

EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA
Oreochromis niloticus **ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS**
PROBIOTICAS

CAROLINA REYES-PERDOMO

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

2009

EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA
Oreochromis niloticus **ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS**
PROBIOTICAS

CAROLINA REYES-PERDOMO

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga Marina

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

VICTORIANO MULERO MENDEZ

Profesor Facultad de Biología

UNIVERSIDAD DE MURCIA (ESPAÑA)

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA

SANTA MARTA, D.T.C.H

2009

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Santa Marta, D.T.C.H ____ de _____ de 2009

A mi mamá y mi abuela quienes merecen lo mejor de este mundo
y siempre me apoyaron incondicionalmente.

A esas personas con las que compartimos un sueño,
ese sueño que no lograron alcanzar, y el cual se refleja en este trabajo
y les dedico con el mayor cariño.

Esas mismas personas
que se convirtieron en estrellitas y ahora nos cuidan y guían desde el cielo:
Juan Felipe, Daniel, Omar, Diego y Juan Francisco.

AGRADECIMIENTOS

A mi mami, la mejor de todas, por su apoyo incondicional, por creer en mi a pesar de las adversidades; ya que sin su apoyo y amor nada hubiese sido posible. A mi abuelita y mis tíos por haberme colaborado en el momento que lo necesité.

A mi directora, Luisa Villamil, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, permitirme hacer parte del Grupo de Investigación en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos y por compartir sus valiosos conocimientos conmigo, a Yiya (Ma. Angélica Martínez) quien me colaboró en todo momento y quien siempre estuvo disponible cuando la necesité. A Adrián, Amparo y Carolina, compañeros del grupo de investigación, por su amistad y apoyo en el laboratorio de Acuicultura en Santa Marta. Al laboratorio de Biología Molecular y a Amparo Canosa (directora del laboratorio de Microbiología) y a todo el personal que allí me colaboró durante la última fase de laboratorio de mi trabajo en Bogotá.

A la Tadeo, sus profesores tanto en Bogotá como en Santa Marta, especialmente a Luis Ernesto Beltrán (Lucho) por su amistad y apoyo constante desde primer semestre y Adolfo Sanjuán quien fue clave en mi formación. Gracias a sus exigencias y enseñanzas, logró que adquiriera una mayor responsabilidad y alimentara mi espíritu científico.

A mis amigos, con quienes compartí momentos muy alegres así como momentos difíciles mientras transcurría la carrera, a mi Rose por su amistad invaluable e incondicional, por aguantarme, estar a mi lado siempre y tener una palabra de aliento cuando la necesité. A Javi Carmona por su ayuda en la etapa final de este trabajo. A todas esas personas que me apoyaron y me acompañaron durante este proceso pero que debido a mi pésima memoria se me escapan en este momento.



RESUMEN

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos que tienen efectos benéficos en el hospedero ya que modifican la microbiota intestinal y desplazan bacterias potencialmente patógenas, además poseen la facultad de potenciar las respuestas de defensa innata. En este estudio se evaluó la capacidad de *Lactobacillus acidophilus*, bacteria empleada en la fermentación de productos lácteos, para modular el nivel de expresión de genes implicados en la defensa como transferrina y las citoquinas IL-1 β y TNF- α . Las tilapias se alimentaron durante quince días con alimento comercial suplementado con *L. acidophilus* (1×10^6 UFC/g) y se tomaron muestras de bazo y riñón a las 24 h 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 semicuantitativa usando primers o cebadores diseñados específicamente para cada gen. Se encontró un incremento significativo en el nivel de expresión de transferrina en el grupo tratado con *L. acidophilus* con respecto al grupo control en riñón a las 24 h y en el bazo a los 15 días. Para TNF α se encontró un aumento significativo en riñón a las 24 h y 15 días, mientras que en el caso de IL-1 β , se evidenció un mayor nivel de transcripción en el bazo a las 24 h, y en riñón y bazo a los 15 días de tratamiento. Los resultados obtenidos sugieren a *L. acidophilus* como probiótico para el cultivo de tilapia nilótica ya que incrementa de manera significativa la expresión de IL-1 β y TNF- α , que son las citoquinas mediadoras en la inflamación, que constituye el primer mecanismo de defensa ante una infección. Así mismo, la transcripción de transferrina también se vio incrementada por la adición del probiótico, y la cual juega un papel biológico primario al transportar y atrapar el hierro creando un ambiente bacteriostático, además de inducir otras funciones como la maduración final de los neutrófilos que poseen importancia en la actividad fagocítica y en la eliminación de agentes invasores.



CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 ACUICULTURA EN COLOMBIA	10
3.2 GENERALIDADES DE LA ESPECIE	12
3.3 SISTEMA INMUNE EN PECES TELEOSTEOS	13
3.4 ENFERMEDADES DESCRITAS EN TILAPIA NILOTICA	17
3.5 USO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS EN ACUICULTURA Y SU EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE LOS ORGANISMOS EN CULTIVO	18
3.6 BASES TEORICAS PARA LA EXPRESIÓN DE GENES Y PRODUCCION DE PROTEINAS A PARTIR DE LA TRADUCCION DEL ARN	20
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	22
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6. HIPÓTESIS	24
7. METODOLOGÍA	25
7.1 SELECCIÓN DE INDIVIDUOS	25
7.2 CEPAS BACTERIANAS	25
7.3 PREPARACIÓN DEL ALIMENTO	25
7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR <i>Lactobacillus acidophilus</i> EN TILAPIA NILOTICA	26
7.5 AISLAMIENTO DE ADN GENOMICO	27
7.6 AISLAMIENTO DE ÁCIDO RIBONUCLÉICO (ARN)	28



	Pag.
7.7 OBTENCIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO (cADN)	29
7.8 OPTIMIZACIÓN DE LOS PRIMERS O CEBADORES A PARTIR DE ADN	30
7.9 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE mRNA Y EXPRESIÓN DE GENES	31
7.10 ELECTROFORESIS EN AGAROSA DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS	33
7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
8. RESULTADOS	35
8.1 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE TEJIDO DE TILAPIA NILOTICA	35
8.2 DISEÑO DE PRIMERS O CEBADORES	35
8.3 PRUEBA Y ESTANDARIZACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS	36
8.4 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE DEFENSA A PARTIR DE cADN	39
8.4.1 Expresión de Transferrina	40
8.4.2 Expresión de TNF- α	42
8.4.3 Expresión IL-1 β	44
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	56
11. RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58
ANEXOS	70



LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Mayores productores mundiales de tilapia para el año 2004	11
Tabla 2. Modelo de alimentación para peces	26
Tabla 3. Componentes necesarios provistos por el kit RETROscript® para llevar a cabo la obtención de cADN a partir de ARN	30
Tabla 4. Secuencias del Genbank usadas como base para la realización de oligonucleótidos usados como primers o cebadores	31
Tabla 5. Componentes necesarios para llevar a cabo la amplificación de genes	32
Tabla 6. Ciclos necesarios para llevar a cabo la amplificación de genes por PCR	33
Tabla 7. Información general de los primers o cebadores diseñados para su uso en el estudio de la expresión de genes de defensa de la tilapia nilótica	36
Tabla 8. Componentes utilizados para llevar a cabo la amplificación de genes	37
Tabla 9. Ciclos necesarios para llevar a cabo la amplificación de genes por PCR en ADN genómico	38



LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>O. niloticus</i> . Tilapia nilótica	12
Figura 2. Obtención de ADN genómico a partir de: 1. Hígado, 2. Músculo, 3. Bazo	35
Figura 3. Expresión del gen Transferrina en el riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica en el grupo control y en el grupo suplementado con <i>L. acidophilus</i> 24 horas y 15 días después de iniciado el tratamiento.	40
Figura 4. Cuantificación y comparación de la tasa de expresión (ARNm) para Transferrina en riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica.	41
Figura 5. Expresión del gen TNF α en el riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica en el grupo control y en el grupo suplementado con <i>L. acidophilus</i> 24 horas y 15 días después de iniciado el tratamiento.	42
Figura 6. Cuantificación y comparación de la tasa de expresión (ARNm) para TNF α en riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica.	43
Figura 7. Expresión del gen IL-1 β en el riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica en el grupo control y en el grupo suplementado con <i>L. acidophilus</i> 24 horas y 15 días después de iniciado el tratamiento.	44
Figura 8. Cuantificación y comparación de la tasa de expresión (ARNm) para IL-1 β en riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica.	45



LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. CALCULOS DE CUANTIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ARN	71
ANEXO B. EXPRESION DEL GEN ACTINA EN RIÑÓN (a) y BAZO (b) EN GRUPO CONTROL Y EN GRUPO CON SUPLEMENTO (<i>L. acidophilus</i>) 24 HORAS Y QUINCE DIAS DESPUÉS DE INICIADO EL TRATAMIENTO.	73
ANEXO C. INTENSIDADES DE BANDA	74



1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se está desarrollando, expandiendo e intensificando en casi todas las regiones del mundo debido a que la demanda de productos de origen acuático para la alimentación por parte de la población mundial se ha incrementado durante los últimos 50 años. En respuesta a la alta demanda, la acuicultura mundial ha crecido enormemente; de una producción de menos de un millón de toneladas en los años 50's a 59,4 millones de toneladas para solamente el año 2004. Este nivel de producción ha alcanzado un valor de 70,3 billones de dólares. De este total, 41,3 millones de toneladas (69,6%) fueron producidas por China y 21,9% por el resto de Asia y la región del Pacífico. La región de Europa Occidental contribuyó con 3,5% con 2,1 millones de toneladas, mientras que Europa Central y Oriental aportaron 250 mil toneladas (0,4%). Latino América y Norte América contribuyeron con 2,3 y 1,3% respectivamente. Finalmente, la producción en Oriente Próximo y el Norte de África y el sub-Sahara solo tuvieron una producción del 0,9 y 0,2% respectivamente, de la producción total para el año de 2004 (FAO, 2006).

A pesar de los grandes avances logrados en la acuicultura, existen ciertos factores negativos como son las enfermedades que constituyen una de las necesidades por resolver en producción acuícola, ya que afectan el avance económico del sector en muchos países. Las técnicas convencionales tales como el uso de desinfectantes y antibióticos han tenido un éxito limitado en la prevención y cura de enfermedades en los organismos acuáticos. El uso masivo de estos últimos para el control de infecciones y enfermedades aumenta la presión selectiva sobre las bacterias, fomentando la resistencia natural bacteriana hacia este tipo de compuestos (Verschuere *et al.*, 2000). Los genes que codifican para dicha resistencia pueden ser transferidos a otras bacterias que, incluso nunca han estado expuestas al antibiótico, lo cual ha llevado a que en los últimos años, se



haya procurado desarrollar métodos alternativos para aumentar la supervivencia de los cultivos marinos, como son el uso de inmunoestimulantes, bien como potenciadores del sistema inmune inespecífico o como adyuvantes de vacunas (Robayo, 2005).

Varios estudios están encaminados hacia el desarrollo de métodos profilácticos efectivos para su uso en acuicultura y que son alternativas viables al uso de químicos. En los últimos años, los avances en biología molecular han permitido un mayor entendimiento de las comunidades microbianas presentes en el cultivo y han incluso facilitado el uso y selección de bacterias patógenas para el desarrollo de vacunas. Ya se han tenido éxitos notables con las vacunas e inmunoestimulantes (Kim y Austin, 2006a).

Teniendo en cuenta estas circunstancias, también se ha propuesto como alternativa potencial a los antibióticos el uso de probióticos. La noción de probiosis alude en general, al conjunto de efectos fisiológicos que, vinculados a los balances microbianos del tracto intestinal, resultan favorables para la entidad biológica hospedante (Robayo, 2005). Gatesoupe (1999) define el término “probióticos” como células microbianas que son administradas con el objetivo de mejorar la salud del hospedero. Éstas, ingresan al tracto gastrointestinal junto con el alimento a manera de suplemento y tienen la capacidad de mantenerse vivas en él. Sin embargo, pese a los numerosos trabajos publicados en los últimos años, el uso de los probióticos en acuicultura sigue siendo ampliamente empírico y sólo en pocos casos se ha podido establecer el efecto real estos agentes en el cultivo (Günther y Jiménez, 2004). Debido a diferentes limitaciones, entre ellas del tipo éticas en el estudio con animales, se ha dificultado el entendimiento de los mecanismos de acción de los probióticos y solo se han obtenido resultados parciales, sin embargo, entre los posibles beneficios atribuidos a la administración de probióticos se pueden mencionar la restauración de la microbiota intestinal y eliminación de



bacterias patógenas por competencia por nutrientes (Balcázar *et al.*, 2007a). Debido a que los peces están continuamente expuestos a un alto rango de microorganismos presentes en el ambiente, la microbiota del intestino de éstos determina en parte la salud del hospedero, por lo cual ha surgido interés en la manipulación de la microbiota intestinal en busca de una comunidad microbiana que sea benéfica para el pez hospedero (Ringo y Gatesoupe, 1997).

Observaciones realizadas en experimentos indican que la administración de bacterias probióticas vía oral podría inducir un incremento en la resistencia a infecciones, incluso, existen reportes en los cuales se indican que compuestos bacterianos actúan como inmunoestimulantes en peces (Panigrahi *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2007a; Tovar-Ramirez *et al.*, 2000; Olafsen, 1998) y camarones (Zhou *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Vasseharan y Ramasamy, 2003; Verschuere *et al.*, 2000).

Con el descubrimiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) a finales del siglo veinte y posteriormente el estudio de los mecanismos para leer y codificar la información del ADN, se han abierto las puertas para que las herramientas moleculares permitan obtener los genomas completos de muchas especies (Baxevanis y Ouellette, 2001) y entender la expresión de genes de los organismos.

A través del presente trabajo se busca estudiar cómo las bacterias probióticas de la especie *Lactobacillus acidophilus* influyen en la expresión genes de defensa de *O. niloticus* ya que este género de bacterias mostró un incremento en la resistencia a infecciones en estudios previos (Ospina, 2009). El estudio se centró en los genes transferrina, Interleuquina (IL-1 β) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF α), ya que la expresión de estos genes juega un papel importante en la



respuesta del sistema inmune inespecífico de los peces ante infecciones bacterianas (Secombes *et al.*, 1999). Para esto también se tuvo en cuenta el gen actina, ya que es un gen altamente conservado y que se expresa constitutivamente en los tejidos examinados (Ordás *et al.*, 2001), permitiendo su uso para llevar a cabo un análisis semi cuantitativo de los genes de defensa de interés.

El uso de probióticos en la acuicultura es prometedor, pero está claro que se necesitan esfuerzos considerables para continuar haciendo investigación encaminada a su uso como inmunoestimulantes y que, a su vez, su uso en el cultivo sea rentable para los productores. Las pruebas inmunológicas y moleculares son instrumentos útiles para verificar si el aumento en la resistencia frente a enfermedades está respaldado por mecanismos inmunes que son potenciados por los inmunoestimulantes. Por esta razón, el presente trabajo se centra en el uso de herramientas moleculares para el estudio del ARN de la tilapia nilótica. La importancia de hacer investigaciones basadas en la expresión del ARN, radica en que es el responsable de transmitir la información genética que a va ser codificada y que al ser estudiada, permitirá evidenciar que los genes transferrina, IL-1 β y TNF α están involucrados en la defensa innata de *O. niloticus* y explicar los patrones de expresión de estos genes claves en la defensa contra las infecciones bacterianas.

El presente estudio se desarrolló en el marco del proyecto Evaluación de Bacterias Probióticas Sobre la Expresión de Genes de Defensa y Resistencia a Infecciones e Incremento en Peso de Tilapia Nilótica *O. niloticus* del Grupo de Investigación en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos financiado por la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, y se llevó a cabo como requisito para optar al título de Biólogo Marino.



2. ANTECEDENTES

Desde finales de los años noventa, se empezaron a realizar proyectos de investigación sobre la utilización de bacterias probióticas en peces. Ringo y Gatesoupe en 1997 publicaron un trabajo sobre la utilización de bacterias del ácido láctico, se enfocaron principalmente en investigaciones que demuestran que los géneros *Streptococcus* sp, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus* sp y *Carnobacterium* sp pertenecen a la microbiota intestinal normal en peces saludables en los diferentes estadios de desarrollo.

En 1999, Gatesoupe propuso el uso de probióticos como una solución promisoriosa para mejorar la microbiota intestinal de individuos cultivados y para aumentar la resistencia a enfermedades. Verschuere *et al.*, en el 2000, hicieron un gran énfasis en el uso en general de los probióticos como la mejor solución ante las infecciones que pueden presentar los cultivos de diferentes especies acuáticas comerciales; crustáceos, moluscos bivalvos y presas vivas como algas unicelulares, rotíferos y *Artemia*.

