



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN
RELATIVA DE GENES CON ACTIVIDAD
PROINFLAMATORIA IL-1 β , TNF- α E IL-6
FRENTE A INFECCIONES CAUSADAS
POR *Yersinia ruckeri* EN TRUCHAS
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) DE LA
SIERRA CENTRAL DEL PERÚ”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN SANIDAD ACUÍCOLA

TANIA RODRÍGUEZ CORNEJO

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 mamá Milagros y hermana Claudia, por el apoyo constante durante mi formación profesional. Son las mejores, las adoro.

A mi papá Fernando, tu espíritu me cuida y guía mis pasos. Me haces falta cada día y todos mis logros son para ti.

A Papá César, este logro llega a ti un poco tarde, pero sé que estarás orgulloso. Te extrañamos mucho.

A Miguel, por el apoyo emocional y el acompañamiento durante todo este proceso y todo el tiempo que venimos caminando de la mano.

AGRADECIMIENTOS

Al Universo, por todos los regalos que me da.

Al Dr. Marcos Enrique Serrano Martínez por su apoyo como asesor y coordinador de la Maestría.

Al Dr. Luis Antonio Llanco Albornoz, por su ayuda constante como co-asesor y por motivarme a seguir sus pasos en este camino de la investigación.

Al Dr. Brian Dixon, Dra. Tania Rodríguez Ramos y a todo el equipo del Laboratorio del Dr. Brian Dixon por el apoyo brindado para la realización de mi tesis durante mi estadía en la Universidad de Waterloo, Canadá. Son excelentes. Gracias por las enseñanzas y la amistad.

A Carmen Hurtado y Fernando Mesías por la gran ayuda brindada durante el muestreo. Infinitas gracias.

A los truchicultores, por su interés en el estudio y por facilitarme el acceso a sus piscigranjas.

A todos mis amigos de la Maestría, gracias por estos dos años compartiendo juntos. Mi amistad incondicional para todos ustedes.

A todos los profesores que nos impartieron sus conocimientos y nos motivaron durante este proceso, y al personal administrativo por el apoyo constante.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar el grado de Maestro en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC, Convenio de Gestión N°230-2015-FONDECYT-DE-PROMOCIÓN 2.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
III.	MARCO TEÓRICO.....	4
	3.1 Cultivo de trucha en el Perú.....	4
	3.2 Enfermedades infecciosas en el cultivo de trucha.....	5
	3.3 Enfermedad entérica de la boca roja o Yersiniosis.....	5
	3.4 Respuesta inmune en peces teleósteos.....	8
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	13
V.	OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	14
VI.	METODOLOGÍA.....	15
	6.1 Diseño del estudio.....	15
	6.2 Población y tamaño de muestra.....	15
	6.3 Procedimientos y técnicas.....	16
	6.3.1 Colección de peces.....	16
	6.3.2 Aislamiento bacteriano y colección de tejidos.....	17
	6.3.3 Análisis microbiológico.....	18

6.3.4 Identificación molecular de <i>Y. ruckeri</i> mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa	19
6.3.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	21
6.3.6 Expresión de genes por qPCR	22
6.3.7 Análisis de datos.....	24
6.3.8 Ensayo piloto: Extracción de proteínas a partir de muestras de suero y Western blot.....	24
6.3.9 Consideraciones éticas.....	26
VII. RESULTADOS.....	27
7.1 Transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias	27
7.2 Ensayo piloto: Determinación de presencia de proteínas IL-1 β , TNF- α e IL-6 en muestras de suero de truchas naturalmente infectadas con <i>Y. ruckeri</i> mediante Western blot.	31
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIONES	52
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers usados para la detección del gen 16S rRNA de *Y. ruckeri*

Tabla 2. Primers usados para el qPCR en tiempo real de los genes evaluados

Tabla 3. Valores de Δ CT para el gen que codifica IL-6 en bazo, riñón anterior y piel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Signos clínicos asociados a infección por *Y. ruckeri*: hemorragia oral y distensión abdominal.

Figura 2. Lesiones internas asociadas a infección por *Y. ruckeri*: presencia de petequias en hígado y bazo agrandado (esplenomegalia).

Figura 3. Colonias en medio TSA y bacilos Gram negativos observados al microscopio.

Figura 4. Producto amplificado de *Y. ruckeri* por PCR convencional.

Figura 5. Expresión relativa del gen que codifica IL-1 β en bazo, riñón anterior y piel.

Figura 6. Expresión relativa del gen que codifica TNF- α en bazo, riñón anterior y piel.

Figura 7. Expresión relativa del gen que codifica IL-6 en bazo.

Figura 8. Tinción Ponceau y Western blot para IL-1 β .

Figura 9. Tinción Ponceau y Western blot para TNF- α .

Figura 10. Tinción Ponceau y Western blot para IL-6.

RESUMEN

La enfermedad entérica de la boca roja o Yersiniosis, causada por la bacteria *Yersinia ruckeri*, es considerada una amenaza importante para la salud de poblaciones de salmónidos de cultivo en todo el mundo. En el Perú, *Y. ruckeri* genera pérdidas económicas en la industria de cultivo de truchas arcoíris. Para estudiar la respuesta inmunológica frente a esta infección bacteriana, se evaluó la expresión cuantitativa relativa de genes que codifican las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6 en bazo, riñón anterior y piel de truchas infectadas y controles. Se recolectaron 32 truchas de cultivo de piscigranjas de la Sierra Central del Perú, que mostraron signos clínicos de la enfermedad. La identidad específica de la bacteria, aislada de bazo y riñón anterior, fue confirmada por técnicas microbiológicas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Adicionalmente, 35 truchas de las mismas poblaciones donde ocurrieron los brotes de enfermedad, que no mostraron signos clínicos, fueron recolectadas como controles. La expresión relativa de los tres genes de citoquinas, determinada por qRT-PCR en tiempo real, mostró incremento altamente significativo en bazo, riñón anterior y piel de peces infectados por *Y. ruckeri*. La mayor expresión fue observada en bazo, sobre todo para los genes que codifican IL-1 β e IL6, que se expresaron 264 y 318 veces más respectivamente con relación a los controles y a la expresión del factor de elongación 1 alfa (EF1 α). Estos resultados muestran una respuesta inmune activa local y sistémica frente a la infección bacteriana estudiada. Este tipo de estudios facilitará el desarrollo de mejores regímenes de tratamiento y vacunación en la acuicultura, al enriquecer nuestra comprensión sobre la inmunología de peces.

Palabras claves: *Oncorhynchus mykiss*, *Yersinia ruckeri*, qRT-PCR, respuesta inmune

ABSTRACT

Enteric red mouth (ERM) disease or Yersiniosis, caused by bacteria *Yersinia ruckeri*, has emerged as a significant health threat to farmed salmonid populations worldwide. In Peru, *Y. ruckeri* contributes to economic losses for the rainbow trout aquaculture industry. In order to study the immunological response against this bacterial infection, quantitative relative expression of pro-inflammatory cytokines codifying genes IL-1 β , TNF- α and IL-6 in spleen, head kidney and skin of infected and control fish, were evaluated. Thirty-two trout from Peruvian fish farms, that showed clinical signs of the disease, were collected. The specific identity of bacteria isolated from spleen and head kidney tissues was confirmed via standard microbiological techniques and polymerase chain reaction (PCR). Additionally, thirty-five fish from the same cultured populations where disease outbreaks occurred, displaying no clinical signs of disease, were collected as controls. Relative expression of three cytokines genes, as determined by real time qRT-PCR, showed highly significant upregulation in spleen, head kidney and skin of fish infected with *Y. ruckeri*. The highest upregulation was seen in spleen tissue, and mainly for IL-1 β and IL6 with 264 and 318-fold changes respectively, relative to controls and expression of elongation factor 1 alpha (EF1 α). These results show an active local and systemic immune response against the studied bacterial infection. This kind of study will facilitate improvements to treatment and vaccination regimes for aquaculture while also improving our understanding of fish immunology.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, *Yersinia ruckeri*, qRT-PCR, immune response.

I. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola mundial se mantiene en constante crecimiento, y la acuicultura, actualmente, aporta la mitad del pescado destinado a consumo humano (FAO, 2018). En el Perú, la acuicultura aún presenta un desarrollo incipiente, aunque las condiciones son favorables para potenciar esta actividad, de importancia tanto para el desarrollo económico como para mejorar la nutrición en el país (FONDEPES, 2004). El cultivo de trucha arcoíris es el primero en importancia en cuanto a volumen a nivel nacional (PRODUCE, 2017).

Los brotes de enfermedades en peces provocan pérdidas económicas en la acuicultura, siendo la enfermedad entérica de la boca roja causada por *Yersinia ruckeri*, una de las enfermedades más importantes en el cultivo de trucha arcoíris (Kumar *et al.*, 2015; SANIPES, 2017).

Los estudios sobre genes asociados a la respuesta inmune frente a enfermedades en peces que contribuyan a una mejor comprensión de los mecanismos de patogenicidad e inmunidad son importantes en la búsqueda de soluciones a esta problemática, favoreciendo el desarrollo de tratamientos y vacunas más eficaces. Sin embargo, aún son pocos los estudios relacionados al tema.

Por esto, el presente estudio pretende caracterizar cambios en la expresión de genes con actividad proinflamatoria frente a infecciones causadas por *Y. ruckeri* en truchas arcoíris provenientes de la Sierra Central del Perú, esperando generar conocimiento que aporte a futuras investigaciones, que a su vez contribuyan al desarrollo sostenible del cultivo de trucha arcoíris en el país.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los brotes de enfermedades y episodios de mortalidad generan un impacto negativo en el desarrollo económico de la acuicultura nacional. *Yersinia ruckeri* es uno de los principales agentes etiológicos causales de enfermedades infecciosas en la producción de trucha arcoíris, generando mortalidades que pueden llegar al 70% en infecciones agudas. En caso de brotes, se dan tratamientos indiscriminados (muchas veces sin diagnóstico previo) con antibióticos, lo que genera resistencia bacteriana y contaminación ambiental, además de ser un problema con implicancia en la salud pública.

Por este motivo, los estudios orientados a identificar cambios en la expresión de genes de la respuesta inmune frente a enfermedades en peces son importantes para la generación de nuevos conocimientos relacionados a la patogénesis e inmunidad frente a infecciones, útiles para desarrollar alternativas de tratamiento y vacunación más eficaces, que contribuirán a la disminución de la casuística de enfermedades y al impacto económico que éstas generan en el cultivo de la trucha arcoíris.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Cultivo de trucha en el Perú

La carne de pescado es uno de los productos alimenticios de mayor comercialización en el mundo y la oferta mundial per cápita alcanzó los 20,3 kg en el 2016. La producción de pesca y acuicultura mundial en el 2016 fue de 171 millones de toneladas, siendo el aporte de la acuicultura de 80 millones de toneladas, lo que significa que, actualmente, la acuicultura provee la mitad del pescado destinado a consumo humano (FAO, 2018). Las proteínas que contiene este recurso representan un componente nutricional fundamental, ya que una porción de 150 gramos puede proporcionar hasta el 60 % del requerimiento proteínico diario de un adulto, sobre todo en aquellos países con una elevada densidad poblacional donde el aporte proteínico total puede ser escaso (FAO, 2014).

Perú es considerado un país pesquero de importancia mundial. La producción de pesca y acuicultura en el año 2016 fue de 3 897 miles de toneladas, de las cuales solo el 2.6% (100 000 toneladas) provenía de la acuicultura (FAO, 2018), siendo la trucha la principal especie cosechada con un volumen de 52 245 toneladas (PRODUCE, 2017). La acuicultura nacional presenta un desarrollo incipiente, con una producción menor en comparación a otros países de la región, sin embargo, Perú cuenta con condiciones naturales favorables para su desarrollo al poseer 354 lagunas altoandinas de dimensiones y temperaturas aptas para la crianza de truchas (FONDEPES, 2004). La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fue introducida al Perú aproximadamente en el

año 1928, y en los últimos años su producción ha tenido un considerable incremento. Su cultivo se desarrolla en las zonas altoandinas, especialmente en los departamentos de Puno, Junín, Huancavelica, Pasco, Ayacucho, Arequipa, Tacna y Cusco (FONDEPES, 2004; Sierralta *et al.*, 2013), regiones que en su mayoría pertenecen a la Sierra del Perú, donde se encuentra el 70.6% de la población en situación de pobreza extrema (INEI, 2017), por lo que su cultivo es un potencial elemento de desarrollo y sustento.

3.2 Enfermedades infecciosas en el cultivo de trucha

Los brotes de enfermedades en peces provocan importantes pérdidas en la acuicultura, siendo la amenaza aún mayor en un marco de cambio climático. Por esto, el manejo sanitario de los peces y bioseguridad adecuados son esenciales para este sector (FAO, 2016).

Mateo *et al.* (2017) identificaron a *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* y *Flavobacterium psychrophilum*, a través de análisis microbiológico, como los principales agentes bacterianos asociados a mortalidad y pobre crecimiento en truchas arcoíris en la región Junín-Perú.

