestra la expresión del gen IL-1 β . En el riñón (Figura 6a) hay una menor expresión del gen en los organismos tratados con *Exiguobacterium* sp. B16 tanto a las 24 horas como a los 15 días con respecto al control, habiendo diferencia significativa a los 15 días de tratamiento.

En cuanto al bazo (Figura 6b), no hay diferencias significativas en la expresión del gen IL-1 β entre el control y el tratamiento con *Exiguobacterium* sp. B16; incluso este último grupo mostró menor expresión del gen a las 24 horas y a los 15 días. Sin embargo a los 15 días, la expresión del gen para ambos tratamientos aumentó con respecto a los valores reportados a las 24 horas.

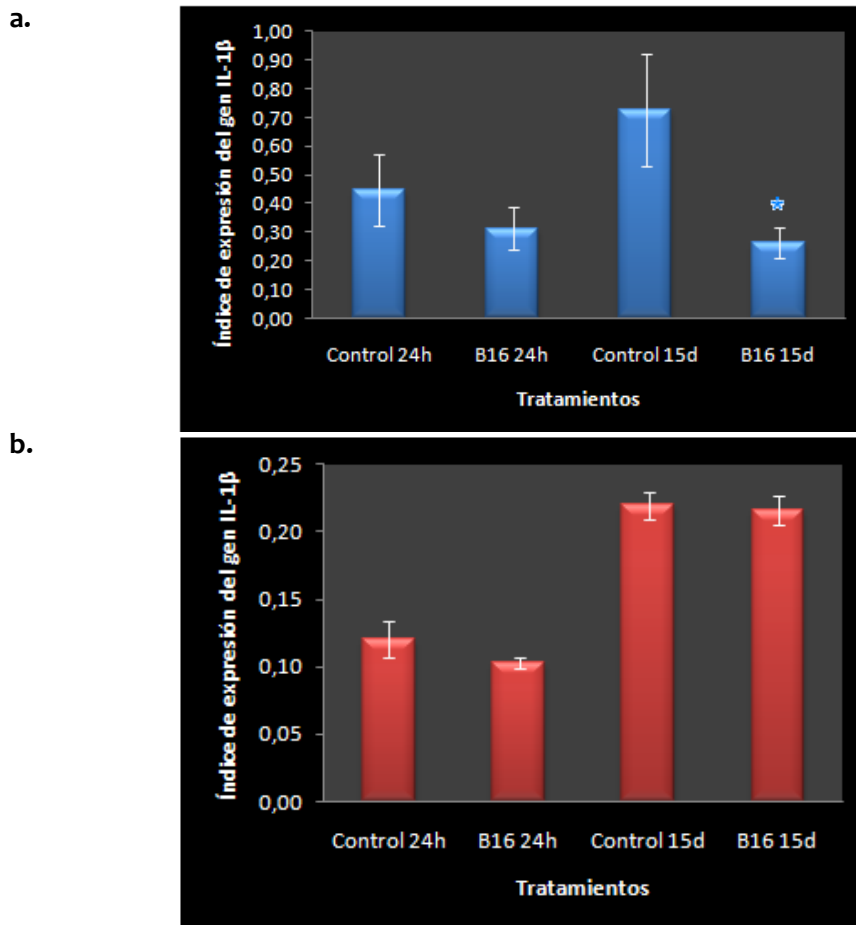


Figura 6. Cuantificación y comparación de la expresión del gen IL-1 β (ARNm) en riñón (a) y bazo (b) de *O. niloticus* en el grupo control y el grupo suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16, a las 24 horas y 15 días de tratamiento.

7.3.3 Expresión del gen regulador de la Hormona de Crecimiento (GH)

La expresión del gen de la hormona de crecimiento se observa en la Figura 7. Los organismos que consumieron alimento suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16 no evidenciaron diferencias significativas en el riñón a las 24 horas con respecto al control; sin embargo se evidencia una diferencia significativa con respecto al control a los 15 días de tratamiento (Figura 7a).

Por su parte, la expresión de GH en el bazo (Figura 7b) es contraria al riñón, ya que tanto a las 24h como a los 15 días, los individuos que consumieron alimento suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16, evidenciaron mayor expresión del gen con respecto al control.