En la mayor parte de estudios realizados en acuicultura, los principales modos de acción descritos son actividad antibacteriana, competencia e incremento en la resistencia durante experimentos de desafío experimental con bacterias patógenas (Aly *et al.*, 2008a; Aly *et al.*, 2008b; Kim y Austin, 2006a; Vázquez *et al.*, 2005; Villamil *et al.*, 2003; Villamil *et al.*, 2002a; Villamil *et al.*, 2002b; Rafiq *et al.*, 2001).

El incremento en la supervivencia y resistencia de los organismos cultivados está fuertemente asociado con la potenciación de los mecanismos de defensa empleados, de acuerdo con información disponible en investigaciones previamente realizadas en mamíferos (Balcázar *et al.*, 2006).



Villamil *et al.*, (2002a), hicieron los primeros aportes en cuanto al efecto de los probióticos en el sistema inmune de los peces cultivados. Evaluaron la capacidad inmunomoduladora de las bacterias acidolácticas (LAB) sobre el robadallo (*Scophthalmus maximus*) utilizando seis especies bacterianas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Pediococcus acidilactici*). Los resultados obtenidos muestran que algunas LAB como *L. lactis* tienen la capacidad de estimular funciones del sistema inmune, tales como la producción de lisozimas y de radicales libres de oxígeno medidos por medio de la quimioluminiscencia, producción de óxido nítrico entre otros. También quedó demostrado el efecto antibacterial *in Vitro* de los productos extracelulares de las seis LAB en estudio contra el patógeno *Vibrio anguillarum*.

Tal como se explicó anteriormente, hasta el momento los estudios realizados respecto al uso de probióticos y su efecto en el sistema inmune de los peces se han centrado en la actividad celular. En el año 2004, Panigrahi *et al.* evaluaron la respuesta inmune de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* al ser tratada con la bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. Después de suministrar el alimento suplementado con la bacteria durante 30 días, se encontró un aumento en la proporción de las bacterias probióticas en el intestino. La concentración de lisozima y otras actividades, como la fagocitosis fueron significativamente mayores en las truchas que recibieron el suplemento respecto al grupo control. Estos resultados indican el potencial rol de *L. rhamnosus* como inmunoregulador para la trucha arco iris, lo cual abre la posibilidad de que también sea aplicable a otras especies comerciales con óptimos resultados, evitando el uso de terapias químicas para tratar enfermedades.

Taoka *et al.*, 2006 describieron el uso de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* y *Saccharomyces cerevisiae* (esta última no es



bacteria sino una levadura) sobre el sistema inmune no específico de individuos de *O. niloticus* infectados experimentalmente con el patógeno *Edwardsiella tarda* que es una bacteria Gram negativa aerobia facultativa que causa lesiones cutáneas y perforación de la pared abdominal. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos: El primer grupo como control, el segundo como suplemento con probióticos vivos en el alimento. el tercer grupo probióticas muertas y el último grupo bacterias probióticas en el agua más no en el alimento. Se reportó un incremento en la resistencia de los individuos tratados con probióticos debido al mejoramiento de los parámetros del sistema inmune no específico, como actividad de lisosimas, migración de neutrófilos y actividad bactericida en el plasma. El método más efectivo fue aquel donde se administraron las células probióticas vivas en el alimento.

Balcázar *et al.* realizaron en el 2007a un estudio similar al llevado a cabo por Panigrahi *et al.* en el 2004, con la misma especie (*O.mykiss*) pero esta vez enfocado más a la respuesta inmune ante la furunculosis específicamente; suplementando el alimento con las bacterias *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* y suministrándolo a los peces por un periodo de dos semanas. En comparación al grupo control, el cual no recibió ningún suplemento, la actividad de los leucocitos del riñón y otras actividades fueron significativamente mayores para los diferentes probióticos utilizados; mientras que la actividad de las lisosimas no presentó ninguna diferencia significativa. Posteriormente, infectaron los peces con *Aeromonas salmonicida*, donde los peces que fueron tratados con probióticos presentaron tasas de supervivencia del 97,8 al 100 % mientras que en el grupo control la tasa fue de 65,6 %. Estos resultados demuestran que el suplementar el alimento con bacterias probióticas puede reducir las mortalidades en peces y sugiere que esta reducción podría estar relacionada con un aumento de la respuesta inmune a nivel tanto humoral como celular, atribuido al uso de probióticos en la alimentación de los peces. En el



mismo año, Balcázar *et al.* evaluaron el efecto de las LAB en la respuesta inmune de la trucha café, *Salmo trutta*, alimentando los individuos durante dos semanas con pienso suplementado con *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides*. Los resultados revelaron que el grupo que fue alimentado con LAB, mostró una mayor actividad de lisozima (excepto el grupo suplementado con *L. sakei*).

La mayoría de los estudios en los que se busca elucidar cual es el efecto de la administración de probióticos en el sistema inmune, abordan el tema a través de ensayos a nivel celular. Sin embargo, Villaroel *et al.*, (2005) realizaron un estudio sobre la expresión de genes de *O. niloticus*. Este estudio se centró bajo el indicio de que la subalimentación afecta de forma directa el metabolismo energético, la eficacia de la utilización del alimento y, por lo tanto, la productividad. Para poder identificar los genes se dividió en dos tratamientos un grupo de 60 individuos, alimentando de forma subóptima, es decir por debajo de las condiciones óptimas (una vez al día), durante 22 días. Se expresaron una media de 25 bandas por pareja de cebadores y un total de 31 bandas expresadas diferencialmente. Algunas secuencias coinciden con genes cuya función es de unión a diferentes proteínas y de regulación de la transcripción, y juegan un papel importante en la sinapsis. Es destacable el gen ALOX5, que interviene en la producción de leucotrienos, los cuales son importantes mediadores de procesos inflamatorios.

Panigrahi *et al.* (2007) evaluaron la modulación de la expresión de los genes de defensa IL-1 β 1 y TNF α 1 y 2 en trucha arco iris (*O. mykiss*) alimentada con suplemento de tres bacterias probióticas seleccionadas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* y *Bacillus subtilis*). Después suplementar el alimento de la con cada una de las bacterias seleccionadas se evidenció un aumento dentro de los parámetros examinados (producción de superóxido por los leucocitos del riñón



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

anterior y actividad del complemento del suero sanguíneo) en quienes recibieron los probióticos.. Además de lo anterior, la expresión de los genes IL-1 β 1, TNF α 1 y 2 y TGF- β aumentó después de dos semanas en bazo y riñón . Los incrementos obtenidos en la expresión de genes, así como los demás parámetros inmunes, en los individuos alimentados con *E. faecium* (la cual fue la bacteria que mostró mejor resultado) se los atribuyen a la adaptación de estos microorganismos de desarrollarse en temperatura ambiente, si se tiene en cuenta que los peces son organismos poiquilotermos.

A pesar de que se han realizado algunos estudios de expresión de genes en peces, el conocimiento sobre las citoquinas o la transferrina presentes en la tilapia es muy poco. De igual manera, tampoco existe disponibilidad de las secuencias completas de los genes de estudio mientras que si se encuentra información disponible para especies de aguas templadas como *O. mykiss* (Panigrahi *et al.*, 2007; Kim y Austin 2006b). Debido a esto, la relación entre el uso de probióticos en la tilapia nilótica y los mecanismos inmunes que se activan no están claramente establecida.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 ACUICULTURA EN COLOMBIA

En Colombia, el aporte de la acuicultura a la producción pesquera nacional supera el 27% de la producción total, siendo las principales especies cultivadas: la tilapia (*Oreochromis* spp.), las cachamas (*Piractus branchipomus* y *Colossoma macropomun*), los camarones de cultivo (*Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*) y la trucha (*Oncorhynchus mykiss*).

Colombia tiene áreas potenciales a lo largo de todo el territorio nacional gracias a su ubicación geográfica, topografía del terreno y su posición como tercer país a nivel mundial en disponibilidad de recursos hídricos, por lo tanto, el liderazgo acuícola del país está basado fundamentalmente en la riqueza de sus recursos hídricos lo que le otorga condiciones privilegiadas para el desarrollo de la acuicultura. El país cuenta con 2900 Km de costas en los dos océanos, 48365 Km² de plataforma continental, 20000 Km de ríos y más de 70000 Ha en ciénagas, lagos, embalses y humedales (Castillo, 2002; Salazar, 2002).

En los últimos 10 años el consumo per cápita de pescados y mariscos se ha incrementado en la población colombiana aumentando de 3,5 Kg. a 6,5 Kg, aportando la acuicultura el 19%. Existe ya un mercado creciente de los productos de la acuicultura, tanto a nivel nacional como internacional. Para el año de 2001, la producción del sector sub pesquero y acuícola presentó un crecimiento del 2% respecto a 1998 y que representó un aporte del 4,05 % al sector agropecuario y del 0,57 % a la economía nacional (Salazar, 2001).

Según la FAO (2006), Colombia ocupó el noveno lugar a nivel mundial en la producción de tilapia para el año 2004, siendo solo superada por Brasil, a nivel Latino Americano, que está séptimo lugar (Tabla 1).



Tabla 1. Mayores productores mundiales de tilapia para el año 2004 (FAO, 2006)

PAIS	TILAPIA (Toneladas)
China	897,276
Egipto	199,038
Filipinas	145,869
Indonesia	139,651
Tailandia	97,653
Taiwán	89,275
Brasil	69,078
República Democrática de Laos	29,205
Colombia	27,953

La disminución del recurso pesquero en ríos y ciénagas, que se acentúa año tras año, por problemas ambientales y de sobrepesca, afectan la captura del recurso y el manejo de pesquerías sostenibles, lo que contribuye a incentivar la producción acuícola del país (Salazar, 2002). A partir del año 2002, debido a los problemas presentes en el cultivo de tilapia en el país, se ha intentado lograr una alianza entre los productores de tilapia colombianos a través de la integración en cadenas productivas, en busca de un verdadero desarrollo sostenible por medio de la unificación de los parámetros en genética, producción, procesamiento, costos, volumen y productos de exportación y estrategias de mercado, lo que generaría una atractiva competencia a las empresas de países latinoamericanos ya posicionados en el mercado de los Estados Unidos (Castillo, 2002).



3.2 GENERALIDADES DE LA ESPECIE

La tilapia nilótica (Figura 1) es originaria de África, donde se distribuyó en forma natural hacia el Medio Oriente. La dispersión de la tilapia, ya con fines piscícolas o pesqueros se inició en el año de 1939 debido a su gran adaptabilidad que la ha convertido en la especie más cultivada en aguas templadas. Actualmente su distribución es mundial (Secretaría de Pesca de México, 1994).



Figura 1. *O. niloticus*. Tilapia nilótica (Ospina, 2008)

Con el desarrollo de la acuicultura en Colombia, a través de los años se han realizado diversas introducciones de especies ícticas que actualmente generan gran demanda en el mercado. Hacia los años 80 fueron traídas al país cíclidos, como la tilapia nilótica, que se ha convertido como una de las familias más importantes en el cultivo comercial no solo a nivel nacional sino mundial (Ospina y Ríos, 1997).



Las tilapias pertenecen a una gran familia de peces llamada Cichlidae, caracterizada por tener el cuerpo oblongo con aletas dorsales largas que tienen entre 23 a 31 espinas y rayos. Estos peces son de aguas cálidas tropicales, el rango óptimo para obtener un mayor rendimiento en términos de crecimiento está entre 30 y 35 C, el cual se verá afectado si la temperatura desciende por debajo de los 15 C y a temperaturas cercanas a 9 C les produce la muerte. (Espejo y Torres, 2001).

3.3 SISTEMA INMUNE EN PECES TELEOSTEOS

En los últimos años, las investigaciones sobre la fisiología, filogenia y ontogenia del sistema inmune de los peces han aumentado considerablemente, sobre todo en las especies económicamente más rentables (Fernández *et al.*, 2002). La respuesta inmune de todos los vertebrados, incluidos los peces, puede dividirse en dos tipos. El primero, la respuesta innata o inespecífica, consiste en una serie de mecanismos filogenéticamente muy antiguos que pueden eliminar los patógenos del organismo o bloquear su entrada de forma inespecífica. El segundo constituye la denominada respuesta inmune combinada o específica, que es inducible y requiere la presencia de una serie de células que reaccionan específicamente con el antígeno inductor y que son los linfocitos. En los peces tanto el hígado como el riñón son considerados órganos hematopoyéticos. Estructuralmente, el riñón anterior se compone de una red de fibras reticulares que proporcionan soporte para el tejido linfo-hematopoyético, que se encuentra disperso entre un sistema de sinusoides revestido por células reticuloepiteliales y aparecen como células principales un gran número de macrófagos, células madre mesenquimales (CMM), y células linfoides en todos sus estadios evolutivos; por otro lado, el bazo es un órgano abdominal compuesto por un sistema de elipsoides esplénicos, CMMs y tejido linfoide que en la mayoría de las especies aparece organizado formando



acúmulos alrededor de los otros dos componentes (Fernández *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 1998).

El sistema inmune específico involucra la producción de anticuerpos a través de un reconocimiento específico del antígeno. En los peces este sistema está conformado por la inmunidad humoral, la cual incluye anticuerpos e inmunoglobinas. La inmunidad mediada por células incluye linfocitos y células inmunocompetentes (Escobar-Briones *et al.*, 2006). El sistema inmune no-específico, el cual será el objeto de estudio de este proyecto, agrupa a aquellos mecanismos que se desarrollan sin que exista un contacto previo o reconocimiento anterior de un patógeno (Ellis, 2001). Este tipo de respuesta comprende una serie de mecanismos, en los que están implicados factores celulares y humorales, que para muchos investigadores, constituyen la primera y más importante línea de defensa frente a gran variedad de agentes foráneos. Los mecanismos de actuación son inespecíficos, es decir, independientes del agente, ya sea este de origen antigénico o no antigénico (Fernández *et al.*, 2002). El sistema inmune no específico a nivel de defensa celular cuenta con macrófagos, granulocitos (tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y células citotóxicas no específicas (NCC). Éstas últimas son consideradas en peces como un equivalente funcional a las células NK (natural killer) en los mamíferos.

Por otro lado, se encuentran las citoquinas, que son proteínas secretadas por las células del sistema inmune, tales como linfocitos y macrófagos activados (Secombes, 1996). Las citoquinas son un grupo de proteínas secretadas de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa), producidas durante las respuestas inmunes natural y específica. Se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de



modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica (Rojas, 2004; Iáñez, 1999).

Iáñez (1999), menciona las siguientes propiedades de las citoquinas:

- Son producidas por múltiples tipos celulares, principalmente del sistema inmune. Dentro del sistema inmune natural, los macrófagos son las células más productoras de citoquinas, mientras que en el sistema específico lo son las células T colaboradoras o Th.
- La producción de las citoquinas suele ser breve (transitoria), limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo (es decir, el agente extraño). En muchos casos ello se debe a que los correspondientes ARNm tienen una vida media corta, que a su vez depende de que las zonas 3' no traducibles son ricas en Adeninas y Uracilo.
- Considerando las diversas citoquinas, éstas pueden exhibir una o varias de las siguientes cualidades:

- Pleiotropía (múltiples efectos al actuar sobre diferentes células).

- Redundancia (varias citoquinas pueden ejercer el mismo efecto).

- Sinergismo (dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente).

- Antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos)

Dentro del grupo de las citoquinas inflamatorias se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) el cual es el principal mediador en la respuesta inmune del hospedero ante infecciones producidas por bacterias Gram negativas y las interleuquinas (IL) cuya función es estimular a los linfocitos, aumentando su proliferación por las señales emitidas por el $TNF\alpha$ (Secombes, 1996). Los componentes que comúnmente se encuentran presentes en las células de las



bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas inducen a la síntesis de citoquinas. Los microorganismos por poseer proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos (exclusivo en bacterias Gram negativas) obran como inmunógenos y los distintos componentes de su membrana celular pueden actuar como antigénicos (Rojas, 2004). Estas moléculas mensajeras solubles del sistema inmune interactúan con células y receptores para generar un mucus protector y mediar en la respuesta inmune ante la presencia de un patógeno (Panigrahi *et al.*, 2007).

