



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**“EXPRESIÓN DE GENES DE LA
RESPUESTA INMUNE LOCAL Y
SISTÉMICA FRENTE A LA INFECCIÓN
POR *Flavobacterium psychrophilum* EN
TRUCHA ARCOÍRIS *Oncorhynchus mykiss*
EN LA PROVINCIA DE PUNO- PERÚ”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA**

CARLOS EDUARDO TÁVARA PALACIOS

Lima- Perú

2019

ASESOR DE TESIS:

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

CO-ASESOR DE TESIS:

Dr. MV. Luis Antonio Llanco Albornoz

DEDICATORIA

A mi hermosa familia, conformada por mi esposa Diana y mi pequeña Rafaela, son los regalos que Dios me dio y la fuerza en mi vida.

A mis padres Neptali y Gladys, ellos siempre velaron por mi educación y están presentes en cada paso importante de mi vida. Mi agradecimiento eterno con ellos.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por todo lo que me rodea en la vida, su bendición es una gran muestra de amor por mí.

A la Dra. Carolina Tafalla y Dra. Estefanía Muñoz, quienes me apoyaron en el desarrollo de la tesis durante mi estadía en el Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA, Madrid). Son un excelente equipo.

Al equipo de Vitapro S.A por haber apostado por la investigación y participar en la realización del presente trabajo.

A todos los amigos de mi promoción de la maestría, me brindaron su amistad incondicional en estos dos años de estudios, aprendiendo mucho de ellos.

A mis profesores por compartir sus conocimientos con nosotros y al personal administrativo por brindarnos las facilidades del caso.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por Cienciaactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N°230-2015-

FONDECYT-DE-PROMOCION 2)

INDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	01
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	02
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	03
3.1. Truchicultura en el Perú.....	03
3.2. Enfermedades infecciosas en sistemas acuícolas	03
3.3. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	04
3.4. Inmunidad en peces teleósteos	08
3.5. Respuesta inmune humoral y celular.....	10
IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	13
V. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	14
5.1. Objetivo general	14
5.2. Objetivo específico	14
VI. METODOLOGÍA	15
6.1. Diseño del estudio	15
6.2. Población y muestra.....	15
6.3. Procedimientos y técnicas.....	15
6.3.1. Colección de tejidos	16
6.3.2. Extracción de ARN y preparación de ADNc.....	16

6.3.3.	Identificación de <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	17
6.3.4.	Evaluación de la expresión del gen inmune por PCR en tiempo real.....	18
6.3.5.	Inmunohistoquímica.....	19
6.3.6.	Plan de análisis.....	21
6.3.7.	Consideraciones éticas... ..	21
VII.	RESULTADOS	22
71.	Detección de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> por PCR convencional	22
72.	Transcripción de genes en la piel y bazo de la trucha arcoíris.....	24
73.	Efecto de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> en la transcripción de genes relacionados con células T en la piel	25
74.	Efecto de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> en la transcripción de genes relacionados con células T en el bazo.....	27
75.	Prueba de Inmunohistoquímica	28
VIII.	DISCUSIÓN.....	32
IX.	CONCLUSIONES	39
X.	RECOMENDACIONES	39
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	40

RESUMEN

Flavobacterium psychrophilum es el agente etiológico de la enfermedad bacteriana del agua fría (BCWD), una enfermedad que a nivel mundial ha causado grandes impactos económicos en la acuicultura de salmónidos. Sin embargo, es importante estudiar un poco más fondo cómo se regula el sistema inmunológico durante un proceso de flavobacteriosis. En el presente estudio, hemos analizado la transcripción de algunos genes inmunes relacionados con la actividad de las células T y B en la piel de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada naturalmente con *F. psychrophilum* en una jaula flotante ubicada en el Puno (Perú). La comparación de los niveles de expresión de estos genes fueron entre truchas arcoíris infectadas o sintomáticas y truchas asintomáticas. Para el caso de peces sintomáticos, se tomaron dos muestras de piel, una muestra cercana a las lesiones ulcerativas, así como una muestra de piel distante de la úlcera, una región sin lesión. Nuestros resultados apuntan a una importante regulación local de IgD, CD4, CD8, perforina e IFN γ dentro de las lesiones ulcerativas. Por otro lado, en el bazo, no se observó diferencias significativas entre los niveles de expresión de estos genes. Para confirmar estos resultados de transcripción, se estudió la distribución de las moléculas IgD y CD3 presentes en las células con técnicas inmunohistoquímicas en las regiones de piel muy cercanas a las úlceras. Nuestros resultados demuestran un rol importante de las células T e IgD en piel frente a *F. psychrophilum* en la trucha arcoíris.

Palabras clave: *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*, expresión de genes, Inmunoglobulina D.

ABSTRACT

Flavobacterium psychrophilum is the etiological agent of the cold water bacterial disease (BCWD), a disease that worldwide has caused major economic impacts in salmonid aquaculture. However, it is important to study a little more thoroughly how the immune system is regulated during a flavobacteriosis process. In the present study, we have analyzed the transcription of some immune genes related to the activity of T and B cells in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with *F. psychrophilum* in a floating cage located in Puno (Peru).). The comparison of the expression levels of these genes was between infected or symptomatic rainbow trout and asymptomatic trout. In the case of symptomatic fish, two samples of skin were taken, a sample close to the ulcerative lesions, as well as a sample of skin distant from the ulcer, a region without injury. Our results point to an important local regulation of IgD, CD4, CD8, perforin and IFN γ within ulcerative lesions. On the other hand, in the spleen, no significant differences were observed between the expression levels of these genes. To confirm these transcription results, the distribution of the IgD and CD3 molecules present in the cells was studied with immunohistochemical techniques in the skin regions very close to the ulcers. Our results demonstrate an important role of T cells and IgD in skin against *F. psychrophilum* in rainbow trout.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*, gene expression, Immunoglobulin D.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de tejidos colectados de piel y bazo para extracción de ARN y posterior conversión a ADNc

Tabla 2. Primers específicos empleados en el PCR convencional

Tabla 3. Primers específicos empleados en el PCR de tiempo real

Tabla 4. Niveles de expresión en piel y bazo de peces asintomáticos

Tabla 5. Comparación de los niveles de expresión de genes inmune en la piel de truchas sintomáticas (S y SU), y Asintomáticas.

Tabla 6. Comparación de los niveles de expresión de genes inmunes en bazo de truchas sintomáticas (S), y asintomáticas (A).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detección de *Flavobacterium psychrophilum* por PCR convencional

Figura 2A. Cromatograma del producto de PCR para identificar *F. psychrophilum* en muestras de piel de peces.

Figura 2B. Confirmación de la identidad de *F. psychrophilum* con el programa Blastn.

Figura 3. Detección inmunohistoquímica de IgD en la zona ulcerativa de la piel de trucha arcoíris infectada naturalmente con *F. psychrophilum*

Figura 4. Detección inmunohistoquímica de CD3 en la zona ulcerativa de la piel de trucha arcoíris infectada naturalmente con *F. psychrophilum*.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas que enfrentan las piscigranjas es la aparición de enfermedades, ya que estas retardan el crecimiento de la población cultivada, causan mortalidad y si no se tratan a tiempo, pueden generar pérdidas económicas muy importantes al piscicultor. Las altas densidades de cultivo, el estrés y pobres condiciones ambientales favorecen el surgimiento y la diseminación de las enfermedades (VETINST, 2018).

Para optimizar una estrategia de control eficiente, es clave tener una comprensión profunda de la respuesta inmune provocada por el patógeno en la especie afectada, de manera particular en las superficies mucosas como la piel, uno de los tejidos preferentemente dañado por *F. psychrophilum*. Así, en un reciente estudio, se detectó el incremento de los niveles de transcripción de genes de IgD e IgT secretado a nivel de branquias en truchas vacunadas por inmersión con una cepa atenuada de *Flavobacterium psychrophilum*, lo mismo ocurre en el caso del intestino (Makesh *et al.*, 2015). Así mismo, Chetri *et al.* (2014) evaluaron los niveles de transcripción de genes de truchas arcoíris infectadas con el parásito *Ichthyobodo necator*, concluyendo que los niveles de IgM, IFN γ y CD4 incrementan significativamente mientras los niveles de CD8 disminuyen de manera significativa.

En el presente estudio se caracterizó la modulación de la respuesta inmune local y sistémica frente a la infección por *Flavobacterium psychrophilum* en la trucha arcoíris en la provincia de Puno- Perú.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el sur del Perú existen reportes de flavobacteriosis, siendo más prevalentes en invierno y primavera, cuando los alevines son sembrados con tamaño y peso mínimo, debido a que su sistema inmune no se ha desarrollado por completo, favoreciendo la aparición de ésta, sin embargo, esta enfermedad también aparece en juveniles y adultos, llegando a alcanzar mortalidades del 90% (Nilsen *et al.*, 2011). Esta enfermedad podría controlarse con un mejor manejo del cultivo y medidas sanitarias más adecuadas que vayan acorde con el sistema de cultivo, en su mayoría intensivos, donde los requerimientos y exigencias para la crianza son mayores para garantizar la calidad del producto.

Como el manejo, muchas veces deficiente, es una parte del problema, también es importante comprender cómo responde el sistema inmune del pez durante la infección por esta bacteria bajo las condiciones de campo en el sur de nuestro país.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Truchicultura en el Perú

En la última década en nuestro país, según la Oficina de Estudios Económicos del Ministerio de la Producción, la producción nacional de trucha creció en 800 %, pasando de 5.794 toneladas en el 2006 a 52.217 toneladas en el 2016. Durante este período, Puno, el mayor productor del Perú, pasó de producir 2.982 a 43.290 toneladas (Ministerio de la Producción) (PRODUCE, 2017). Sin embargo, debido a un inadecuado manejo, los productores tienen que luchar a diario para evitar la proliferación de patógenos que puedan ocasionar enfermedad en sus cultivos.

Enfermedades infecciosas en sistemas acuícolas

Productivamente, las enfermedades se traducen en pérdidas económicas importantes por mortalidad, disminución de calidad del producto final, mayor tiempo de cultivo en las masas de agua y los costos adicionales del tratamiento (Antaya, 2008). Las enfermedades infecciosas que afectan a truchas en cultivo pueden ser originadas por bacterias, virus, parásitos y hongos. Según Mateo *et al.* (2016), para el caso de Perú, se observó que en las truchas analizadas se detectó *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* y *Flavobacterium psychrophilum*, como los principales agentes infecciosos que amenazan la acuicultura del país.

Flavobacterium psychrophilum

Como sabemos, las enfermedades infecciosas que enfrenta el cultivo de truchas son varias, entre las más importantes se destacan las producidas por bacterias Gram negativas. El agente causal la Enfermedad Bacteriana del Agua Fría (BCDW) es *Flavobacterium psychrophilum*. Esta enfermedad afecta al cultivo de truchas (*Oncorhynchus mykiss*) a nivel mundial y ha sido detectada en casi todas las especies de salmónidos (Cipriano y Holt, 2005). La trucha arcoíris es especialmente susceptible a la infección (Ramsrud *et al.*, 2007).