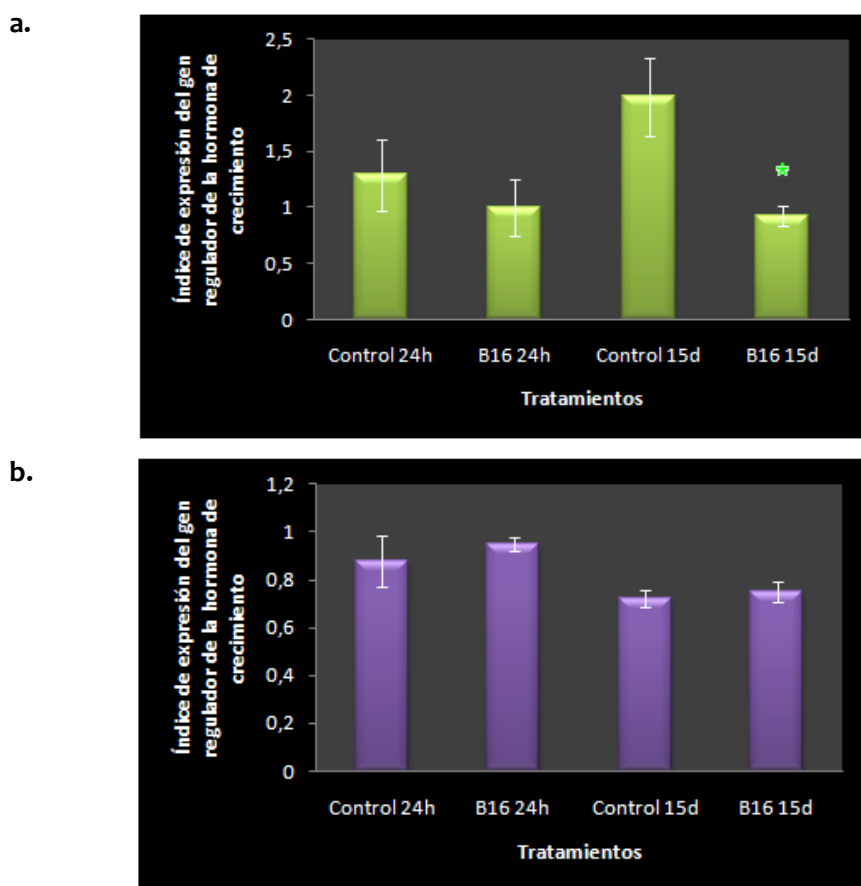


Figura 7. Cuantificación y comparación de la expresión del gen regulador de la hormona de crecimiento (ARNm) en riñón (a) y bazo (b) de *O. niloticus* en el grupo control y el grupo suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16, a las 24 horas y 15 días de tratamiento.

8. DISCUSIÓN

El uso de probióticos en acuicultura ha tenido un gran éxito, pues no sólo ha surgido como una alternativa al tratamiento con antibióticos, sino también como un suplemento del alimento comercial, pues ejerce efectos positivos tanto el crecimiento de los organismos de cultivo (Lara-Flores *et al.*, 2003; Günter y Jiménez, 2004; Balcázar *et al.*, 2006; Aly *et al.*, 2008a; 2008b; Wang *et al.*, 2008; Azza *et al.*, 2009) como la prevención de enfermedades, incluso llegando a estimular el sistema inmune mediante la regulación de la expresión de algunos genes de defensa (Villamil *et al.*, 2003a; Panigrahi *et al.*, 2004; Kim y Austin, 2006; Balcázar *et al.*, 2007a, 2007b; Bonaldo *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Panigrahi *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2008c; Wang *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009; Nayak 2010). El presente trabajo es un nuevo aporte al conocimiento científico que se basa en estudios preliminares desarrollados por el Grupo de Investigación en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos (GICMOA) con la cepa *Exiguobacterium* sp. B16, donde se probó su actividad antimicrobiana *in vitro* y sus propiedades probióticas *in vivo*, pues al ser suministrada en una concentración de 10^6 UFC/ml, como suplemento en el alimento, causó un incremento en talla y peso de juveniles de tilapia nilótica (*O. niloticus*). Los resultados del presente estudio permiten determinar el efecto de *Exiguobacterium* sp. B16 en la expresión de algunos genes como transferrina, interleuquina-1 β (IL-1 β) y hormona de crecimiento (GH) en los órganos hematopoyéticos riñón y bazo de *O. niloticus*.

La transferrina es una proteína encargada de transportar el hierro en la sangre y su rol es fundamental en el sistema inmune ya que limita la cantidad de hierro disponible para los patógenos invasores y por ende, su capacidad de reproducción (Stafford y Belosevic, 2003; Stafford *et al.*, 2004; Rengmark y Lingaas, 2007; Haddad y Belosevic, 2009). Los peces alimentados con *Exiguobacterium* sp. B16 mostraron un aumento significativo en la expresión del gen transferrina a las 24 horas en bazo, sin embargo a los 15 días no se observó un cambio significativo al igual que en el riñón. Brunt *et al.* (2008) observaron un incremento en la expresión de transferrina en el suero de truchas arcoíris alimentadas durante el mismo período de tiempo con *Bacillus* sp.; no obstante, es necesario realizar

más estudios de transferrina en riñón y bazo de peces, pues aunque se ha estudiado la función de esta proteína, aún se desconoce el mecanismo preciso mediante el cual la transferrina activa los macrófagos presentes en los órganos de los peces (Stafford y Belosevic, 2003; Stafford *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado que esta proteína no sólo transporta y limita la cantidad de hierro en el organismo, sino que está directamente involucrada en la defensa contra enfermedades bacterianas, pues en el estudio de Liu *et al.* (2010), transferrina aumentó su expresión en *Ictalurus punctatus* luego de ser sometida a una infección con *Edwardsiella ictaluri*, mas no lo hizo cuando se inyectó únicamente con hierro-dextrano. A pesar de la poca información que existe con respecto a la expresión genética en riñón y bazo de peces por acción de proteínas como transferrina o de su acción contra enfermedades bacterianas, en mamíferos se ha descubierto que la escisión de algunas proteínas del hospedero pueden llegar a activar los macrófagos e inducir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Okamura *et al.*, 2001; Smiley *et al.*, 2001); esto indica que durante una respuesta, la activación de las células inmunes puede ser regulada por patógenos o por escisión de factores del hospedero (Stafford y Belosevic, 2003). Además aunque la transferrina se expresa primariamente en el hígado, también se produce por acción de los macrófagos, es por esto que está presente en sitios de inflamación como el riñón y el bazo; y su expresión tiende a disminuir luego de 24 horas, posiblemente porque es una proteína de fase aguda (Stafford & Belosevic, 2002; Gómez & Balcázar, 2008; Nayak, 2010) y probablemente porque su actividad inmunoestimulante se activa en estados tempranos de inflamación (Haddad y Belosevic, 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos en la expresión del gen IL-1 β , encargado de mediar y estimular los genes del proceso inflamatorio (Lee *et al.*, 2006), se observó una regulación negativa por parte de *Exiguobacterium* sp. B16, ya que los peces con alimento suplementado no presentaron diferencias significativas comparado con los peces del control. Aunque es poco usual, la baja expresión de IL-1 β después de un período de alimentación con probióticos, también la reportan Becerril *et al.* (2008) en el hígado de *Sparus aurata* alimentados con *Debaryomyces hansenii* durante 2 semanas; y Panigrahi *et al.* (2007) quienes suplementaron el alimento de trucha arcoíris con *Lactobacillus*