3.3 Enfermedad entérica de la boca roja o Yersiniosis

La enfermedad entérica de la boca roja o Yersiniosis es una de las principales enfermedades bacterianas en salmónidos, cuyo agente etiológico es *Y. ruckeri*, la cual fue aislada por primera vez en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en los años 50,

en Hagerman Valley, Idaho, USA (Ross y Rucker, 1966). Aunque la infección por esta bacteria afecta a distintas especies de peces, la trucha arcoíris es la más susceptible (Furones *et al.*, 1993). *Y. ruckeri* está ampliamente distribuida, encontrándose en Norteamérica, Medio Oriente, Europa, Sudáfrica, China, Australia, Nueva Zelanda, India, Venezuela y Chile (Bravo y Kojagura, 2004; Kumar *et al.*, 2015; Troncoso *et al.*, 1994).

Y. ruckeri es un bacilo gram negativo con extremos redondeados, facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Ha sido subdividida en 4 serotipos con diferentes subgrupos: Serotipo O1 subdividido en 2 subgrupos O1a (serovar I) y O1b (serovar III), serotipo O2 (serovar II) subdividido en 3 subgrupos O2a, O2b y O2c, serotipo O3 (serovar V) y serotipo O4 (serovar VI). El serotipo O1a está asociado a la mayoría de los brotes (Romalde *et al.*, 1993).

Esta enfermedad afecta a los peces en todos sus estadios, pero suele ser aguda en alevines y crónica en peces adultos. Los signos clínicos son letargia, nado cerca de la superficie, pérdida de apetito, exoftalmia, oscurecimiento de la piel (melanosis), abdomen distendido, y hemorragias en la cavidad oral y la superficie corporal (cabeza, base de las aletas y a lo largo de la línea lateral) (Tobback *et al.*, 2007). Las hemorragias características en y alrededor la cavidad oral le dieron el nombre de enfermedad de la boca roja, sin embargo, este signo no es aparente en todos los peces afectados y su ausencia no implica que no haya infección, por lo que la enfermedad también ha sido referida como Yersiniosis (Sirvas *et al.*, 2011; Tobback *et al.*, 2007). La infección

aguda es severa y está asociada a la presencia de hemorragia en cavidad oral (Carson y Wilson, 2009). Estudios han detectado el signo de boca roja con relativa baja frecuencia (Sierralta *et al.*, 2013). Internamente se pueden observar petequias en la superficie del hígado, páncreas, intestino, vejiga natatoria y músculos laterales, también se puede apreciar el bazo agrandado y oscurecido, y el intestino inflamado, conteniendo un fluido opaco y purulento (Kumar *et al.*, 2015). La severidad de esta enfermedad se asocia a la virulencia de la cepa y al grado de estrés (Tobback *et al.*, 2007). Las pérdidas por esta enfermedad pueden llegar a ser muy altas, las mortalidades tras infecciones agudas varían entre 30-70 % (Altinok, 2004; Horne y Barnes, 1999). En condiciones donde *Y. ruckeri* es endémica se puede observar una mortalidad baja pero persistente y las pérdidas pueden variar entre 10-15% en un ciclo productivo (Horne y Barnes, 1999).

La infección por *Y. ruckeri* es transmitida por contacto directo entre peces infectados y no infectados. Se ha demostrado la existencia de portadores, hasta el 25% de una población de truchas arcoíris puede cargar *Y. ruckeri* en el intestino, pudiendo liberar la bacteria en condiciones de estrés. La formación de biofilms es otro mecanismo importante para la supervivencia de la bacteria en superficies y sedimentos del ambiente acuático, y la transmisión de la enfermedad también se asocia a vectores como invertebrados acuáticos y aves (Kumar *et al.*, 2015).

En el Perú, Bravo y Kojagura (2004) aislaron *Y. ruckeri* por primera vez, en el departamento de Junín. Sirvas *et al.* (2011) identificaron 19 cepas de *Y. ruckeri* mediante PCR, tanto en peces con y sin signología clínica, en Canta, Lima. Sierralta *et*

al. (2013) aislaron cepas de *Y. ruckeri* correspondientes al serotipo O1a, y mencionaron que en los últimos años los episodios de mortalidad fueron más frecuentes en la región de Junín. SANIPES (2017) informó que dentro del Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos – 2016 se encontró una prevalencia de *Y. ruckeri* de 8% en truchas arcoíris, hallándose la enfermedad en la región Puno.

3.4 Respuesta inmune en peces teleósteos

Los peces carecen de medula ósea y ganglios linfáticos como principal característica de su sistema inmune. Sus órganos linfoides primarios incluyen al timo, donde se diferencian y seleccionan los linfocitos T; y al riñón anterior, órgano de principal importancia en la hematopoyesis y donde se encuentran una gran cantidad de macrófagos y linfocitos B. Los órganos linfoides secundarios incluyen al bazo, donde ocurre la presentación de antígenos y se induce la respuesta inmune adaptativa; y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), que cuenta con componentes del sistema inmune innato y adaptativo (Vega-Ramírez *et al.*, 2010; Zapata *et al.*, 1996).

El MALT comprende al tejido linfoide asociado al intestino (GALT), tejido linfoide asociado a las branquias (GIALT), tejido linfoide asociado a la piel (SALT) y tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT). Estos tejidos son de vital importancia en peces ya que el ambiente acuático posee una microbiota rica y diversa, encontrándose, la barrera epitelial, en constante exposición a distintos patógenos, y a su vez tolerando la microbiota comensal (Gomez *et al.*, 2013; Salinas, 2015).

Adicionalmente, las citoquinas son proteínas que regulan las actividades de las células implicadas en la defensa del organismo, éstas son sintetizadas y secretadas, en primera instancia, cuando las células centinelas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a través de sus receptores, induciéndose la inflamación y otros mecanismos de defensa. Algunas de las citoquinas proinflamatorias de mayor importancia son: interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Tizard, 2009; Vega-Ramírez *et al.*, 2010).

La familia de citoquinas IL-1 está conformada por 11 miembros, en mamíferos, siendo los principales: Interleuquina 1 α (IL-1 α), Interleuquina 1 β (IL-1 β), receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) e IL-18, quienes tienen un rol importante en la regulación de la inflamación y la respuesta inmune. IL-1 β es un potente activador de la respuesta inmune humoral y es producida por una gran variedad de células, principalmente por monocitos y macrófagos (Bird *et al.*, 2002, Zou y Secombes, 2016).

IL-1 β fue la primera interleuquina caracterizada en peces teleósteos y cartilagosos, su rol como regulador de la inflamación es conservado en peces. También modula la expresión de miembros de la familia IL-17, que son importantes en la defensa frente a infecciones bacterianas. IL-1 β induce la expresión de genes proinflamatorios como: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-34 y ciclooxigenasa -2 (COX-2) en macrófagos y leucocitos primarios, atrae leucocitos estimulando la producción de quimiocinas en el lugar de infección, y algunos estudios han demostrado que estimula la producción de anticuerpos al ser administrada junto a vacunas bacterianas como adyuvante (Zou y

Secombes, 2016). La administración intraperitoneal de IL-1 β recombinante en truchas incrementa la migración de leucocitos a la cavidad peritoneal, aumenta la actividad fagocítica e induce la expresión de IL-1 β , COX-2 y lisozima en los órganos linfoides (Hong *et al.*, 2003). La administración directa de proteína recombinante IL-1 β en el intestino de carpas chinas, provocó inflamación intestinal severa (Bo *et al.*, 2015).

TNF- α es una citoquina proinflamatoria principalmente producida por monocitos/macrófagos activados, que ejerce una variedad de funciones inmunológicas sobre la regulación de la inflamación y la respuesta inmune celular. TNF- α es un mediador importante en la respuesta inmune frente a infecciones causadas por bacterias Gram negativas (Manning y Nakanishi, 1996; Zou *et al.*, 2003). Se ha demostrado su existencia en trucha arcoíris y otras especies de peces (Zou *et al.*, 2003).

En peces, TNF- α es uno de los genes del sistema inmune que se expresa con mayor rapidez ante una infección. De manera similar a los mamíferos, TNF- α de peces tiene un rol clave en la regulación de la inflamación y muestra funciones superpuestas con IL-1 β . TNF- α estimula la actividad fagocítica de los leucocitos incrementando su capacidad de destruir microbios; también estimula la expresión de varios genes del sistema inmune asociados a la inflamación como: IL-1 β , IL-8, IL-17C, TNF- α , COX-2 y genes envueltos en la respuesta antimicrobiana (Zou y Secombes, 2016).

Se sugiere que TNF- α está envuelta en la proliferación y migración de leucocitos en peces, incrementa la migración de macrófagos de una manera dosis-dependiente, activa

la expresión de quimiocinas en células locales como las endoteliales, y ejecuta una actividad pro-apoptótica (Zou y Secombes, 2016). Al inyectarse TNF- α intraperitonealmente en doradas, se observó un rápido reclutamiento de fagocitos al lugar de inyección e inducción de granulopoyesis en el riñón anterior (García-Castillo *et al.*, 2004).

IL-6 es una citoquina producida por macrófagos y mastocitos, asociada a una respuesta inflamatoria temprana y a la inmunidad adquirida, siendo la mediadora principal de la reacción de fase aguda y choque séptico. Su producción es estimulada por endotoxinas bacterianas, IL-1 y TNF- α . También promueve la proliferación de células B (Manning y Nakanishi, 1996; Tizard, 2009).

En peces, IL-6 ocupa un rol central en la respuesta inmune ya que actúa como un agente proinflamatorio promoviendo reacciones de fase aguda, hematopoyesis y diferenciación de células inmunes frente a infecciones bacterianas o parasitarias (Zante *et al.*, 2015). En este sentido, Abós *et al.* (2016) mostraron que, en la trucha, los efectos de IL-6 en células B de bazo incluyen proliferación, activación de NF- κ B, incremento en la secreción de IgM, incremento en la transcripción de Blimp1 y disminución de la expresión de MHC-II de superficie, revelándola como un factor de diferenciación para células secretoras de IgM.

Estudios *in vitro* han mostrado que IL-6 recombinante es un promotor del crecimiento de macrófagos y que incrementa la expresión génica de péptidos antimicrobianos

(AMP). Tras la inyección de IL-6 recombinante en meros, se observó incremento en la expresión de varios factores de transcripción envueltos en la diferenciación de células T (Tbet, GATA3, c-maf) e IgMH en riñón anterior y bazo, por lo que se podría asociar a IL-6 con una respuesta de tipo Th2 (Zou y Secombes, 2016).

Muchos estudios de expresión de genes relacionados a la respuesta inmune se han realizado de manera experimental en salmónidos como la trucha arcoíris, y para evaluar la respuesta a desafíos con *Y. ruckeri* y otros patógenos de importancia en su cultivo (Chettri *et al.*, 2012; Croisetiere *et al.*, 2008; Evenhuis y Cleveland, 2012; Wiens *et al.*, 2006).

Raida y Buchmann (2009) hallaron incremento en la expresión relativa de los genes IL-1 β , TNF- α e IL-6 en hígado de truchas arcoíris desafiadas con *Y. ruckeri*, en comparación con un grupo control. Asimismo, Harun *et al.* (2011) encontraron incremento en la expresión de los genes IL-1 β , TNF- α e IL-6 en bazo y branquias de truchas arcoíris infectadas con *Y. ruckeri*, en comparación con truchas arcoíris que solo fueron inyectadas con PBS.

Teniendo en cuenta la importancia de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6 en la respuesta inmune de los peces, en el presente estudio se evaluarán los cambios en su expresión frente a infecciones naturales causadas por *Y. ruckeri* en truchas arcoíris de la Sierra Central del Perú.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La producción de truchas en el Perú se encuentra en crecimiento, teniéndose los recursos necesarios para el potenciamiento de este sector, sin embargo, los brotes de enfermedades seguidos de una mortalidad elevada generan impacto en el desarrollo económico de la industria acuícola y del país, restringiendo la expansión y crecimiento de esta importante actividad.

Yersinia ruckeri es el agente etiológico de una de las más importantes enfermedades en la producción de trucha arcoíris a nivel mundial y nacional, habiéndose reportado principalmente en los departamentos de Junín, Lima y Puno. Su distribución es amplia y genera alta morbilidad y mortalidad.

Estudios sobre la expresión de genes envueltos en la respuesta inmune frente a infecciones en peces vienen siendo realizados alrededor del mundo y buscan contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos de patogenicidad y respuesta frente a estas infecciones, sin embargo, dichos estudios solo han sido realizados de manera experimental, bajo condiciones controladas, por lo que no se conoce el desenvolvimiento de la respuesta inmune frente a infecciones naturales. La generación de conocimientos sobre el tema permitirá una mayor eficacia en el desarrollo de vacunas y un mejor manejo sanitario en caso de brotes de enfermedad.

V. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo general

- Determinar la expresión relativa de genes con actividad proinflamatoria IL-1 β , TNF- α e IL-6 frente a infecciones causadas por *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de la Sierra Central del Perú.

Objetivos específicos

- Determinar la expresión relativa de genes con actividad proinflamatoria IL-1 β , TNF- α e IL-6 en bazo, riñón anterior y piel, de truchas arcoíris clínicamente sanas y truchas arcoíris naturalmente infectadas por *Yersinia ruckeri* a través de qRT-PCR en tiempo real.
- Evaluar la asociación entre los niveles de expresión de genes con actividad proinflamatoria y el estatus sanitario de los animales estudiados.
- Realizar un ensayo piloto para evaluar la abundancia de las proteínas IL-1 β , TNF- α e IL-6 en muestras de suero de truchas arcoíris clínicamente sanas y truchas arcoíris naturalmente infectadas por *Yersinia ruckeri* a través de la evaluación de los perfiles proteicos mediante Western blot.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño del estudio

La investigación realizada es de tipo descriptiva.

6.2 Población y tamaño de muestra

La población estudiada estuvo conformada por 67 truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) hembras de entre 5-9 meses de edad, con una talla aproximada de 22-25 cm y un peso aproximado de 150-250 gramos, pertenecientes a las fases juvenil y de engorde. Dichas truchas provinieron de piscigranjas de crianza semi-intensiva, con un sistema americano (estanques de cemento) de la Sierra Central del Perú (Jauja, Huaraz, Huancayo, Huaura y Concepción) durante el periodo febrero – junio 2018, las cuales se dividieron en dos grupos. El primer grupo estuvo conformado por 32 truchas naturalmente infectadas por *Y. ruckeri*, las cuales presentaron signos clínicos sugerentes de Yersiniosis (letargia, nado cerca de la superficie, exoftalmia, melanosis, abdomen distendido y hemorragias en cavidad oral y superficie corporal), y cuya determinación del patógeno mediante Reacción en cadena de la Polimerasa se encuentra detallada en el punto 6.3.4. Asimismo, la procedencia de los peces se muestra en el Anexo 1. El segundo grupo, denominado grupo control, incluyó 35 truchas clínicamente sanas (sin evidencia de lesiones ni cambios en el comportamiento) de las mismas pozas donde ocurrieron brotes de enfermedad, cuya procedencia se detalla en el Anexo 2.

6.3 Procedimientos y técnicas

6.3.1 Colección de peces

Los peces fueron anestesiados por inmersión usando una solución de metasulfonato de tricafina (100mg/L) hasta la pérdida de la conciencia y respuesta motora del pez. Inmediatamente después se realizó la eutanasia mediante corte de la médula espinal (AVMA, 2013; CCAC, 2010; Hinojosa y Serrano-Martínez, 2013; Roberts y Syme, 2016). Posteriormente, se realizó el examen físico correspondiente y se describieron las lesiones de los peces que presentaban signos clínicos de enfermedad que incluyeron: exoftalmia, melanosis, abdomen distendido y hemorragias en cavidad oral y superficie corporal, como se observa en la Figura 1. Finalmente, previa limpieza de la zona a disecar con alcohol etílico 70°, se procedió con la necropsia según el protocolo descrito por Meyers (2009).

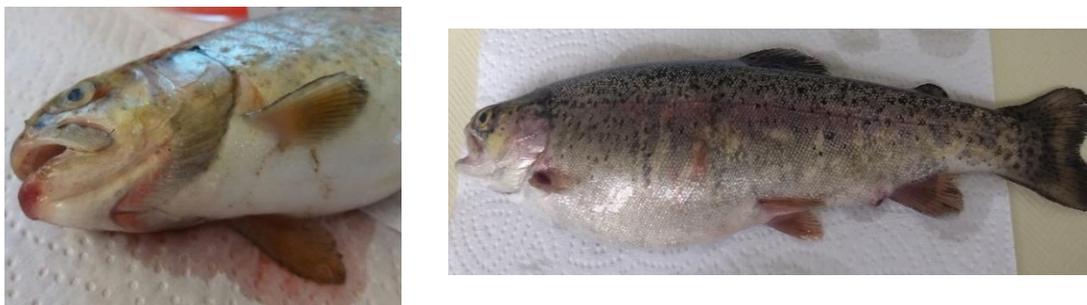


Figura 1. Signos clínicos asociados a infección por *Y. ruckeri*: hemorragia oral y distensión abdominal.

6.3.2 Aislamiento bacteriano y colección de tejidos

Para el aislamiento de la bacteria, luego de describir las lesiones internas de las truchas enfermas que incluyeron: petequias en órganos internos, bazo agrandado y oscurecido, e intestino inflamado, como se muestra en la Figura 2, se realizó la siembra en Agar Tripticasa de Soya (TSA) a partir de muestras de bazo y riñón anterior. Asimismo, para ambos grupos de estudio, se colectaron muestras de bazo, riñón anterior y piel en tubos de 1.5 mL (Eppendorf, Alemania) conteniendo 1 mL de RNA later (Sigma, USA), para la posterior extracción de ARN. Las muestras fueron transportadas en una nevera con hielo hasta el Laboratorio de Parasitología Animal-FAVEZ-UPCH, donde las placas sembradas se colocaron en la incubadora IRE-160 (RAYPA, España) y las muestras de tejidos en RNA later fueron conservadas a -70 °C. Además, se colectó 1 mL de sangre de la vena caudal de algunos de los especímenes muestreados, para un ensayo piloto. Se obtuvo el suero mediante centrifugación a 3500 rpm, usando una microcentrífuga Spectrafuge™ 16M High Speed (Labnet International, USA), y las muestras fueron conservadas a -70 °C.



Figura 2. Lesiones internas asociadas a infección por *Y. ruckeri*: presencia de petequias en hígado y bazo agrandado (esplenomegalia).

6.3.3 Análisis microbiológico

En el laboratorio, las placas fueron incubadas a 25°C por 24 horas. Posteriormente, se realizó la identificación de las colonias teniendo en cuenta su forma redonda, tamaño pequeño, color crema brillante y bordes regulares definidos. Para su identificación inicial, se tomaron 4 colonias por placa, las que fueron sometidas a Tinción Gram (bacilos negativos) y a las pruebas de Catalasa (+) y Oxidasa (-) (Figura 3). Se tomó una colonia joven presuntiva por cada pez, las colonias seleccionadas fueron enriquecidas en caldo BHI a través de su incubación a 25°C por 24 horas, para la posterior centrifugación y obtención del pellet bacteriano.

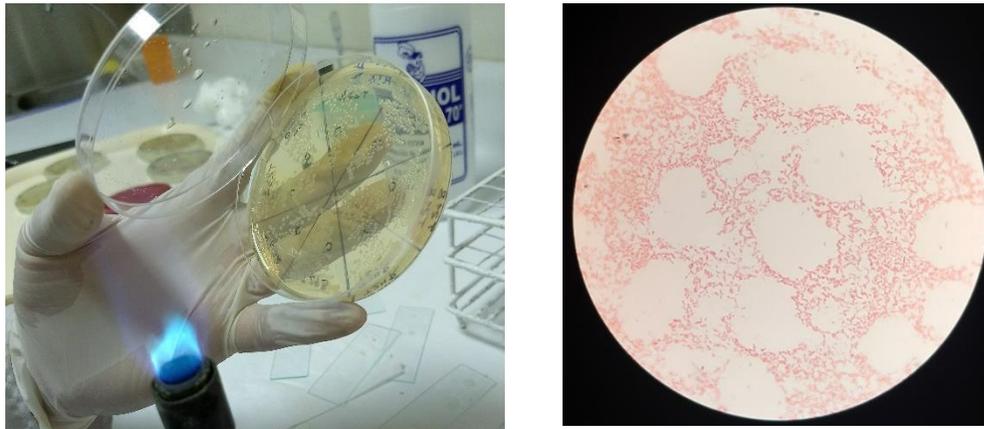


Figura 3. Colonias en medio TSA y bacilos Gram negativos observados al microscopio.

6.3.4 Identificación molecular de *Y. ruckeri* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa

El ADN bacteriano fue extraído utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA), según las indicaciones del fabricante. Para la confirmación molecular de la infección por *Y. ruckeri*, se usó el protocolo de PCR establecido por Gibello *et al.* (1999) para el gen 16S rRNA, detectándose el amplicón del tamaño esperado de 575 pb (Figura 4). Cada reacción de PCR de 20 µL incluyó 1 µL de DNA, una concentración de 10 pmol para cada primer, 2mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTP), 10 µL de buffer para Taq polimerasa y 5 U/µL de Taq polimerasa. Los primers se muestran en la Tabla 1. Se usó el termociclador Mastercycler™ Nexus (Eppendorf, Alemania) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 5 minutos a 92°C, seguida de 35 ciclos por 1 minuto a 92°C, alineamiento a 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 5 minutos. La electroforesis se llevó a cabo en el equipo Enduro™ Gel Systems and Power Supplies (Labnet, USA), con un marcador de 50 bp (Invitrogen, Brasil), agarosa al 1.2%, y tampón Tris, Ácido acético, EDTA (TAE) 1X. Finalmente, se realizó el revelado con bromuro de etidio, observándose en el transiluminador MiniBIS (DNR Bio-Imaging Systems, Israel).



Figura 4. Producto amplificado de *Y. ruckeri* por PCR convencional (575 pb). Carril 1 y 10: Marcador de peso molecular de 50 pb. Carril 2 al 7: Muestras positivas. Carril 8: control positivo (*Y. ruckeri* ATTC 29473). Carril 9: control negativo (agua ultra pura libre de DNAsas).

Tabla 1. Primers usados para la detección del gen 16S rRNA de *Y. ruckeri*

Patógeno	Primers Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	T° alineamiento	Referencia
<i>Yersinia ruckeri</i>	F: GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG R: GAAGGCACCAAGGCATCTCTG	575 pb	60°C	Gibello <i>et al.</i> (1999)

F: forward

R: reverse

pb: pares de bases

6.3.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las muestras de tejido en RNA later fueron enviadas en hielo seco (-70°C) al Laboratorio del Dr. Brian Dixon, Departamento de Biología, Universidad de Waterloo, Canadá, para su procesamiento. La extracción de ARN fue realizada a partir de 10 mg de las muestras de tejido (bazo, riñón anterior y piel) usando 1 mL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen, USA), según las indicaciones del fabricante. Luego de la cuantificación de ARN usando la placa Take3 y el lector Synergy H1 (BioTek Instruments, USA), 5 µg de ARN fueron tratados con DNAsa I (Thermo Scientific, USA) para eliminar cualquier resto de DNA genómico, a 37°C por 30 minutos. La DNAsa I fue removida usando una columna del kit de purificación de ARN (Norgen Biotek, Canadá). Las muestras fueron cuantificadas nuevamente y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Posteriormente, 500 ng de ARN total fueron utilizados para la

síntesis de ADN complementario (ADNc) usando el Supermix qScript cDNA (Quanta Biosciences, USA), según las indicaciones del fabricante. El ADNc se diluyó en una proporción 1:10 con agua libre de RNasa y fue almacenado a -20°C.