Según Crump *et al.* (2005), las mayores pérdidas suelen ocurrir en alevines (0.2 a 2 g de peso), donde puede presentarse mortalidades acumuladas de hasta 90% (Nilsen *et al.*, 2011). Holt (1987) y Cipriano y Holt (2005), también reportaron mortalidades de hasta 50% en alevines de salmón coho. Esto posiblemente se deba al poco desarrollo del sistema inmune de estos animales (Crump *et al.*, 2001). No obstante, esta enfermedad también ataca a peces en etapas juveniles o adultos (Antaya *et al.*, 2008). Tasas de mortalidad del 85% en trucha arcoíris han sido reportadas por Brown *et al.* (1997), del 70% en Europa Occidental por Santos *et al.* (1992), Bruno (1992) y en Turquía por Kum *et al.* (2008). Sin embargo, también hay reportes de tasas de mortalidad inferiores, por ejemplo, Jensen *et al.* (2003), informaron un promedio de 34% de mortalidad en Dinamarca; Bruno (1992), reportó entre 10 y 30% en el Reino Unido, y según Gultepe y Tanrikul (2006), apenas 20% de mortalidad en Turquía. Post (1987) indicó que la mortalidad podría ser muy baja (1%) y continua, pero si no se controla, podría alcanzar hasta

un 75% en una epizootia grave.

Las diferentes tasas de mortalidad por BCDW probablemente se deben a una serie de factores, por ejemplo, la temperatura del agua es clave (Noga, 2000). Aunque la enfermedad ocurre principalmente entre 4 a 10 ° C (Wood, 1979; Post 1987), es más letal a 15 ° C (Groff y LaPatra, 2001). Wood (1979), notó un aumento de la mortalidad en el salmón coho con el aumento de la temperatura del agua de 10 a 16 °C. El incremento de temperatura del agua, de 16 a 21 ° C, es típico en los brotes de BCWD en ayu en Japón (Asakawa *et al.*, 2000).

Lorenzen *et al.* (1997), describen a *Flavobacterium psychrophilum* como un bacilo gramnegativo, causante de lesiones erosivas y necróticas en la piel de la trucha y que puede ser observado al microscopio desde raspados de las zonas afectadas. Esta bacteria también se puede encontrar en muestras de bazo secadas al aire y teñidas con colorante safranina, observándose su morfología clásica (Hidalgo *et al.*, 2014).

El aislamiento e identificación de esta bacteria es dificultoso debido a sus requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo (Nematollahi *et al.*, 2003) empleándose por esto técnicas moleculares complementarias, como PCR, para confirmar el diagnóstico (Toyama *et al.*, 1994; Bader *et al.*, 1998; Urdaci *et al.*, 1998).

Las infecciones por *Flavobacterium psychrophilum* se encuentran distribuidas por todo el mundo (Nicolas *et al.*, 2008). Así, la BCWD ha

sido identificado en América del Norte (Holt, 1987; Hesami *et al.*, 2008), Europa (Toranzo y Barja, 1993; Bernardet y Kerouault, 1989; Santos *et al.*, 1992; Wiklund *et al.*, 1994; Lorenzen y Olesen, 2011), Australia (Schmidtke y Carson, 1995), Chile (Bustos *et al.*, 1995), Japón (Wakabayashi *et al.*, 1994), Corea (Lee y Heo, 1998), Turquía (Gultepe y Tanrikul, 2006) y Perú (León *et al.*, 2009).

La patogénesis de la infección por *Flavobacterium psychrophilum* comienza con la presencia del patógeno en masas de agua dulce, donde puede sobrevivir durante varios meses o incluso años (Madetoja *et al.*, 2003; Vatsos *et al.*, 2003). También puede estar presente en peces asintomáticos, que actúan como reservorio (Nilsen *et al.*, 2011) y en peces infectados, que pueden liberar hasta 10^7 bacterias/h en el agua (Madetoja *et al.*, 2002). Los peces muertos liberan incluso un mayor número de bacterias (Madetoja *et al.*, 2000). Si bien aún se discute mucho sobre la presencia del patógeno en la piel sana de los peces, las rupturas en el tegumento son la ruta de ingreso más probable y directa (Madetoja *et al.*, 2002; Decostere *et al.*, 2000). Madetoja *et al.* (2002), observaron que una abrasión de la piel y mucosas aumentaban en gran medida la invasión de *F. psychrophilum*. Así mismo, Miwa y Nakayasu (2005), aislaron la bacteria solo de la piel dañada, incluso si las lesiones ocasionadas eran apenas microscópicas, y enfatizaron que las lesiones cutáneas son una puerta importante para el ingreso de *F. psychrophilum*.

Los parámetros químicos de un cuerpo de agua degradado, con altas concentraciones de materia orgánica o de nitrito, por ejemplo, también puede jugar un papel importante (García *et al.*, 2000).

Aunque la transmisión vertical es altamente probable (Brown *et al.*, 1997), Madsen y Dalsgaard (2008), sugieren que *F. psychrophilum* está apenas íntimamente conectado con la membrana del huevo, pero no dentro del mismo.

F. psychrophilum al ingresar al pez, segrega una proteasa psicrófila (Bertolini *et al.*, 1994) y crea perforaciones tubulares para obtener Ca para una mayor activación de esta enzima (Secades *et al.*, 2001). Una vez que ingresó a la dermis, *F. psychrophilum* se propaga a través del colágeno del tejido conjuntivo, por la cual tiene una gran afinidad, y se expande aún más en la musculatura (Miwa y Nakayasu, 2005). Luego se producen úlceras abiertas, con lesiones posteriores en los órganos internos (Evensen y Lorenzen, 1996).

Flavobacterium psychrophilum suprime fuertemente los mecanismos de defensa humoral no específicos de los peces infectados (Siwicki *et al.*, 2004). LaFrentz *et al.* (2002) y LaFrentz *et al.* (2003) notaron que se necesitan mediadores inmunes no específicos y anticuerpos específicos para inducir una respuesta inmune efectiva contra esta bacteria.

En la actualidad no hay vacunas comerciales disponibles para la Flavobacteriosis, dejando a los antibióticos como principal recurso de acción para controlar los brotes de esta enfermedad. Hoare *et al.* (2017), realizaron un estudio piloto en Reino Unido para evaluar la eficacia de

una vacuna polivalente de células enteras, que contiene *F. psychrophilum* inactivado con formalina, para inducir inmunidad protectora en alevines de trucha arcoíris observándose en los resultados un aumento de IgT en los peces vacunados, indicando el importante rol de esta inmunoglobulina durante la infección. Sin embargo, es necesario evaluar esta vacuna frente a otros serotipos y genotipos locales de *F. psychrophilum* para comprobar su capacidad protectora.

Inmunidad en peces teleósteos

A diferencia de los vertebrados terrestres, los peces viven en un medio ideal para el crecimiento de microbios y sus superficies mucosas son colonizadas constantemente por una variedad de organismos, entre ellos comensales y patógenos oportunistas (Salinas, 2015). Las superficies mucosas están continuamente expuestas al entorno externo y pueden considerarse la principal vía de entrada de patógenos en todos los seres vivos. Para mantener la homeostasis, los peces cuentan con un tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) como barrera, con componentes innatos y adaptativos, responsables de proteger contra el ataque continuo de microorganismos y antígenos, pero también tolerante con la colonización simbiótica beneficiosa (Gomez *et al.*, 2013).

En las mucosas de teleósteos se han descrito cuatro MALT diferentes, que son los siguientes: tejido linfóide asociado al intestino (GALT); tejido linfóide asociado a las branquias (GIALT), tejido linfóide asociado a la piel (SALT) y, el tejido linfóide asociado a la nasofaringe

(NALT), recientemente caracterizado (Tacchi *et al.*, 2014). Los MALT de peces comparten muchas características con las superficies mucosas tipo I de los mamíferos, a pesar de algunas diferencias funcionales y estructurales (Gomez *et al.*, 2013). A diferencia de los homeotermos, los MALT de teleósteos no presentan estructuras linfoides organizadas, como los ganglios linfáticos. Por lo tanto, los MALT de teleósteos aparentemente no poseen formación de centro germinal. En general, existen características comunes entre todos los MALT de teleósteos, a pesar de encontrarse en diferentes especies, como: la presencia de una capa de moco, que actúa como una barrera física y química; la presencia de componentes inmunes innatos y adaptativos, que incluyen Inmunoglobulinas secretadas (sIgs) con un papel preponderante de IgT; el transporte de anticuerpos a través del epitelio y, la presencia de una comunidad bacteriana compleja y diversa involucrada en el desarrollo y regulación del sistema inmune de la mucosa (Rombout *et al.*, 2014; Salinas, 2015).

Curiosamente, se ha descrito previamente que, en la homeostasis, las células inmunes no se distribuyen homogéneamente por toda la piel, sino que son más numerosas en secciones anteriores cercanas a las branquias (Leal *et al.*, 2016). Esto podría explicar por qué *F. psychrophilum* generalmente ingresa al huésped y produce daños en áreas específicas de la piel, como el pedúnculo y los flancos, que se describen como regiones corporales con menor presencia de linfocitos y que muestran valores de expresión más bajos para la mayoría de los genes inmunes (Leal *et al.*, 2016).

Respuesta Inmune Humoral y Celular

La respuesta humoral en peces es mediada principalmente por inmunoglobulinas, que son clasificadas en tres isotipos, IgM, IgD e IgT. Las dos primeras están presentes en todas las especies de peces teleósteos estudiados hasta la fecha y son producidas por la mayoría de linfocitos B. Las IgT son expresadas, de forma única, por los linfocitos B de la trucha arcoíris (Zhang *et al.*, 2010) y del pez cebra (Schorpp *et al.*, 2006). Estos anticuerpos parecen estar distribuidos principalmente en las superficies mucosas (Zhang *et al.*, 2010). Hasta el momento, se han descrito IgM e IgT en secreciones cutáneas de la mucosa (Maki y Dickerson, 2003; Xu *et al.*, 2013), pero poco se ha reportado la presencia de IgD. Es importante mencionar que un estudio reciente demostró la regulación de IgD en branquias e intestinos en respuesta a inmersión y vacunación oral, respectivamente (Makesh *et al.*, 2015).

Por otra parte, las células T poseen un receptor (TCR) que reconoce antígenos cuando se exponen asociados al Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), de clase I o clase II. Una primera clasificación de las células T puede basarse en las cadenas de TCR que expresan, ya sea $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (Bonneville *et al.*, 2010). Las células $\alpha\beta$ - T convencionales se dividen en células T citotóxicas (Tc) o T helper (Th), que se diferencian por la expresión de las glucoproteínas unidas a la membrana CD8 o CD4, respectivamente. Estas moléculas tienen la función de co-receptores para el TCR, de esta manera estabilizan la interacción con el MHC y mejoran la activación de TCR a través de CD3 (Zhang *et al.*, 2010).