rhamnosus, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecium* durante 45 días, obteniendo buenos resultados con *L. rhamnosus* y *E. faecium* en algunos parámetros evaluados del sistema inmune como la producción de anión superóxido por parte de los leucocitos del riñón y la expresión de algunos genes, pero pocos cambios en IL-1 β en riñón y bazo con *B. subtilis*; sin embargo no describen con exactitud por qué se dan estas bajas expresiones y su implicación en los organismos. Por su parte el estudio de Picchietti *et al.* (2009), también reporta una regulación negativa de IL-1 β en larvas de *Dicentrarchus labrax* después de haber consumido *Brachionus plicatilis* y *Artemia* enriquecida con el probiótico *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, aislado del tracto gastrointestinal de *D. labrax*. Aunque hubo buenos resultados en cuanto al crecimiento larval, la baja modulación de este gen la confieren a una fuerte correlación entre IL-1 β y la expresión de algunos genes dentro de los cuales se destacan IL-10, TGF- β , y COX-2. Cabe destacar la importancia de realizar más estudios con otros genes, pues es probable que en el presente estudio la baja modulación de IL-1 β sea debido a la interacción de este gen con otros genes que probablemente también presentaron una baja expresión con respecto a los peces del control. Además también es posible que no haya modulación de IL-1 β como parte de una respuesta anti-inflamatoria de algunos probióticos, en este caso *Exiguobacterium* sp. B16, tal y como sugiere Numri *et al.* (2005); obviamente se hacen necesarios más estudios donde se lleven a cabo pruebas experimentales después de la inducción de reacciones inflamatorias. De igual manera no hay que dejar de lado que en órganos como el bazo y el riñón, las citoquinas están altamente influidas por las hormonas relacionadas al estrés, indicando un rol importante del sistema endocrino en la modulación de la respuesta inmune de los peces (Castillo *et al.*, 2009).

Por otra parte, el gen que codifica para la hormona de crecimiento (GH), presentó un aumento en el bazo a las 24 horas, aunque no estadísticamente significativo. Sin embargo el estudio de Ardila (2010) reporta un aumento evidente en peso y talla de los peces alimentados con *Exiguobacterium* sp. B16. Esto permite señalar que el crecimiento de los peces que consumen bacterias con efectos probióticos, no siempre está relacionado con una alta expresión del gen GH, pues pueden existir otros factores que influyen en el incremento de la talla y el peso como los mecanismos de acción propios de

la bacteria, dentro de los cuales se encuentran las propiedades proteolíticas de *Exiguobacterium* sp. B16, que puede facilitar la degradación proteica del alimento proporcionando una absorción más eficiente de los nutrientes necesarios para un mejor desarrollo de los peces (Orozco *et al.*, 2009).

Asimismo la diferencia significativa encontrada en la expresión del gen GH en riñón a los 15 días, entre los peces del control y los que consumieron alimento suplementado con *Exiguobacterium* sp. B16, pudo haber sido producto de un factor estresante como la introducción de la nasa para retirar individuos muertos o el recambio de agua, que se puede ver reflejado en un aumento en la expresión de GH y de algunos componentes del factor humoral y celular de la respuesta innata de los peces (Pickering *et al.*, 1991; McCormick *et al.*, 1998; Jeay *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2009; Saera *et al.*, 2009; Calduch *et al.*, 2010). Sin embargo este aumento no se vio en los organismos que consumieron *Exiguobacterium* sp. B16 pues es posible que la bacteria haya ayudado a contrarrestar este efecto.

Teniendo en cuenta los diferentes efectos que pueden producir los probióticos en la respuesta inmune de los peces, y que han surgido como una opción distinta a las vacunas, cabe resaltar estudios como el de Mulero *et al.* (2008); quienes demuestran que la estimulación de genes del sistema inmune mediante vacunas en larvas y peces de corta edad de la especie *Sparus aurata*, incrementa la susceptibilidad a enfermedades reduciendo la supervivencia; lo que indica que aunque los genes de defensa se encuentren en el pez a tan corta edad, una estimulación persistente de éstos conlleva a la muerte por enfermedades. Esto permite destacar el potencial de *Exiguobacterium* sp. B16 como probiótico apto para la administración en larvas y juveniles de *O. niloticus*, pues logra influenciar positivamente el crecimiento de juveniles de tilapia nilótica (Ardila, 2010), más no lo hace mediante la estimulación de los genes propuestos en este estudio. Es necesario señalar la falta de estudios e información puntual y precisa acerca de los mecanismos por medio de los cuales los probióticos actúan en el tracto gastrointestinal de los peces, pues aunque se han demostrado excelentes resultados en términos de incremento en peso y talla (Panigrahi *et al.*, 2004; Balcázar *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2008; Cammarota *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2010), son

escasos los estudios que han revelado los efectos de una bacteria nativa sobre los genes implicados en la defensa sistémica y mucosa (Aly *et al.*, 2008a; 2008b; Azza *et al.*, 2009).