A nivel de defensa humoral, en el sistema inmune no específico se encuentran factores solubles tales como la transferrina y el interferón. La transferrina es una glicoproteína que juega un papel central en el transporte de hierro entre los sitios de absorción, almacenamiento y utilización de este elemento en todos los vertebrados. El hierro es un elemento esencial en el establecimiento de muchos patógenos y su posterior infección al hospedero; la transferrina limita la cantidad de hierro endógeno disponible para los patógenos haciendo que no esté disponible para las bacterias (Yano, 1996).

Para que se desarrolle una infección en los peces o cualquier otro organismo, debe producirse una invasión y posterior penetración los microorganismos patógenos presentes en el medio. Esta infección dependerá del estado físico y fisiológico del animal así como la cantidad de patógeno presente, entre otros factores. Una vez las bacterias se establecen dentro del pez, este puede morir o bien, recuperarse gracias a un sistema de defensa eficiente (Escobar-Briones *et al.*, 2006), por lo cual es de suma importancia el conocimiento profundo del sistema inmune de los peces cultivados y de los mecanismos que activan durante una infección bacteriana.



3.4 ENFERMEDADES DESCRITAS EN TILAPIA NILOTICA

Uno de los factores a los que le atribuye el éxito del cultivo de tilapia es que se considera un organismo altamente resistente a muchas enfermedades que afectan a los peces, sin embargo, microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Edwardsiella* y *Aeromonas* pueden provocar serias enfermedades y pérdidas considerables en los cultivos (Escobar-Briones *et al.*, 2006). *Edwardsiella tarda* es un agente bacteriano infeccioso que ocasiona necrosis en órganos como el timo y el riñón y septicemias agudas que finalmente desembocan en importantes mortalidades (Pirarat *et al.*, 2006).

Aeromonas hydrophila es un bacilo corto Gram-negativo, mótil, anaerobio facultativo. En peces se describen tres formas de la enfermedad: la septicémica, la cutánea, con lesiones limitadas a piel y músculo; y una de tipo latente, que es una forma sistémica sin presencia de signos clínicos (Rodríguez *et al.*, 2005). Aunque estas bacterias se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos pueden llegar a ser patógenas en peces, causando heridas en la piel del individuo. En una forma aguda presenta hemorragia en branquias, alrededor del ano y órganos internos; en una forma sub aguda, los signos característicos son abscesos y úlceras, aletas sangrientas y descarga sangrienta por ano y nariz. Usualmente se utilizan bactericidas o antibióticos para eliminar estas bacterias (Vásquez *et al.*, 2001; Burgess *et al.*, 1998).

La estreptocosis (enfermedad producida por bacterias del género *Streptococcus*) es una enfermedad crónica que se caracteriza por la presencia de granulomas en el bazo, cerebro, hígado y riñón produciendo un exudado purulento en el tejido muscular con encapsulamiento mecanizado cerca de la línea lateral. Durante una infección crónica, las tilapias afectadas pueden mostrar movimientos natatorios desorientados y erráticos debido a que se produce una meningoencefalitis,



exoftalmia uni o bilateral con o sin opacidad de la córnea y hemorragia periocular. Debido a que algunas sintomatologías de la enfermedad se pueden confundir con problemas del tipo nutricional, parasitario o contaminación en la manipulación de muestras, es importante aislar e identificar correctamente el agente patológico. (Ma *et al.*, 2009; Conroy, 2004; Vasquez *et al.*, 2001).

Otra enfermedad en los cultivos de peces es la conocida como columnaris, la cual es causada por una mixobacteria; *Flexibacter columnaris* en aguas dulces, o *Flexibacter maritimus* en aguas saladas (a partir de 28 ppt.); *F. columnaris* es un patógeno común en la tilapiacultura. La enfermedad se caracteriza por la presencia de áreas de erosión o lesiones necróticas poco profundas de color blanquecino-grisáceas a blanquecino-amarillentas, localizadas al nivel de las aletas (“podredumbre de las aletas”), cabeza y/o cuerpo. Las branquias también son afectadas y muestran signos de palidez y necrosis (Conroy, 2004).

También se ha descrito la incidencia del género *Mycobacterium* como bacteria patógena en los cultivos. Es importante señalar que los agentes etiológicos de la micobacteriosis en numerosas especies ícticas dulceacuícolas y marinas, el *Mycobacterium chelonae*, el *M. fortuitum* y el *M. marinum*, están asociadas con infecciones humanas (Conroy, 2004; Vasquez *et al.*, 2001).

3.5 USO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS EN ACUICULTURA Y SU EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE LOS ORGANISMOS EN CULTIVO

A principios del siglo XX, Metchnikoff propuso implantar bacterias del ácido láctico (LAB) en el intestino humano para suprimir el efecto nocivo de otros microorganismos dentro del organismo (Gatesoupe, 1999). Debido a los buenos resultados de la aplicación de bacterias probióticas en mamíferos (Fooks y



Gibson, 2002; Shu y Giil, 2002), su aplicación ha sido propuesta también para el cultivo de peces y de invertebrados acuáticos. Villamil *et al.*, (2002a) definen los probióticos como microorganismos utilizados como adyuvantes dentro de una dieta, afectando de forma benéfica la fisiología del hospedador a través de la modulación su sistema inmune, así como, incrementando el balance nutricional y de la microbiota presente en el tracto intestinal. Aunque algunas LAB son microorganismos típicos de la microbiota intestinal predominantes en humanos y animales terrestres, géneros tales como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Carnobacterium* y *Lactobacillus* han sido evaluadas en peces y moluscos por su potencial probiótico (Gatesoupe, 2008).

Balcázar *et al.* (2007), Günther y Jiménez (2004) y Villamil *et al.* (2002) mencionan algunos de los beneficios atribuidos a la administración de probióticos:

- ✱ Restauración de la microbiota intestinal propia del organismo.
- ✱ Fuente de nutrientes y enzimas que contribuyen a un mejoramiento de la digestibilidad en el hospedero.
- ✱ Mejoramiento de la calidad del agua, sea por metabolización de la materia orgánica o por interacción con algunas algas.
- ✱ Contribución a la eliminación de bacterias patógenas: exclusión competitiva por nutrientes, competencia por sitios de fijación en el intestino o producción de un aumento en la respuesta inmunológica del hospedero.
- ✱ Modulación del sistema inmune, incrementando la actividad de algunas células tales como macrófagos, linfocitos y lisosimas.

Se ha demostrado que una dieta suplementada con probióticos puede modular la respuesta inmune, por lo que se espera que esto aumente el buen estado de salud de los hospederos. En general, las investigaciones indican que el consumo de especies de LAB genera el incremento en la actividad de los fagocitos, lisosimas y



producción de radicales de oxígeno y nitrógeno; además, varios estudios sugieren a los probióticos como estimulantes a la inducción de ciertas citoquinas como el Interferón gamma (INF γ) (Villamil y Novoa, en prensa).

Las LAB se caracterizan por ser cocos o bacilos Gram-positivos, usualmente no móviles, no poseer endoesporas y por producir ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Los miembros de este grupo carecen de porfinas y citocromos, no llevan a cabo transporte de electrones vía fosforilación, por lo que obtienen la energía solo a través de la fosforilación del sustrato. Las LAB del género *Lactobacillus* son de morfología bacilar, la mayoría son especies homofermentadoras (que solo producen ácido láctico) aunque existen algunas heterofermentadoras, que generan compuestos tales como el etanol y el CO₂. Su uso tradicional ha sido en derivados lácteos, debido a su capacidad de crecer en pH ácido (Balcázar *et al.*, 2007b; Madigan *et al.*, 2004; Ringo y Gatesoupe, 1997).

3.6 BASES TEORICAS PARA LA EXPRESIÓN DE GENES Y PRODUCCION DE PROTEINAS A PARTIR DE LA TRADUCCION DEL ARN.

En las moléculas de ADN se encuentran las unidades hereditarias llamadas genes. El gen es la unidad de almacenamiento de información capaz de sufrir replicación, mutación y expresión (Klug & Cummings, 1999). Cuando una parte de la información contenida en la molécula de ADN, que está en el nucleo, debe ser utilizada en el citoplasma de la célula para la construcción de proteínas, ella es transcrita bajo la forma de una pequeña cadena de ARN: el ARN mensajero (ARNm). Uno a uno se van añadiendo los ribonucleótidos en la dirección 5' a 3', usando como molde una de las cadenas de ADN con ayuda de la ARN polimerasa (Zamudio, 2005). La traducción ocurre en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. La iniciación de la traducción está dada por el acoplamiento de la



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

subunidad ribosómica menor a una cadena de ARNm cerca de su extremo 5'. A continuación el cebador o primer de ARN de transferencia (ARNt) se coloca en su lugar y se aparea con el codón iniciador del ARNm. Una vez que el ribosoma completo se ha ensamblado en el codón de iniciación, comienza la etapa de elongación. Hacia el final de la secuencia de la molécula de ARNm, hay un codón que sirve como señal de terminación. La traducción también se conoce como síntesis de proteínas, dado que es la transferencia de información del lenguaje de los nucleótidos al de los aminoácidos (Curtis y Barnes, 2001)



4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Elucidar el efecto de la bacterias probiótica de la especie *Lactobacillus acidophilus*, al ser utilizada como suplemento en la dieta de *Oreochromis niloticus*, en el nivel de expresión de algunos genes de defensa innata (transferrina, IL-1 β y TNF- α) por medio de su efecto inmunomodulador *in vivo*, relacionando esto con el incremento en resistencia durante infecciones experimentales.



5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de las bacterias probióticas seleccionadas de la especie *Lactobacillus acidophilus* evaluando los niveles de transcripción de la transferrina de *Oreochromis niloticus*.
- Valorar el efecto de las bacterias probióticas seleccionadas de la especie *Lactobacillus acidophilus* sobre la expresión de las citoquinas IL-1 β y TNF- α de *Oreochromis niloticus*



6. HIPÓTESIS

- ✿ El nivel de expresión de los genes transferrina, IL-1 β y TNF α , que regulan algunos mecanismos de defensa no específica en *O. niloticus*, será mayor en los individuos cuya alimentación fue enriquecida con *Lactobacillus acidophilus* que en el grupo control, donde el alimento no recibirá ningún tipo de suplemento.



7. METODOLOGÍA

7.1 SELECCIÓN DE INDIVIDUOS

Se usaron individuos de *O. niloticus* obtenidos del SENA Agropecuario de Gaira en buen estado de salud y que no estuvieron expuestos a patógenos ni recibieron ningún tipo de vacuna. Los peces se pusieron en acuarios con oxígeno constante, a una temperatura promedio de 26° C y fueron alimentados con pienso comercial tres veces al día.

7.2 CEPAS BACTERIANAS

Se usaron aislados de *L. acidophilus* donadas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. El cultivo de las bacterias se hizo en Man Rogosa & Sharpe (MRS) a 36° C. Posteriormente, los cultivos se mantuvieron a -20° C en medio MRS + glicerol 20% para poder tener las cepas disponibles para usos posteriores.

7.3 PREPARACIÓN DEL ALIMENTO

Las LAB se cultivaron en medio MRS líquido a una temperatura de 36 °C durante 48 horas en un incubador con agitación. Luego se centrifugaron los cultivos y se lavaron tres veces con tampón fosfato, PBS (10mM- Na_3PO_4 , 150mM-NaCl; pH 7.2). Finalmente se suspendieron en la misma solución. La concentración de dicha suspensión bacteriana se mantuvo entre 10^6 UFC/ml ya que ha sido previamente descrita como la dosis más eficiente en varios estudios (Villamil *et al.*, 2003;



Balcázar *et al.*, 2006). Posteriormente, dicha suspensión se incorporó lentamente en el alimento hasta alcanzar una concentración de 10^6 UFC/g ya que ha sido previamente descrita como la dosis más eficiente en múltiples estudios (Villamil *et al.*, 2003; Balcázar *et al.*, 2006).

7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR *Lactobacillus acidophilus* EN TILAPIA NILOTICA

Se usaron peces de 0.2 g sanos, obtenidos en el SENA y previamente aclimatados. Los peces se distribuyeron en acuarios de 20 L de agua, garantizando las condiciones de temperatura de 26°C y concentraciones de oxígeno próximas a la saturación. Se distribuyeron al azar 50 individuos por cada acuario, cuya capacidad era de 20 L. Los acuarios se mantuvieron a 26° C, con flujo estático de agua y un recambio diario del 25%. El foto periodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los peces se alimentaron tres veces al día con un 4% de biomasa durante las dos primeras semanas con el pienso suplementado (Tabla 2).

Tabla 2. Modelo de alimentación para peces

ALIMENTACIÓN
Concentrado comercial 24% proteína sin suplemento
Concentrado comercial 24% + <i>L. acidophilus</i>

Una vez iniciada la alimentación con el pienso suplementado, se tomaron muestras de los peces de cada uno de los acuarios a las 24 horas y 15 días de tratamiento. Se extrajeron riñón y bazo de cinco individuos de cada tratamiento y se guardaron por separado en tubos eppendorf estériles con 300 µl de RNAlater (Ambion), la cual es una solución que estabiliza y protege el ARN en la célula y



evita la necesidad de procesar las muestras inmediatamente o congelarlas en nitrógeno líquido para su preservación (Applied Biosystems, 2007). Las muestras se rotularon y se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis en los laboratorios de Biología Molecular de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano (sede Bogotá) donde se realizó la extracción de ARN.

7.5 AISLAMIENTO DE ADN GENOMICO

Para llevar a cabo esta parte del proyecto, se realizó extracción de ADN genómico de *O. niloticus* por medio del método fenol-cloroformo (Tomado y modificado de Sambrook y Russell, 2001):

Inicialmente se prepararon 15 ml de SNET (buffer de lisis) con los siguientes componentes: 20 mM de Tris-Cl (pH 8), 5 mM de EDTA (pH 8), 400 mM de NaCl, 1% (p/v) de SDS, y se llenó a aforo en un tubo falcon de 15 ml con agua destilada desionizada.

Se escogieron las muestras de tejido de hígado, músculo y bazo. En un tubo eppendorf estéril se colocó una muestra de tejido de 10 a 20 mg y se adicionó 400 μl de buffer de lisis y 1 μl de proteinasa K. Las muestras se incubaron toda la noche a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (18 horas aprox.). Pasado el periodo de incubación, se retiraron las muestras del horno y se adicionaron 700 μl de cloroformo:isomialcohol y se procedió a agitar manualmente durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm por 5 minutos y la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril. El ADN obtenido se precipitó con 500 μl de etanol al 100% y nuevamente se centrifugó a 15.000 rpm por 15 minutos. Con cuidado de no remover el pellet de ADN, se retiró el etanol y se agregaron 500 μl de etanol al 75% para realizar el segundo lavado. De nuevo se centrifugó a 15.000 rpm por otros 15 minutos. Se procedió a retirar el etanol y se dejó el tubo destapado para que se secara el pellet



de ADN. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 μ l de agua libre de nucleadas, se probó su presencia al hacer una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se almacenó a -20 °C.

7.6 AISLAMIENTO DE ÁCIDO RIBONUCLÉICO (ARN)

Para evitar que durante la manipulación del ARN éste fuera degradado por ARNsas ambientales, se usó un juego de pipetas estériles junto con la aplicación de RNAzap (Ambion) a los elementos de laboratorio para su aislamiento y manipulación.

La extracción de ARN se realizó con el kit RNAqueus® (Ambion), según se describe a continuación:

Se descongeló y removió la mayor cantidad de material extraño posible. Se pesó la muestra de tejido necesaria (de 1 a 75 mg máximo) y posteriormente se agregaron 200 μ L de la solución Lysis/Binding y se agitó y homogenizó el tejido. Luego, se puso a la muestra 200 μ L de etanol al 64% y se mezcló cuidadosamente con la pipeta y también invirtiendo el tubo varias veces. La mezcla anterior se pasó a un tubo de colección con filtro. Se centrifugó a RCF 10,000–15,000 x g (10,000-14,000 rpm) por un minuto. Luego se desechó lo que pasó a través del filtro y se reutilizó el tubo de colección para los pasos de lavado.

Para el proceso de lavado se adicionaron 700 μ L de “Wash Solution #1” al filtro y se repitió el proceso de centrifugado del paso anterior. Se lavó nuevamente con 500 μ L de “Wash Solution #2/3”. Después de descartar el “Wash Solution”, se centrifugó para remover trazas de las sustancias utilizadas para el lavado. Finalmente, se puso el filtro en un nuevo Tubo de Colección. Se adicionó “Elution



Solution” pre calentado a $\sim 70\text{--}80^\circ\text{C}$ al centro del filtro y se cerró el tubo. El volumen está correlacionado con la cantidad de ARN que se requiera. El mínimo requerido es $50\ \mu\text{L}$, el cual se agregó en alícuotas secuenciales de $40\ \mu\text{L}$ y $10\ \mu\text{L}$. Se centrifugó por 30 segundos a temperatura ambiente (RCF 10,000-15,000 g). Se adicionó una segunda alícuota de “Elution Solution” al centro del filtro y se centrifugó de nuevo.