6.3.6 Expresión de genes por qPCR

Los genes con actividad proinflamatoria seleccionados para evaluar la respuesta inmune frente a la infección natural por *Y. ruckeri* fueron IL-1 β , TNF- α e IL-6. Para ello, se cuantificó la expresión relativa de cada gen a través de qPCR utilizando el equipo LightCycler® 480 System (Roche, Suiza). Cada reacción de PCR de 10 μ L incluyó 2.5 μ L de ADNc, 5 μ L del fluoróforo LightCycler® 480 SYBR® Green I Master 2X (Roche, Suiza) y 2.5 μ L de la mezcla de primers específicos forward y reverse (Sigma, Aldrich). Cada muestra fue analizada por triplicado. Para cada placa se usó un control negativo, para el que se adicionaron todos los componentes de la reacción de qPCR excepto por el ADNc que se sustituyó por agua libre de nucleasas, y un calibrador que consistió en una mezcla de ADNc de muestras provenientes de truchas infectadas que fue incluido para anular la variación interplaca. El programa de qPCR consistió en un paso de incubación a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, alineamiento a 60°C por 5 segundos y extensión a 72°C por 8 segundos. El gen Factor de Elongación 1 alfa (EF1 α) fue escogido como gen de referencia después de verificar que su expresión no variaba independientemente de la presencia o no de infección. Los primers utilizados para cada gen, se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Primers usados para el qPCR en tiempo real de los genes evaluados

Gen	Primers (5'-3')	Tamaño (pb)	T° de alineamiento	Referencias
Factor de elongación 1 alfa (EF1 α)	F: CGCACAGTAACACCGAAACTAATTAAGC R: GCCTCCGCACTTGTAGATCAGATG	134 pb	60 °C	Semple <i>et al.</i> (2018)
Interleuquina 1 β (IL-1 β)	F: CCACAAAGTGCATTTGAAC R: GCAACCTCCTCTAGGTGC	155 pb	60 °C	Semple <i>et al.</i> (2018)
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	F: GTGCAAAGATACCCACC R: CACTGCACGGTGTGTCAG	108 pb	60 °C	Semple <i>et al.</i> (2018)
Interleuquina 6 (IL-6)	F: CTTCTACACGCTATCTCTCACTC R: CGTCTGTCCCGAGCT	128 pb	60 °C	Semple <i>et al.</i> (2018)

F: forward

R: reverse

pb: pares de bases

6.3.7 Análisis de datos

La expresión de cada gen fue normalizada con la expresión relativa del gen que codifica EF1 α , gen utilizado como gen de referencia, y los niveles de expresión fueron calculados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para cada placa de qPCR, se realizó una curva de fusión leyendo la fluorescencia a cada grado entre 60-95 °C con el objetivo de verificar la amplificación de un solo producto, previamente identificado como producto específico por secuenciación (Semple *et al.*, 2018). El análisis estadístico se realizó con el programa Statistica 7 (StatSoft, USA). Para comparar la expresión relativa de cada gen en estudio en muestras provenientes de peces infectados y controles, se utilizó la prueba estadística T de Student, luego de corroborar que los datos seguían una distribución normal y las varianzas entre los grupos eran homogéneas. Las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas, muy significativas y altamente significativas cuando los valores de probabilidad resultantes de la prueba T fueron menores o iguales que 0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

6.3.8 Ensayo piloto: Extracción de proteínas a partir de muestras de suero y Western blot

Para el ensayo piloto sobre la presencia y abundancia de citoquinas se utilizaron cuatro muestras de suero de truchas con signos clínicos e infectadas por *Y. ruckeri* y cuatro muestras de suero de truchas clínicamente sanas. Se trabajó con una dilución 1/3 para cada muestra, y se realizaron dos extracciones con cloroformo (1:1, V:V) utilizando la fase superior y acuosa para las determinaciones. Se usó el marcador de peso molecular

Pageruler de 10-180 kDa (Thermo Fisher, USA). Las muestras extraídas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para separar las proteínas en base a su peso molecular, usando geles de separación al 15%. Después de este procedimiento, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 35 minutos utilizando el equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, USA), membrana que fue teñida con Tinción Ponceau (Sigma, USA) por 5 minutos para verificar igual carga de proteínas por carril del gel. Posterior a ello, se realizaron 3 lavados con Solución Salina Tamponada Tris con Tween (TBS-T) de 5 minutos cada uno para desteñirla y fue incubada en leche descremada al 5% en TBS-T a temperatura ambiente por una hora para bloquear los espacios libres de proteínas en la membrana. Luego, se realizaron 3 lavados con TBS-T de 5 minutos cada uno y se procedió a realizar la incubación con el anticuerpo primario anti-citoquina correspondiente diluido en leche descremada al 5% en TBS-T a 4 °C durante toda la noche. Para IL-1 β se usó como anticuerpo primario el anticuerpo anti IL-1 β hecho en pollo (Somru Bioscience, Canadá) 1/300, para TNF- α el anticuerpo anti TNF- α hecho en conejo (Cedarlane, Canadá) 1/500, y para IL-6 se utilizó el anticuerpo anti IL-6 hecho en pollo (Somru Bioscience, Canadá) 1/300. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (pollo o conejo) conjugado a la enzima fosfatasa alcalina durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T e incubadas con una solución de detección conteniendo los sustratos de la enzima fosfatasa alcalina: nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3'-indol-fosfato (BCIP) (Sigma, USA) para visualizar las proteínas

detectadas por los anticuerpos específicos. Al visualizar las bandas esperadas, la reacción enzimática fue parada retirando la solución de detección y enjuagando con agua destilada. Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente para luego ser digitalizadas en el equipo de imágenes ChemiDoc (BioRad, USA).

6.3.9 Consideraciones éticas

Los peces utilizados en el presente estudio fueron anestesiados utilizando metasulfonato de triclaína (100 mg/L) antes de realizar la eutanasia. El manejo se realizó de manera rápida y adecuada, disminuyéndose al máximo la manipulación y evitándose el estrés y sufrimiento. Este trabajo fue sometido a la evaluación y aprobación previa por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia como indica la constancia 049-09-18.

VII. RESULTADOS

7.1 Transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias

La expresión relativa de los tres genes de citoquinas estudiados, determinados por qRT-PCR en tiempo real, mostraron un incremento altamente significativo ($p \leq 0.001$) en los tres órganos analizados de truchas naturalmente infectadas con *Y. ruckeri*. Los mayores incrementos se observaron en la expresión relativa del gen que codifica IL-1 β e IL6 en bazo, expresándose 264 y 318 veces más, respectivamente, en truchas infectadas en comparación con las truchas que no presentaban signos clínicos (grupo control).

El gen que codifica IL-1 β mostró la mayor expresión relativa teniendo en cuenta los tres órganos evaluados, observándose la mayor expresión en bazo con 264 veces más en peces infectados naturalmente por *Y. ruckeri* en relación al grupo control, seguido por riñón anterior y piel, como se observa en la Figura 5.

En el caso del gen que codifica TNF- α , el mayor incremento también se observó en bazo, expresándose 13.5 veces más en peces infectados con *Y. ruckeri* en relación con el grupo control. La expresión de este gen fue similar para riñón anterior y piel como se observa en la Figura 6.

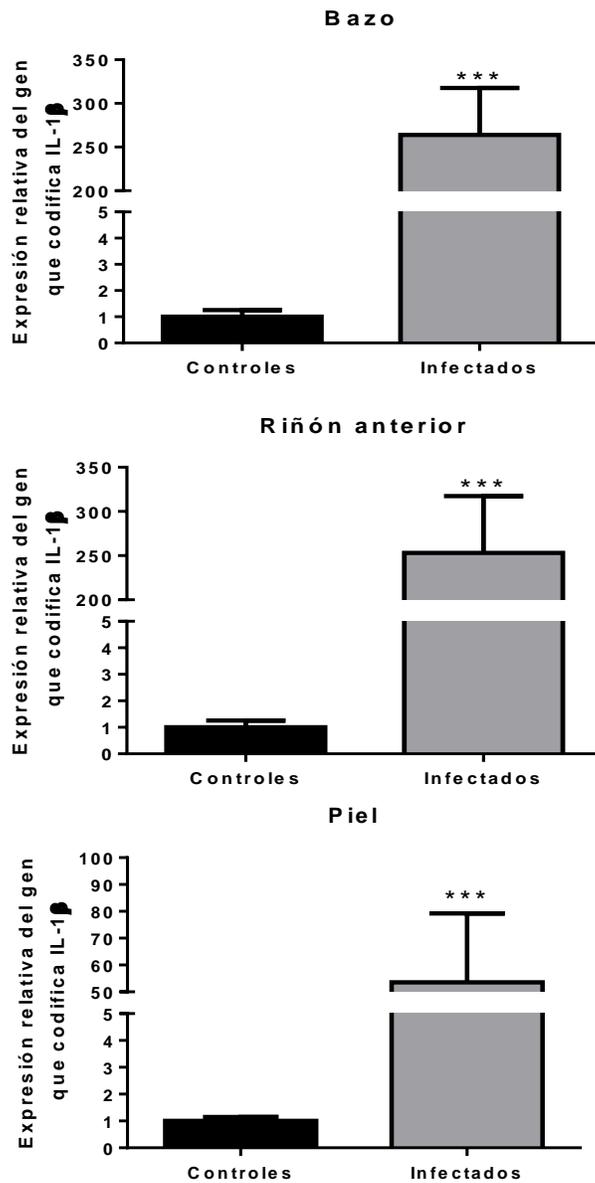


Figura 5. Expresión relativa del gen que codifica IL-1 β en bazo, riñón anterior y piel, resultante del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y utilizando EF1 α como gen de referencia. En las muestras controles el valor de expresión relativa fue ajustado a 1 para calcular el incremento en número de veces en las muestras infectadas (*fold change*). Los valores se muestran como la media \pm error estándar de la media.

N= 34 (controles) y 32 (infectados).

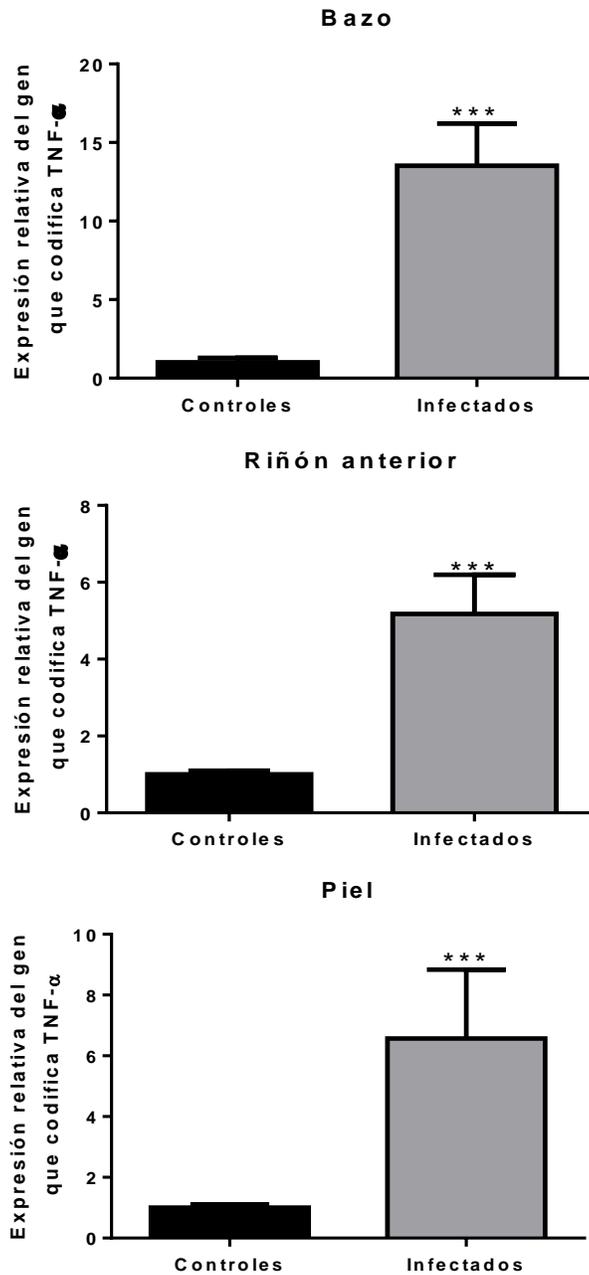


Figura 6. Expresión relativa del gen que codifica TNF- α en bazo, riñón anterior y piel, resultante del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y utilizando EF1 α como gen de referencia. En las muestras controles el valor de expresión relativa fue ajustado a 1 para calcular el incremento en número de veces en las muestras infectadas (fold change). Los valores se muestran como la media \pm error estándar de la media.

N= 35 (controles) y 32 (infectados).

El gen que codifica IL-6, por otro lado, se expresó 318 veces más en el bazo de peces enfermos en comparación con el grupo control, como se observa en la Figura 7. Sin embargo, en el caso del riñón anterior y piel, aunque se obtuvo expresión del gen de interés en las muestras provenientes de peces clínicamente enfermos, no ocurrió lo mismo en las muestras controles, lo que imposibilitó la utilización del método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los valores de ΔCT para bazo, riñón anterior y piel se muestran en la Tabla 3.

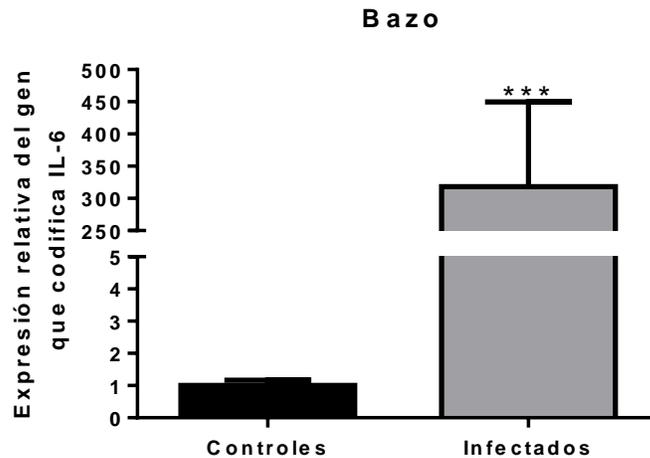


Figura 7. Expresión relativa del gen que codifica IL-6 en bazo, resultante del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y utilizando EF1 α como gen de referencia. En las muestras controles el valor de expresión relativa fue ajustado a 1 para calcular el incremento en número de veces en las muestras infectadas (fold change). Los valores se muestran como la media \pm error estándar de la media. N= 25 (controles) y 32 (infectados).