También es preciso realizar más ensayos con *Exiguobacterium* sp. B16, para estudiar el efecto de su administración en la dieta sobre la supervivencia de los peces frente a diferentes patógenos y para conocer más a fondo la posible protección que puede otorgar durante un desafío experimental por una posible estimulación del sistema inmune; es importante tener en cuenta que *Exiguobacterium* sp. B16 puede estar modulando otros genes de defensa distintos a los evaluados en el presente estudio y por esto cabe resaltar que todas las bacterias difieren ampliamente entre sí en cuanto a su modo de acción, incluyendo la capacidad de activar o no el sistema inmune. Dentro de estas capacidades, se han descrito distintos modos de acción de las bacterias probióticas para causar beneficios en la acuicultura como la exclusión competitiva de bacterias patógenas (Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009), el recurso de nutrientes y contribución enzimática a la digestión (Gatesoupe, 1999, Irianto y Austin, 2002; Ma *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2009), la absorción directa de material orgánico disuelto por parte de las bacterias, que se refleja en la calidad del agua (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Lalloo *et al.*, 2007), mejoramiento de la respuesta inmune contra microorganismos patógenos (Irianto y Austin, 2002; Balcázar, 2003; Villamil *et al.*, 2003a; Kim y Austin, 2006; Magnadóttir, 2006; Balcázar *et al.*, 2007a, 2007b; Bonaldo *et al.*, 2007; Panigrahi *et al.*, 2007; Nayak, 2010), entre otros. Por lo tanto cada probiótico difiere de los demás funcionalmente y tiene propiedades distintas (Tinh *et al.*, 2007); en este caso *Exiguobacterium* sp. B16 causó efectos positivos reflejados en un incremento en talla y peso, posiblemente por sus propiedades proteolíticas y al parecer no mediante la estimulación de los genes de defensa estudiados.

9. CONCLUSIONES

- ◆ No hay efecto inmunomodulador en tilapia nilótica por parte de *Exiguobacterium* sp. B16, ya que la expresión de los genes de defensa transferrina e IL-1 β no es significativamente mayor en los peces que fueron alimentados con la bacteria nativa seleccionada, con respecto a los peces control quienes consumieron alimento comercial.
- ◆ El incremento en talla y peso de los juveniles de tilapia nilótica observado anteriormente, parece no estar relacionado directamente con el incremento en la expresión del gen regulador de la hormona de crecimiento (GH) en el riñón y bazo, ni a las 24 horas ni a los 15 días de tratamiento con *Exiguobacterium* sp. B16.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios con bacterias nativas aisladas que comprueben sus propiedades probióticas tanto *in vitro* como *in vivo*, pues ofrece mayores alternativas en la industria de la acuicultura; ya que la microbiota de los peces es un sistema natural del cual se pueden extraer bacterias benéficas y potenciar su acción como bacterias probióticas.
- Ejecutar estudios donde se evalúen genes de defensa distintos para comprobar si *Exiguobacterium* sp. B16 modula alguno como IL-6, IL-8, IL-10, IL-22, COX-2, entre otros.
- Realizar estudios donde se pruebe la actividad probiótica de *Exiguobacterium* sp. B16 en larvas de tilapia nilótica.
- Evaluar los efectos moduladores de las hormonas ACTH, adrenalina y cortisol en la respuesta inmune de los peces ya que pueden tener implicaciones importantes en la expresión de genes y sus efectos pueden llevar a un mejor entendimiento de las interacciones entre el sistema inmune y endocrino.

BIBLIOGRAFÍA

- Aly, S., Azza, M., George, J. y Mohamed, F. 2008a. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 177: 1-6.
- Aly, S., Ahmed, Y., Ghareeb, A. y Mohamed, F. 2008b. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish y Shellfish Immunology*, 25: 128-136.
- Aly, S., Fathi, M. y George, J. 2008c. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture research*, 39: 647-656.
- Applied Biosystems. 2007. Molecular and cell biology catalog. USA. 448 p.
- Ardila, D. 2010. Evaluación del efecto de aislados bacterianos sobre el peso, talla y supervivencia a infecciones experimentales en juveniles de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*. Tesis de Pregrado. Santa Marta, Colombia.
- Austin, B., Stuckey, L., Robertson, P., Effendi, I. y Griffith, D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal Fish Diseases*, 18: 93-96.
- Azza, M., Khattab, Y. y Shalaby, A. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish y Shellfish Immunology*, 27: 175-180.
- Balcázar, J., De Blas, I., Ruiz, I., Cunningham, D., Vendrell, D. y Múzquiz, J. 2006. The role of probiotics in Aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.
- Balcázar, J., De Blas, I., Ruiz, I., Vendrell, D., Calvo, A.C., Márquez, I., Gironés, O. y Múzquiz, J.L. 2007a. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97: 522-527.