El ARN aislado en cada muestra se cuantificó espectrofotométricamente tomando $18\ \mu\text{L}$ y posteriormente midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm. Un valor de 1 A_{260} equivale a $40\ \mu\text{g}$ ARN /ml. La concentración en $\mu\text{g/ml}$ se encontró multiplicando A_{260} por el factor de dilución y el coeficiente de extinción. ($1\ A_{260} = 40\ \mu\text{g}$ ARN/mL).

$$A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 = \mu\text{g ARN/mL}$$

La proporción de A_{260} a A_{280} es el valor para estimar la pureza del ARN, éste debe estar en un rango de 1,8 a 2,0.

7.7 OBTENCIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO (cADN)

Se usaron $0,5\ \mu\text{g}$ de ARN aislado de cada muestra como molde para sintetizar el cADN usando el kit RETROscript® (Ambion) que emplea la enzima transcriptasa reversa para la síntesis de cADN a partir de cadenas molde. En este proyecto, se propuso el uso de oligo (dt) por su afinidad con las colas poli A típicas del mRNA. El proceso de retrotranscripción se hizo la mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla 3.



Tabla 3. Componentes necesarios provistos por el kit RETROscript® para llevar a cabo la obtención de cADN a partir de ARN

CANTIDAD	COMPONENTE
0,5 µg	ARN obtenido
2 µL	Oligo(dT)
2 µL	Buffer 10x RT
4 µL	Mezcla dNTP
1 µL	Inhibidor Placentar ARNse
1 µL	MMLV-RT
Hasta 20 µL	Agua libre de nucleasas

Se mezcló generosamente y se incubó a 44 °C durante una hora, posteriormente se incubó a 92 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima Transcriptasa Reversa MMLV-RT, la cual es una enzima ARN-dependiente codificada por el Moloney Murine Leukemia Virus y que se usa para la síntesis de cADN a partir de una cadena simple de ARN. La principal ventaja de esta enzima es que mantiene más intacto el ARN debido a que presenta una baja actividad de la ARNasa H, esta última encargada de eliminar el ARN de un híbrido ADN-ARN (Gerard *et al.*, 1997). Las reacciones obtenidas se guardaron a -20 °C, debidamente rotuladas, para realizar posteriormente el análisis de genes.

7.8 OPTIMIZACIÓN DE LOS PRIMERS O CEBADORES A PARTIR DE ADN

El proceso de la PCR se llevó a cabo utilizando primers o cebadores específicos que se diseñaron a partir de la única secuencia disponible en el Genbank para estos genes en tilapia nilótica (Tabla 4). Los primers se diseñaron usando el programa Primer Quest, que hace una simulación virtual de la reacción de PCR, y



arroja posibles parejas de primer sutiles para la amplificación de un producto específico de acuerdo con una condiciones predeterminadas. Se tuvo en cuenta factores claves como el número de pares de bases, la especificidad de la reacción, la temperatura de anillamiento, la posible formación de loops, de dímeros etc. Se verificó la especificidad y buena ampliación de los primers o cebadores en el ADN genómico de la tilapia.

Tabla 4. Secuencias del GeneBank usadas como base para la realización oligonucleótidos usados como primers o cebadores

Gen	pb	“Forward”	“Reverse”	Referencia Gene bank
Actina	596	TGTGACCAACTGGGATGACAT GGA	TTCCGCAGGATTCCATACC AAGGA	EF206801.1
Transferrina	423	CACTCTGTGACGTTTCATCTCTG	GTAGTAGAGTGGTAGAGTC CAAGG	gi_89475214
IL-1b	216	TCAGTTCACCAGCAGGGATGA GAT	TAGAGGTTTGTGCCTTTGAT GCC	gi 71044470
TNF a	538	AGCCAGAAGCACTAAAGGCCGA AGA	AGTGCAAACACGCCAAAGA AGGTC	AY428948.1

Se probó cada uno de los primers o cebadores con el ADN obtenido y se estandarizaron los tiempos y temperaturas para la amplificación de los genes específicos para poder, posteriormente, evaluar los niveles de transcripción de mRNA y expresión de genes.

7.9 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE mRNA Y EXPESION DE GENES

El cADNobtenido se usó como molde para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers o cebadores diseñados para cada uno de los



genes a estudiar. Para el estudio de la expresión de los genes que codifican para la transferrina, IL-1 β y TNF α se tomó a actina como “*house keeping*”, el cual es un gen que se expresa en todas o la mayor parte de las estirpes celulares, por codificar una proteína necesaria para la función celular y cuya expresión es constante. Este gen es también llamado estructural, en oposición a los genes específicos de tejido (Departamento de Genética-Universidad de Navarra, 2007).

El cADN que codifica para la actina también se amplificó en cada muestra y se empleó como control positivo de la RT-PCR (PCR con transcriptasa reversa), ya que es un gen altamente conservado y que se expresa constitutivamente en los tejidos examinados (Ellis, 2001). Se utilizó RT-PCR ya que este es la técnica recomendada para amplificar copias de cADN a partir de ARN y es usada frecuentemente para amplificar genes específicos cuando su secuencia es conocida, al menos de manera parcial (Griffiths *et al.*, 2002).

Para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se usó Taq Polimerasa GoTaq® Green Master Mix (Promega) para la amplificación (tabla 5). Este último es un mix que permite hacer una carga directa de la muestra al gel para electroforesis, evitando la adición de buffers de carga al ADN como el azul de bromofenol.

Tabla 5. Componentes necesarios para llevar a cabo la amplificación de genes

CANTIDAD	COMPONENTE
1-5 μ L	cADN
Hasta 50 μ L	Agua libre de nucleasas
2,5 μ L	De cada primer
1-2 U	GoTaq® Green Master Mix



Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador 100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research usando los siguientes parámetros (tabla 6).

Tabla 6. Ciclos necesarios para llevar a cabo la amplificación de genes por PCR

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Denaturación inicial	1	94-95 C	2-4 minutos
Amplificación	30	94 C	20-30 segundos
		50 C*	20-30 segundos
		72 C	1 minuto
Extensión final	1	72 C	5 minutos

*La temperatura de anillamiento varía para cada gen de estudio dependiendo de los resultados obtenidos durante la estandarización de los primers o cebadores utilizados. Para actina y transferrina se mantuvo en 50 C y para TNF α e IL-1 β se aumentó a 60 C.

7.10 ELECTROFORESIS EN AGAROSA DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos amplificados se corrieron en una cámara de electroforesis GEL XL Ultra v2 Labnet, junto con un gel de agarosa al 1 % en tampón TBE con 2 μ l de bromuro de etidio (se debió tener especial cuidado con este último ya que es una sustancia mutagénica, carcinogénica y venenosa). Se cargaron 10 μ l de cada muestra y se usó el Marcador Molecular 100bp ADN (Promega). Las muestras se sometieron a electroforesis durante 30 minutos 100 V y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Para estimar el nivel de inducción de los genes en cada muestra, se calculó la intensidad neta de cada banda dividiendo la intensidad de cada banda entre la intensidad de la banda de actina correspondiente usando un fotodocumentador UVP GelDoc-It Imagen System,



junto con el programa Vision-Works LS[®]. Acquisition and Analysis, Versión 6.4.3 (UVP, LLC).

7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En esta etapa se utilizaron los datos de densitometria de las bandas para cada gen para hallar el promedio de cada tratamiento. Para determinar diferencias entre los tratamientos se corrió la prueba de Mann-Whitney, tomando un valor significativo en términos de $P < 0,05$. También se calculó la desviación estándar. Para esto se utilizó el programa STATGRAPHICS plus 5.0.



8. RESULTADOS

8.1 OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE TEJIDO DE TILAPIA NILOTICA

Siguiendo el método de fenol-clorformo se realizó la extracción de ADN genómico para llevar a cabo la prueba y estandarización de los primers o cebadores o cebadores a utilizar en el estudio de la expresión de genes de defensa. Los resultados obtenidos muestran que, al presentar las bandas más claras, se realizó una mejor extracción a partir del bazo de tilapia (figura 2), razón por la cual se escogió este ADN para la estandarización de los oligonucleótidos.

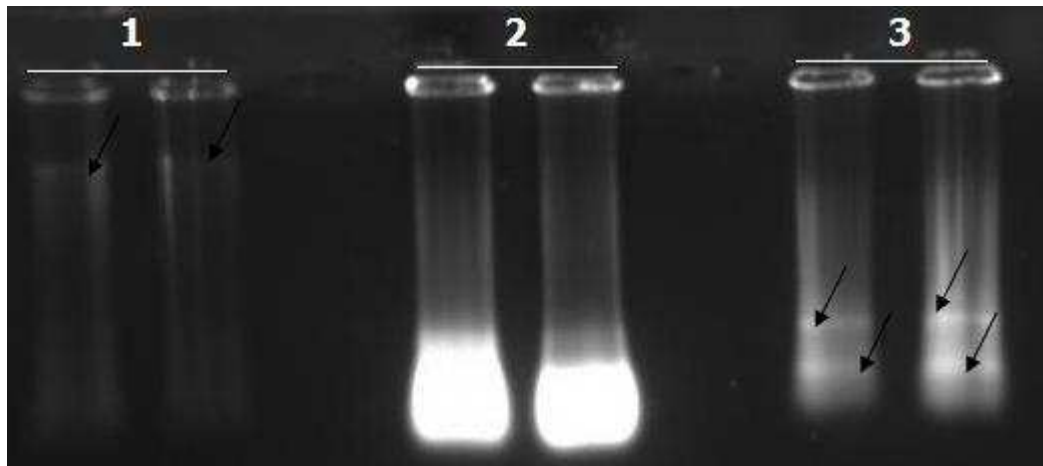


Figura 2. Obtención de ADN genómico a partir de: 1. Hígado, 2. Músculo, 3. Bazo. Las flechas indican las bandas que confirman la presencia de ADN.

8.2 DISEÑO DE PRIMERS O CEBADORES

A partir de las secuencias disponibles en el Genbank para *O. niloticus* y del programa Primer Quest se realizó el diseño de los primers utilizados en el estudio de la expresión de los genes transferrina, IL-1 β y TNF α ; así como también del gen



actina, el cual se utilizó como *house keeping* (Tabla 7), dónde pb hace referencia al tamaño del gen dado en pares de bases y Tm a la temperatura de melting, es decir, la temperatura a la cual se produce la hibridación de los primers con los fragmentos de ADN que se desean amplificar. Esta temperatura es relativamente específica para cada primer. La formula para calcular la TM es la siguiente:

$$Tm = 4(G+C) + 2 (A+T).$$

Tabla 7. Información general de los primers o cebadores diseñados para su uso en el estudio de la expresión de los genes de defensa de la tilapia nilótica.

GEN	pb	Tm (°C)
Actina	596	59,9
		60,4
Transferrina	423	55,1
		55,5
IL-1 β	216	59,8
		59,6
TNF- α	538	60,5
		60,4

Posteriormente, se verificó la especificidad y buena ampliación de los primers o cebadores en el ADN genómico de la tilapia.

8.3 PRUEBA Y ESTANDARIZACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para evaluar y poner a punto a reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para cada uno de los genes, se realizaron diferentes pruebas, cambiando la cantidad



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

y/o concentraciones de cada uno de los componentes necesarios para la amplificación de los mismos, hasta obtener una banda única.

Los componentes utilizados fueron GoTaq® Green Master Mix (Promega), Primers o cebadores (Rv y Fw), ADN genómico a partir de bazo y agua libre de nucleasas, realizando en laboratorio un total de seis combinaciones; las cuales incluyeron cantidad y concentración de cebadores, cantidad y concentración de ADN y temperaturas y ciclos de la PCR. En la tabla 8 se encuentran las combinaciones que presentaron mejores resultados (en todos usando ADN en dilución 1:10, es decir, 1 µL del ADN obtenido en 9 µL de agua libre de nucleasas), mientras que en la tabla 9 están los ciclos y tiempos necesarios para la amplificación de los genes.

Tabla 8. Componentes utilizados para llevar a cabo la amplificación de genes

MEZCLA	A	B	C	D	E	F	G	H
COMPONENTE	CANTIDAD							
GoTaq® Green Master Mix (Promega) (µl)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Primer (Fw) (µl)	1	0,5	0,5	0,25	1 (1:10)	0,5 (1:10)	0,5 (1:10)	0,25 (1:10)
Primer (Rv) (µl)	1	0,5	0,5	0,25	1 (1:10)	0,5 (1:10)	0,5 (1:10)	0,25 (1:10)
ADN (µl)	1 (1:10)	1 (1:10)	1 (1:100)	1 (1:10)	1 (1:10)	1 (1:10)	1 (1:10)	1 (1:100)
Agua libre de nucleasas (µl)	3,25	4,25	4,25	4,25	3,25	4,25	4,25	4,75
Volumen Total (µl)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5



Tabla 9. Ciclos necesarios para llevar a cabo la amplificación de genes por PCR en ADN genómico

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Denaturación inicial	1	94 C	2 minutos
Amplificación	30	94 C	30 segundos
		50 C	30 segundos
		72 C	45 segundos
Extensión final	1	72 C	3 minutos

Posteriormente, para la visualización de los fragmentos de AND se utilizó un gel de agarosa al 1% y al cual se le adicionó 2 μ L de bromuro de etidio como marcador de ácidos nucleicos. Se llevó a cabo la electroforesis por 30 minutos a 100 V, utilizando 10 μ L de cada una de las muestras, junto con el buffer de carga, el cual ya viene incluido en la GoTaq® Green Master Mix y el marcador de peso molecular para poder conocer el peso de las bandas obtenidas.

En este montaje, los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla H para actina, en el caso de la transferrina se presentó amplificación en todos los casos. Para TNF- α , los mejores resultados se presentaron en las mezclas D, E y F y para IL-1 β la mejor amplificación se presentó en los montajes donde se usaron los primers o cebadores diluidos 1:10 (E, F, G y H).

Conociendo ya las cantidades necesarias de cada uno de los componentes necesarios para la amplificación de los genes en ADN genómico, nuevamente se llevó a cabo la prueba de los oligonucleótidos, esta vez ya en el cADN obtenido a partir de 0,5 μ gr ARN de riñón y bazo de la tilapia nilótica. Los ciclos de PCR para los genes actina y transferrina se mantuvieron igual, mientras que para IL-1 β y



TNF α , de acuerdo con la Tm de los primers, se usó una temperatura de 60°C para garantizar mayor especificidad en el anillamiento de los primers.

Los pesos (pb) de cada uno de los genes en el ADN genómico fueron mayores a los esperados, de acuerdo con los diseños elaborados con base en las secuencias de mRNA disponibles en el Genbank. En el caso de cADN los pesos de Actina y transferrina coincidieron con los esperados (596 bp y 423 bp respectivamente) mientras que para IL-1 β y TNF α se mantuvieron los pesos obtenidos con ADN genómico (467 bp y 916 bp respectivamente).

8.4 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE DEFENSA A PARTIR DE cADN

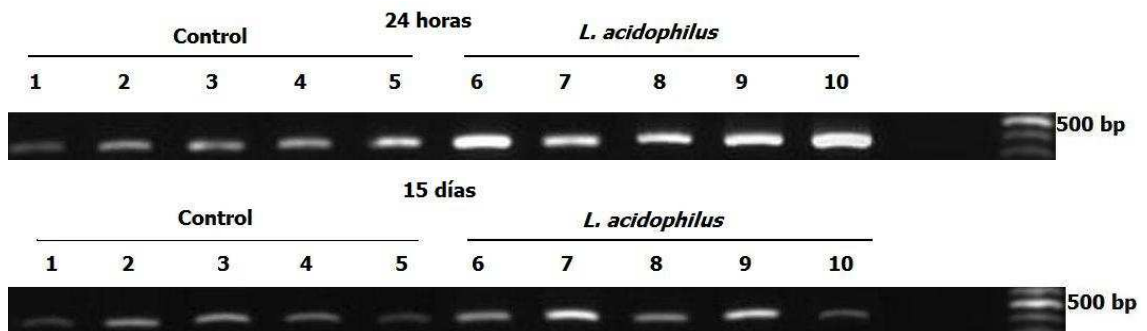
Para estimar el nivel de inducción de los genes en cada muestra, se calculó por densitometria de las bandas a través de la cuantificación de la intensidad neta de cada banda dividiendo la intensidad de cada banda entre la intensidad de la banda de actina correspondiente. Este proceso se llevó a cabo para el estudio de la expresión de los genes de defensa que codifican para la Transferrina, IL-1 β y TNF α y del gen Actina que actúa como “*house keeping*” y el cual también se amplificó en cada muestra y se empleó como control positivo de la RT-PCR.