Las células citotóxicas pueden matar células infectadas o cancerosas después de reconocer antígenos en el contexto de MHC de clase I (Strasser *et al.*, 2009) a través de liberación de moléculas efectoras tales como perforina (Milstein *et al.*, 2011). Por otro lado, las células T helper expresan CD4 y producen citocinas que regulan la acción de otras células inmunitarias, principalmente células B (Kleinewietfeld y Hafler, 2013). En el caso de mamíferos, existen subconjuntos bien definidos que incluyen Th1, Th2, Th17 y Treg.

Las células Th1 secretan citocinas efectoras, como el IFN γ , para controlar las infecciones intracelulares (Kanhare *et al.*, 2012). Las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, estas estimulan a las células B y controlan infecciones de tipo extracelular mediante la producción de anticuerpos (Ruan *et al.*, 2011). Las células Treg, que son reguladas a través de Foxp3, tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la autotolerancia (Zhang y Zhao, 2007).

Para el caso de los peces, estudios genómicos realizados en diferentes especies han identificado componentes asociados con las funciones de las células T, lo que permite especular que los diferentes subconjuntos de células T también están presentes (Laing y Hansen, 2011), sin embargo, se deberá investigar más. Células T han sido identificadas en la mucosa intestinal (Rombout *et al.*, 2011), pero no ha sido investigada a profundidad su presencia en la piel de peces óseos. A pesar de esto, la transcripción de varios genes inmunes asociados con las actividades de las células T ha sido reportada en la piel, sugiriendo que los linfocitos T también son componentes del Tejido Linfoide asociado a la piel

“SALT”, en estas especies (Gomez *et al.*, 2013). Por ejemplo, la transcripción de GATA-3 e IL4/13, homólogos de los genes de citocinas IL-4 e IL-13 de las células Th2 de los mamíferos, se examinó en varios tejidos de trucha arcoíris, donde los niveles de transcripción fueron más altos en timo, piel y branquias (Takizawa *et al.*, 2011).

En general, existen genes posiblemente asociados con la respuesta inmune local y/o sistémica durante una infección en peces y según Yáñez y Martínez (2010), en acuicultura, la caracterización de estos es escasa, pero se espera mayores estudios referidos al tema que ampliarán nuestro conocimiento de la respuesta inmune. En este trabajo nos enfocamos en aquellos genes expresados durante la flavobacteriosis en la trucha arcoíris.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Identificar diferencias en la expresión de genes relacionados a la respuesta inmune en la trucha naturalmente infectada con *Flavobacterium psychrophilum* permitirá entender mejor la patogénesis de la enfermedad, así como implementar medidas preventivas y sanitarias más eficientes, buscando reducir las pérdidas económicas y mortalidad que hoy en día ocasiona ésta en las etapas de alevinaje y de engorde. Finalmente, estudiar los niveles de expresión de algunos genes en la trucha arcoíris que estén asociados a la respuesta inmune específica a nivel local y sistémica durante la infección por *Flavobacterium psychrophilum*, permitirá conocer qué tipos de células participan y comprender qué mecanismos de defensa son los más eficientes para combatir la progresión de esta enfermedad.

V. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Cuantificar los niveles de expresión de genes relacionados a la respuesta inmune local y sistémica durante la infección con *Flavobacterium psychrophilum* en la trucha arcoíris procedente de Puno.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e identificar animales afectados por flavobacteriosis en la zona sur del Perú.
- Cuantificar la expresión de genes relacionados al sistema inmune local (piel) y responsable por inmunidad sistémica (bazo) de peces asintomáticos y sintomáticos con flavobacteriosis.
- Determinar las diferencias de medias entre los niveles de expresión de los genes estudiados para cada estatus sanitario de los animales analizados.
- Confirmar a través de una prueba de inmunohistoquímica los resultados obtenidos en la transcripción de genes, en tejidos de animales enfermos, respecto a animales clínicamente sanos.

VI. METODOLOGÍA

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Dado que solamente se registrarán las variables sin afectarlas y en una sola ocasión, esta investigación es de tipo observacional, transversal y analítico.

6.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.

Se consideró un tamaño de muestra en función a un estudio similar realizado por Leal *et al* (2016) y Abós *et al* (2014). Según estos autores, utilizaron un tamaño mínimo de $n=5$. En el presente estudio se utilizó un $n=20$. Se consideraron dos grupos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), un grupo de truchas asintomáticas (siete) y un grupo de truchas sintomáticas (trece), de aproximadamente 25 cm y 350 gramos de peso, procedentes de jaulas flotantes cultivadas en el lago Titicaca, provincia de Puno, Perú, durante el mes de febrero del 2018. Llámese sintomáticas o enfermas a aquellos peces que mostraban ulceraciones en el pedúnculo y base de las aletas o a lo largo del cuerpo, además de ello, quienes resultaban positivos después de ser diagnosticados por PCR convencional. Se consideró como asintomáticos a aquellos peces que no mostraron lesión externa y se veían en buenas condiciones. Los parámetros físicoquímicos del cultivo en jaulas durante el muestreo fueron los siguientes: Temperatura del agua: 17 °C, nivel de oxígeno disuelto 6 mg/L, pH 8.1, transparencia del agua 90 cm. La densidad de cosecha en jaula es 15 tm/m³.

6.3. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

6.3.1. Colección de tejidos

Antes de realizar la necropsia, los peces se sacrificaron por sobredosis de benzocaína (30 mg/L). En el caso de los animales sintomáticos se retiraron dos secciones de piel, una que cubrió un área de región sana y otra de la región cercana a la herida. Para el caso de los peces asintomáticos se tomó una sola región. Las muestras individuales se conservaron inmediatamente en la solución de Bouin y luego en parafina para el análisis inmunohistoquímico en un total de 5 peces sintomáticos y 2 peces asintomáticos; así como también se conservó en RNA later, para los estudios de expresión de genes. Adicionalmente, de cada individuo, se conservó tejidos de bazo en RNA Later (Tabla 1)

Tabla 1. Número de tejidos colectados de piel y bazo para extracción de ARN y posterior conversión a ADNc.

	<i>Asintomático</i>	<i>Sintomático</i>		<i>Total muestras</i>
	<i>(A)</i>	<i>Piel sin Lesión (S)</i>	<i>Piel ulcerada (SU)</i>	
Piel	7	13	13	33
Bazo	7	13		20

6.3.2. Extracción de ARN y preparación de ADNc

El ARN total se extrajo de muestras de piel y bazo utilizando el kit SV Total RNA Isolation System, siguiendo las instrucciones del fabricante, en el laboratorio de Parasitología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia-UPCH. Finalmente, los pellets de ARN se eluyeron en agua libre de RNasa y almacenaron a -80 ° C hasta su uso. Posteriormente, se usó 1 µg de RNA para obtener cDNA de cada muestra usando el

GoScript™ Reverse Transcription System de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se diluyó en una proporción de 1: 4 con agua y se almacenó a -20 ° C. El Procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de Parasitología de la FAVEZ- UPCH.

6.3.3. Identificación de *Flavobacterium psychrophilum* por PCR

Los primers empleados para el PCR convencional (Tabla 2) se diseñaron para detectar el gen rRNA 16S de *F. psychrophilum*. Todos los PCRs fueron corridos en un Thermo Scientific™ Termociclador Artik con un volumen de reacción de 25 µL para cada muestra. Cada reacción incluyó 18.5 µL de H₂O libre de DNAsa, 2.5 µg de Buffer 10X, 1 µL de MgCl₂, 0.5 µL de dNTPs, 0.5 µL de Primer Forward y 0.5 µL de Primer Reverse (ambos a 10 pmol), 0.75 µL de Taq DNA Polymerase y 1 µL de cDNA. El protocolo de PCR incluyó una desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación, que incluyeron una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos, y elongación a 72°C por 30 segundos, con un paso de elongación final a 72°C por 7 min.

Se usó el 100 bp DNA ladder “Promega” (4 µL) como marcador molecular. Los amplicones luego fueron visualizados bajo luz UV en un transiluminador (UVP BioDoc- It™ Imaging System), donde la presencia de un amplicón de 239 pb se consideró como positivo para *F. psychrophilum*. Estos amplicones fueron secuenciados para confirmar la identidad de la bacteria en estudio. La cepa ATCC 49418 de *F. psychrophilum* fue utilizada como control positivo y agua libre de

nucleasas como control negativo. El procedimiento se realizó en el Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA-INIA, Madrid).

Tabla 2. Primers específicos empleados en el PCR convencional

Gen	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
Fpsy	GCAATCTACCTTTTACAGAGGGATAGCCC	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGA

6.3.4. Evaluación de la expresión de genes inmunes por PCR en tiempo real.

Para evaluar los niveles de transcripción de los diferentes genes relacionados a la respuesta inmune en muestras de piel y bazo, se realizó un PCR en tiempo real en equipo LightCycler® 480 System (Roche) utilizando SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems) y Primers específicos previamente optimizados por Leal *et al.*(2016) (mostrados en la Tabla 3). Cada muestra se midió en las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 ° C, seguido de 45 ciclos de amplificación (15 segundos a 95 ° C y 1 minuto 60 ° C). La expresión de genes individuales se normalizó a la expresión relativa del EF-1 α de la trucha y los niveles de expresión se calcularon usando el método $2^{-\Delta Ct}$, donde ΔCt se determina restando el valor de EF-1 α del Ct objetivo. Controles negativos sin muestra se incluyeron en todos los experimentos.

El procedimiento de cuantificación de los niveles de expresión de los diferentes genes en estudio se realizó en el Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA-INIA, Madrid).

Tabla 3. Primers específicos empleados en el PCR de tiempo real

(Leal *et al.*, 2016)

Gen	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
EF-1A	GATCCAGAAGGAGGTCACCA	TTACGTTGACCTCCATCC
CD4	CCTGCTCATCCACAGCCTAT	CTTCTCCTGGCTGTCTGACC
CD8	AGTCGTGCAAAGTGGGAAAG	GGTTGCAATGGCATAACAGTG
CK11	GAACATTCTTTGAGCATACTAAT	TGCACAATACTTCTCCCAT
Eomes	ACAACGTATTTGTTGAGGTCGTGTT	CATCTTGTTACCTTGATGTTGTT G
Perforin	GGAACGACGACCTGTTAGGA	TCATAGGGGAGGGCACATAG
IFN γ	GAAGGCTCTGTCCGAGTTCA	TGTGTGATTTGAGCCTCTGG
FoxP3	CCAGAACCGAGGTGGAGTGT	TGACGGACAGCGTTCTTCCA
IL4 / 13	CAACCAACCAAAGATGAAGACG	CAACGGTGCCTTCTGAAGTTTG
IgT	AACATCACCTGGCACATCAA	TTCAGGTTGCCCTTTGATTC
IgM	TGCGTGTTTGAGAACAAAGC	GACGGCTCGATGATCGTAAT
IgD	AGCTACATGGGAGTCAGTCAACT	CTTCGATCCTACCTCCAGTTCCT
IgD mb	TGAACATATCCAAACCAGAGCTCC	GTCCTGAAGTCATCATTTTGTCTT GA
IgD sec	TGAACATATCCAAACCAGGTGTCTG	GTCCTGAAGTCATCATTTTGTCTT GA

6.3.5. Inmunohistoquímica

Para estudiar cambios patológicos en peces que muestran síntomas de enfermedad, secciones de piel de peces asintomáticos y piel con lesiones ulcerativas de trucha arcoíris sintomática fueron sometidos a un método inmunohistoquímico indirecto para detectar IgD de trucha arcoíris y también CD3 (Abós *et al.*, 2018).