- Balcázar, J., De Blas, I., Ruiz, I., Vendrell, D., Girones, O. y Muzquiz, J. 2007b. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic Lactic Acid Bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51: 185-193.
- Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar, D., Ascencio, F. y Esteban, M. 2008. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 731-739.
- Bonaldo, A., Thompson, K., Manfrin, A., Adams, A., Murano, E., Mordenti, A. y Gata, P. 2007. The influence of dietary β -glucans on the adaptive and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis. *Ital. Anim. Sci.*, 6: 151-164.
- Brunt, J. y Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control Lactococcosis and Streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal Fish Diseases*, 28: 693–701.
- Brunt, J., Hansen, R., Jamieson, D. y Austin, B. 2008. Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121: 199-205.
- Calduch, J., Davey, G., Saera, A., Houeix, B., Talbot, A., Prunet, P., Cairns, M. y Pérez, J. 2010. Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *BMC Genomics*, 193: 1471-2164.
- Cammarota, M., De Rosa, M., Stellavato, A., Lamberti, M., Marzaioli, I. y Giuliano, M. 2009. *In vitro* evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: emphasis on innate immunity. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 90-98.
- Castillo, J., Teles, M., Mackenzie, S. y Tort, L. 2009. Stress-related hormones modulate cytokine expression in head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 27: 493-499.

- Chistiakov, D., Hellemans, B. y Volckaert, F. 2007. Review on the immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117: 1–16.
- Corvalán, A. 2002. Biología molecular en infectología. Parte I: Desarrollo y metodologías. *Revista Chilena Infectología*, 19: 14-24.
- Covello, J.M., Bird, S., Morrison, R.N., Battaglione, S.C., Secombes, C.J. y Nowak, B.F. 2009. Cloning and expression analysis of three striped trumpeter (*Latris lineata*) pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β and IL-8, in response to Infection by the ectoparasitic, *Chondracanthus goldsmidi*. *Fish y Shellfish Immunology*, 26: 773–786.
- De Ferrari, L. 2005. Mining housekeeping genes with a naive bayes classifier. The University of Edinburgh, 1-85.
- Eknath, A., Bentsen, H., Ponzoni, R., Rye, M., Nguyen, N., Thodesen, J. y Gjerde, B. 2007. Genetic improvement of farmed tilapias: composition and genetic parameters of a synthetic base population of *Oreochromis niloticus* for selective breeding. *Aquaculture*, 273: 1–14.
- Elbassuony, R. 2005. Quality evaluation of aqua cultured *Oreochromis niloticus* fish recovered from motile *Aeromonas septicaemia* disease. *Journal of Applied Sciences Research*, 13: 302-306.
- Ellis, A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 827–839.
- Escobar, L., Olvera, M. y Puerto, C. 2006. Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. 107-128.
- Evans, D., Leary, J. y Jaso, L. 2001. Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 791-805.
- FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live Lactic Acid Bacteria. Argentina, 1-34.

- FAO. 2002. FAO species identification guide for fisherie purposes. USA, 3: 1690-1693.
- FAO. 2006. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. El Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura. Roma.
- Fast, M., Sims, D., Burka, J., Mustafa, A. y Ross, N. 2002. Skin morphology and humoral non-specific defense parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and atlantic salmon. *Comp Biochem Physiol.*, 132: 645-657.
- Ferguson, R., Merrifield, D., Harper, G., Rawling, M., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcázar, J y Davies, S. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of non-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 10: 1-12.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365–378.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Girón, M., Santerre, A., González, F., Casas, J., Hernández, M., Peregrina, J., Takemura, A. y Zaitseva, G. 2007. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish y Shellfish Immunology*, 23: 760-769.
- Giuseppe, S., Buonocore, F. y Mazzini, M. 2006. Biological activity of cytokines: An evolutionary perspective. Dipartimento di Scienze Ambientali, University of Tuscia, Largo dell'Università, 01100 Viterbo, Italy.
- Gómez, G y Balcázar, J. 2007. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *Federation of European Microbiological Society (FEMS)*, 145-155.
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R. y Gelbart, W. 2002. An introduction to genetic analysis. W.H Freeman and Company. New York. 860 p.
- Günter, J. y Jimenez, R. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* vol. 52 (4): 937-943 pp.

- Haddad, G. y Belosevic, M. 2009. Transferrin-derived synthetic peptide induces highly conserved pro-inflammatory responses of macrophages. *Molecular Immunology*, 46: 576-586.
- Hamel, O. y Aderson, J. 2002. Relationship between antigen concentration and bacterial load in Pacific salmon with bacterial kidney disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51: 85-92.
- Harris, J. y Bird, D. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77: 163-176.
- Hipólito, A., Maeda, A. y Martínez, S. 2008. Use of *Microbacterium* sp. and *Exiguobacterium mexicanum* to improve the survival and development of *Artemia* under xenic conditions. *Aquacult. Int.*, 1-6.
- Hjelmeland, K., Christie, M. y Raa, J. 1983. Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*, and its biological significance. *Journal Fish Biol.*, 23: 13-22.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) y Comisión Europea (CE)©. 2007. Fichas internacionales de seguridad química. Bromuro de etidio ICSC: 1676
- Irianto, A. y Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal Fish Diseases*, 25: 333-342.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, J.H. y Evans, D.L. 2001. The nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): Molecular organization and signaling properties. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 701-711.
- Jeay, S., Sonenshein, G., Postel, M., Kelly, P. y Baixeras, E. 2002. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188: 1-7.
- Jurecka, P., Irnazarow, I., Stafford, J., Ruszczuk, A., Taverne, N., Belosevic, M., Savelkoul, H. y Wiegertjes, G. 2009. The induction of nitric oxide response of carp macrophages by transferrin is influenced by the allelic diversity of the molecule. *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 632-638.

- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1–14.
- Kim, D. y Austin, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotics. *Fish y Shellfish Immunology*, 21: 513-524.
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J. y Gardiner, N. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1471-1479.
- Lara-Flores, M. 2003. Aislamiento e identificación de microorganismos nativos del tracto intestinal de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) con potencial probióticos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. México. 135
- Lee, D., Hong, S., Lee, H., Jun, L., Chung, J., Kim, K. y Jeong, H. 2006. Molecular cDNA cloning and analysis of the organization and expression of the IL-1 β gene in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Part A 143: 307-314.
- Leonce, C. y Defeo, O. 1997. Evaluation of three length-based methods for estimating growth in tropical fishes: the red snapper *Lutjanus campechanus* of the Campeche bank (Mexico). *Sci. Mar.*, 61: 297-303.
- Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G. y Hong, H. 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol. Lett.*, 29: 525-530.
- Liu, H., Takano, T., Abernathy, J., Wang, S., Sha, Z., Jiang, Y., Terhune, J., Kucuktas, H., Peatman, E. y Liu, Z. 2010. Structure and expression of transferrin gene of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 159-166.
- Lorenzen, N., Jorgen, N. y Vestergard, P. 1990. Neutralization of egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral g protein. Great Britain, *Journal of General Virology*, 71: 561-567.

- Ma, C., Chon, Y y Oh, K. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogenes by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture*, 287: 266-270.
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur v. Vesturlandsveg, IS-112 Reykjavík, Iceland. *Fish y Shellfish Immunology*, 20: 137-151.
- McCormick, S., Shrimpton, J., Carey, J., O’Dea, M., Sloan, K., Moriyama, S. y Björnsson, B. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, 168: 221-235.
- Mulero, I., Sepulcre, P., Fuentes, I., García, A., Meseguer, J., García, A. y Mulero, V. 2008. Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptative immunocompetence. *Molecular Immunology*, 45: 2981-2989.
- Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish y Shellfish Immunology*, doi:10.1016/j.fsi.2010.02.017.
- Nikoskelainen, S., Ouweahnd, A., Salminen, S. y Bylund, G. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198: 229-236.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S. y Lilius, E. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunology*, 15: 443-452.
- Noguera, C. 2010. Aislamiento, identificación y valoración *in vitro* del potencial probiótico de cepas nativas de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Tesis de pregrado. Santa Marta, Colombia.

- Nurmi, J., Puolakkainen, P. y Rautonen, N. 2005. *Bifidobacterium lactis* sp. 420 upregulates cyclooxygenase (Cox)-1 and down-regulates Cox-2 gene expression in a Caco-2 cell culture model. *Nutr Cancer*, 51: 83–92.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C. y Strauss, J.F. 2001. The extra domain A of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 276: 10229–10233.
- Olabuenaga, S. 2000. Sistema inmune en peces. *Gayana, Concepción*. 64: 2-12.
- Orozco, C., López, A. y Maeda, A. 2009. Aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria *Exiguobacterium mexicanum* and *Microbacterium* sp. in the gut lumen of *Artemia franciscana* larvae under gnotobiotic conditions. *Current Science*, 96: 1-10.
- Pancer, Z. y Cooper, M. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 24: 497-518.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. y Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102: 379-388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J. y Aoki, T. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 372-382.
- Picchietti, S., Fausto, A., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A., Buonocore, F., Scapigliati, G. y Abelli, L. 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L). *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 368-376.

- Pickering, A., Pottinger, T., Sumpter, J., Carragher, J. y Le Bail, P. 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 83: 86-93.
- Pierce, A., Fox, B., Davis, L., Visitación, N., Kitahashi, T., Hirano, T. y Grau, E. 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 154: 31-40.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M. y Endo, M. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology Immunopathology*, 113: 339-47.
- Plouffe, D., Hanington, P., Walsh, J., Wilson, E. y Belosevic, M. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*, Blackwell Munksgaard, 12: 266-277.
- Poletto, A., Wasko, A., Oliveira, C., Azevedo, A., Carvalho, R., Silva, M., Foresti, F. y Martins, C. 2008. Identities among actin-encoding cDNAs of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and other eukaryote species revealed by nucleotide and amino acid sequence analyses. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 352-256.
- Praveen, K., Evans, D. y Jaso-friedman, L. 2006. Constitutive expression of Tumor Necrosis Factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 43: 279-291.
- Rengmark, A. y Lingaas, F. 2007. Genomic structure of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) transferrin gene and a haplotype associated with saltwater tolerance. *Aquaculture*, 272: 146-155.
- Reyes-perdomo, C. 2009. Expresión de genes de defensa de la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* alimentada con suplemento de bacterias probióticas. Tesis de Pregrado. Santa Marta, Colombia.