Tejidos	Valores de ΔC_t para IL-6	
	Infectados	Controles
Bazo	10.92 \pm 2.99	17.28 \pm 1.44
Riñón anterior	12.29 \pm 2.51	No detectados
Piel	10.97 \pm 3.44	No detectados

Tabla 3. Valores de ΔC_T para el gen que codifica IL-6 en bazo, riñón anterior y piel.

7.2 Ensayo piloto: Determinación de presencia de proteínas IL-1 β , TNF- α e IL-6 en muestras de suero de truchas naturalmente infectadas con *Y. ruckeri* mediante Western blot.

En el Western blot realizado para IL-1 β se encontraron dos bandas de proteínas de aproximadamente 25 kDa de tamaño en suero de truchas con infección natural por *Y. ruckeri* que presentaban signos clínicos de enfermedad, las cuales podrían corresponder a la proteína IL-1 β madura. Estas bandas no se aprecian en el suero de truchas sin signos clínicos de enfermedad.

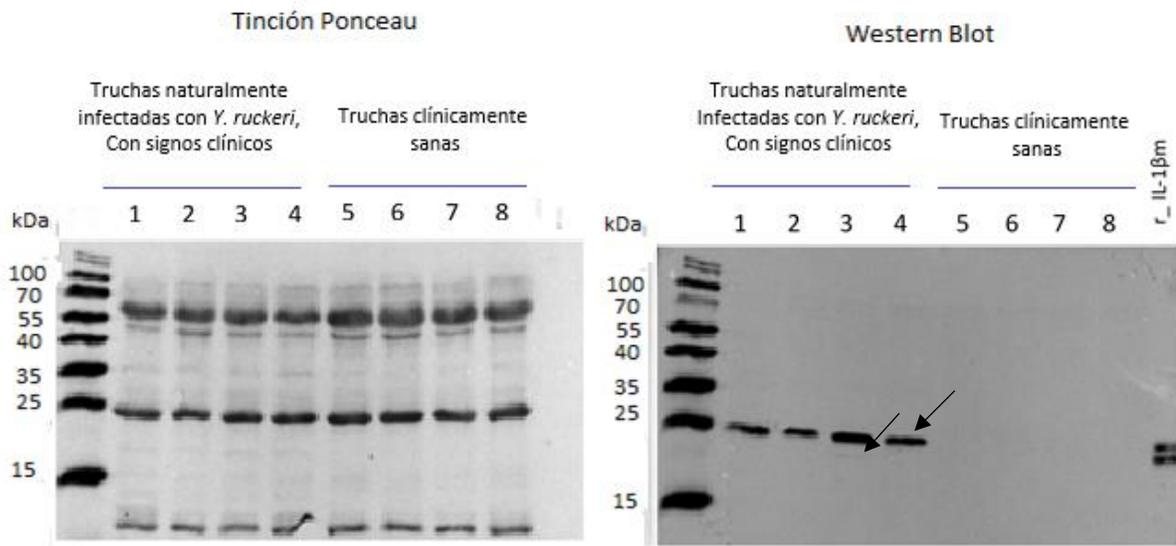


Figura 8. Tinción Ponceau y Western blot para IL-1 β . Membrana teñida con Tinción Ponceau: se aprecia igual carga de proteínas por carril. Western blot: presencia de dos bandas cercanas a 25 kDa de tamaño en muestras provenientes de truchas naturalmente infectadas con *Y. ruckeri* que presentaron signos clínicos de enfermedad. Un fragmento recombinante de IL-1 β se usó como control positivo en el último carril.

En el caso de TNF- α , se observaron 2 bandas mayores que 25 kDa y menores que 35 kDa según indica el marcador de peso molecular, en el suero de truchas con infección natural por *Y. ruckeri* que presentaban signos clínicos de enfermedad, las cuales podrían corresponder a la proteína precursora. Igualmente se obtuvo una banda menor de 15 kDa que podría corresponder a la proteína madura. Estas bandas no se aprecian en el suero de truchas sin signos clínicos de enfermedad.

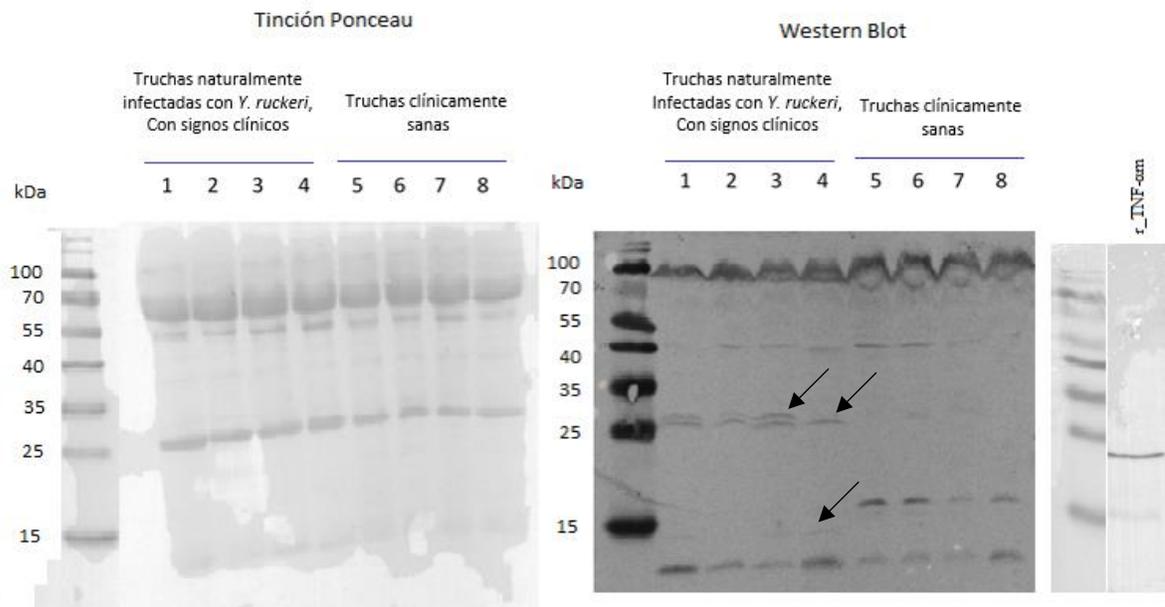


Figura 9. Tinción Ponceau y Western blot para TNF- α . Membrana teñida con Tinción Ponceau: se aprecia igual carga de proteínas por carril. Western blot: presencia de dos bandas mayores que 25 kDa y menores que 35 kDa, y una tercera banda menor que 15 kDa, en muestras provenientes de truchas naturalmente infectadas con *Y. ruckeri* que presentaron signos clínicos de enfermedad. Un fragmento recombinante de TNF- α se usó como control positivo en el último carril.

En el ensayo realizado para IL-6 se observaron dos bandas de proteínas de entre 10 y 15 kDa de tamaño en el suero de truchas con infección natural por *Y. ruckeri* que presentaban signos clínicos de enfermedad, las cuales podrían corresponder a la proteína IL-6, aunque estas no corresponden con la talla esperada para IL-6 en trucha

arcoiris según la escasa literatura sobre el tema. Estas bandas no se aprecian en el suero de truchas sin signos clínicos de enfermedad.

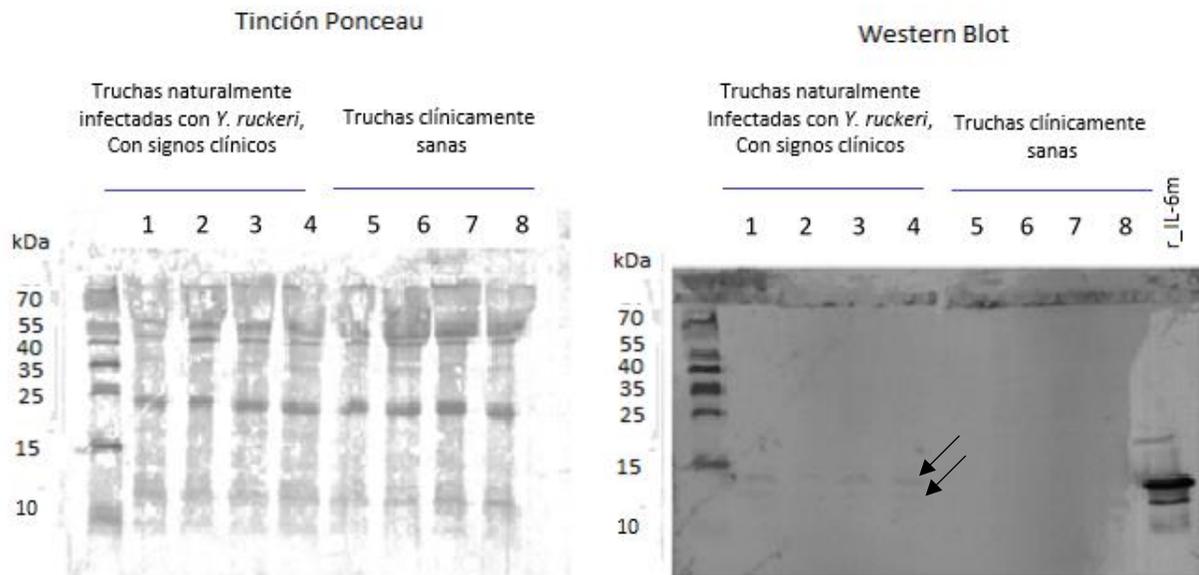


Figura 10. Tinción Ponceau y Western blot para IL-6. Membrana teñida con Tinción Ponceau: se aprecia igual carga de proteínas por carril. Western blot: presencia de dos bandas de entre 10 y 15 kDa de tamaño, en muestras provenientes de truchas naturalmente infectadas con *Y. ruckeri* que presentaron signos clínicos de enfermedad. Un fragmento recombinante de IL-6 se usó como control positivo en el último carril.

VIII. DISCUSIÓN

La inmunología en peces es un campo que hasta la fecha se sigue explorando y comprendiendo con mayor detalle, muchos estudios experimentales han evaluado la expresión de genes de inmunidad en truchas arcoíris frente a *Y. ruckeri*, bajo condiciones controladas, sin embargo, no se ha estudiado la respuesta inmunológica durante infecciones naturales.

El presente estudio demuestra que existe un incremento altamente significativo en la expresión relativa de los genes que codifican las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6 en el bazo, riñón anterior y piel de truchas arcoíris naturalmente infectadas por *Y. ruckeri*, lo que sugiere que hay una respuesta inmune activa frente a esta infección bacteriana. Estos resultados evidencian que la respuesta en truchas infectadas por *Y. ruckeri* en medio natural, es similar a la encontrada en estudios experimentales donde se muestra el incremento en la expresión de estos genes de citoquinas proinflamatorias post infección con *Y. ruckeri* (Chettri *et al.*, 2012, Raida y Buchmann, 2008, Raida y Buchmann, 2009, Wiens y Vallejo, 2010).

El gen que codifica IL-1 β fue el que mostró la mayor expresión relativa teniendo en cuenta los tres órganos evaluados (264 veces más en bazo, 253 veces más en riñón anterior y 54 veces más en piel) frente a la infección natural por *Y. ruckeri*, al comparar los valores de incremento en número de veces con respecto a los controles. Algunos

componentes bacterianos inducen la transcripción de IL-1 β por parte de los leucocitos (Secombes *et al.*, 1999) y estos resultados demuestran la importancia de este proceso en la inducción de citoquinas de acción temprana en la respuesta inmune sistémica y local frente a esta enfermedad.

Los resultados del presente trabajo muestran similitud con estudios experimentales previos. Harun *et al.* (2011) mostraron un marcado incremento en la expresión del gen IL-1 β en el bazo de truchas arcoíris infectadas con *Y. ruckeri* a partir de las 24 horas post inyección, con un pico de expresión de casi 1000 veces más en comparación a las truchas control inyectadas con PBS a las 48 horas post desafío. Raida y Buchmann (2008) también hallaron incremento significativo en la expresión del gen que codifica IL-1 β en el bazo de truchas arcoíris infectadas con *Y. ruckeri*, a las ocho horas, un día y tres días (pico de 77 veces más) post desafío, en comparación con el grupo control de truchas inyectadas con PBS; además, encontraron que, a los siete, 14 y 28 días post desafío ya no se observaba diferencia en la expresión de IL-1 β . Por otro lado, Wiens y Vallejo (2010) encontraron que la expresión relativa del gen IL-1 β en el bazo se vio incrementada significativamente al día uno, tres, cinco y siete post infección con *Y. ruckeri*, viéndose el máximo incremento al tercer día post desafío en truchas arcoíris inyectadas con 5000 UFC (322 veces más, en comparación a la expresión en truchas no infectadas). El presente estudio utilizó especímenes infectados en medio natural, por lo que, determinar el tiempo de infección de las truchas no fue posible, sin embargo, al asociar nuestros hallazgos con los de estudios experimentales, se podría asumir que el tiempo de infección de los peces fue menor de 14 días.