Las muestras de piel se fijaron en solución de Bouin durante 24 h, se deshidrataron con etanol y xilol, se incluyeron en parafina y luego se

seccionaron a 5 μm . Después de desparafinar y rehidratar, la peroxidasa endógena se inactivó por incubación en H_2O_2 al 3% en metanol durante 25 min y se recuperaron los antígenos mediante calentamiento en tampón Tris-EDTA (pH 9) en un horno microondas (800 w durante 5 min y 450 w durante 5 min).

La unión no específica se bloqueó con albúmina de suero bovino al 5% (BSA, Sigma-Aldrich) en solución salina tamponada con Tris (TBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, las secciones se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos de ratón (mAbs) que reconocen IgD y CD3 de trucha. El paso de incubación con la anti IgD trucha (4 μg / ml) (Ramírez-Gómez *et al.*, 2012) se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 h, mientras que la incubación con el anti CD3 trucha (2,5 μg / ml) (Boardman *et al.*, 2012) se realizó durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios no unidos se lavaron a continuación con TBS. En seguida, se añadió un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Finalmente, las secciones se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se visualizaron con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro. Se utilizó hematoxilina de Harris como contratinción nuclear y se realizó el montaje con medio DPX.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó en el Centro de Investigación de Sanidad Animal (CISA-INIA, Madrid).

6.3.6. Plan de análisis

Los análisis estadísticos y la representación gráfica se realizaron con Microsoft Excel 2010 y GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software Inc.). Se usó Prueba t de Student de dos colas no pareada y pareada según fue el caso. Para el caso de comparación entre niveles de expresión en peces asintomáticos y sintomáticos se utilizó una prueba t de Student de dos colas no pareada. Cuando se realizó una comparación entre las secciones ulcerativas y sin lesión de la piel del mismo pez, se usó una prueba t de Student de dos colas pareadas para determinar las diferencias estadísticamente significativas. Para comparar niveles de expresión inicial entre piel y bazo de peces asintomáticos se utilizó una Prueba t de Student de dos colas pareada. El nivel estadísticamente significativo fue aceptado en $p < 0.05$.

6.3.7. Consideraciones éticas

Los experimentos aquí descritos cumplen con los lineamientos de la Ley de Protección a los Animales Domésticos y a los Animales Silvestres mantenidos en cautiverio (Ley 27265/ Título 6/ Art. 18) y fueron previamente aprobados por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el código de registro 102402. La anestesia se aplicó antes del sacrificio siguiendo las recomendaciones de Zhal *et al.* (2012) para la anestesia general (narcosis). Todos los esfuerzos se enfocaron en minimizar el sufrimiento.

VII. RESULTADOS

7.1. Detección de *Flavobacterium psychrophilum* por PCR convencional

En el análisis por PCR convencional de los cDNA de la piel ulcerada de truchas enfermas (EPU) y de peces clínicamente sanos (CP) se detectó el amplicón del tamaño esperado (Fig. 1), indicando que ambos grupos de peces estaban infectados con *Flavobacterium psychrophilum*.

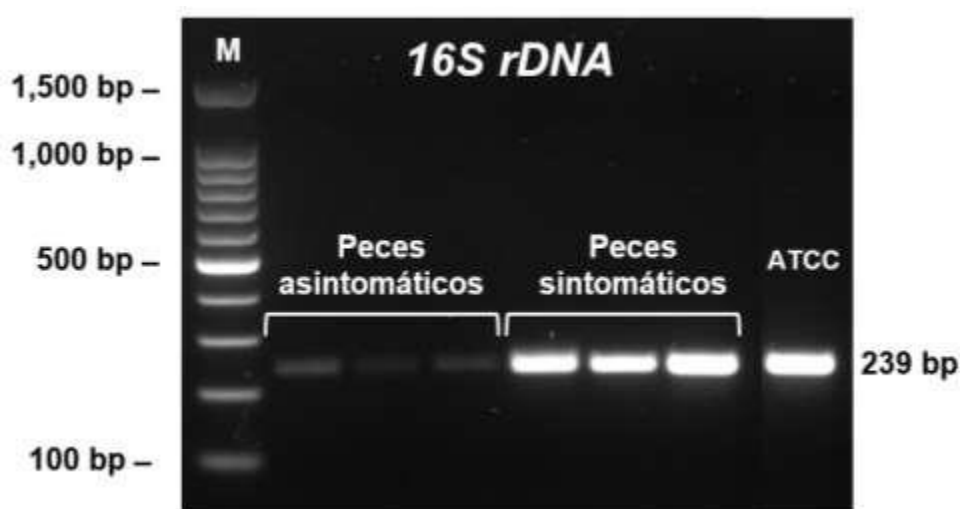


Figura 1. Detección de *Flavobacterium psychrophilum* por PCR convencional.

Leyenda: MPM: 100 bp (DNA ladder “Promega”)

Los productos de PCR se secuenciaron en la unidad de secuenciamiento del Centro de Investigación de Sanidad Animal- CISA (Madrid, España) y se observaron las fastas en el programa Chromas Lite 2.0 (Fig. 2A), posteriormente se confirmó la especie con el programa Blastn (Fig. 2B), arrojando para cada producto (forward y reverse) 100 % de identidad con la especie *Flavobacterium psychrophilum*, confirmando así la presencia de la bacteria en las muestras.

7.2. Transcripción de genes en la piel y bazo de la trucha arcoíris.

Primero se analizó la expresión de genes en la mucosa de la piel de truchas aparentemente sanas y se observó que la Ig M se expresa en grandes cantidades, junto a la quimiocina CK11 (Tabla 4). En seguida, se evaluó la expresión de genes en el bazo de truchas asintomáticas, la expresión más elevada fue de Ig M, mientras que CK11 estuvo entre las más bajas, junto a IL4/13. (Tabla 4)

Para confirmar que la piel es un tejido rico en células T, comparamos los niveles de transcripción de diferentes genes relacionados con la inmunidad mediada por estas células en la piel, con los observados en el bazo de peces aparentemente sanos (Tabla. 3). Los niveles de transcripción fueron significativamente mayores en el bazo que en la piel, para todos los casos, excepto con la quimiocina CK11 (esto indica una importante presencia de células T). Para el caso de genes relacionados a inmunoglobulinas, la tendencia fue similar, la transcripción de genes en bazo fue significativamente mayor.

Tabla 4. Niveles de expresión en piel y bazo de peces asintomáticos

Peces Asintomáticos

<i>Gen</i>	Piel				Bazo			
	\bar{x}	SD	Min	Max	\bar{x}	SD	Min	Max
<i>CD4</i>	0.001 ^a	0.001	0.000	0.003	6.024 ^b	7.116	0.224	17.753
<i>CD8</i>	0.001 ^a	0.001	0.000	0.004	2.467 ^b	3.820	0.114	10.556
<i>CK11</i>	0.132	0.168	0.009	0.495	0.040 ^b	0.072	0.000	0.198
<i>Eomes</i>	0.001 ^a	0.001	0.000	0.002	5.569 ^b	10.571	0.059	29.446
<i>Perforin</i>	0.001 ^a	0.000	0.000	0.002	3.862 ^b	5.198	0.160	14.320
<i>IFNγ</i>	0.001 ^a	0.001	0.000	0.002	0.708 ^b	0.207	0.358	1.035
<i>IL4 / 13</i>	0.000 ^a	0.000	0.000	0.000	0.045 ^b	0.070	0.000	0.186
<i>IgT</i>	0.001 ^a	0.000	0.000	0.001	11.354 ^b	18.225	0.002	49.867
<i>IgM</i>	0.443 ^a	0.307	0.092	0.975	318.091 ^b	190.141	146.213	706.150
<i>IgD</i>	0.001 ^a	0.001	0.000	0.003	21.955 ^b	34.193	0.023	85.036
<i>Foxp3</i>	-	-	-	-	0.359	0.576	0.005	1.636

a,b: letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

7.3. Efecto de *Flavobacterium psychrophilum* en la transcripción de genes relacionados con células T en la piel.

Se evaluó el nivel de expresión de la zona no dañada de la piel de truchas infectadas con *Flavobacterium psychrophilum*, y comparó con la zona ulcerada del mismo pez enfermo y el de una trucha clínicamente sana. No se encontró diferencia significativa entre los niveles de transcripción, de todos los genes evaluados, de la piel de un pez aparentemente sano y la piel no dañada de una trucha enferma. Cuando se comparó la piel de la trucha aparentemente sana respecto a la piel ulcerada del pez enfermo, se encontró diferencias significativas para los genes CD4, CD8a, Perforina e IFN γ , observándose una regulación positiva significativa en la zona ulcerada (Fig. 6).

Reducidos niveles de transcripción de Eomes fueron observados en la zona ulcerada, respecto de los animales sanos. En cuanto a la respuesta humoral, en los marcadores de inmunoglobulinas se observó aumento de la transcripción de IgD (regulación positiva). Al evaluar a qué tipo de IgD (de membrana y secretada) se debía este incremento, se detectó que los mayores niveles de expresión de IgD fueron por la IgD de membrana y que en ambos tipos de IgD existió diferencia significativa entre ambos grupos de peces (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los niveles de expresión de genes inmune en la piel de truchas sintomáticas (S y SU), y Asintomáticas.