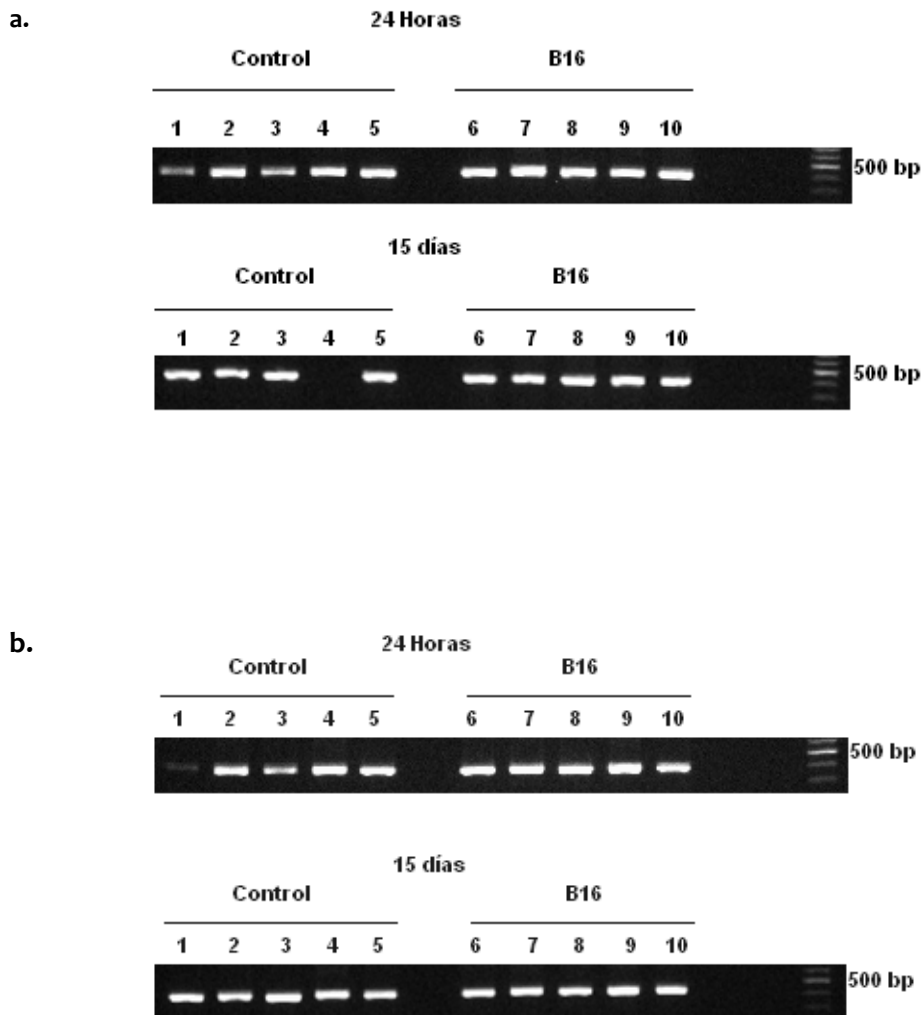
- Robertson, P., O’ dowd, C., Burrells, C., Williams, P. y Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 185: 235–243.
- Rodrigues, D., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M. y Tiedje, J. 2006. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 10: 285-294.
- Roitt, I. 1998. *Fundamentos de inmunología*. Editorial Médica Panamericana.
- Rosmini, M.R., Sequeira, G.J., Guerrero, I., Martí, L.E., Dalla, R., Frizzo, L. y Bonazza, J.C. 2004. Producción de prebióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3: 181-191.
- Saera, A., Calduch, J., Prunet, P. y Pérez, J. 2009. Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement. Differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 154: 197-203.
- Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. y Meseguer, J. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 67–77.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Secombes, C.J. 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses: 63- 103. En: Iwama, G and Teruyuhi, N. *The fish immune system: Organism, pathogen and environment*. Academic Press.
- Secombes, C.J., Zou, J., Laing, K., Daniels, G.D. y Cunningham, C. 1999. Cytokine genes in fish. *Aquaculture*, 172: 93-102.

- Smiley, S.T., King, J.A. y Hancock, W.W. 2001. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *Journal Immunology*, 167: 2887-94.
- Son, V., Changa, C., Wu, M., Guu, Y., Chiu, C. y Cheng, W. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunology*, 26: 691-698.
- Stafford, J. y Belosevic, M. 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental & Comparative Immunology*, 27: 539-554.
- Stafford, J., Wilson, E. y Belosevic, M. 2004. Recombinant transferrin induces nitric oxide response in goldfish and murine macrophages. *Fish y Shellfish Immunology*, 17: 171-185
- Tanekhy, M., Matsuda, S., Itano, T., Kawakami, H., Kono, T. y Sakai, M. 2010. Expression of cytokine genes in head kidney and spleen cells of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Nocardia seriolae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134: 178-183.
- Tavares-días, M.T., Martins, L.M. y Morales, F.R. 2001. Parasitic fauna of cultivated fishes in feed fishing farm of Franca, Sao Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Zoología*, 18: 67-69.
- Thomsom, A. y Lotze, M. 2003. *The cytokine handbook*. Academic Press. London. 1031.
- Tinh, N., Dierckens, K., Sorgeloos, P. y Bossier, P. 2007. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology*, 12p.
- Velasco, R. 2004. La biología molecular y el ADN. Grupo de Investigación ASUBAGROIN FCA Unicauca, 2: 55-60.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 655-671.