8.4.1 Expresión de transferrina

La expresión relativa del gen transferrina se puede observar en la Figura 3a (riñón) y 3b (bazo), siendo mayor la expresión del gen en los individuos cuyo alimento fue suplementado con *L. acidophilus* respecto al control, donde se evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en riñón 24 horas ($P\text{value} = 0,0011$) (Figura 4a) y bazo 15 días ($P\text{value} = 0,013$) (Figura 4b).

a.



b.

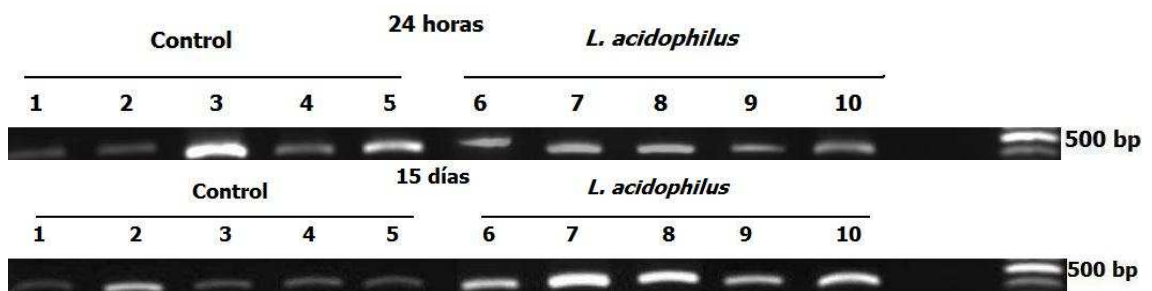
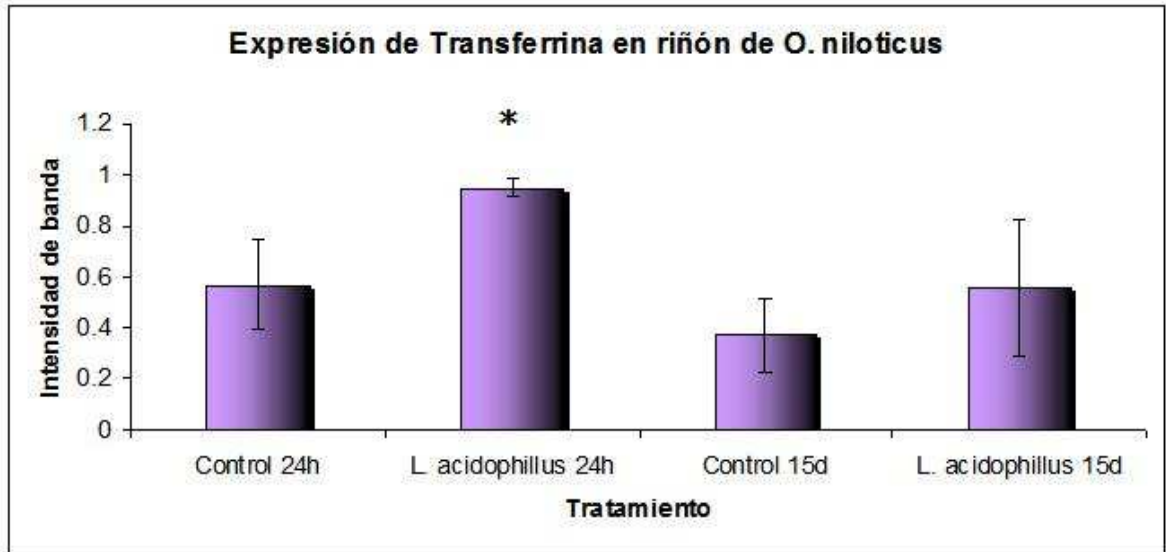


Figura 3. Expresión del gen transferrina en el riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica en el grupo control y en el grupo suplementado con *L. acidophilus* 24 horas y 15 días después de iniciado el tratamiento.



EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus* ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).

a.



b.

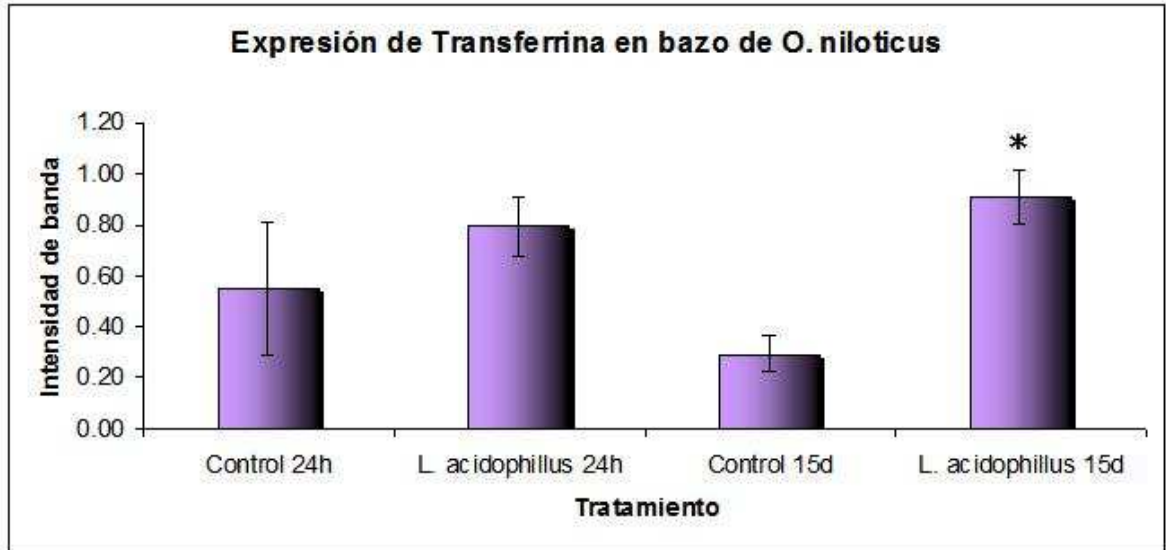


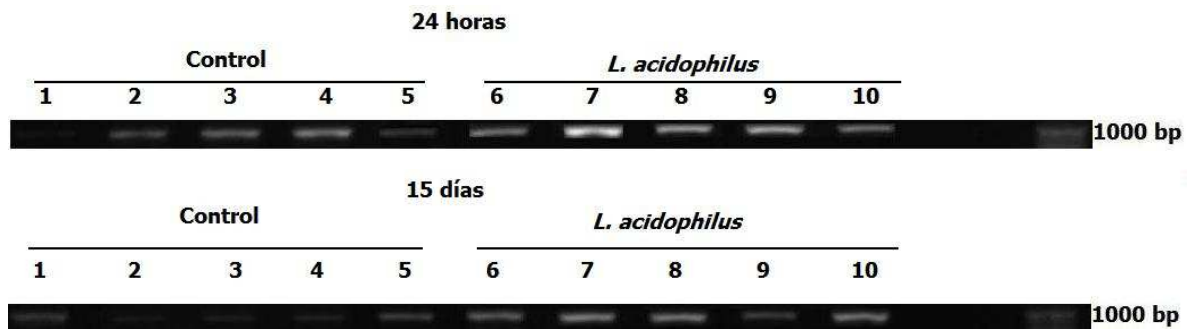
Figura 4. Cuantificación y comparación de la tasa de expresión (ARNm) para transferrina en riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica.



8.4.2 Expresión de TNF- α

La expresión relativa del gen TNF α se puede observar en la Figura 5a (riñón) y 5b (bazo), siendo mayor la expresión del gen en los individuos cuyo alimento fue suplementado con *L. acidophilus* respecto al control, donde se evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en riñón ($P_{\text{value}} = 0,028$ para 24h y $P_{\text{value}} = 0,016$ para 15 días) (Figura 6a) pero no en bazo (Figura 6b).

a.



b.

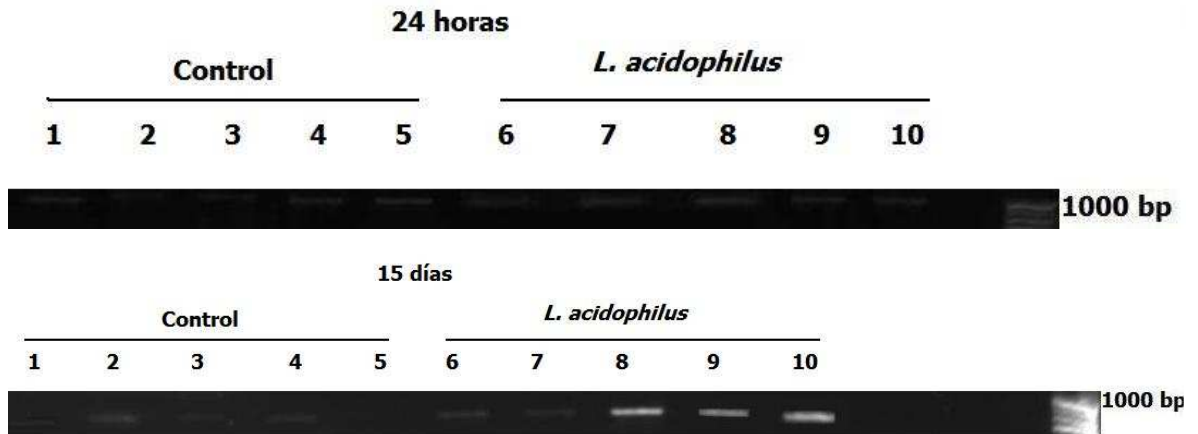
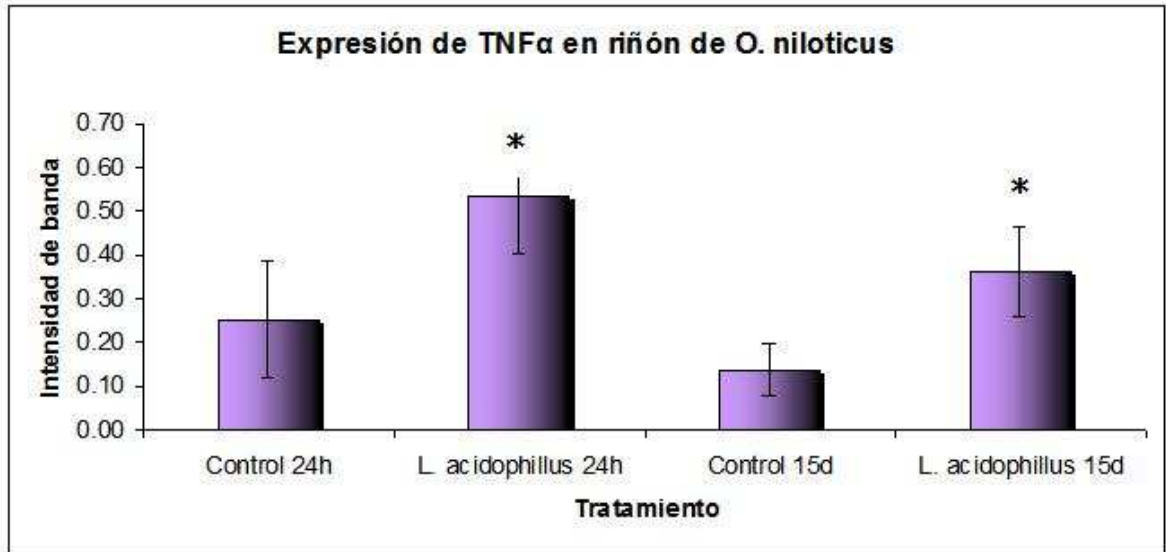


Figura 5. Expresión del gen TNF α en el riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica en el grupo control y en el grupo suplementado con *L. acidophilus* 24 horas y 15 días después de iniciado el tratamiento.



EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).

a.



b.

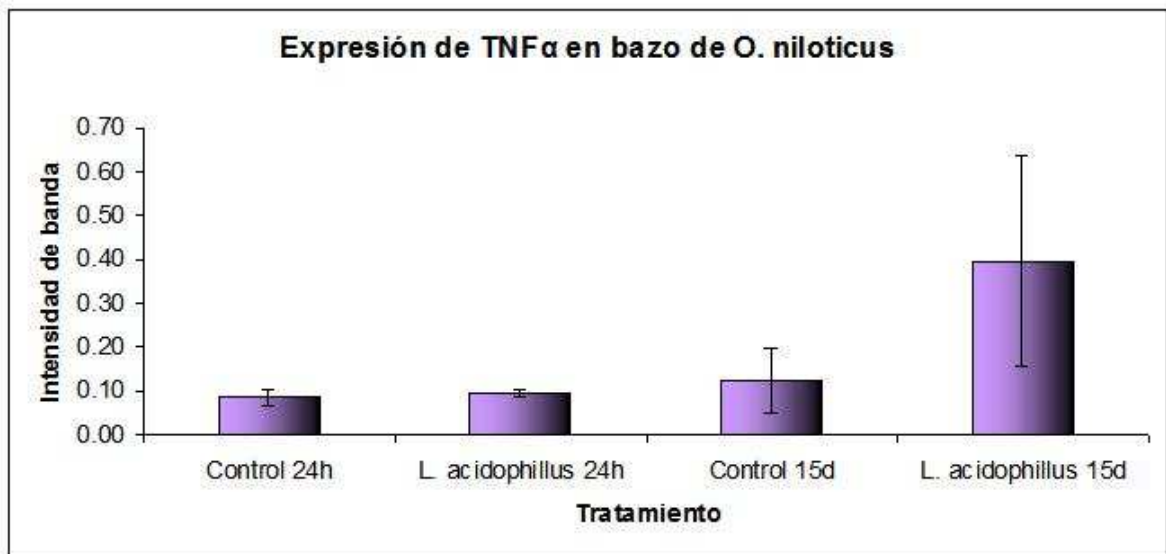


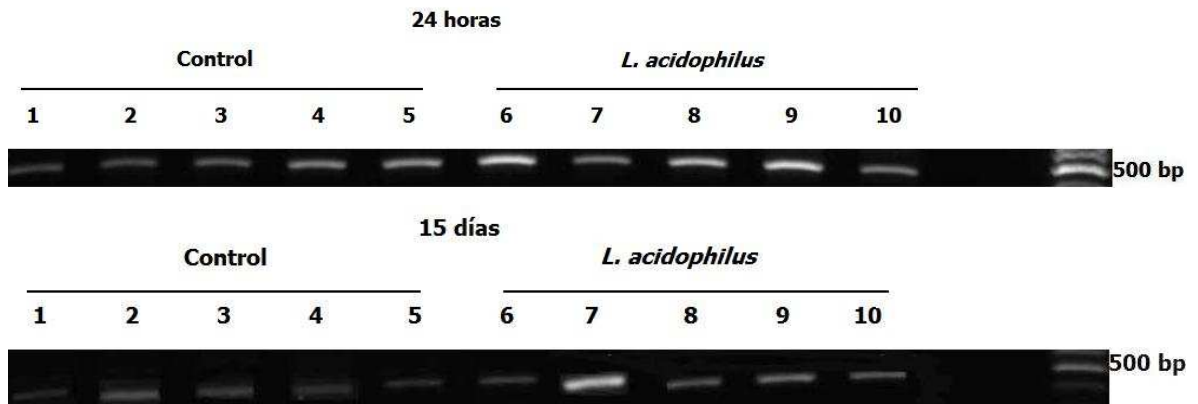
Figura 6. Cuantificación y comparación de la tasa de expresión (ARNm) para TNF α en riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica.



8.4.3 Expresión IL-1 β

La expresión relativa del gen IL-1 β se puede observar en la Figura 7a (riñón) y 7b (bazo), siendo mayor la expresión del gen en los individuos cuyo alimento fue suplementado con *L. acidophilus* respecto al control, donde se evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en riñón 15 días ($P_{\text{value}} = 0,036$) (Figura 8a) y bazo ($P_{\text{value}} = 0,012$ para 24h y $P_{\text{value}} = 0,012$ para 15 días) (Figura 8b).

a.



b.