Gen	Pez Asintomático (A)						Pez Sintomático					
	Sintomático sin lesión (S)			Sintomático ulcerado (SU)			Sintomático sin lesión (S)			Sintomático ulcerado (SU)		
	\bar{x}	SD	Min	Max	\bar{x}	SD	Min	Max	\bar{x}	SD	Min	Max
<i>CD4</i>	0.0014 ^a	0.0010	0.0003	0.0028	0.0026 ^{ab}	0.0041	0.0005	0.0153	0.0056 ^b	0.0044	0.0005	0.0136
<i>CD8</i>	0.0012 ^a	0.0014	0.0002	0.0043	0.0015 ^a	0.0019	0.0001	0.0059	0.0045 ^b	0.0052	0.0002	0.0129
<i>CK11</i>	0.1323	0.1678	0.0091	0.4948	0.0691	0.1054	0.0160	0.4075	0.0370	0.0278	0.0073	0.1127
<i>Eomes</i>	0.0005	0.0007	0.0001	0.0019	0.0006	0.0013	0.0000	0.0049	0.0004	0.0005	0.0000	0.0021
<i>Perforin</i>	0.0010 ^a	0.0004	0.0004	0.0017	0.0013 ^a	0.0008	0.0003	0.0030	0.0039 ^b	0.0034	0.0006	0.0094
<i>IFNγ</i>	0.0006 ^a	0.0007	0.0002	0.0021	0.0011 ^a	0.0014	0.0001	0.0046	0.0040 ^b	0.0047	0.0002	0.0130
<i>IL4 / 13</i>	0.0001	0.0001	0.0000	0.0003	0.0001	0.0001	0.0000	0.0004	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002
<i>IgT</i>	0.0010	0.0003	0.0005	0.0014	0.0005	0.0004	0.0001	0.0012	0.0012	0.0016	0.0000	0.0047
<i>IgM</i>	0.4431	0.3071	0.0922	0.9751	0.5381	0.3093	0.1276	1.0000	1.0098	0.9643	0.0497	3.0823
<i>IgD</i>	0.0008 ^a	0.0010	0.0000	0.0028	0.0008 ^a	0.0014	0.0000	0.0050	0.0119 ^b	0.0152	0.0001	0.0461
<i>IgD mb</i>	0.0011 ^a	0.0008	0.0003	0.0024	0.0026 ^a	0.0060	0.0003	0.0215	0.0212 ^b	0.0261	0.0001	0.0693
<i>IgD sec</i>	0.0000 ^a	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000 ^a	0.0000	0.0000	0.0001	0.0007 ^b	0.0009	0.0000	0.0024

a,b,c indican diferencia significativa entre grupos (p<0.05)

7.4. Efecto de *Flavobacterium psychrophilum* en la transcripción de genes relacionados con células T en el bazo

Para comprender si las respuestas de las células T del bazo frente a la flavobacteriosis era comparable a las de la piel, estudiamos el efecto de *Flavobacterium psychrophilum* sobre los niveles de expresión de genes inmunes relacionados a las células T en este órgano (Tabla 6). En este caso, no se observó un aumento significativo en los niveles de transcripción de los genes evaluados en respuesta a la bacteria. La expresión más elevada se mostró en IgM y las expresiones más bajas se mostraron en la citoquina CK11 e IL4/13.

Tabla 6. Comparación de los niveles de expresión de genes inmunes en bazo de truchas sintomáticas (S), y asintomáticas (A).

Gen	Asintomático (A)				Sintomático (S)			
	\bar{x}	SD	Min	Max	\bar{x}	SD	Min	Max
CD4	6.024	7.116	0.224	17.753	6.568	10.315	0.007	33.825
CD8	2.467	3.820	0.114	10.556	1.395	1.525	0.003	4.691
CK11	0.040	0.072	0.000	0.198	0.004	0.005	0.000	0.016
Eomes	5.569	10.571	0.059	29.446	1.272	1.470	0.004	4.438
Perforin	3.862	5.198	0.160	14.320	1.621	1.690	0.008	5.169
IFN γ	0.708	0.207	0.358	1.035	0.738	0.376	0.000	1.021
IL4 / 13	0.045	0.070	0.000	0.186	0.007	0.006	0.000	0.018
IgT	11.354	18.225	0.002	49.867	1.092	2.235	0.007	7.674
IgM	318.091	190.141	146.213	706.150	302.073	209.344	51.625	634.730
IgD	21.955	34.193	0.023	85.036	5.468	6.880	0.009	23.918
Foxp3	0.359	0.576	0.005	1.636	0.063	0.068	0.001	0.168

7.5. Prueba de Inmunohistoquímica

Para verificar si la IgD también estaba regulada al alza, a nivel de proteína, en las lesiones ulcerativas, realizamos un estudio inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo específico contra la IgD de la trucha arcoíris. En muestras de piel ulcerativa, se observó una infiltración de células mononucleares en la capa de células basales epiteliales y más fuertemente en el estrato esponjoso y el estrato compacto interno de la dermis, en comparación con muestras de piel obtenidas de peces asintomáticos (Fig. 3 y 4). Además, el análisis inmunohistoquímico mostró una reactividad positiva contra el anticuerpo IgD en células dentro de la dermis de muestras de piel ulcerativa de peces sintomáticos (Fig. 3). La presencia de estas células IgD + fue menor en muestras de piel de trucha arcoíris sin lesiones (Fig.3). Estos resultados confirman la implicación de la IgD en la respuesta inmune local contra *F. psychrophilum*.

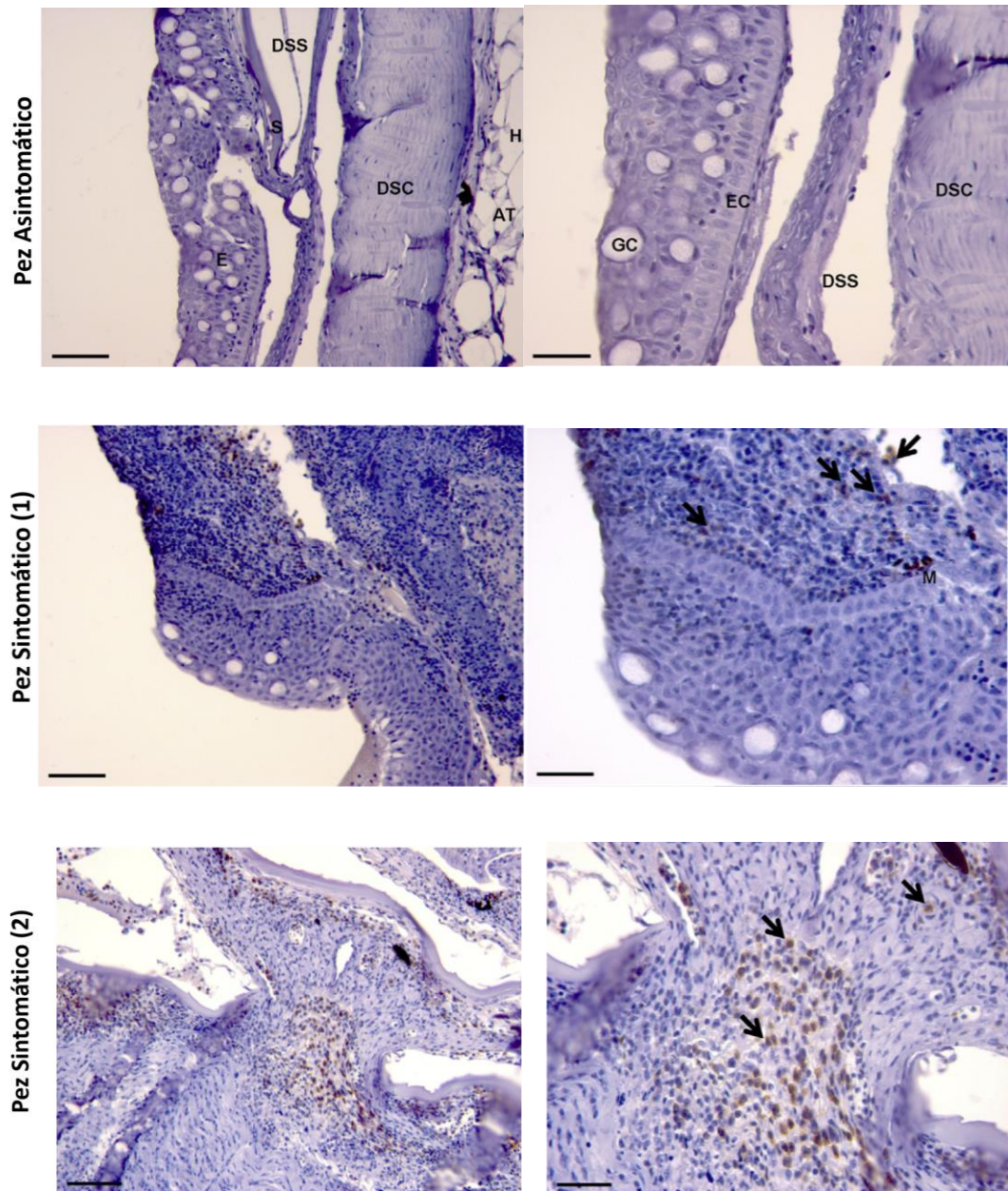


Figura 3. Detección inmunohistoquímica de IgD en la zona ulcerativa de la piel de trucha arcoíris infectada naturalmente con *F. psychrophilum*. La figura representa un pez asintomático y dos peces sintomáticos con lesiones ulcerativas, mostrados a 20× (imágenes de la izquierda, barra de escala = 40 μm) y a 40× (Imágenes de la derecha, barra de escala = 20 μm). Las puntas de las flechas indican las células representativas de IgD. E, epidermis; ES, escama; EED, estrato esponjoso de la dermis; ECD, estrato compacto de la dermis; H, hipodermis; TA, Tejido adiposo; CG, células goblet; CE, célula epitelial; M, melanóforos.

El hecho de que tanto los niveles de ARNm de CD4 como los de CD8 estaban regulados al alza en las lesiones ulcerativas sugería fuertemente una mayor presencia de células T en las lesiones, dado que los ARNm de CD4 y CD8 no están regulados transcripcionalmente en células T individuales (Cliff *et al.*, 2004). Para verificar este punto, también realizamos un estudio inmunohistoquímico con un anticuerpo específico contra CD3 de trucha arcoíris, un marcador de células pan T (Boardman *et al.*, 2012). Se identificaron células CD3 + en la epidermis de muestras de piel ulcerativas de peces sintomáticos (Fig. 4), mientras que la presencia de células T fue mucho menor en muestras de piel de trucha arcoíris sin lesiones (Fig. 4).

