

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Evaluación de los efectos de la quitina en la respuesta
inmune humoral y celular innata de especímenes
juveniles *Oncorhynchus mykiss* desafiados con la cepa
estándar *Flavobacterium psychrophilum* NMCD
1947T**

Tesis

para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Pablo César Hurtado Lévano

ASESORA

Libertad Alzamora Gonzales

Lima – Perú

2010

He visto tu verde resplandor, viejo roble, y tus ágiles ramas extenderse en la plenitud del todo; y los años se apilarán sobre tí y veré tus hojas que caerán en tristes otoños; pero siempre estaré ahí porque la gracia de Dios estará entre nosotros...

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar, debo agradecer el apoyo económico brindado por el Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado 2008 auspiciado por el Vicerrectorado de Investigación – Consejo Superior de Investigaciones y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que me facilitó el desarrollo y la culminación de mi tesis.
- A mi estimada asesora, la Dra. Libertad Alzamora, por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta tesis y sobretodo por brindarme su amistad, sus conocimientos en el plano científico y humano, los cuales me han servido para entender el orden y la importancia de mis prioridades.
- Al Biólogo Erasmo Colona por su amistad, reflejada en su buen humor; sus consejos y su guía oportuna en los momentos más difíciles.
- A mis queridos padres, Carmen y Paulino, quienes con ejemplo de lucha y perseverancia, me han enseñado que los errores pasados solamente son las huellas de un gran futuro.
- A la Bióloga Evelyn Álvarez por su apoyo valioso en algunas metodologías empleadas en esta tesis.
- A mi amigo Marco Cabello y a sus padres, por su amistad y colaboración en el transporte de los especímenes de trucha empleadas en esta tesis.
- Al Dr. Julio Santiago por su apoyo en el proceso de extracción de quitina realizado en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.
- A mi querido hermano, José Antonio, excelente estudiante, ejemplo de perseverancia y lucha académica.
- A mi pequeña Sofía por su apoyo incondicional y por ese hermoso regalo que dignifica mi vida.

- A Isabel, Ana, César, Ober, Cecilia, Henry y Junior, grandes compañeros del laboratorio de Inmunología.
- A mis incondicionales amigos de la Fraternidad: Melina, Gisela, Janet, Coral, Yanina, Cledy, Manuel, Eddy, Julio y Óscar.
- Y sobretodo a Dios por aliviar mi corazón y brindarme su gran amor que me renueva cada día.

ABREVIATURAS

1. **ACH:** Actividad hemolítica del complemento
2. **BCWD:** Enfermedad bacteriana del agua fría.
3. **PAMP`s:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
4. **CISD:** Grupo de truchas no tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida e infectadas con *F. psychrophilum*.
5. **QISD:** Grupo de truchas tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida e infectadas con *F. psychrophilum*.
6. **QN:** Grupo de truchas tratadas con quitina.
7. **GRC:** glóbulos rojos de carnero.
8. **i p:** vía intraperitoneal
9. **i m:** vía intramuscular
10. **SFT:** suero fetal de ternera.

INDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
1. LA ACUICULTURA Y PISCICULTURA.....	3
1.1. FACTORES EXTRÍNSECOS.....	3
1.2. FACTORES INTRÍNSECOS.....	4
2. INMUNOESTIMULANTES EN EL CAMPO DE LA ACUICULTURA.....	6
2.1. INMUNOESTIMULANTES NATURALES.....	8
2.2. QUITINA.....	10
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	14
2. MÉTODOS EMPLEADOS.....	18
V. RESULTADOS.....	28
VI. DISCUSIÓN.....	32
VII. CONCLUSIONES.....	37
VIII. RECOMENDACIONES.....	38
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
X. ANEXOS.....	51

RESUMEN

La acuicultura es una de las áreas de mayor prioridad para el desarrollo de nuestro país, sin embargo, existen muchos aspectos en los cuales no se ha investigado y otros en los que se está iniciando, como es el caso del uso de inmunoestimulantes para lograr mejores resultados en la producción de algunas especies de importancia económica. Uno de los inmunoestimulantes investigados en peces dulceacuícolas es la quitina, que administrada como suplemento dietético potencia la respuesta inmune previniéndoles del ataque de agentes patógenos como *Flavobacterium psychrophilum*. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad inmunoestimulante de la quitina, administrada por vía oral a juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en condiciones de inmunocompetencia e inmunosupresión y posteriormente desafiados con la cepa estándar *F. psychrophilum* 1947^T causante de la “enfermedad del agua fría”. Para demostrar los efectos de la quitina se evaluaron parámetros de la inmunidad innata celular (actividad fagocitaria y producción de óxido nítrico) y humoral (complemento por vía alternativa y lisozima sérica). Además, se determinó el tiempo necesario de tratamiento con quitina para lograr una adecuada inmunoestimulación.