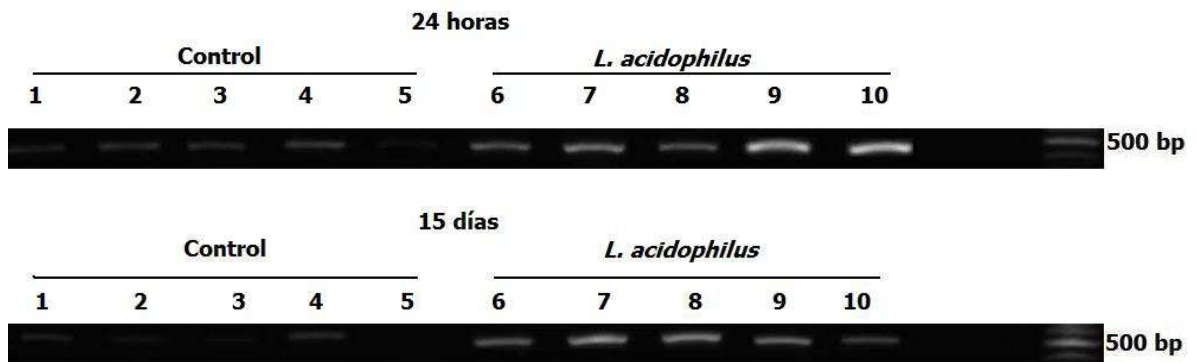
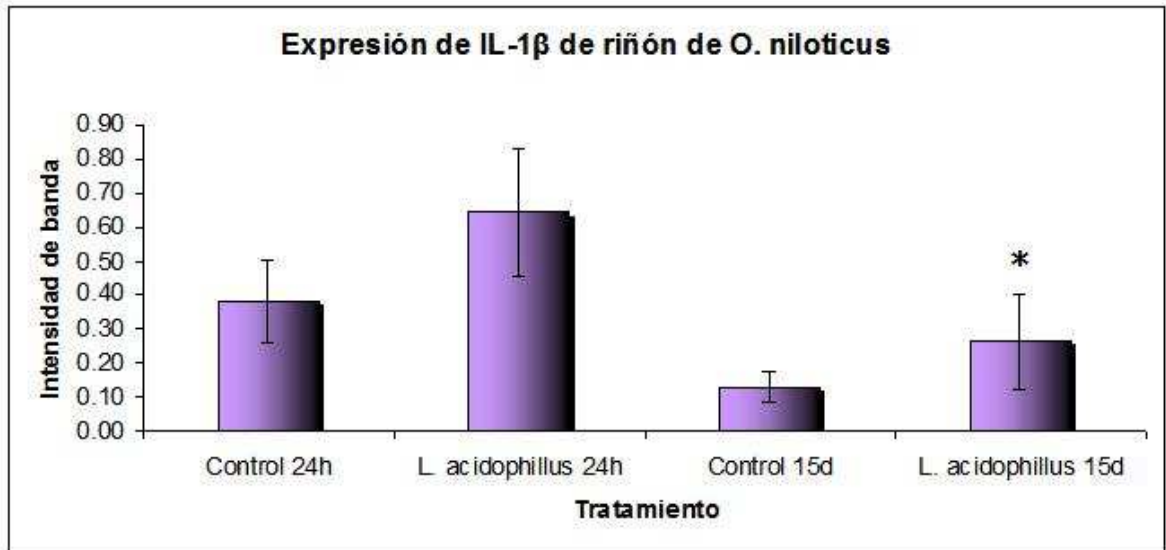


Figura 7. Expresión del gen IL-1 β en el riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica en el grupo control y en el grupo suplementado con *L. acidophilus* 24 horas y 15 días después de iniciado el tratamiento.



EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).

a.



b.

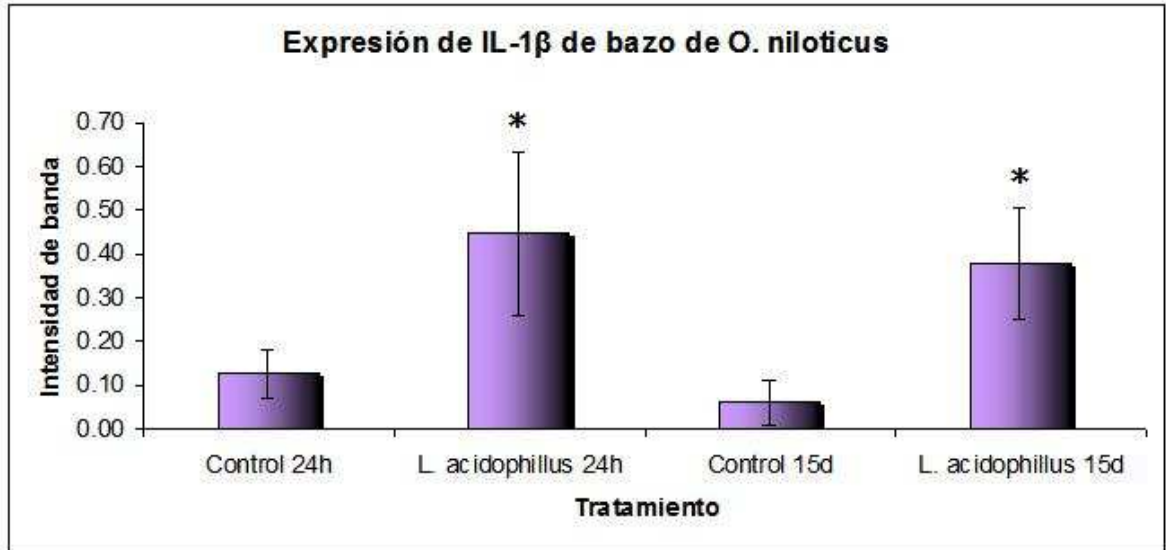


Figura 8. Cuantificación y comparación de la tasa de expresión (ARNm) para IL-1 β en riñón (a) y bazo (b) de la tilapia nilótica.



9. DISCUSIÓN

Los actuales resultados muestran un evidente incremento en la expresión de los genes de defensa de la tilapia nilótica después de ser alimentada con un suplemento de bacterias probióticas. La detección de genes a partir de genomas completos requiere en principio de DNA con calidad aceptable y un diseño de primers que permitan una amplificación específica. Adicionalmente se requiere estandarizar las condiciones generales, como temperatura de anillamiento, concentración de DNA, primers y Taq DNA polimeasa (Luque y Herráez, 2001). En el caso de la amplificación de los genes al utilizar como molde ADN genómico, el peso de las bandas fue mayor al esperado. Esto se debe a que los primers fueron hechos específicamente para ser utilizados en ADNc a partir de ARN. Algunas secuencias internas presentes en el ADN no aparecen en el ARNm maduro ya que los genes están fragmentados y poseen segmentos de nucleótidos que no codifican, es decir, no se encuentran en el producto final del ARNm y los cuales se conocen como intrones (Klug y Cummings, 1999). La presencia de estos intrones hace que las bandas de los genes estudiados en ADN genómico tengan un peso mayor a las bandas resultantes al utilizar ADNc. En el caso de la Actina y la Transferrina, al usar el ADNc, sus bandas tuvieron los pesos esperados, mientras que para IL-1 β y TNF- α , a pesar que se obtuvieron bandas únicas al momento de la estandarización, se mantuvo el peso obtenido en ADN genómico, presentando la misma banda siempre; lo cual implica que se está obteniendo el gen.

Este fenómeno se puede atribuir a una posible contaminación del ADNc, sin embargo, esta causa es descartada si se tiene en cuenta que se utilizó un kit altamente específico para la obtención del ARN y síntesis del ADNc. Por otro lado, en caso de una contaminación, se hubiese presentado una serie de bandas inespecíficas y no se hubiera obtenido los pesos esperados en Actina y



Transferrina, ya que se utilizó el mismo ADNc como molde. Por otro lado, también puede existir la posibilidad de que los genes IL-1 β y TNF- α presentes sean isoformas del gen, generadas tal vez por un splicing alternativo. Teniendo en cuenta que solo hay una secuencia de los genes para *O. niloticus* en el Genbank, no existe una plena certeza que sea lo suficientemente completa como para el diseño de primers altamente específicos que eviten la presencia de intrones al momento de ser amplificados, haciendo que su peso no coincida con el esperado al momento de utilizar ADNc.

El presente trabajo se basa en estudios preliminares con cepas seleccionadas de del género *Lactobacillus* (*L. acidophilus* y *L. casei*) donde se encontró que *L. acidophilus*, después de realizar infecciones experimentales con *Aeromonas hydrophila*, favorece la supervivencia. (Ospina, 2009). El eje central de este trabajo busca, entonces, elucidar cómo se da este incremento en la supervivencia. Vale en cuenta tener en cuenta que un incremento en la tasa de crecimiento y disminución de la mortalidad después de una infección está comúnmente asociado a la actividad de los probióticos en peces, donde se da una modulación de las respuestas a nivel humoral, facilitando así la exclusión de patógenos potenciales (Kim y Austin, 2006a; Gómez y Balcázar, 2008).

Los resultados del presente trabajo evidencian su efecto en la expresión constitutiva de los genes transferrina, TNF α e IL-1 β . Se encontró que los genes evaluados son constitutivos tanto en riñón, como en bazo en *O. niloticus*. La expresión constante de estos genes se puede deber al hecho que tanto el riñón como el bazo en los peces son considerados órganos hematopoyéticos, así como el incremento en su expresión después del uso de *L. acidophilus* se puede atribuir a que estos microorganismos poseen factores estimulantes del sistema inmune



asociados bien, a la pared celular o a productos extracelulares inherentes a este microorganismo.

La carencia de médula ósea y ganglios linfáticos en los peces teleósteos es una de las principales diferencias con los mamíferos, lo que hace que no se pueda diferenciar claramente entre órganos hematopoyéticos y órganos linfoides primarios y secundarios, razón por la cual se escogieron el bazo y el riñón como órganos de estudio para el presente trabajo. Por otro lado, se encuentran los mecanismos de defensa humorales, donde sobresale la función de las citoquinas, las cuales son producidas por células y posteriormente pasan a la hemolinfa. Entre las principales citoquinas en peces cabe mencionar IL-1 β , Interferón, TNF- α ; entre otras, las cuales regulan la inmunidad como tal en el organismo (Gómez y Balcázar, 2008).

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular secretadas por las células a la hemolinfa y que median y regulan la inmunidad, la inflamación y la hematopoyesis y que son producidas después de un estímulo. El factor de necrosis tumoral (TNF) es la citoquina encargada de mediar la respuesta inmune del hospedero ante infecciones y la interleuquina (IL) estimula los linfocitos y la producción de leucocitos en respuesta ante una infección. En forma general, las citoquinas actúan uniéndose a receptores específicos de membrana, los cuales envían señales a través de segundos mensajeros para alterar su comportamiento, es decir, la expresión de los genes. La respuesta a estas citoquinas incluyen un incremento o disminución de la expresión de las proteínas de membrana (incluyendo los receptores específicos para las citoquinas), proliferación y secreción de moléculas efectoras. Sin embargo, lo anterior aplica solo para IL-1 β y TNF α , ya que la transferrina no es una citoquina, por lo cual su mecanismo de acción es diferente.



La presencia de $TNF\alpha$ como gen constitutivo se ha evidenciado también en el riñón de *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus gorboscha*, *Oncorhynchus keta* y *Sparus aurata* (Fast *et al.*, 2007; Bridle *et al.*, 2006; Savan y Sakai, 2004; Gracia-Castillo *et al.*, 2002) Esta citoquina es altamente producida por las células mieloides en el riñón anterior, el cual es un órgano hematopoyético en peces (Ordás *et al.*, 2007; MacKenzie *et al.*, 2003). Praveen *et al.* (2006) encontraron también una expresión constitutiva de $TNF\alpha$ en la tilapia nilótica en las células citotóxicas no específicas (NCC) extraídas del riñón anterior y el bazo, además de ser también un gen constitutivo principalmente en riñón, hígado, corazón y branquias, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Panigrahi *et al.*, (2007), encuentran a $TNF\alpha$ como gen constitutivo en riñón y bazo de *Oncorhynchus mykiss*, lo cual hace evidente la importancia de estos órganos hematopoyéticos en diferentes especies. La expresión de $IL1\beta$ también fue constitutiva para *O. niloticus* el presente estudio, este gen también se encontró como constitutivo para *Scophthalmus maximus* en riñón, bazo y branquias por parte de Villamil y Novoa (2003).

Para $TNF\alpha$ se encontró un aumento significativo en riñón a las 24 horas y 15 días. Se piensa que los componentes de la pared celular como los péptidos presentes, así como la como la producción de bacteriocinas de estas bacterias Gram positivas poseen componentes que son capaces de producir una activación del sistema inmune, una modulación de la expresión de algunos de los genes de defensa que hace que los peces estén menos susceptibles a tener una infección bacteriana. Las bacteriocinas son péptido biológicamente activos que con propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo este concepto se ha modificado recientemente ya que también se han encontrado actividades bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora. *L. acidophilus* al ser una LAB debe ser



productora de algún tipo de bacteriocina, así como *Lactococcus lactis* es productor de la ya conocida nisina, y la cual es altamente conocida por sus efectos en diferentes huéspedes mamíferos (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2003). El efecto inmunomodulador de la nisina en peces fue demostrado en *Scophthalmus maximus* (Villamil *et al.*, 2002b).

Durante la autólisis que tiene lugar *in vivo* muchos microorganismos, éstos liberan moléculas de su citoplasma, con gran capacidad de activar el sistema inmune. La pared celular de las bacterias tiene una serie de moléculas capaces de estimular el sistema inmune como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos y macromoléculas como peptidoglucanos y lipoproteínas (y lipopolisacáridos en el caso de las bacterias Gram negativas). Los peptidoglucanos de la pared celular poseen su capacidad de activación del sistema inmune en un peptapéptido compuesto por ALA-GLI-LIS-ALA-ALA. Esta parte de la molécula esta presente en algunas especies de bacterias y la asociación de peptidoglucanos con polímeros o con ritol, glicerol y ácido teitoico constituye la base molecular para la especificidad de lactobacilos como activadores (Rojas, 2004).

Existen tres categorías funcionales dentro de las citoquinas: Reguladores de la respuesta inmune innata., reguladores de la respuesta inmune específica y estimulantes de la hematopoyesis (Gómez y Balcázar, 2008). Este último se centra principalmente en su función como reguladores de la respuesta inmune innata, los cuales son producidos principalmente por macrófagos, aunque también pueden ser producidos por linfocitos, NCC y otras células y este proceso se da en respuesta a antígenos microbianos o compuestos en células afectadas o dañadas. Entre los mediadores de la inflamación dados por los fagocitos activos están particularmente IL-1 β y TNF- α . Este último es uno de los principales mediadores de la inflamación en mamíferos y cuyas señales de activación regulan la activación celular y proliferación, citotoxicidad y apoptosis: cuando se induce una respuesta



inflamatoria la cascada de citoquinas inicia con TNF- α , la cual estimula a IL-1 β y ésta a su vez estimula a IL-6 desencadenando el reclutamiento y la migración de neutrófilos y macrófagos a la zona de infección (MacKenzie *et al.*, 2003; Ordas *et al.*, 2007; Panigrahi *et al.*, 2007; Gómez y Balcázar, 2008). Los componentes celulares comúnmente presentes en bacterias Gram positivas (peptidoglucanos de la pared celular) (o Gram negativas (usualmente la capa de lipopolisacáridos) inducen la síntesis de citoquinas (Panigrahi *et al.*, 2007 siendo el caso de *L. acidophilus*, que al ser una bacteria no perteneciente a la microbiota, activa la acción de las citoquinas de una forma benéfica al no ser una bacteria patógena, tal como ocurrió en este caso. Sin embargo, esto no es una regla general para todas las LAB exógenas que se puedan administrar a un individuo. Existen diferencias estructurales en la composición de las paredes celulares que hace que existan diferencias en la eficacia de las mismas (Villamil *et al.*, 2002a), razón por la cual hay que profundizar en estudios que nos ayuden a determinar que es lo que pasa exactamente durante el proceso de inmunomodulación y de qué forma lo hacen.

Dado este caso, una función adicional que se puede atribuir a *L. acidophilus* es el de acumular iones metálicos para una posterior inducción de diferentes funciones a nivel inmune. Organismos como los lactobacilos y las levaduras pueden acumular intracelularmente o acumular en su superficie iones metálicos y minerales presentes en el medio, como por ejemplo el selenio, el cual es concentrado por estas bacterias de manera inorgánica y producirlo de forma orgánica. El selenio como un elemento que actúa aumentando la función inmune así como inducción de la apoptosis dada por la liberación de selenio orgánico (Kelin, 2004; Sanz *et al.*, 2004).