En el caso del gen que codifica TNF- α , estudios experimentales previos como el de Harun *et al.* (2011), mostraron un incremento significativo de este gen en el bazo a las 24, 48 y 72 horas post infección con *Y. ruckeri*, dándose la mayor expresión a las 72 horas. Por su parte, Wiens y Vallejo (2010) observaron que tras el desafío con *Y. ruckeri* en truchas arcoíris se vio un incremento en la expresión del gen TNF- α en el bazo los días uno, tres, cinco y siete, dándose la máxima expresión (776 veces mayor, en comparación a la expresión en truchas no infectadas) en peces infectados con 50,000 UFC al día uno post desafío. En el mismo estudio, los autores mostraron un incremento significativo en la expresión de los genes TNF- α e IL-1 β en el bazo de manera temprana y a dosis infectivas bajas de *Y. ruckeri*, seguido del aumento en la expresión relativa de la proteína de fase aguda SAA (Amiloide A sérico), por lo que estas dos citoquinas podrían contribuir a su regulación en el bazo.

En el presente estudio se observó, de manera similar, un incremento altamente significativo en la expresión relativa del gen que codifica TNF- α (14 veces más en bazo, cinco veces más en riñón anterior y siete veces más en piel) en truchas naturalmente infectadas con *Y. ruckeri*, en comparación con el grupo control. Este gen suele expresarse de manera temprana ante una infección, en este caso el aumento en su transcripción puede deberse a la exposición continua al patógeno en condiciones de campo, causando reinfecciones en nuevos animales.

En el trabajo realizado, el gen que codifica IL-6 mostró la mayor expresión, incrementándose 318 veces más en el bazo de truchas naturalmente infectadas por *Y.*

ruckeri, en comparación con las truchas clínicamente sanas. De la misma manera, Harun *et al.* (2011) observaron incremento en la expresión relativa del gen IL-6 en el bazo a las 24, 48 y 72 horas post desafío con *Y. ruckeri*, viéndose la mayor expresión (casi 500 veces más, en relación al grupo control) a las 24 horas post infección. Raida y Buchmann (2008) también hallaron un incremento significativo en la expresión del gen que codifica IL-6 en el bazo de truchas arcoíris que fueron infectadas experimentalmente con *Y. ruckeri*, al día uno (10 veces más) y al día tres (20 veces más) post inyección con el patógeno, en comparación con el grupo control. El efecto de la infección experimental con otras bacterias sobre la expresión del gen que codifica IL-6, también ha sido estudiado en truchas arcoíris. Así, por ejemplo, Zante *et al.* (2015) estudiaron la expresión relativa de este gen en truchas arcoíris infectadas con una dosis alta (1×10^7 UFC) de *Aeromonas salmonicida*, bacteria Gram negativa de importancia en la acuicultura peruana, encontrando un incremento significativo en la expresión de este gen en el bazo a tan solo seis horas post infección (38 veces más, en comparación al grupo control de peces inyectados con PBS). También observaron un incremento significativo temprano en la expresión del gen IL-6 en hígado y branquias, demostrando que el gen que codifica IL-6 es activado en diferentes tejidos en la etapa inicial de la infección.

En el presente estudio, con relación a la expresión de este gen en riñón anterior y piel, la falta de detección de la expresión del gen que codifica IL-6 en las truchas clínicamente sanas (controles) no nos permitió utilizar el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, esto pudo deberse a un nivel de expresión constitutiva extremadamente bajo para este gen en células del riñón

anterior y piel, relacionado a la inactividad o reposo de células como las células dendríticas en caso de piel. Sin embargo, el hecho de que la expresión del gen que codifica esta citoquina solo fuera detectada en las muestras provenientes de peces infectados, presupone un aumento en la expresión de este gen tanto en riñón anterior como en piel producto de la infección bacteriana. Un experimento futuro en laboratorio sería necesario para verificar los niveles de expresión basal de IL-6, así como los niveles de expresión incrementados tras la exposición con *Y. ruckeri*.

Cabe resaltar el marcado incremento en la expresión de los genes que codifican las tres citoquinas proinflamatorias estudiadas (IL1 β , TNF α e IL6) en el bazo, similar a lo observado en estudios experimentales (Harun *et al.*, 2011; Raida y Buchmann, 2008; Wiens y Vallejo, 2010). Esto se relacionaría a la replicación bacteriana y flujo de células inmunes durante la Yersiniosis en el bazo, considerado un órgano linfoides secundario de gran importancia en peces (Wiens *et al.*, 2006).

El tamaño del bazo también puede asociarse a la progresión de la enfermedad y a la respuesta frente a ella. En este sentido, Wiens y Vallejo (2010) encontraron una correlación significativa y positiva entre el tamaño del bazo y la carga de *Y. ruckeri* en este órgano (UFC por mg de tejido). Estos autores observaron que el bazo mostró un aumento de tamaño desde el tercer día post infección, y esto estuvo influenciado por la dosis de inyección. Asimismo, hallaron una correlación positiva y significativa entre el tamaño del bazo y la transcripción de los genes proinflamatorios IL-1 β y TNF- α . En el presente estudio se observó esplenomegalia como uno de los principales hallazgos en

peces infectados por *Y. ruckeri*, sin embargo, estudios de correlación con la carga bacteriana, usando qPCR para titular la bacteria, serían necesarios para demostrar esa asociación. Por otro lado, factores genéticos, independientes de la enfermedad, pueden también asociarse al tamaño del bazo (Hadidi *et al.*, 2008).

No se encontraron estudios previos disponibles del efecto de infecciones por *Y. ruckeri* sobre la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias en el riñón anterior y piel de peces. Sin embargo, otros investigadores han estudiado el efecto sobre estos genes tras infecciones con otras bacterias Gram negativas. Este es el caso del estudio realizado por Henriksen *et al.* (2013) en el que se muestra como la infección por inmersión con *Flavobacterium psychrophilum*, bacteria Gram negativa de importancia mundial en la acuicultura, provoca un incremento significativo en la expresión del gen que codifica IL-1 β en el riñón anterior de alevines de trucha arcoíris (casi cuatro veces más, en comparación con el grupo control) a las cuatro horas post desafío.

Por otro lado, Wu *et al.* (2015) encontraron incremento significativo en la transcripción del gen que codifica IL-1 β en el riñón anterior de la corvina azafrán, con un pico a las 12 horas (14 veces más, en comparación al grupo control) post infección vía intraperitoneal con *Vibrio alginolyticus*. Tras el desafío con *A. salmonicida* atípica tratada con formalina, en el bacalao común, Feng *et al.* (2009) hallaron un incremento significativo en la expresión del gen IL-1 β en comparación con el grupo control de peces inyectados con PBS, observándose la mayor expresión a las seis horas post infección (684 veces más en bazo y 356 veces más en riñón anterior).

Tras la infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en cobia, Tran *et al.* (2019) hallaron un incremento en la expresión del gen TNF- α (11 veces más) a las tres horas post desafío, aumento en la transcripción del gen IL-6 a las tres horas y un pico en su expresión a las 48 horas (12 veces más) post inyección, e incremento en la expresión del gen IL-1 β a las 48 horas (45 veces más) y 96 horas (33 veces más) post infección, en el riñón anterior; en comparación con el grupo control. Orioux *et al.* (2013) mostraron que el gen IL-1 β sobre expresa en el riñón, bazo, hígado y branquias de truchas arcoíris naturalmente infectadas con *F. psychrophilum*, en comparación con truchas aparentemente sanas, y sugieren a este gen como un buen marcador genético para flavobacteriosis.

El riñón anterior es un órgano linfoide primario en peces teleósteos donde se encuentran abundantes macrófagos, considerados los principales productores de IL-1 β y TNF- α (Vega-Ramírez *et al.*, 2010; Zapata *et al.*, 1996; Zou, 2003). El presente estudio muestra también un aumento significativo en la expresión relativa de los genes que codifican IL-1 β y TNF- α en el riñón anterior de truchas naturalmente infectadas con *Y. ruckeri* respecto a las truchas clínicamente sanas, lo que enfatiza la respuesta sistémica frente a esta infección bacteriana.

Chaves-Pozo *et al.* (2005) sugirieron que el reclutamiento y la activación de linfocitos tras una infección ocurre en el bazo, mientras que el riñón anterior actúa principalmente como un tejido hematopoyético que provee y reemplaza células durante infecciones bacterianas, sin embargo, no descartaron que este órgano también este asociado a la respuesta inmune. En un estudio realizado por Raida y Buchmann (2007), se observó

que la expresión del gen que codifica IL-1 β fue mayor en bazo que en riñón anterior tras la vacunación intraperitoneal de truchas arcoíris con una bacterina de *Y. ruckeri*. Esto es coherente con los resultados obtenidos, al observarse un mayor incremento en la expresión relativa de los genes que codifican IL-1 β y TNF- α en bazo, en comparación con riñón anterior.

La respuesta inmune en piel ha sido mayormente estudiada frente a infecciones parasitarias. Zhang *et al.* (2018) encontraron que tras la infección experimental con *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) en truchas arcoíris, la expresión relativa del gen TNF- α en piel se vio incrementada a los siete días post desafío, en comparación con el grupo control. En el caso del bazo, la expresión de este gen se vio incrementada a las 48 horas post infección.

En carpas comunes infectadas con *Argulus japonicus*, Forlenza *et al.* (2008) hallaron un aumento significativo en la transcripción del gen TNF- α en piel (zonas lesionadas y zonas sin lesión), en comparación con el grupo control, a los seis días post desafío. Para IL-1 β no se encontró diferencia significativa respecto a los controles. Asimismo, Chettri *et al.* (2014) encontraron un aumento significativo en la expresión relativa de los genes que codifican IL-1 β , TNF- α e IL-6 en piel de alevines de truchas arcoíris infectadas con *Ichthyobodo necator*, en comparación con alevines no infectados.

Muñoz-Atienza *et al.* (2019) demostraron que en el caso de infección natural por *F. psychrophilum* en truchas arcoíris la respuesta inmune local es vital, ya que se encontró un incremento significativo en la expresión de diferentes genes asociados a la respuesta inmune en la piel lesionada de peces sintomáticos, en comparación con los peces asintomáticos. Por el contrario, no se encontró diferencia significativa en la expresión de estos genes en el bazo de peces sintomáticos respecto a los controles.

En el caso de piel, órgano seleccionado por su papel como tejido linfoide y de primera barrera de defensa frente a los patógenos, y por la falta de estudios asociados a su respuesta frente a *Y. ruckeri*, los resultados hallados en el presente estudio muestran un incremento significativo en la expresión de los genes que codifican IL-1 β y TNF- α en truchas arcoíris naturalmente infectadas con *Y. ruckeri* respecto a las truchas clínicamente sanas, demostrando la importancia de SALT y la respuesta inmune local frente a este patógeno.

Existen estudios referentes a la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias en distintos órganos frente a la infección por *Y. ruckeri* en truchas arcoíris. Raida y Buchmann (2009) encontraron un pico de incremento en la expresión relativa de los genes IL-1 β (67 veces más), TNF- α (13 veces más) e IL-6 (1100 veces más) en el hígado de truchas arcoíris a los tres días post desafío con *Y. ruckeri* mediante inyección intraperitoneal, en comparación a su expresión en truchas arcoíris no infectadas. Chettri *et al.* (2012) encontraron un incremento en la expresión de los genes que codifican IL-1 β y TNF- α en órganos internos (mezcla de bazo, hígado, riñón, branquias, intestino,

etc.) de alevines infectados con *Y. ruckeri* mediante baño de inmersión, en comparación con el grupo control. El gen IL-1 β mostró incremento en su expresión desde las 24 hasta las 96 horas post infección, donde se observó el pico de expresión (21 veces más, en comparación con el grupo control). La expresión del gen TNF- α se vio incrementa a las 72 y 96 horas post infección, respecto al grupo control. A los 25 días post infección no se encontró diferencia significativa en la expresión relativa de ninguna de las dos citoquinas con relación al grupo control.

Sobre estudios en MALT, Evenhuis y Cleveland (2012) hallaron un incremento significativo en la expresión del gen TNF- α (casi dos veces más) en el intestino de truchas arcoíris al noveno día post desafío por inmersión con *Y. ruckeri*, en comparación con el grupo control. Harun *et al.* (2011), por otro lado, encontraron un incremento en la transcripción del gen TNF- α en branquias a tan solo seis horas post inyección intraperitoneal con *Y. ruckeri*, en comparación con truchas no infectadas. En el mismo estudio, a las 24 horas post desafío, los autores observaron un incremento en la expresión de los genes IL-6 y TNF- α , y a las 48 horas post infección vieron un aumento en la expresión de los genes que codifican IL-1 β , TNF- α e IL-6 en branquias, en comparación con el grupo control.