Las truchas fueron alimentadas con pienso suplementado con quitina y sin ella (n=20 en cada caso) durante 2 y 4 semanas. La quitina se incorporó a la dosis de 100g/Kg de alimento, el mismo que fue suministrado a la proporción del 1% de la biomasa. Luego del tratamiento los dos grupos fueron inmunosuprimidos con ciclofosfamida y desafiados por vía intramuscular.

Se concluye que existe una mejora significativa en la producción de óxido nítrico y la actividad de lisozima sérica de los peces inmunosuprimidos y tratados con quitina en comparación con los peces inmunocompetentes y los no tratados. El complemento por vía alternativa y la actividad fagocitaria *in vitro* no mostraron variaciones significativas para ambos grupos desde las dos semanas de tratamiento.

Palabras clave: Acuicultura, inmunoestimulación, quitina, *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*.

ABSTRACT

The aquaculture is a field major priority than other for the development in our country; however, there exist many aspects in which it has not been investigated and others in which is beginning, as is the case of the use of immunoestimulants for to achieve better results in the production of the many species from economic importance. One of the stimulants investigated in other species of fish is the chitin that administered as dietary supplement enhances the immune response, providing them of the assault of pathogenic agents as *Flavobacterium psychrophilum*.

The aim of the investigation was to evaluate immunostimulant activity of chitin administered by oral route to rainbow trout's youths (*Oncorhynchus mykiss*) in immunocompetent and immunosupressed conditions e infected with a test strain, *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T, causing of the "cold water disease". To demonstrate the immunostimulating with chitin there were evaluated parameters of the cellular (phagocytary activity and production of nitric oxide) and humoral (complement's activity by alternative route and lysozyme serum's) innate immunity. In addition it decided the necessary time of treatment with the immunostimulant to achieve the suitable one immunostimulation.

Trouts were fed by pienso with and without chitin (n=20 in each case) for 2 and 4 weeks. The chitin was added to the dose of 100g/Kg of food and was supplied a proportion of 1% of biomass. Immediately of treatment both groups were immunosupressed with ciclofosphamide and infected by intramuscular route.

I concluded that there exists a significant improvement of the production of nitric oxide and lysozyme serum's activity in the immunosupressed fishes and treated with chitin in comparison with the immunocompetents fishes and not treated. The complement by alternative route and *in vitro* phagocytary activity did not show significant variations for both groups from two weeks of treatment.

Key words: Aquaculture, immunostimulation, chitin, *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha dado énfasis al empleo de inmunoestimulantes para la prevención de enfermedades causadas por agentes patógenos en acuicultura, adquiriendo un interés especial los inmunoestimulantes de origen natural, como la quitina; compuesto biocompatible, biodegradable, inocuo para el ambiente y además por la posibilidad de tener valor nutricional agregado.

La quitina, homopolisacárido de unidades N-acetilglucosamina, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza. Se encuentra principalmente en el exoesqueleto de los insectos, conchas de crustáceos y paredes celulares de hongos; presenta un probado efecto inmunoestimulante en mamíferos y ha sido escasamente demostrado en peces.

Los inmunoestimulantes potencian la capacidad de resistencia a las enfermedades mediante un incremento de los mecanismos de defensa, lo que los convierte en agentes profilácticos primarios de carácter preventivo, dirigidos a la aplicación en sistemas de producción de animales. Las vías de administración de los inmunoestimulantes también han sido motivo de investigación, siendo la inyección intraperitoneal y endovenosa las más empleadas; sin embargo, estas vías son estresantes e invasivas por lo que el empleo de la vía oral, aplicando el producto juntamente con el alimento permite su administración en grandes cantidades de peces, con un bajo esfuerzo y costo, ya que no requiere de personal entrenado, éste ha sido el motivo por el cual para el presente estudio se seleccionó la vía oral.

El desarrollo sostenible requiere no sólo un enfoque económico sino también la consideración del costo biológico del mismo; por lo tanto, se hace más conveniente la estrategia proactiva (preventiva) que la curativa (Newman, 1999a, 2003b; Jin, 2003).

La estrategia curativa tiene consecuencias no deseables como son: costos elevados, pérdida de efectividad de los antibióticos, mayor posibilidad de residuos en la carne, inducción de resistencia bacteriana y un efecto negativo sobre el medio ambiente; así por ejemplo, se ha demostrado que muchos antibióticos tienen efecto modulador dosis dependiente, debe considerarse que los efectos *in vivo* resultan de las propiedades integradas tanto de los fármacos como de los metabolitos, pudiendo ser estimulantes o inhibitorios.