Kim y Austin (2006), hicieron un estudio *in vitro* en el cual se demostró que al usar *Carnobacterium maltaromaticum* y *C. divergens* como probióticos en *Oncorhynchus mykiss* no hubo expresión de IL-1 β y TNF α en las células del tracto



digestivo pero si en las células del riñón anterior a las 6 y 12 horas, lo cual indica una inducción del efecto inflamatorio. En el mismo año (2006b) demostraron que existía un aumento de la actividad de las lisosimas (15 y 30 minutos *in vitro*) y los macrófagos (14 días después) al utilizar las mismas cepas pero esta vez también inyectando patógenos, donde se evidenció que solo el 20% de los peces murieron al ser inyectados con *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*.

Panigrahi *et al.* (2007) estudiaron la expresión en citoquinas en *Oncorhynchus mykiss* usando como probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* y *Bacillus subtilis*, encontrando un aumento de la transcripción de las citoquinas IL-1 β y TNF α . Los peces fueron alimentados durante dos semanas con los diferentes probióticos. Después del periodo de alimentación, hubo una mayor expresión de los genes de defensa de los que recibieron suplemento con respecto al control, siendo *Enterococcus faecium*, de las tres especies usadas, la que presentó mejores resultados (mayor expresión)

L. rhamnosus es otro probiótico que ha sido objeto de estudio como inmunomodulador y en la respuesta a la resistencia contra la furunculosis (Panigrahi *et al.*, 2004; Balcázar *et al.*, 2007) y ya se tenía claro que debido a que los linfocitos y los macrófagos tienen sitios de unión para el péptidoglucano de las paredes de las LAB. Pero no solo buenos resultados se obtuvieron con *L. rhamnosus*, sino que también se demostró que *L. acidophilus* induce a la producción de IL-1, IL-2 (facilita la proliferación de los linfocitos T activados), IL-5 (producción de eosinófilos), IL-6 (proteínas de fase aguda de inflamación, activadas por IL-1), TNF α e Interferón (Panigrahi *et al.*, 2007).

Todo lo discutido anteriormente se evidencia en el presente estudio, donde el incremento de la expresión de los genes de defensa indica un estímulo benéfico



del sistema inmune del hospedero, sugiriendo que *L. acidophilus* tiene un alto potencial como probiótico para el cultivo de tilapia nilótica. La membrana de las células en el hospedero posee receptores de citoquinas, los cuales se activan al entrar en contacto con los componentes de la pared de las bacterias probióticas. La unión de las células a determinadas moléculas inicia la transducción gracias a las cuales un mensaje captado en la membrana de una célula induce en ésta un cambio metabólico o la expresión a nivel del núcleo de determinados genes (Rojas, 2004).

Por otro lado, se encontró que la transferrina también es un gen constitutivo en el riñón y bazo de la tilapia nilótica. La transferrina ha sido identificada en un amplio rango de organismos (insectos, crustáceos, peces y mamíferos) y posee una alta homología a nivel estructural y la secuencia entre diferentes especies por lo cual se considera un gen altamente conservado evolutivamente. Para *O. niloticus* se encontró que el gen es constitutivo tanto en riñón como en bazo, mientras que en *Carassius auratus* es constitutiva en el hígado y no presentó ningún tipo de activación en los leucocitos del riñón (Stafford y Bolosevic, 2003). Villamil y Novoa (2003) también encontraron la expresión constitutiva *in Vitro de este gen* en los macrófagos de *Scophthalmus maximus*, así como también en los tejidos de riñón, bazo e hígado. La transferrina crea un ambiente bacteriostático, limitando la disponibilidad de hierro para las bacterias patógenas. En una fase aguda, estimula una respuesta inmune para retirar hierro de tejidos que estén afectados. En peces la transferrina actúa como activador de macrófagos (Gómez y Balcázar, 2008),

Después de la administración de *L. acidophilus*, se encontró un incremento significativo en el nivel de expresión de transferrina con respecto al grupo control en riñón a las 24 horas y en el bazo a los 15 días.



En los peces la transferrina ha sido identificada como una proteína en fase aguda, es decir que su concentración plasmática varía al menos un 25% durante los estados inflamatorios (Rojas, 2004), y se ha observado un incremento de su expresión al realizar infecciones bacterianas experimentales en *Oncorhynchus mykiss* (Stafford *et al.*, 2004). También se ha encontrado que es activadora primaria de la respuesta antibacterial en los macrófagos de *Carassius auratus*, induciendo la respuesta de óxido nítrico (NO).

El uso de Transferrina recombinante (procariota-eucariota) produce la respuesta de NO en peces y mamíferos, además de de mostrar una activación enzimática endógena: la activación de serina proteasas al parecer es uno de los pasos necesarios para la inducción de la respuesta inmune innata y posterior reconocimiento de los receptores TRL (Toll Like Receptor, los cuales son unas proteínas que se encargan del reconocimiento de varios patógenos expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos) donde se da la iniciación y la transducción de señales intracelulares que inducen los mecanismos inmunes innatos en macrófagos (Stafford *et al.*, 2004), donde se piensa que es el lugar donde el probiótico actúa para incrementar el nivel de expresión del gen. La transferrina está ampliamente distribuida, incluso, Wojtczak *et al.* (2005) demostraron que es la principal proteína en el plasma seminal de la carpa común, y que podría ser transportada de la sangre al semen o ser secretada por las Células de Sertoli donde su función sería la de transportar hierro a las células germinales presentes o como protección de los espermatozoos ante las bacterias.

Los microorganismos considerados como probióticos potenciales pueden usarse para incrementar la inmunidad y así mejorar la salud y la resistencia a enfermedades en *O. niloticus*. Aly *et al.* (2008a) demostraron que un mes era suficiente para mejorar el sistema inmune, sin embargo, en el presente estudio se encontró que 24 horas después de la administración del probiótico la maquinaria



empieza a activarse para modular la expresión de los genes de defensa en la tilapia nilótica, notándose un incremento significativo de la expresión con tan solo dos semanas alimentación. Estos resultados son buenos si se tiene en cuenta que Aly *et al.* (2008a) en el mismo documento aconsejan realizar más pruebas a nivel comercial, enfocados en el área de costo-beneficio para poder recomendar su amplio uso en acuicultura. Una reducción en el tiempo de administración equivale a una menor inversión económica por parte de los productores, generando mayor protección y resitencia a infecciones bacterianas en los cultivos y lo cual se reflejará en una mejor calidad en los cultivos, y a su vez, en mejores ganancias.

L. acidophilus puede ser considerado como un probiótico con un gran efecto inmunomodulador en los cultivos de *O. niloticus* debido al incremento significativo de la expresión de los genes transferrina, TNF α e IL-1 β , los cuales son fundamentales en la primera línea de defensa del pez ante un agente bacteriano patógeno.



10. CONCLUSIONES

- Los genes de defensa transferrina, $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ son genes que muestran una expresión constitutiva en los órganos riñón y bazo en la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).
- Las bacterias probióticas de la especie *Lactobacillus acidophilus* ejercen un efecto inmunomodulador en la tilapia nilótica al incrementar la expresión de los genes de defensa transferrina, $IL-1\beta$ y $TNF-\alpha$, los cuales son clave en la defensa innata de los peces al ser la primera línea de defensa ante las infecciones microbianas.



11. RECOMENDACIONES

A pesar de los buenos resultados obtenidos, se recomienda realizar el mismo estudio utilizando otros candidatos a probióticos para poder ampliar la información respecto a la función inmunomoduladora de éstos, así como también otros peces de interés comercial. Por otro lado, sería importante realizar la medición del nivel de expresión de los genes por medio de un método totalmente cuantitativo como la qPCR (PCR en tiempo real).

También se recomienda llevar a cabo estudios enfocados en la obtención de bacterias nativas típicas de la microbiota intestinal de los peces y su potencial uso como probióticos ya que la patogénesis de las bacterias tiene una mayor prevalencia en los episodios de mortalidad de los cultivos en Colombia.



BIBLIOGRAFÍA

ALY, S.; AHMED, Y.; GHAREEB, A. y MOHAMED, M. 2008a. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish & Shellfish Immunology. Vol 25: 128-136.

ALY, S.; MOHAMED, M. y JOHN, G. 2008b. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research. Vol 39: 647-656.

APPLIED BIOSYSTEMS. 2007. Molecular and cell biology catalog. USA. 448 p.

BALCÁZAR, J.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D. y MUZQUIS, J. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology. Vol 114: 173-186.

BALCÁZAR, J.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; GIRONES, O. y MUZQUIZ, J. 2007a. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunol Med Microbiol. Vol 51: 185-193.

BALCÁZAR, J.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; CALVO, A.; MARQUEZ, I.; GIRONES, O. y MUZQUIZ, J. 2007b. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). British Journal of Nutrition. Vol 97: 522-527.



BAXEVANIS, A. y OUELLETTE, F. 2001. Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins. Second edition. John Wiley & Sons. New York. 477 p.

BERNSTEIN, R.; SCHLUTER, S. y MARCHALONIS, J. 1998. Immunity: 215-242. En: IWAMA, G y TERUYUHI, N (Ed.) The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. Academic Press.

BURGUESS, P.; BAILEY, M. y EXELL, A. 1998. A-Z tropical fish diseases & health problems. Howell Book House. New York. 392 p.

CASTILLO, L. 2002. La importancia de la tilapia roja en el desarrollo de la piscicultura en Colombia. Asociación Red Cauca, Alevinos del Valle. [En Línea]. Fecha de consulta: 23-01-08. Disponible en Internet en: <http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/new/TilapiaColombia.pdf>

CHIU, CH., GUU, Y.K., LIU, C.H., PAN, T.M. y CHENG, W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish. Shellfish. Immunol. Vol 23(2): 364-377.

CONROY, G. 2004. Importantes enfermedades detectadas en tilapias cultivadas en América Central y del Sur. 7 p. [En Línea]. Fecha de consulta: 25-01-08. Disponible en Internet en: http://www.panoramaacuicola.com/ediciones/pam-9-6/pam-9-6_20-25.pdf

CURTIS, H. y BARNES, N. 2001. Biología. Sexta Edición en Español Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1496 p.



DE MAN, JC.; ROGOSA, M. y SHARPE, ME. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol. Vol 23: 130–135.

ELLIS, AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev Comp Immunol. Vol 25: 827-839.

ESCOBAR-BRIONES, L.; OLVERA-NOVOA, M. y PUERTO-CASTILLOS, C. 2006. Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales Implicaciones. En: Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium InteARNcional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 107-127.

ESPEJO, C. y TORRES, E. 2001. Cultivo de las tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y plateada (*Oreochromis niloticus*). En: Fundamentos en acuicultura continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 283-299.

FAO. 2006. State of world aquaculture. Inland Water Resources and Aquaculture Service, Fishery Resources Division. Roma. 132 p.

FAST, M.D., JOHNSON, S.C. y JONES, S.R.M. 2007. Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β -1, TNF α -1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. Fish & Shellfish Immunology. Vol 22: 403-407.

FERNÁNDEZ, A.; DE BLAS, I y RUIZ, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. Revista AquaTIC (16). [En Línea]. Fecha de consulta: 11-



06-08. Disponible en Internet en:
<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=146>

FOOKS, L y GIBSON, R. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. Br J Nutr. Vol 88: S39-S49.

GARCÍA-CASTILLO, J., PELEGRÍN, P., MULERO, V y MESEGUER, J. 2002. Molecular cloning and expression análisis of tumor necrosis factor α from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. Immunogenetics. Vol 24: 200-207.

GATESOUBE, FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. Vol 180: 147-165.

GATESOUBE, FJ. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. Vol 14: (1-3): 107–114.

GERARD, G.; FOX, D.; NATHAN, M. y D'ALESSO J. 1997. Reverse transcriptase: The use of cloned moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize ADN from ARN. Molecular Biotechnology. Vol 8 (1): 61-77.

GÓMEZ, G. y BALCÁZAR, J. 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunol Med Microbiol. Vol 52: 145–154.



GONZALEZ-MARTINEZ, B., GÓMEZ-TREVIÑO, M y JIMÉNEZ-SALAS, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. Revista Salud Pública y Nutrición. Vol 4 (2). [En Línea]. Fecha de consulta: 16-05-09. Disponible en Internet en: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>

GÜNTHER, J. y JIMENEZ-MONTEALEGRE, 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. Vol 52 (4): 937-943.

GRIFFITHS, A.; MILLER, J.; SUZUKI, D.; LEWONTIN, R. y GELBART, W. 2002. An introduction to genetic analysis. Seventh edition. W.H Freeman and Company. New York. 860 p.

IAÑEZ, E. 1999. Curso de inmunología general: citoquinas. [En Línea]. Fecha de consulta: 10-06-08. Disponible en Internet en: http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_14.htm#_Toc443216944

KIM, D. y AUSTIN, B. 2006a. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish & Shellfish Immunology Vol (21): 513-524.

KIM, D. y AUSTIN, B. 2006b. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol (114): 297–304

KLEIN, E. 2004. Glickman Urologic Clinical Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio. J of Urology. Vol (171): S50-S53.



KLUG, W. y CUMMINGS, M. 1999. Conceptos de genética. Quinta edición. Prentice Hall. España. 814 p.

LEE, D.; HONG, S.; LEE, H.; JUN, L.; CHUNG, J.; KIM, K. y JEONG, H. 2006. Molecular cADN cloning and analysis of the organization and expression of the IL-1 β gene in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*: 307-314.

LI K.; ZHENG T.; TIAN Y.; XI F.; YUAN J.; ZHANG G y HONG H. 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal micromicrobiota and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol Lett.* Vol (4):525-30.

LUQUE J. y HERRÁEZ, A. 2001. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ediciones Harcourt. Madrid.

MA, C.; CHON, Y y OH, K. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture.* Vol 287: 266-270.

MACKENZIE, S.; PLANAS, J. y GOETZ, F. 2003. LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Developmental and Comparative Immunology.* Vol (27): 393–400.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. y PARKER, J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Prentice Hall. Madrid. 1011 p.



OLAFSEN, J.A. 1998. Interaction between host and bacteria in aquaculture. In: Proceeding from the US-EC Workshop on Marine Microorganism: Research Issues for Biotechnology. European Commision Brusels. Belgium.

ORDÁS, M.; COSTA, M.; ROCA, F.; LÓPEZ-CASTEJÓN, G.; MULERO, V.; MESEGUER, J.; FIGUERAS, A. y NOVOA, B. 2007. Turbot TNF α gene: Molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. *Molecular Immunology*. Vol (44): 389–400.

OSPINA, A. 2009. Evaluación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* como agentes probióticos sobre la resistencia a infecciones e incremento en peso de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* Tesis en preparación

OSPINA, G. y RIOS, M. 1997. Determinación de los requerimientos de proteína en crías de tilapia roja (*Oreochromis* sp., variedad Santafe de Antioquia) y tilapia nilótico (*Oreochromis niloticus*) a partir de su primera alimentación exogena durante la fase de larvicultura. 64 p. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina.

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; KOBAYASHI, T.; PUANGKAEW, J.; SATOH, S. y SUGITA, H. 2004. Inmune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol 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*. Vol 31: 372-382.

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*). *Vet Immunol Immunopathol* 113(3-4):339-47 pp.

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*. Vol 43: 279-291

RAFIQ, M.; THOMPSON, K.; PENMAN, D. y McANDREW, B. 2001. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol 25: 37-46.

RONDON, I. 2004. Inmunoestimulantes en medicina veterinaria. *Orinoquía*. Vol 8: 56-75.

RINGO, E. y GATESOUBE, FJ. 1997. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. Vol 160: 177-203.

ROBAYO LOPEZ, C. 2005. Aplicación del probiótico *Roseobacter* 27-4 a la mejora del cultivo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) bajo la presencia del patógeno *Vibrio anguillarum*. 125 p. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina.

RODRIGUEZ, M.; BOTERO, E.; IREGUI, C. y FIGUEROA, J. 2005. Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophyla* y sus efectos en tilapia roja



(*Oreochromis* spp.) y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Acta Biológica Colombiana. Vol 10 (2): 76-93.

ROJAS, W. 2004. Inmunología. Corporación para Investigaciones Biológicas. 13 edición. Medellín.

SALAZAR, G. 2001. Consideraciones generales sobre la acuicultura. En: Fundamentos en acuicultura continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 1-18.

SALAZAR, G. 2002. El cultivo de organismos acuáticos a pequeña escala en Colombia. República de Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. INPA.