- Vine, N., Leukes, W. y Kaiser, H. 2004. *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett*, 231: 145–152.
- Villamil, L., Figueras, A. y Novoa, B. 2003a. Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 14: 157-169.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. y Novoa, B. 2003b. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219: 43–56.
- Villarroel, M., Tupac-Yupanqui, I., Nicodemus, N., Rico, M., Cañón, J., Menoyo, D., Alvaríño, M. y Dunner, S. 2005. Expresión diferencial de genes en tialpia *Oreochromis niloticus* (L.1758) bajo estrés alimentario. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 21: 261-270.
- Vishnivetskaya, T., Kathariou, S. y Tiedje, J. 2009. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13: 541-555.
- Wang, T., Holland, J., Bols, N. y Secombes, C. 2005. Cloning and expression of the first non-mammalian *Interleukin-11* gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The FEBS Journal*, 1136-1147.
- Wang, Y., Tian, Z., Yao, J. y Li, W. 2008. Effect of probiotics *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277: 203-207.
- Wasko, A., Severino, F., Presti, F., Poletto, A. y Martins, C. 2007. Partial molecular characterization of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) α -cardiac muscle actin gene and its relationship to actin isoforms of other fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 30: 1089-1092
- Xing, Y., Feng-Ying, G., Quing-Mei, Z., Jun-Jie, B., Huan, W., Hai-Hua, L. y Qing, J. 2008. Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme. *Mol. Biol. Rep.*, 1-8.
- Yada, T. 2007. Growth hormone and fish immune system. *General and Comparative Endocrinology*, 152: 353-358.

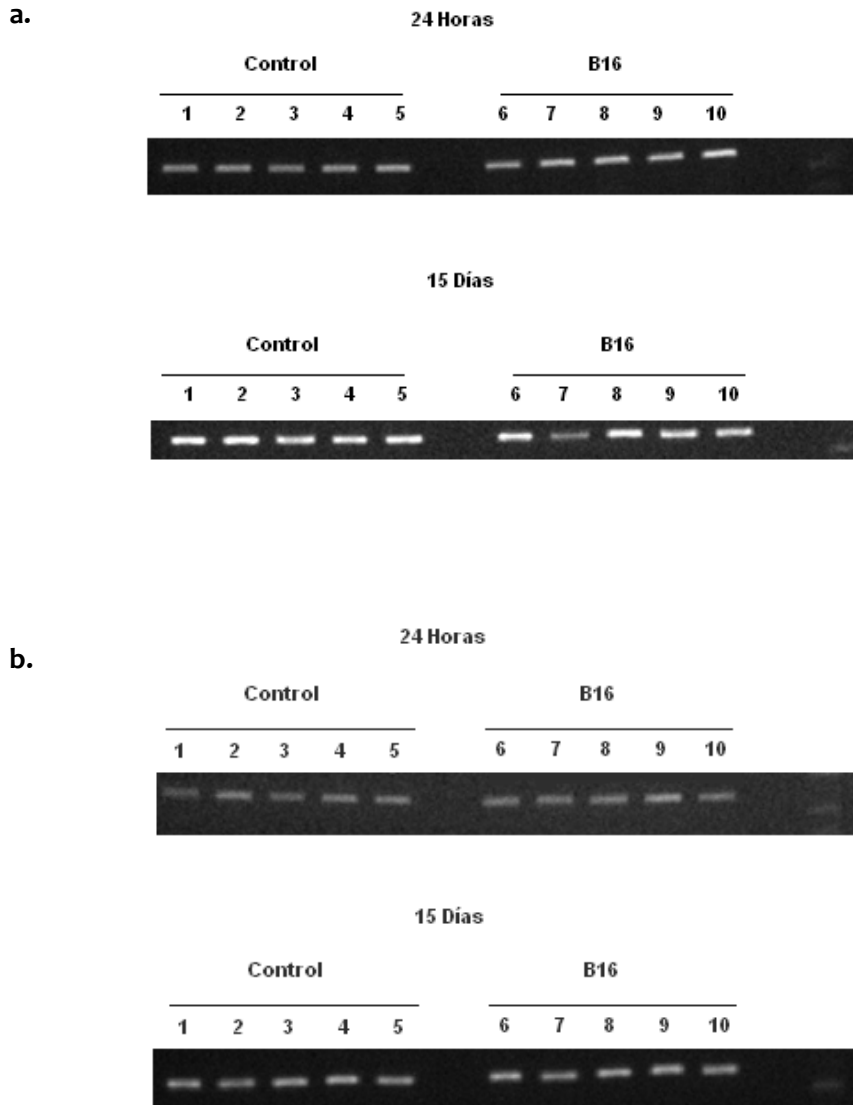
ANEXO B

EXPRESIÓN DEL GEN TRANSFERRINA EN RIÑÓN (a) Y BAZO (b) DE *Oreochromis niloticus* EN EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO SUPLEMENTADO CON *Exiguobacterium* sp. B16, A LAS 24 HORAS Y 15 DÍAS DEL TRATAMIENTO.



ANEXO C

EXPRESIÓN DEL GEN IL-1 β EN RIÑÓN (a) Y BAZO (b) DE *Oreochromis niloticus* EN EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO SUPLEMENTADO CON *Exiguobacterium* sp. B16, A LAS 24 HORAS Y 15 DÍAS DEL TRATAMIENTO.



ANEXO D

EXPRESIÓN DEL GEN REGULADOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN RIÑÓN (a) Y BAZO (b) DE *Oreochromis niloticus* EN EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO SUPLEMENTADO CON *Exiguobacterium* sp. B16, A LAS 24 HORAS Y 15 DÍAS DEL TRATAMIENTO.