Tobback *et al.* (2009) reaislaron *Y. ruckeri* de branquias, piel, intestino, hígado, riñón y bazo de truchas arcoíris previamente desafiadas por inmersión con este patógeno; encontrando mayor cantidad de bacterias en las branquias inmediatamente post infección. Su hallazgo sugirió a las branquias como puerta de entrada para *Y. ruckeri*,

aunque mencionaron que la bacteria también podría colonizar otras superficies como la piel e intestino para luego ingresar al hospedero. El incremento en la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias en piel, observado en el presente estudio, podría sugerir que esta es otra ruta de ingreso del patógeno, sin embargo, mayores estudios deben ser realizados al respecto.

Sobre la respuesta de genes de citoquinas proinflamatorias, Raida y Buchmann (2009) encontraron incremento significativo en la expresión relativa de los genes IL-1 β , TNF- α e IL-6 en hígado tras la primera infección con *Y. ruckeri* en truchas arcoíris, en comparación con el grupo control, observándose una posible inducción del gen que codifica la proteína amiloide sérica A (SAA) asociada a la expresión del gen IL-1 β . Sin embargo, tras la reinfección con la misma dosis del patógeno, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes que codifican estas tres citoquinas, en comparación a los controles. Es importante resaltar que la transcripción del gen SAA sí se vio incrementada de manera temprana (a las ocho horas y al día post infección) tras la reinfección. De manera similar, Raida y Buchmann (2008) hallaron incremento en la transcripción de los genes que codifican IL-1 β e IL-6 en el bazo de truchas arcoíris tras la infección primaria con *Y. ruckeri*, pero no tras la infección secundaria, en comparación con el grupo control, proponiendo que el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa explicaría la rápida eliminación del patógeno y la poco pronunciada activación de citoquinas.

Por otro lado, otros estudios evaluaron la respuesta inmune en truchas vacunadas contra *Y. ruckeri*, tras la infección con el mismo patógeno. Harun *et al.* (2011) encontraron incremento significativo en la expresión de los genes IL-1 β , TNF- α e IL-6 en bazo de truchas arcoíris vacunadas y posteriormente desafiadas, en comparación con el grupo control, sin embargo, la expresión fue mucho menor comparada con las truchas no vacunadas que fueron desafiadas. La respuesta observada fue temprana y la expresión de los genes IL-1 β e IL-6 se vio incrementada en bazo a las seis horas post desafío en peces vacunados, en comparación con el grupo control. A las 48 horas, ya no se observó diferencia significativa en la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias en comparación con el grupo control. En el caso de branquias se observó lo contrario, a las 48 horas la transcripción de estos genes fue mayor en los peces vacunados y desafiados, por lo que estos autores mencionan que la respuesta adaptativa puede variar de acuerdo al lugar y estadio de infección.

IL-1 β es sintetizada como una proteína precursora que no posee un péptido señal, necesitando ser procesada para su posterior liberación como proteína activa. En mamíferos, diversas proteasas como caspasa 1, elastasa y catepsina G reconocen secuencias específicas en la región central de proIL-1 β , separando el péptido maduro del precursor. La caspasa 1, también llamada enzima convertidora de IL-1 β (ICE), es la principal proteasa procesadora de IL-1 β . Para que este mecanismo ocurra se requiere el ensamble y activación de un gran complejo multiproteico conocido como inflammasoma, cuya función es producir IL-1 β madura a través de la activación de caspasa 1 (Ogryzko *et al.*, 2014; Zou y Secombes, 2016). Aunque en los ortólogos de IL-1 β en peces, no se

ha identificado un sitio de corte para ICE, evidencia emergente ha demostrado que la IL-1 β de teleósteos puede ser anclada por caspasas y que el procesamiento de proIL-1 β en su forma activa puede darse por la activación canónica y no canónica de caspasas efectoras 1 y 8 en el inflamasoma. Asimismo, distintos sitios de corte en una región pequeña central de proIL-1 β han sido reportados en distintas especies (Zou y Secombes, 2016). Hong *et al.* (2004) detectaron una proteína nativa IL-1 β precursora de un tamaño aproximado de 29 kDa y una proteína IL-1 β madura de aproximadamente 24 kDa, usando la línea celular RTS-11 de macrófagos de trucha arcoíris.

En el ensayo piloto realizado, los resultados observados en el Western blot para IL-1 β muestran la presencia de dos bandas de proteína de aproximadamente 25 kDa de tamaño en suero de truchas con infección natural por *Y. ruckeri* que presentaban signos clínicos de enfermedad, las cuales podrían corresponder a la proteína IL-1 β madura. Estas bandas no se aprecian en el suero de truchas sin signos clínicos de enfermedad. Sin embargo, estudios de secuenciamiento de proteínas a partir de estas bandas deben ser realizados para la determinación de la presencia de la proteína, y estudios de cuantificación de la proteína por medio de ELISA evidenciarían el comportamiento real de la proteína activa.

Interesantemente, a diferencia de la familia IL-1 de mamíferos, expandida a partir de un solo locus, se presume que, durante la duplicación del genoma de pez, el locus IL-1 se duplicó a el mismo generando múltiples genes IL-1 en diversas especies de peces. Existe evidencia a partir del alineamiento de secuencias, filogenética y comparación

sinérgica que apoya la conclusión de la existencia de dos distintas proteínas IL-1 β , parálogas, en peces (Ogryzko *et al.*, 2014), lo que explicaría la presencia de las dos bandas ligeramente diferentes en el Western blot realizado.

En el caso de la proteína TNF- α , la liberación de su forma soluble requiere la remoción de la región precursora, cuyo proceso es facilitado por la enzima convertidora de TNF- α (TACE) que ancla a proTNF- α en el sitio específico. A diferencia de IL-1 β , existe un sitio de corte previsto para TACE en todas las secuencias de TNF- α en peces, lo que sugiere que el mecanismo de procesamiento y liberación para TNF- α es conservado en todos los vertebrados (Zou y Secombes, 2016). Tres proteínas TNF- α parálogas han sido descritas en peces teleósteos; TNF- α 1, cuya forma precursora tiene un tamaño de 27.11 kDa y la forma madura un tamaño predicho de 17.83 kDa (Laing *et al.*, 2001); TNF- α 2, con un tamaño de 28.17 kDa en su forma precursora y un tamaño predicho de 17.89 kDa en su forma madura (Zou *et al.*, 2002); y TNF- α 3, con un tamaño de 26.78 kDa en su forma precursora y un tamaño predicho de 19.35 kDa en su forma madura (Hong *et al.*, 2013). El Western blot realizado para TNF- α en el ensayo piloto, mostró la presencia de 2 bandas proteicas ligeramente mayores que 25 kDa de tamaño en el suero de truchas con infección natural por *Y. ruckeri* que presentaban signos clínicos de enfermedad, las cuales podrían corresponder a dos de las tres isoformas proteicas en su forma precursora. También cabe la posibilidad de que algunas de las bandas detectadas contenga más de una proteína y que el método de separación no fue suficientemente sensible para separar y visualizar bandas de tamaños muy cercanos. Además, se visualizó una banda cercana a 15 kDa de tamaño que podría corresponder a la proteína

madura. Esta proteína sería más pequeña que las predichas en la literatura. Sin embargo, el sitio del corte proteolítico de TNF- α en peces no ha sido estudiado experimentalmente y solo se ha predicho de manera teórica mediante alineación de secuencias con las TNF- α de mamíferos (Hong *et al.*, 2013). Estas bandas no se aprecian en el suero de truchas sin signos clínicos de enfermedad, no obstante, se requieren mayores estudios para su confirmación.

Se conoce muy poco sobre la función y caminos de señalización de IL-6 en peces. La proteína IL-6 de trucha arcoíris tiene un peso molecular predicho de 23.8 kDa (Costa *et al.*, 2011; Iliev *et al.*, 2007). Sin embargo, como en otras citoquinas de peces, la familia IL-6 puede tener múltiples parálogos (Zou y Secombes, 2016). Aunque en nuestros resultados las bandas que se encontraron fueron cercanas a 15 kDa de tamaño, los patrones proteicos fueron diferentes para peces enfermos y peces clínicamente sanos, por lo que mayores estudios son requeridos para identificar la identidad de estas bandas.

Diferentes investigaciones han estudiado el efecto local de IL-1 β en el sistema inmune. Hong *et al.* (2003) mostraron que la inyección intraperitoneal de IL-1 β recombinante en truchas arcoíris tuvo un efecto significativo en la supervivencia post exposición a *A. salmonicida*, sugiriendo que esta citoquina tiene propiedades inmunoestimulantes. Wu *et al.* (2015) obtuvieron resultados similares tras la inyección intraperitoneal de IL-1 β recombinante en la corvina azafrán, observando mejora en la tasa de supervivencia y reducción de la carga bacteriana en tejidos luego de la infección con *V. alginolyticus*. Asimismo, Wang *et al.* (2019) demostraron que la proteína recombinante IL-1 β del pez

gato americano es eficaz como un potencial adyuvante en la vacunación contra agentes bacterianos, al observarse un aumento en la respuesta inmune de este pez al ser coinyectada con una vacuna contra *Streptococcus iniae*. Por otro lado, al administrarse directamente proteína recombinante IL-1 β en el intestino de carpas chinas se observó una inflamación intestinal severa (Bo *et al.*, 2015). Los resultados encontrados en el presente estudio muestran la importancia de IL-1 β en la respuesta frente a la infección por *Y. ruckeri*, por lo que sería interesante evaluar su potencial como adyuvante e inmunoestimulante.

En algunos casos, una respuesta inflamatoria exacerbada puede resultar negativa, por lo que la regulación de la inflamación resultante del balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias es de vital importancia (Raida y Buchmann, 2008). En futuros estudios sería importante incluir la evaluación de la expresión de genes de citoquinas antiinflamatorias, y su correlación con la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias, frente a la infección natural por *Y. ruckeri*.

Es importante tener en cuenta que, aunque los peces suelen portar a *Y. ruckeri*, la enfermedad solo es detectada cuando el estrés asociado al cultivo intensivo (mal manejo, altas densidades, etc.), pobre calidad de agua y altas temperaturas superan las defensas inmunes, causando pérdidas para el productor (Horne y Barnes, 1999). En el Perú, las condiciones de manejo en el cultivo de truchas aún son deficientes, lo que promueve la presencia de esta y otras enfermedades bacterianas como Furunculosis por *A. salmonicida* y Flavobacteriosis por *F. psychrophilum* en los sistemas productivos.

Asimismo, pueden darse infecciones múltiples por estos tres agentes, por lo que estudios tras infecciones naturales resultan más complejos y son necesarios luego de conocer la respuesta frente a infecciones experimentales.

Los resultados obtenidos aportan conocimiento para una mejor comprensión de la respuesta inmune en truchas arcoíris frente a la infección natural por *Y. ruckeri*, sin embargo, se requieren aún otros estudios para entender la interacción hospedero-patógeno, lo que permitirá el desarrollo de herramientas que contribuyan a la sostenibilidad del cultivo de trucha arcoíris en el país.

IX. CONCLUSIONES

El incremento altamente significativo en la expresión relativa de los genes que codifican IL-1 β , TNF-a e IL-6 en bazo, riñón anterior y piel muestran la importancia de la respuesta inmune sistémica y local frente a esta enfermedad.

El mayor incremento en la expresión de los genes evaluados (IL-1 β , TNF-a e IL-6) en el bazo, muestran la importancia de este órgano inmune secundario en peces teleósteos.

El incremento significativo en la expresión de los genes que codifican IL-1 β , TNF-a e IL-6 en respuesta a la infección natural por *Y. ruckeri*, indica claramente que los peces infectados montan una fuerte respuesta inflamatoria frente al patógeno.

El gen que codifica IL-1 β fue el que mostró una mayor expresión en los tejidos riñón anterior y piel, y junto a IL6 fue el que mostró la mayor expresión en bazo, pudiendo considerarse de importancia para el desarrollo de mejores regímenes de tratamiento y vacunación en la truchicultura, por lo que, mayor investigación al respecto es requerida para determinar si la expresión observada en este tipo de estudios es apropiada o excesivamente inflamatoria.

En los Western blot realizados para las proteínas IL-1 β , TNF-a e IL-6, se obtuvieron patrones de bandas diferentes entre las truchas clínicamente sanas y aquellas con signos

clínicos e infectadas por *Y. ruckeri*, esto sugeriría la participación de las proteínas mencionadas en truchas enfermas, siendo necesaria la secuenciación para determinar su identidad.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abós B, Wang T, Castro R, Granja A, Leal E, Havixbeck J, Luque A, Barreda D, Secombes C, Tafalla C. 2016. Distinct differentiation programs triggered by IL-6 and LPS in teleost IgM+ B cells in the absence of germinal centers. *Scientific Reports*. 6:30004.
- Altinok I. 2004. The infectious route of *Yersinia ruckeri* is affected by salinity. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 24(5):253-259.
- [AVMA] American Veterinary Medical Association. 2013. Guidelines for the Euthanasia of Animals. Illinois. 102 p.
- Bravo S, Kojagura V. 2004. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*. 24(2):104-108.
- Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes C. 2002. Evolution of interleukin-1beta. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 13:483-502.
- Bo Y, Song Y, Wu K, Hu B, Sun B, Liu Z, Fu J. 2015. Characterization of interleukin-1 β as a proinflammatory cytokine in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*. 46:584-595.
- [CCAC] Canadian Council on Animal Care. 2010. CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. Ottawa. 32 p.
- Carson J, Wilson T. 2009. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure Manual. Tasmania. 19 p.