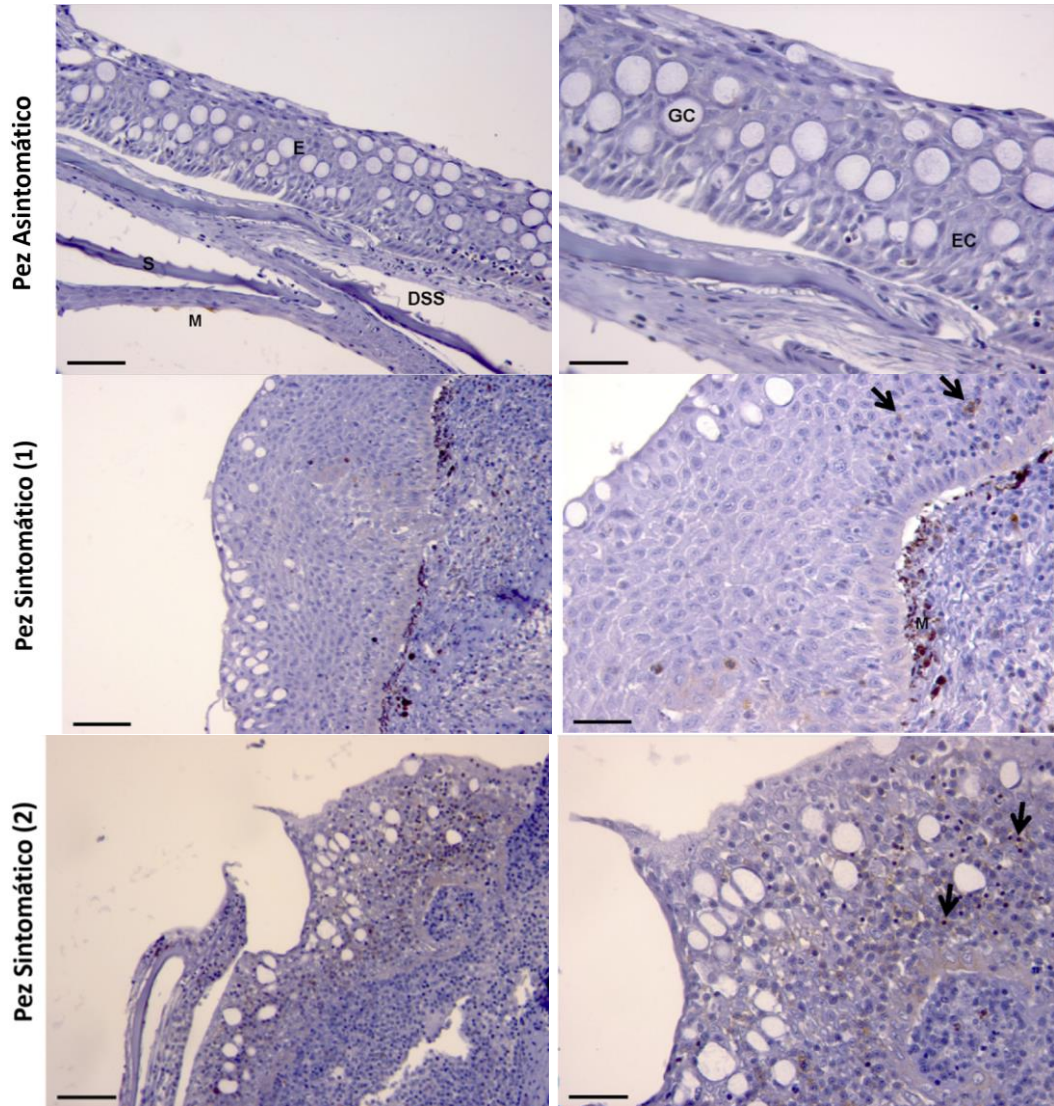


Figura 4. Detección inmunohistoquímica de CD3 en la zona ulcerativa de la piel de trucha arcoíris infectada naturalmente con *F. psychrophilum*. La figura representa un pez asintomático y dos peces sintomáticos con lesiones ulcerativas, mostrados a 20× (imágenes de la izquierda, barra de escala = 40 μ m) y a 40× (Imágenes de la derecha, barra de escala = 20 μ m). Las puntas de las flechas indican las células representativas de CD3. E, epidermis; ES, escama; EED, estrato esponjoso de la dermis; ECD, estrato compacto de la dermis; H, hipodermis; TA, tejido adiposo; CG, células goblet; CE, célula epitelial; M, melanóforos.

VIII. DISCUSIÓN

El estudio de la respuesta inmune provocada durante el curso de una infección con un patógeno específico es clave para el desarrollo racional de vacunas efectivas. En el caso de *F. psychrophilum*, aunque algunos estudios previos se han centrado en analizar la respuesta transcripcional al patógeno después de infecciones experimentales (Langevin *et al.*, 2012; Henriksen *et al.*, 2015), ninguno de estos estudios se realizó durante la infección natural en la trucha arcoíris. Además, estos estudios se enfocaron en determinar la regulación transcripcional de los genes inmunitarios en los órganos inmunes centrales, como el riñón anterior (Langevin *et al.*, 2012; Henriksen *et al.*, 2015), pero no determinaron la regulación de los genes inmunes en la piel, el principal sitio de adherencia para la bacteria, donde coloniza y se multiplica antes de ingresar al huésped y donde se observan los principales signos clínicos (Papadopoulou *et al.*, 2017).

En los peces, la piel es una de las primeras líneas de defensa contra los patógenos transmitidos por el agua. Debido a que en estos animales la piel no está queratinizada, las células de la epidermis están en contacto directo con el ambiente acuático y deben responder inmediatamente a la exposición a patógenos. De acuerdo con Salinas (2015), dentro de la piel, las células B y T se encuentran diseminadas de forma desorganizada, constituyendo lo que se ha designado como tejido linfoide asociado a la piel (SALT). Por esta razón, en el presente trabajo, se analizó los niveles de expresión de diferentes genes relacionados con la función de las células B y T en la piel de la trucha arcoíris que muestran claros signos clínicos de BCWD, obtenidos del lago Titicaca en la región de Puno.

Como paso inicial, se verificó por PCR, la presencia de *F. psychrophilum* en muestras de piel, observando que aunque esta bacteria también podía identificarse en peces aparentemente sanos, los amplicones fueron de menor intensidad que aquellos encontrados en animales con sintomatología clara, sugiriendo una mayor carga bacteriana en los animales afectados. Esto podría ser confirmado mediante análisis con real time PCR. Del mismo modo, Orieux *et al.* (2013) detectaron *F. psychrophilum* por PCR en peces asintomáticos durante el curso de un brote de BCWD. En cualquier caso, la detección de *F. psychrophilum* en la piel de individuos aparentemente sanos sugiere que estos peces actúan como reservorios que dispersan las bacterias en las aguas circundantes, como se informó anteriormente (Madetoja *et al.*, 2000).

En cuanto a los niveles de transcripción de algunos marcadores genéticos del sistema inmune celular y humoral, podemos afirmar que la piel de la trucha arcoíris es un tejido rico en células T, con elevados niveles de transcripción de factores relacionados a la actividad de estas células, comparables a los encontrados en el bazo, aunque con diferencia significativa entre ellos, excepto para CK11. Esto muestra una importante presencia y participación de linfocitos T a nivel de piel. De acuerdo con Leal *et al.* (2016), parece que la mucosa de peces teleósteos, como la trucha arcoíris, en ausencia de ganglios linfáticos, se comporta como órgano linfoide secundario, donde las células B y T coinciden y se activan directamente.

Un estudio previo realizado en trucha arcoíris, cultivadas experimentalmente en un sistema de flujo de agua parcialmente recirculante a 12°C, demostró que los niveles de transcripción de IL4 / 13 eran más altos en la piel, las branquias y el timo en comparación con el bazo (Takizawa *et al.*, 2011). Estos resultados sirvieron para formular la hipótesis de que el entorno de células T de la piel está orientado hacia

un perfil Th2. Nuestros resultados no se ajustan a esta hipótesis, ya que observamos mayores niveles de transcripción de IL4 / 13 en el bazo en comparación con los niveles encontrados en la piel. Esto puede ser debido, en parte, a que los peces considerados como clínicamente sanos, procedieron del mismo ambiente que los animales enfermos, es decir de un sistema de cultivo abierto, no controlado y hasta estresante para los peces; la elevación en los niveles de expresión de estos genes, por encima de lo esperado en animales asintomáticos, se debió a la infección bacteriana. Además, encontramos que los niveles de transcripción de CD8a y perforina también eran mucho más elevados en el bazo que en la piel, lo que sugiere una importante presencia de células T CD8⁺ en este tejido.

Habiéndose establecido que las células T son un componente principal del tejido linfoide asociado a la piel (SALT) de teleosteos (Leal *et al.*, 2016), estudiamos si la infección con la bacteria en estudio podría alterar los niveles de transcripción de factores relacionados a la actividad de células T en este tejido. Observamos que, efectivamente, la bacteria moduló muchos de estos factores relacionados con células T, como fue para el caso total, CD4, CD8a, Perforina e IFN γ , indicando una respuesta de estas células en la piel a la infección causada por *F. psychrophilum*. También se destaca la regulación positiva de los niveles de transcripción de los genes CD8 y perforina en la piel ulcerada en comparación con lo observado en muestras de piel sin lesiones de peces asintomáticos y sintomáticos.

En conjunto, estos resultados sugieren que las células citotóxicas T juegan un papel importante en la respuesta a *F. psychrophilum*, probablemente matando las células infectadas en los sitios donde la concentración bacteriana es más alta. Dado que la capacidad de *F. psychrophilum* para sobrevivir dentro de las células de la trucha arcoíris ya se ha demostrado (Decostere *et al.*, 2001), nuestros resultados coinciden

con los obtenidos experimentalmente, en respuesta a otros microorganismos intracelulares, en otros animales. Por ejemplo, se informó que las células T CD8 + juegan un papel protector importante contra *Listeria monocytogenes* en ratones a través de una vía dependiente de la perforina (Kägi *et al.*, 1994). De forma similar, se detectaron células T citotóxicas CD8 + que reconocen células infectadas con *Salmonella* en ratones expuestos a una cepa virulenta de *S. typhimurium*, otro patógeno intracelular (Lo *et al.*, 1999).

Los niveles de ARNm de IFN γ también se regularon positivamente en secciones de piel ulcerosa en comparación con los observados en muestras de piel sin lesiones de peces asintomáticos y sintomáticos. En la homeostasis, se cree que la piel tiene un perfil Th, preferentemente Th2 (Takizawa *et al.*, 2011). Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a un cambio de perfiles Th2 a Th1 en respuesta a la infección bacteriana. En este contexto, las células Th1 secretarían citocinas efectoras como IFN γ y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) para controlar las infecciones intracelulares, e interleucina 2 (IL-2) para inducir la proliferación de linfocitos (Damsker *et al.*, 2010). En línea con esta hipótesis, los niveles de ARNm de CD4 también estaban regulados positivamente.

En cuanto a genes de inmunoglobulinas, aún no se ha determinado cabalmente si la IgD está implicada en la respuesta inmune de la piel a otros patógenos. Pero, recientemente, se informó que la IgD estaba fuertemente regulada en respuesta a una vacuna de *F. psychrophilum* (Makesh *et al.*, 2015). En ese estudio, se detectó un aumento de los niveles de expresión de IgD secretora en branquias e intestinos de trucha arcoíris inmunizada contra *F. psychrophilum* por inmersión o intubación anal, respectivamente. En el caso de los peces inmunizados mediante intubación anal, los niveles de IgD también aumentaron significativamente en la piel (Makesh

et al., 2015). En conjunto, estos resultados apuntan a un papel principal de la IgD en la respuesta a *F. psychrophilum*, especialmente visible en los compartimentos mucosos. El presente estudio sugiere un rol más relevante de IgD, expresándose de manera más activa frente a la infección por *F. psychrophilum*. Además, continuando con la respuesta humoral, el presente trabajo respalda la hipótesis planteada por Danilova *et al.* (2015) y Castro *et al.* (2013), quienes afirman que la expresión de IgM es dominante en términos absolutos en todos los órganos y esencial para la protección inmune contra diferentes patógenos en diferentes rutas de infección (Danilova *et al.*, 2015). IgT, a pesar de ser menos transcrita que IgM, es fundamental en la respuesta inmunitaria a nivel de mucosas, y su papel en las respuesta sistémica no debe desconsiderarse (Castro *et al.*, 2013).