SAMBROOK, J y RUSSELL, D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Vol 1. Third edition. CSHL Press. New York.

SANZ, Y.; COLLADO, M. y DALMAU, H. 2004. Funciones metabólicas y nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. Acta Pediátrica Española. Vol 62 (11): 520-526.

SECOMBES, CJ. 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses: 63-103. En: IWAMA, G y TERUYUHI, N (Ed.) The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. Academic Press.

SECOMBES, CJ.; ZOU, J.; LAING, K.; DANIELS, GD y CUNNINGHAM, C. 1999. Cytokine genes in fish. Aquaculture. Vol 172: 93-102



SECRETARIA DE PESCA. 1994. Cultivo de tilapia. Colección Nacional de Manuales de Capacitación: Dirección General de Organización y Capacitación Pesquera. México. 46 p.

SHU Q. y GILL, H. 2002. Immune protection mediated by the probiotics *Lactobacillus rhamnosis* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection en mice. FEMS Immunol Med Microbiol. Vol 34: 59-64.

STAFFORD, J. y BELOSEVIC, M. 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. Developmental and Comparative Immunology. Vol 27: 539-554.

STAFFORD, J.; WILSON, E. y BELOSEVIC, M. 2004. Recombinant transferrin induces nitric oxide response in goldfish and murine macrophages. Fish. Shellfish. Immunol. Vol 17: 171-185.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J.; KIM, S.; PARK, S.; YOSHIKAWA, T. y SAKATA, T. 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. Fisheries Science. Vol 72: 755-766.

TOVAR-RAMÍREZ, D.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; CAHU, C.; GATESOUBE, F.J.; Y VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. 2000, Avances en Nutrición Acuícola. En: L.E. CRUZ -SUÁREZ, D. RICQUE-MARIE, M. TAPIA-SALAZAR, M.A OLVERA-NOVOA,. Y CIVERA-CERECEDO, R., (Ed.), Memorias del V Simposium InteARNcional de Nutrición Acuícola, Mérida, 19.

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. 2007. Glosario de genética. Departamento de Genética de la Universidad de Navarra. [En Línea]. Fecha de consulta: 13-05-08. Disponible en Internet en: <http://www.unav.es/genetica/glosario/glosarioGH.html>



VASEEHARAN, B. Y RAMASAMY, P. 2003 Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol. Vol 36: 83–87.

VASQUEZ, C.; VILLANUEVA, M. y RODRIGUEZ, H. 2001. Principales enfermedades de los peces en cultivo. En: Fundamentos en acuicultura continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 147-188.

VAZQUEZ, J.A.; GONZALEZ, M.P. y MURADO, M.A. 2005. Effects of lactic bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish, Aquaculture. Vol 245: 149-161.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; PATRICK, Z. y VERSTRAETE, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents en aquaculture. American Society for Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol 64 (4): 655-671.

VILLAMIL, L.; TAFALLA, A.; FIGUERAS, A y NOVOA, B. 2002a. Evaluation of Immunomodulatory Effects of Lactic Acid Bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*). Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol 9 (6): 1318-1323

VILLAMIL, L.; FIGUERAS, A y NOVOA, B. 2002b. Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish & Shellfish Immunology. Vol 14: 157-169.



VILLAMIL, L.; FIGUERAS, A. y NOVOA, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*. Vol 219: 43-56.

VILLAMIL L. y NOVOA, B. En Prensa. Probiotics in aquaculture. En: PEREZ, N (Ed). *Biotechnology & applied biochemistry-review book* . Transworld Research Network

VILLAROEL, M.; TUPAC-YUPANQUI, I.; NICODEMUS, N.; RICO, M y CAÑÓN, J. 2005. expresión diferencial de genes en tilapia *Oreochromis niloticus* (L., 1758) bajo estrés alimentario. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr*. Vol 21 (1-4): 261-270.

WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G. y CIERESZKO, A. 2005. Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma. *Fish & Shellfish Immunology*. Vol 19: 387-391.

YANO, T. 1996. The nonspecific immune system: humoral defense: 106-140 En: IWAMA, G y TERUYUHI, N (Ed.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press.

ZAMUDIO, T. 2005. La transcripción y la traducción. Regulación Jurídica de las Biotecnologías. [En Línea]. Fecha de consulta: 11-06-08. Disponible en Internet en: http://www.biotech.bioetica.org/clase1-14.htm#_Toc95371667

ZHOU, X.; PAN, Y.; WANG, Y. Y LI, W. 2007. *In vitro* assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. Vol 8(9): 677-683.



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

ANEXOS



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

**ANEXO A.
CALCULOS DE CUANTIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE ARN**

De 1 a 5 (Riñón-control 24h), 6 a 10 (Riñón-*L. acidophilus* 24 h), 11 a 15 (Riñón-control 15d), 16 a 20 (Riñón-*L. acidophilus* 15 d). De 21 a 25 (Bazo-control 24h), 26 a 30 (Bazo-*L. acidophilus* 24 h), 31 a 35 (Bazo-control 15d), 36 a 40 (Bazo-*L. acidophilus* 15 d).

MUESTRA	A280	A260	RATIO (A260:A280)	CONCENTRACIÓN CALCULADA µg ARN / mL	µL ARN
1	0.029	0.041	1.41	164	3.05
2	0.013	0.021	1.62	84	5.95
3	0.014	0.021	1.50	84	5.95
4	0.032	0.054	1.69	216	2.31
5	0.037	0.070	1.89	280	1.79
6	0.014	0.016	1.14	64	7.81
7	0.017	0.021	1.24	84	5.95
8	0.021	0.023	1.10	92	5.43
9	0.030	0.045	1.50	180	2.78
10	0.046	0.084	1.83	336	1.49
11	0.027	0.038	1.41	152	3.29
12	0.018	0.027	1.50	108	4.63
13	0.011	0.029	2.64	116	4.31
14	0.024	0.031	1.29	124	4.03
15	1.602	2.652	1.66	10608	0.05
16	0.043	0.078	1.81	312	1.60
17	0.021	0.025	1.19	100	5.00
18	0.024	0.037	1.54	148	3.38
19	0.111	0.158	1.42	632	0.79
20	0.013	0.021	1.62	84	5.95
21	0.042	0.040	0.95	160	3.13
22	0.063	0.059	0.94	236	2.12
23	0.037	0.056	1.51	224	2.23
24	0.026	0.027	1.04	108	4.63
25	0.158	0.155	0.98	620	0.81
26	0.047	0.052	1.11	208	2.40
27	0.023	0.025	1.09	100	5.00
28	0.036	0.047	1.31	188	2.66
29	0.037	0.025	0.68	100	5.00
30	0.035	0.040	1.14	160	3.13
31	0.048	0.075	1.56	300	1.67
32	0.018	0.036	2.00	144	3.47
33	0.023	0.040	1.74	160	3.13
34	0.023	0.037	1.61	148	3.38
35	0.046	0.077	1.67	308	1.62



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

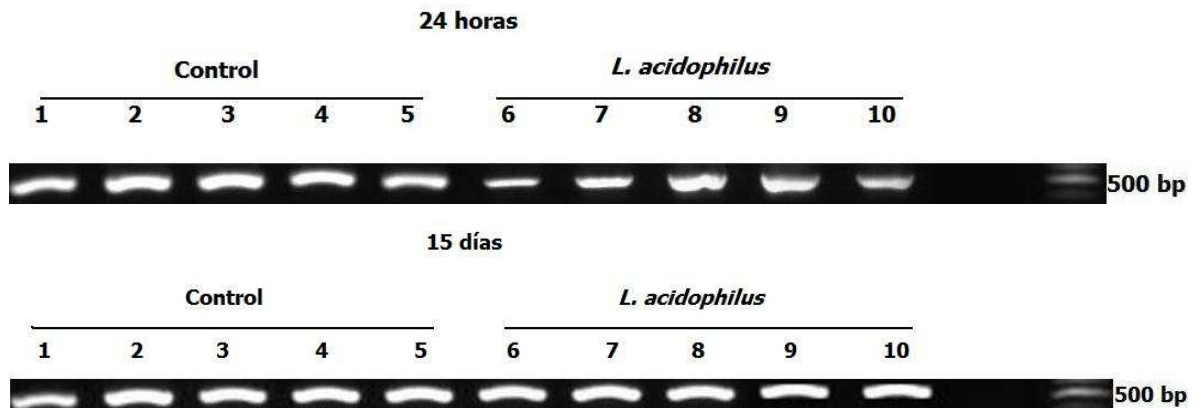
36	0.029	0.049	1.69	196	2.55
37	0.035	0.046	1.31	184	2.72
38	0.131	0.162	1.24	648	0.77
39	0.181	0.193	1.07	772	0.65
40	0.102	0.130	1.27	520	0.96



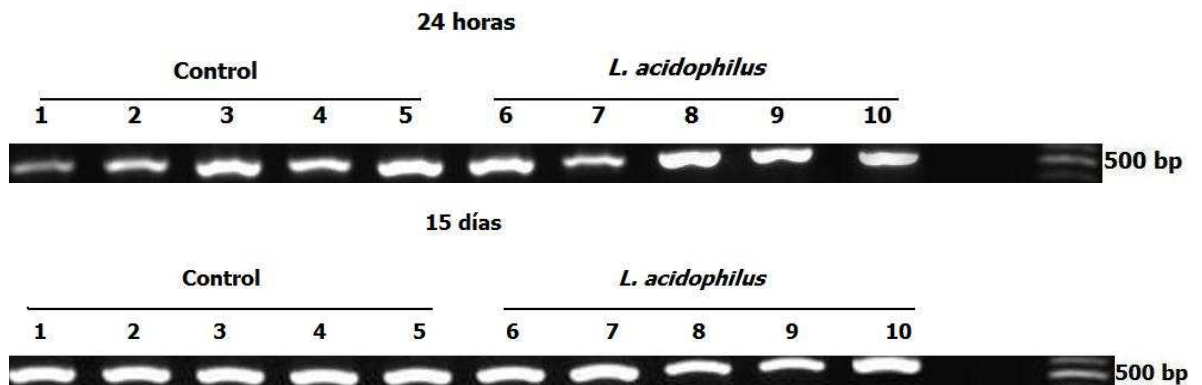
ANEXO B.

EXPRESION DEL GEN ACTINA EN RIÑÓN (a) y BAZO (b) EN GRUPO CONTROL Y EN GRUPO CON SUPLEMENTO (*L. acidophilus*) 24 HORAS Y QUINCE DIAS DESPUÉS DE INICIADO EL TRATAMIENTO.

a.



b.





ANEXO C.
INTENSIDADES DE BANDA

a. Transferrina riñón

	BANDA	INTENSIDAD ACTINA	INTENSIDAD TRANS.	INTENSIDAD NETA TRANS.	PROMEDIO	DESVIACIÓN
Control 24h	1	188	69	0.37	0.57	0.174267609
	2	245	136	0.56		
	3	255	127	0.50		
	4	237	139	0.59		
	5	255	215	0.84		
L. acidophilus 24h	6	252	250	0.99	0.95	0.031828883
	7	253	232	0.92		
	8	253	243	0.96		
	9	254	243	0.96		
	10	255	234	0.92		
Control 15d	11	252	51	0.20	0.34	0.143878714
	12	255	113	0.44		
	13	255	130	0.51		
	14	255	90	0.35		
	15	255	47	0.18		
L. acidophilus 15d	16	254	126	0.50	0.60	0.268873577
	17	255	234	0.92		
	18	255	117	0.46		
	19	255	215	0.84		
	20	255	73	0.29		



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

b. Transferrina bazo

	BANDA	INTENSIDAD ACTINA	INTENSIDAD TRANS.	INTENSIDAD NETA TRANS.	PROMEDIO	DESVIACIÓN
Control 24h	21	135	62	0.46	0.55	0.261965729
	22	211	67	0.32		
	23	255	234	0.92		
	24	249	85	0.34		
	25	255	187	0.73		
<i>L. acidophilus</i> 24h	26	255	210	0.82	0.80	0.114593419
	27	233	212	0.91		
	28	255	214	0.84		
	29	253	203	0.80		
	30	255	154	0.60		
Control 15d	31	255	66	0.26	0.29	0.069828275
	32	255	102	0.40		
	33	254	83	0.33		
	34	255	58	0.23		
	35	255	65	0.25		
<i>L. acidophilus</i> 15d	36	253	205	0.81	0.91	0.104097621
	37	255	252	0.99		
	38	254	253	1.00		
	39	248	193	0.78		
	40	254	244	0.96		



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

c. TNF α riñón

	BANDA	INTENSIDAD ACTINA	INTENSIDAD TNF- α	INTENSIDAD NETA TNF- α	PROMEDIO	DESVIACIÓN
Control 24h	1	188	15	0.08	0.25	0.135046833
	2	245	62	0.25		
	3	255	82	0.32		
	4	237	103	0.43		
	5	255	46	0.18		
<i>L. acidophilus</i> 24h	6	252	109	0.43	0.53	0.128204724
	7	253	179	0.71		
	8	253	135	0.53		
	9	254	154	0.61		
	10	255	100	0.39		
Control 15d	11	252	46	0.18	0.14	0.058097666
	12	255	17	0.07		
	13	255	26	0.10		
	14	255	31	0.12		
	15	255	53	0.21		
<i>L. acidophilus</i> 15d	16	254	80	0.31	0.36	0.102139141
	17	255	116	0.45		
	18	255	112	0.44		
	19	255	53	0.21		
	20	255	101	0.40		



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

d. TNF α bazo

	BANDA	INTENSIDAD ACTINA	INTENSIDAD TNF- α	INTENSIDAD NETA TNF- α	PROMEDIO	DESVIACIÓN
Control 24h	1	188	18	0.10	0.09	0.020034762
	2	245	15	0.06		
	3	255	17	0.07		
	4	237	25	0.11		
	5	255	25	0.10		
<i>L. acidophilus</i> 24h	6	252	20	0.08	0.09	0.009060284
	7	253	25	0.10		
	8	253	26	0.10		
	9	254	24	0.09		
	10	255	25	0.10		
Control 15d	11	252	35	0.14	0.12	0.072895452
	12	255	50	0.20		
	13	255	35	0.14		
	14	255	36	0.14		
	15	255	0	0.00		
<i>L. acidophilus</i> 15d	16	254	42	0.17	0.40	0.242896606
	17	255	31	0.12		
	18	255	163	0.64		
	19	255	116	0.45		
	20	255	155	0.61		



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

e. IL-1 β riñón

	BANDA	INTENSIDAD ACTINA	INTENSIDAD IL-1 β	INTENSIDAD NETA IL-1 β	PROMEDIO	DESVIACIÓN
Control 24h	1	188	50	0.27	0.38	0.120978433
	2	245	70	0.29		
	3	255	84	0.33		
	4	237	117	0.49		
	5	255	134	0.53		
<i>L. acidophilus</i> 24h	6	252	203	0.81	0.64	0.189863417
	7	253	114	0.45		
	8	253	175	0.69		
	9	254	211	0.83		
	10	255	111	0.44		
Control 15d	11	252	20	0.08	0.13	0.043281637
	12	255	50	0.20		
	13	255	35	0.14		
	14	255	29	0.11		
	15	255	29	0.11		
<i>L. acidophilus</i> 15d	16	254	37	0.15	0.26	0.14183039
	17	255	129	0.51		
	18	255	47	0.18		
	19	255	63	0.25		
	20	255	58	0.23		



**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA DE LA TILAPIA NILOTICA *Oreochromis niloticus*
ALIMENTADA CON SUPLEMENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (Reyes-Perdomo, 2009).**

f. IL-1 β bazo

	BANDA	INTENSIDAD ACTINA	INTENSIDAD IL-1 β	INTENSIDAD NETA IL-1 β	PROMEDIO	DESVIACIÓN
Control 24h	1	188	21	0.11	0.13	0.056460811
	2	245	36	0.15		
	3	255	31	0.12		
	4	237	48	0.20		
	5	255	12	0.05		
<i>L. acidophilus</i> 24h	6	252	67	0.27	0.45	0.185681938
	7	253	103	0.41		
	8	253	72	0.28		
	9	254	154	0.61		
	10	255	172	0.67		
Control 15d	11	252	26	0.10	0.06	0.050818549
	12	255	14	0.05		
	13	255	7	0.03		
	14	255	31	0.12		
	15	255	0	0.00		
<i>L. acidophilus</i> 15d	16	254	74	0.29	0.38	0.12500236
	17	255	135	0.53		
	18	255	121	0.47		
	19	255	94	0.37		
	20	255	58	0.23		