- Chaves-Pozo E, Muñoz P, López-Muñoz A, Pelegrín P, García A, Mulero V, Meseguer J. 2005. Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res.* 320:61-68.
- Chettri J, Raida M, Kania P, Buchmann K. 2012. Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Developmental and Comparative Immunology.* 36: 463-474.
- Chettri J, Kuhn J, Jaafar R, Kania P, Møller O, Buchmann K. 2014. Epidermal response of rainbow trout to *Ichthyobodo necator*: immunohistochemical and gene expression studies indicate a Th1-/Th2-like switch. *Journal of Fish Diseases.* 37:771–783.
- Costa M, Maehr T, Diaz-Rosales P, Secombes C, Wang T. 2011. Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: Effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Molecular Immunology.* 48:1903– 1916.
- Croisetiere S, Tarte P, Bernatchez L, Belhumeur P. 2008. Identification of MHC class II β resistance/susceptibility alleles to *Aeromonas salmonicida* in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Immunology.* 45:3107–3116.
- Evenhuis J, Cleveland B. 2012. Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal immune gene expression following bacterial challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 146:8-17.

- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 248 p.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 224 p.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 253 p.
- Feng C, Johnson S, Hori T, Rise M, Hall J, Gamperl A, Hubert S, Kimball J, Bowman S, Rise M. 2009. Identification and analysis of differentially expressed genes in immune tissues of Atlantic cod stimulated with formalin-killed, atypical *Aeromonas salmonicida*. *Physiol Genomics*. 37:149–163.
- [FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2004. Manual de cultivo de trucha arcoíris en jaulas. Lima. 123 p.
- Forlenza M, Walker P, de Vries B, Wendelaar Bonga S, Wiegertjes G. 2008. Transcriptional analysis of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) immune response to the fish louse *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura). *Fish and Shellfish Immunology*. 25:76-83.
- Furones M, Rodgers C, Munn C. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 3:105-125.
- García-Castillo J, Chaves-Pozo E, Olivares P, Pelegrín P, Meseguer J, Mulero V. 2004). The tumor necrosis factor α of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts,

yet it functions in a species-specific manner. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61:1331–1340.

- Gibello A, Blanco M, Moreno M, Cutuli M, Domenech A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal J. 1999. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:346-350.
- Gomez D, Sunyer O, Salinas I. 2013. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*. 35:1729-1739.
- Gorgoglione B, Zahranc E, Taylor N, Feist S, Zou J, Secombes C. 2016. Comparative study of CXC chemokines modulation in brown trout (*Salmo trutta*) following infection with a bacterial or viral pathogen. *Molecular Immunology*. 71:64-77.
- Hadidi S, Glenney G, Welch T, Silverstein J, Wiens G. 2008. Spleen size predicts resistance of rainbow trout to *Flavobacterium psychrophilum* challenge. *The Journal of Immunology*. 180:4156–4165.
- Harun N, Wang T, Secombes C. 2011. Gene expression profiling in naïve and vaccinated rainbow trout after *Yersinia ruckeri* infection: Insights into the mechanisms of protection seen in vaccinated fish. *Vaccine*. 29:4388-4399.
- Henriksen M, Kania P, Buchmann K, Dalsgaard I. 2013. Evaluation of the immune response in rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after waterborne exposure to *Flavobacterium psychrophilum* and/or hydrogen peroxide. *Journal of Fish Diseases*. 38(1):55-66.

- Hinostroza E, Serrano-Martínez E. 2013. Efecto anestésico del metasulfonato de tricafina en paiches (*Arapaima gigas*) juveniles. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 24(4):451-458.
- Hong S, Peddie S, Campos-Pérez J, Zou J, Secombes C. 2003. The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1 β on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Developmental and Comparative Immunology. 27:801–812.
- Hong S, Zou J, Collet B, Bols N, Secombes C. 2004. Analysis and characterisation of IL-1 β processing in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish & Shellfish Immunology. 16:453-459.
- Hong S, Li R, Xu Q, Secombes C, Wang T. 2013. Two types of TNF- α Exist in Teleost fish: Phylogeny, Expression, and Bioactivity Analysis of Type-II TNF- α 3 in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. The Journal of Immunology. 191:5959-5972.
- Horne M, Barnes A. 1999. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Woo P, Bruno D, editors. Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. UK: CABI publishing. p 455-477.
- Iliev D, Castellana B, MacKenzie S, Planas J, Goetz F. 2007. Cloning and expression analysis of an IL-6 homolog in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Immunology. 44:1803–1807.
- [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2017. Informe Técnico: Evolución de la Pobreza Monetaria 2007-2016. Lima. 179 p.

- Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*. 46. 103.
- Laing K, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N, Hirono I, Aoki T, Secombes C. 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α . *European Journal Biochemistry*. 268:1315-1322.
- Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25:402-408.
- Manning M, Nakanishi T. 1996. The specific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T, editors. *The fish immune system. Organism, pathogen, and environment*. San Diego: Academic Press. p 159-205.
- Meyers T. 2009. Chapter 4: Standard necropsy procedures for finfish. In: Heil N, editor. *National wild fish health survey. Laboratory procedures manual*. 5^a ed. Georgia: U. S. Fish and Wildlife Service. p 1-11.
- Muñoz-Atienza E, Távara C, Díaz-Rosales P, Llanco L, Serrano-Martínez E, Tafalla C. 2019. Local regulation of immune genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish and Shellfish Immunology*. 86:25-34.
- Ogryzko N, Renshaw S, Wilson H. 2014. The IL-1 family in fish: Swimming through the muddy waters of inflammasome evolution. *Developmental and Comparative Immunology*. 46:53-62.

- Orieux N, Douet D, Hénaff M, Bourdineaud J. 2013. Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* bacterial cells in farmed rainbow trout: Characterization of metallothionein A and interleukin1-b genes as markers overexpressed in spleen and kidney of diseased fish. *Veterinary Microbiology*, 162:127–135.
- [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2017. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2016. Lima. 202 p.
- Raida M, Buchmann K. 2007. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis Aquat Org*. 77: 41-52.
- Raida M, Buchmann K. 2008. Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. *Fish and Shellfish Immunology*. 25:533-541.
- Raida M, Buchmann K. 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Developmental and Comparative Immunology*. 33:35-45.
- Roberts J, Syme D. 2016. Effects of using tricaine methanesulfonate and metomidate before euthanasia on the contractile properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myocardium. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 55(5):565-569.
- Romalde J, Margariños B, Barja J, Toranzo A. 1993. Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification. *Systematic and Applied Microbiology*. 16:411-419.

- Ross A, Rucker R. 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Microbiology. 12:763-770.
- Salinas I. 2015. The mucosal immune system of teleost fish. Biology. 4:525-539.
- [SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2017. Informe N° 024-2017 SANIPES/DSNPA/SDIP. Lima. 4 p.
- Secombes C, Bird S, Cunningham C, Zou J. 1999. Interleukin-1 in fish. Fish and Shellfish Immunology. 9:335-343.
- Semple S, Mulder I, Rodriguez-Ramos T, Power M, Dixon B. 2018. Long-term implantation of acoustic transmitters induces chronic inflammatory cytokine expression in adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Immunology and Immunopathology. 205:1-9.
- Sierralta V, León J, De Blas I, Bastardo A, Romalde J, Castro T, Mateo E. 2013. Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura. 38: 28-45.
- Sirvas S, Sánchez C, Peña C. 2011. Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. Revista Peruana de Biología. 18(3):349 - 353.
- Tizard I. 2009. Cómo se activa la inflamación. En: Tizard I, editor. Introducción a la inmunología veterinaria. 8ª ed. España: Elsevier. p 11-27.

- Tran H, Chen S, Chaung H, Cheng T. 2019. Molecular cloning of IL-6, IL-10, IL-11, IFN- γ and modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines in cobia (*Rachycentron canadum*) after *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 230:10-18.
- Tობბაქი E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. 30: 257-268.
- Tობბაქი E, Decostere A, Hermans K, Ryckaert J, Duchateau L, Haesebrouck F, Chiers K. 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 84:219-228.
- Troncoso M, Toledo M, Portel D, Figueroa G. 1994. Aislamiento de *Yersinia ruckeri* en salmónidos de cultivo. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 9 p.
- Vega-Ramírez MT, Moreno-Lafont MC, García-Flores V, López-Santiago R. 2010. Capítulo 24: Inmunología en peces. En Gutiérrez J, editor. *Inmunología Veterinaria*. México: Manual Moderno. p 1-6.
- Wang E, Liu T, Wu J, Wang K, Chen D, Geng Y, Huang X, Ouyang P, Lai W, Ai X. 2019. Molecular characterization, phylogenetic analysis and adjuvant effect of channel catfish interleukin-1 β s against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*. 87:155-165.
- Wiens G, Glenney G, LaPatra S, Welch T. 2006. Identification of novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chemokines, CXCD1 and CXCD2: mRNA expression after *Yersinia ruckeri* vaccination and challenge. *Immunogenetics* 58:308-323.

- Wiens G, Vallejo R. 2010. Temporal and pathogen-load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 29:639-647.
- Wu J, Shi Y, Zhang X, Li C, Li M, Chen J. 2015. Molecular characterization of an IL-1 β gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection. *Zoological Research*. 36(1):133-141.
- Zante M, Borchel A, Brunner R, Goldammer T, Rebl A. 2015. Cloning and characterization of the proximal promoter region of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6 gene. *Fish & Shellfish Immunology*. 43:249-256.
- Zapata A, Chibá A, Varas A. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama G, Nakanishi T, editors. *The fish immune system. Organism, pathogen, and environment*. San Diego: Academic Press. p 1-62.
- Zhang X, Ding L, Yu Y, Kong W, Yin Y, Huang Z, Zhang X, Xu Z. 2018. The change of teleost skin commensal microbiota is associated with skin mucosal transcriptomic responses during parasitic infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Frontiers in Immunology*. 9:2972.
- Zou J, Wang T, Hirono I, Aoki T, Inagawa H, Honda T, Soma G, Ototake M, Nakanishi T, Ellis A, Secombes C. 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 161-172.

- Zou J, Peddie S, Scapigliati G, Zhang Y, Bols N, Ellis A, Secombes C. 2003. Functional characterization of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*. 27:813-822.
- Zou J, Secombes C. 2016. The function of fish cytokines. *Biology*. 5:23.

ANEXOS

Anexo 1. Truchas arcoíris con signos clínicos e infectadas por *Y. ruckeri*, según su procedencia.

Trucha infectada	Departamento	Provincia
1	Junín	Jauja
2	Junín	Jauja
3	Junín	Jauja
4	Junín	Jauja
5	Junín	Jauja
6	Junín	Jauja
7	Junín	Jauja
8	Junín	Jauja
9	Junín	Jauja
10	Junín	Jauja
11	Junín	Jauja
12	Junín	Jauja
13	Junín	Jauja
14	Áncash	Huaraz
15	Áncash	Huaraz
16	Áncash	Huaraz
17	Junín	Huancayo
18	Junín	Huancayo
19	Junín	Huancayo
20	Junín	Huancayo
21	Junín	Huancayo
22	Junín	Huancayo
23	Junín	Huancayo
24	Junín	Huancayo
25	Junín	Huancayo
26	Lima	Huaura
27	Lima	Huaura
28	Áncash	Huaraz
29	Áncash	Huaraz
30	Junín	Concepción
31	Junín	Concepción
32	Junín	Concepción

Anexo 2. Truchas arcoíris clínicamente sanas, según su procedencia.

Trucha clínicamente sana	Departamento	Provincia
1	Junín	Jauja
2	Junín	Jauja
3	Junín	Jauja
4	Junín	Jauja
5	Junín	Jauja
6	Junín	Jauja
7	Junín	Jauja
8	Junín	Jauja
9	Junín	Jauja
10	Junín	Jauja
11	Junín	Jauja
12	Junín	Jauja
13	Áncash	Huaraz
14	Áncash	Huaraz
15	Áncash	Huaraz
16	Junín	Huancayo
17	Junín	Huancayo
18	Junín	Huancayo
19	Junín	Huancayo
20	Junín	Huancayo
21	Junín	Huancayo
22	Junín	Huancayo
23	Junín	Huancayo
24	Junín	Huancayo
25	Lima	Huaura
26	Lima	Huaura
27	Áncash	Huaraz
28	Junín	Concepción
29	Junín	Concepción
30	Junín	Concepción
31	Junín	Huancayo
32	Junín	Huancayo
33	Junín	Huancayo
34	Lima	Huaura
35	Lima	Huaura