La migración de linfocitos B a áreas ricas en linfocitos T es mediada por la acción de quimiocinas específicas, altamente expresadas en estos órganos (Montero *et al.*, 2011a). Si bien es cierto que la función de cada quimiocina aún es poco estudiada en peces, está claro que cumplen un rol importante en la modulación de la expresión de algunos genes. El primer reporte de la función de CK11 es de Muñoz Atienza *et al.* (2019) en la cual se menciona que esta quimiocina durante la homeostasis, los transcritos en piel y branquias se expresan fuertemente, para las cuales no se ha informado un papel inmunológico hasta la fecha. Además, el autor agrega que CK11 ejerce una potente actividad antimicrobiana contra una amplia gama de patógenos de la trucha arco iris, tales como *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, y *Yersinia ruckeri* y un ciliato parásito *Ichthyophthirius multifiliis*. En el presente trabajo, nuestros resultados coinciden con los de Montero *et al.* (2011b), al observar que la transcripción de CK11 en la mucosa de la piel, ulcerada y sana, son elevados, sugiriendo una función como

atrayerente de linfocitos B, debido a la importante presencia de inmunoglobulinas. Así mismo, el presente trabajo coincide con Atienza et al (2019), en la cual CK11 aparentemente no cumple un rol antimicrobiano contra *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoíris. En el caso del bazo, se observó regulación negativa en la transcripción de genes y probablemente una disminución en el número de células T, sugiriendo que la principal función para esta quimiocina se da en la mucosa de la piel.

La transcripción de factores activadores de células T en la piel, en respuesta a infecciones transmitidas por el agua, podría ser específica según el patógeno encontrado; sin embargo, diversas infecciones parasitarias también parecen modular las respuestas de las células T de forma similar a la causada por virus y bacterias. Por ejemplo, los niveles de IFN γ en la piel aumentaron en la trucha arcoíris tras la infección con *Gyrodactylus salaris*, similar a los detectados por nosotros contra *Flavobacterium psychrophilum*, aunque otros genes relacionados con células T, como CD4 o CD8, no se modularon significativamente (Jorgensen et al., 2009). De igual forma, durante la infección con *Ichthyobodo necator*, también hubo un aumento significativo de IFN γ y CD4 (Chettri et al., 2014), como en el presente trabajo. En los peces afectados por flavobacteriosis del presente estudio, el aumento en los niveles de CD4 sugiere cierta correlación con un aumento en el número de células T, observado en el análisis inmunohistoquímico.

De manera interesante, en el presente estudio, ningún gen fue regulado significativamente, de manera positiva o negativa en el bazo, y la función de las células T citotóxicas también parece no estar regulada en respuesta a *Flavobacterium psychrophilum*. Según Takisawa et al. (2014), sugieren que Eomes es una molécula clave encargada de la función y diferenciación de células CD8 de

memoria, que podría expandirse de manera efectiva en caso de reinfección. La transcripción de Eomes se regula negativamente en la piel y en el bazo de los peces enfermos pero no de manera significativa, junto con la perforina para el caso del bazo, sugiriendo que no existe una activación de las células T citotóxicas, hasta probablemente después de una reinfección.

IFN γ es una citocina clave, que juega un papel importante contra la infección viral y bacteriana intracelular (Swain *et al.*, 2015). En el caso del bazo, el ligero aumento de niveles de expresión para el caso de IFN γ y CD4 no es estadísticamente significativo. Este aumento no sugiere una activación de la respuesta Th1 frente a *Flavobacterium psychrophilum*. Por otro lado, también se sabe que las células T CD8 + secretan IFN cuando se activan. Por ejemplo, en gimbuna carpín (*Carassius auratus langsdorfii*), los linfocitos CD8+ sensibilizados contra *Edwardsiella tarda* cuando son transferidos a destinatarios sanos, estimulan la expresión de IFN γ y perforina en linfocitos renales y esplénicos, contribuyendo a la citotoxicidad mediada por células contra el patógeno (Yamasaki *et al.*, 2014). Sorprendentemente, estos cambios en los niveles de expresión de CD8, IFN γ o perforina no fueron visibles en el bazo, lo que sugiere que la respuesta local es muy importante durante el curso de la enfermedad. Todos estos resultados resaltan la importancia de la piel en la respuesta inmune frente a la infección con *F. psychrophilum* en la trucha arcoíris.

IX. CONCLUSIONES

- Se detectó *Flavobacterium psychrophilum* en el total de truchas analizadas procedentes de Puno durante el mes de Febrero 2018.
- Niveles de mRNA CD4, CD8, perforin e IFN γ están reguladas en aumento en la lesiones ulcerativas durante una infección natural por *F. psychrophilum*.
- mRNA IgD secretado y de membrana también son reguladas en aumento en las lesiones ulcerativas.
- No hay respuesta immune visible en los niveles transcripcionales de bazo.
- Un elevado número de células expresando IgD y CD3 están presentes en la piel inflamada.
- Estos resultados apuntan a un papel relevante de las células T CD8 + e IgD en la respuesta local a *F. psychrophilum*.

X. RECOMENDACIONES

- Si la activación de las células T CD8 + a niveles sistémicos o locales se correlaciona con la protección contra la flavobacteriosis merece un estudio adicional, así mismo con la misma consideración, estudiar Ig D ya que este es un tema importante que se debe tener en cuenta para el futuro diseño de vacunas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abós B, Castro R, González Granja A, Havixbeck J, Barreda D, Tafalla C. (2014). Early activation of teleost B cells in response to rhabdovirus infection. *Journal of virology*, 89(3), 1768-80.
2. Abós B, Estensoro I, Perdiguero P, Faber M, Hu Y, Díaz-Rosales P, Granja AG, Secombes CJ, Holland JW, Tafalla C. (2018). Dysregulation of B Cell activity during proliferative kidney disease in rainbow trout, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1203.
3. Antaya C. (2008). Current Eco-Economical Impacts of *Flavobacterium psychrophilum*. *MMG 445 Basic Biotechnol. J.* 4:7-12.
4. Asakawa M, Kiyota S, Matsuo R, Nambu T. (2000). Outbreaks of bacterial coldwater disease in ayu in Kumamoto Prefecture. *Memoirs of the Faculty of Education, Kumamoto University, Natural Science.* 49: 47-55.
5. Bader JA, Shotts Jr E. (1998). Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. *J. Aquat. Anim. Health.* 10: 311-9.
6. Bernardet J-F, Kerouault B. (1989). Phenotypic and genomic studies of “*Cytophaga psychrophila*” isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1796-800.
7. Bertolini JM, Wakabayashi H, Watral VG, Whipple MJ, Rohovec JS. (1994). Electrophoretic detection of proteases from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. *J. Aquat. Anim. Health.* 6: 224-33.

8. Boardman T, Warner C, Ramírez-Gómez F, Matrisciano J, Bromage E. (2012). Characterization of an anti-rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CD3epsilon monoclonal antibody, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145 (1–2) 511–515.
9. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*, 10: 467–478.
10. Brown LL, Cox WT, Levine RP. (1997). Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Organ.* 29: 213- 8.
11. Bruno DW. (1992). *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the UK. *B. Eur. Assoc. Fish Pat.* 12: 215-6.
12. Bustos PA, Calbuyahue J, Montaña J, Opazo B, Entrala P, Soler Visenc R. (1995). First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.* 5(15): 162-164.
13. Castro R, Jouneau L, Pham HP, Bouchez O, Giudicelli V, Lefranc MP, Quillet E, Benmansour A, Cazals F, Six A, Fillatreau S, Sunyer O, Boudinot P. (2013). Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *PLoS Pathog.* 9:e1003098.
14. Chettri JK, Kuhn JA, Jaafar RM, Kania PW, Moller OS, Buchmann K. (2014). Epidermal response of rainbow trout to *Ichthyobodo necator*:

- Immunohistochemical and gene expression studies indicate a Th1-/Th2-like switch. *J. Fish. Dis.* 37: 771–783.
15. Cipriano RC, Holt RA. (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, cause of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry syndrome. United States Department of Interior, U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory; Fish Disease Leaflet No. 86
 16. Cliff JM, Andrade IN, Mistry R, Clayton CL, Lennon MG, Lewis AP, Duncan K, Lukey PT, Dockrell HM. (2004). Differential gene expression identifies novel markers of CD4+ and CD8+ cell activation following stimulation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 173 (1) 485- 493.
 17. Crump E, Perry M, Clouthier S, Kay W. (2001). Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbio.* 67 (2): 750-759
 18. Crump E, J Burian, P Allen, W Kay. (2005). Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiol.* 151, 3127- 3135.
 19. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. (2010). Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1183, 211-221.
 20. Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA. (2005). The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* 6:295–302.
 21. Decostere A, Lammens M, Haesebrouck F. (2000). Difficulties in experimental infection studies with *Flavobacterium psychrophilum* in

- rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion, oral and anal challenges. Res. Vet. Sci. 69:165-9.
22. Decostere A, D'Haese E, Lammens M, Nelis H, Haesebrouck F. (2001). In vivo study of phagocytosis, intracellular survival and multiplication of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), spleen phagocytes. Journal of fish diseases. 24, 481-487.
 23. Evensen Ø, Lorenzen E. (1996). An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Dis. Aquat. Organ. 25: 53-61.
 24. Garcia G, Pozet F, Michel C. (2000). Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. Dis. Aquat. Organ. 42: 191-7.
 25. Gomez D, Sunyer JO, Salinas I, 2013. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. Fish Shellfish Immunol. 35, 1729–1739.
 26. Groff JM, LaPatra SE. (2001). In: Lim CE, Webster CD. Nutrition and Fish Health New York: Haworth Press; pp. 11-78.
 27. Gultepe N, Tanrikul TT. (2006). Treatment methods of *Flavobacterium psychrophilum*: cause of rainbow trout fry syndrome (RFTS) and bacterial coldwater disease (BCWD) in Turkey. J. Fish Int. 1: 102-5.
 28. Henriksen MM, Kania PW, Buchmann K, Dalsgaard I. (2015). Evaluation of the immune response in rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after waterborne exposure to *Flavobacterium psychrophilum* and/or hydrogen peroxide. J. Fish Dis. 38(1) 55–66.

29. Hesami S, Allen KJ, Metcalf D, Ostland VE, MacInnes JJ, Lumsden JS. (2008). Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. *Can. J. Microbiol.* 54: 619-29.
30. Hoare R, Ngo TP, H Bartie, KL, Adams A. (2017). Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Veterinary Research.* 48, 43.
31. Holt RA. (1987). *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold water disease in salmonid fish. Ph.D. thesis. Oregon State University.
32. Jensen PA, Henriksen NH, Michelsen K, Madsen L, Dalsgaard I. (2003). Prevention of RTFS (rainbow trout fry syndrome) and limitation of medicine requirements in egg and fry stocks on Danish fish farms. DGU-Rapport No. 124-03; Charlottenlund: Danish Institute for Fisheries Research.
33. Jorgensen TR, Raida MK, Kania PW, Buchmann K. (2009). Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in skin and fin tissue during infection with a variant of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Folia Parasitol (Praha).* 56: 251–258.
34. Kägi D, Ledermann B, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. (1994). CD8⁺ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *European Journal of Immunology.* 24, 3068-3072.
35. Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, Gokmen MR, Perucha E, Jackson I, Lord G, Jenner R. (2012). T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2

differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements.
Nat Commun, 3: 1268

36. Kleinewietfeld M, Hafler DA. (2013). The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*, 25: 305–312.
37. Kum C, Kirkan S, Sekkin S, Akar F, Boyacioglu M. (2008). Comparison of in vitro antimicrobial susceptibility in *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout fry. *J. Aquat. Anim. Health*. 20: 245-51.
38. LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR, Congleton JL, Sun B, Cain KD. (2002). Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative percent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis*. 25: 703-13.
39. LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR, Cain KD. (2003). Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum* the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome. *J. Fish Dis*. 26: 377-84.
40. Laing KJ, Hansen JD. (2011). Fish T cells: recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol*, 35: 1282–1295.
41. Langevin C, Blanco M, Martin SA, Jouneau L, Bernardet JF, Houel A, Lunazzi A, Duchaud E, Michel C, Quillet E, Boudinot P. (2012). Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One* 7(6).
42. Leal E, Granja AG, Zarza C, Tafalla C. (2016). Distribution of T cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin and responsiveness to viral infection, *PLoS One* 11 (1) (2016) e0147477.

43. Lee KB, Heo GJ. (1998). First isolation and identification of *Cytophaga psychrophila* from cultured ayu Korea. *Fish Pathol.* 33: 37-8.
44. León J, Avalos R, Ponce M. (2009). *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Revista Peruana Biología*, 15: 117-124
45. Lo WF, Ong H, Metcalf ES, Soloski MJ. (1999). T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to Salmonella infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J. Immunol.* 162 (9): 5398- 406.
46. Lorenzen E, Olesen NJ. (1997) Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. *Dis. Aquat. Organ*; 31: 209-20.
47. Madetoja J, Nyman P, Wiklund T. (2000). *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* 43: 27-38.
48. Madetoja J, Dalsgaard I, Wiklund T. (2002). Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Dis. Aquat. Organ.* 52: 109-18.
49. Madetoja J, Nystedt S, Wiklund T. (2003). Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 217-23
50. Madsen L, Dalsgaard I. (2008). Water recirculation and good management: potential methods to avoid disease outbreaks with *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 31: 799-810.
51. Makesh M, Sudheesh PS, Cain KD. (2015). Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an

- attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. *Fish Shellfish Immunol.* 44: 156–163.
52. Maki JL, Dickerson HW. (2003). Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10: 876–881.
53. Mateo EC, Castro T, Sierralta V, Mateo DR. (2016). Bacteriological and histopathological study of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Peru. *Journal of Fish Disease.* 40: 941- 946.
54. Milstein O, Hagin D, Lask A, Reich-Zeliger S, Shezen E, Ophir E, Eidelstein Y, Afik R, Antebi Y, Dustin M, Reisner Y. (2011). CTLs respond with activation and granule secretion when serving as targets for T-cell recognition. *Blood*, 117: 1042–1052.
55. Miwa S, Nakayasu C. (2005). Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Organ.* 67: 93-104.
56. Montero J, Ordas MC, Alejo A, Gonzalez-Torres L, Sevilla N, Tafalla C. (2011a). CK12, a rainbow trout chemokine with lymphocyte chemo-attractant capacity associated to mucosal tissues. *Mol. Immunol.* 48: 1102–1113.
57. Montero J, Garcia J, Ordas MC, Casanova I, Gonzalez A, Villena A, Coll J, Tafalla C. (2011b). Specific regulation of the chemokine response to viral hemorrhagic septicemia virus at the entry site. *J. Virol.* 85: 4046–4056.
58. Muñoz- Atienza E, Aquilino C, Syahputra K, Al-Jubury A, Araújo C, Skov J, Kania PW; Hernandez PE, Buchmann K, Cintas LM, Tafalla C. (2019).

- CK11, a Teleost Chemokine with a Potent Antimicrobial Activity. *J Immunol* 180:568
59. Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F. (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 26: 563-74.
60. Nicolas, P., Mondot, S., Achaz, G., Bouchenot, C., Bernardet, J. F., & Duchaud, E. (2008). Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3702-9.
61. Nilsen H, Olsen AB, Vaagnes Ø, Hellberg H, Bottolfsen K, Skjelstad H, Colquhoun DJ. (2011). Systemic *Flavobacterium psychrophilum* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) farmed in fresh and brackish water in Norway. *J. Fish Dis.* 34: 403-8.
62. Noga EJ. (2010). *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press. 2nd Ed. (June 2010). 536 pp
63. Orieux N, Douet DG, Le Hénaff M, Bourdineaud JP. (2013). Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* bacterial cells in farmed rainbow trout: characterization of metallothionein A and interleukin 1- β genes as markers overexpressed in spleen and kidney of diseased fish. *Vet. Microbiol.* 162 (1): 127-35.
64. Papadopoulou A, Dalsgaard I, Lindén A, Wiklund T. (2017). *In vivo* adherence of *Flavobacterium psychrophilum* to mucosal external surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *J. Fish Dis.* 40(10) 1309–1320.
65. Post GP (1987). *Textbook of fish health*. New Jersey; T.F.H. Publications. 2nd Ed. 288 pp.

66. PRODUCE, 2017. Portal de Evaluación de Impacto y Estudios Económicos 2017. Ministerio de la Producción. Lima. [Internet]. [Acceso junio 2018]. Disponible en: <http://www.ogeiee.produce.gob.pe/>
67. Ramírez-Gómez F, Greene W, Rego K, Hansen JD, Costa G, Kataria P, Bromage ES. (2012). Discovery and characterization of secretory IgD in rainbow trout: secretory IgD is produced through a novel splicing mechanism, J. Immunol. 188 (3) 1341–1349.
68. Ramsrud A, LaFrentz S, LaFrentz B, Cain K, Call D. (2007). Differentiating 16S Rna alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. Journal of Fish Diseases, 30: 175–180.
69. Rombout J.H., Yang G., Kiron V. (2014). Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 40:634–643.
70. Ruan Q, Kameswaran V, Zhang Y, Zheng S, Sun J, Wang J, et al. (2011) The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORgamma-RORgamma T transcriptional axis. J Exp Med 208: 2321–2333.
71. Salinas I (2015). The mucosal immune system of teleost fish. Biology (Basel). 4:525–39.
72. Santos Y, Huntly PG, Turnbull A, Hastings TS. (1992). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in the United Kingdom. Bull Eur. Assoc. Fish Pathol. 12: 209-10.
73. Schmidtke LM, Carson J. (1995). Characteristic of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia. Dis. Aquat. Organ. 21: 157-61.
74. Schorpp M, Bialecki M, Diekhoff D, Walderich B, Odenthal J, Maischein HM, Zapata A, Boehm T. (2006). Conserved functions of Ikaros in vertebrate

- lymphocyte development: genetic evidence for distinct larval and adult phases of T cell development and two lineages of B cells in zebrafish. *J Immunol*, 177: 2463–2476
75. Secades P, Alvarez B, Guijarro JA. (2001). Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2436-44.
76. Siwicki AK, Pozet F, Morand M, Kazun K, Glqbski E, Trapkowska S. (2004). Atypical bacterial gill disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence on non specific humoral defence mechanisms. *Archiv. Polish Fish.* 12: 5-12.
77. Strasser A, Jost PJ, Nagata S (2009). The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, 30: 180–192.
78. Swain B, Basu M, Lenka S, Das S, Jayasankar P, Samanta M. (2015). Characterization and Inductive Expression Analysis of Interferon Gamma-Related Gene in the Indian Major Carp, Rohu (*Labeo rohita*). *DNA and Cell Biology.* 34:5, 367-378.
79. Tacchi L, Musharrafieh R, Larragoite ET, Crossey K, Erhardt EB, Martin SAM, LaPatra SE, Salinas I. (2014). Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nat. Commun.* 5:5205.
80. Takizawa F, Koppang EO, Ohtani M, Nakanishi T, Hashimoto K, Fischer U, Dijkstra JM. (2011). Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Mol. Immunol.* 48: 1360–1368.
81. Takizawa F, Araki A, Ohtani M, Toda H, Saito Y, Soto Lampe V, Martinus Dijkstra J, Ototake M, Moritomo T, Nakanishi T, Fischer U. (2014). Transcription analysis

- of two Eomesodermin genes in lymphocyte subsets of two teleost species. *Fish & Shellfish Immunology* 36 (2014) 215e222
82. Toranzo AE, Barja JL. (1993). Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. *Bull Eur. Assoc. Fish Pathol.* 13: 30-2.
83. Toyama T, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H. (1994). Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathol.* 29: 271-5.
84. Urdaci MC, Chakroun C, Faure D, Bernardet JF. (1998). Development of polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Res. Microbiol.* 149: 519-30.
85. Vatsos IN, Thompson KD, Adams A. (2003). Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Dis. Aquat. Organ.* 26: 115-26.
86. Wakabayashi H, Toyama T, Iida T. (1994). A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish. Pathol.* 29: 101-4.
87. Wiklund T, Kass K, Lönström L, Dalsgaard I. (1994). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. *Bull Eur. Assoc. Fish Pathol. Pat.* 14: 44-6.
88. Wood JW. (1979). Diseases of Pacific salmon their prevention and treatment. 3rd ed. Olympia: Washington Department of Fisheries. 82 pp.
89. www.vetinst.no/sykdom-og-agens/flavobacterium-psycrophilum (página visitada el 11 setiembre 2018).

90. Xu Z, Parra D, Gomez D, Salinas I, Zhang Y-A, von Gersdorff Jørgensen L, Heinecke RD, Buchmann K, LaPatra S, Sunyer O. (2013). Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U A.* 110:13097–102.
91. Yamasaki M, Araki K, Nakanishi T, Nakayasu C, Yamamoto A. (2014). Role of CD4 (+) and CD8alpha (+) T cells in protective immunity against *Edwardsiella tarda* infection of ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish & shellfish Immunology* 36: 299-304.
92. Yáñez JM, Martínez V. (2010). Genetic factors involved in resistance to infectious diseases in salmonids and their application in breeding programmes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42: 1-13.
93. Zahl IH, Samuelsen O, Kiessling A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38: 201–218.
94. Zhang L, Zhao Y. (2007). The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4 (+) CD25(+) T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol*, 211: 590–597.
95. Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, LaPatra S, Batholomew J, Sunyer O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol*, 11: 827–835.