La mayoría de los inmunoestimulantes presentan efectos de corta duración y sólo se prolongan por algunas semanas, por lo cual se requiere de una aplicación en forma continua.

Los peces cuentan con la enzima quitinasa que desdobla la N-acetil-D-glucosamina o quitina por hidrólisis de sus enlaces. Esta enzima tiene un peso molecular de aproximadamente 30 KDa. Su actividad ha sido detectada en bazo, plasma, linfa y en tejidos linfomiéloides, es posible que tenga una función proactiva actuando contra la quitina presente en hongos y parásitos de invertebrados, esta característica convierte a la quitina en un excelente producto biodegradable y al mismo tiempo en una fuente de bioelementos tan importantes como el carbono y nitrógeno (Olabuena, 2000).

La aplicación de inmunoestimulantes proporciona un *status* de salud superior que hace cada vez más innecesaria la aplicación de antibióticos que pueden provocar el surgimiento de resistencia, que dificulta un posterior tratamiento.

El mayor inconveniente de este método preventivo es que la obtención de los productos a administrar, como la quitina, necesita de un proceso industrial laborioso que encarece los tratamientos; sin embargo, es indispensable realizar un estudio que

demuestre su efecto inmunoestimulante para posteriormente considerar la utilización de ciertos microorganismos completos que contengan quitina y sean de fácil obtención, en grandes cantidades y a bajo costo, tales como las levaduras.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. LA ACUICULTURA Y PISCICULTURA

La acuicultura es una de las mejores técnicas ideadas por el hombre para aumentar la disponibilidad de alimento. Es considerada una alternativa en la administración de los recursos acuáticos, ya que se basa en la producción por medio del cultivo de organismos animales y vegetales; dirigida al consumo humano.

La piscicultura o cultivo de peces es la técnica acuícola más desarrollada. Es también considerada como el futuro de la actividad pesquera, ya que la demanda precisará la elección de un producto de suministro constante y de alta calidad, con el adecuado control de enfermedades (Sánchez, 2004).

A la piscicultura se encuentran asociados factores extrínsecos, como la temperatura, los cambios de estación y los parámetros abióticos del agua; e intrínsecos, como estado fisiológico y reproductivo, niveles hormonales, nutrición, etc; que intervienen drásticamente en la producción.

2.1.1. FACTORES EXTRÍNSECOS

Los factores extrínsecos asociados a la actividad piscícola son aquellos que afectan directa e indirectamente en el metabolismo de los peces disminuyendo su tasa de supervivencia, por consiguiente, una disminución en la producción. Por ejemplo los cambios estacionales y la temperatura ambiental influyen notoriamente sobre la respuesta inmune, específicamente sobre la producción de anticuerpos (Olabuenaga, 2000 y Padrós y Furones, 2002).

El control de ciertos parámetros bioquímicos del agua tales como: temperatura, oxígeno disuelto (OD), concentración de metales pesados, etc; son

fundamentales para la actividad piscícola. La temperatura es un parámetro importante que debe medirse a diario, ya que nos determina el rendimiento del cultivo. Al aumentar la temperatura se acelera el metabolismo de los peces, así como, reduce el tiempo de duración de la comida en el tracto digestivo (Rodríguez y Anzola, 2001).

Las elevadas concentraciones de metales pesados y/o gases tóxicos como el sulfuro de hidrógeno, así como los pesticidas utilizados en la actividad agrícola, ocasionan daños irreversibles de la especie cultivada.

2.1.2. FACTORES INTRÍNSECOS

Las enfermedades debido a causas intrínsecas se manifiestan por alteraciones de las condiciones ambientales a las que están sometidas las especies de interés acuícola. Por ejemplo las altas densidades de peces que se alcanzan mediante las tecnologías aplicadas a la piscicultura (cultivo intensivo y tecnificado) generan estrés, que afecta el sistema inmunitario de los peces ocasionando una respuesta disminuida y por consecuencia susceptibilidad a ser atacados por agentes patógenos primarios u oportunistas, que restringen la productividad acuícola (Dautrempuits *et al.*, 2003; Wendelaar, 1997 y Svoboda, 2001). Entre los patógenos más comunes se encuentran varias taxas bacterianas, que reúnen a especies como: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium psychrophilum* (antes *Flexibacter psychrophilum*), *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri*, entre otras; las cuales están asociadas a enfermedades en peces (Austin y Austin, 2007). Por ejemplo, en salmónidos las bacterias Gram negativas son las principales causantes de enfermedades siendo el grupo de las flavobacterias responsables de cuadros patológicos que manifiestan afecciones de piel, aletas y branquias. Se han

reportado casos en que las infecciones por *Flavobacterium psychrophilum* (antes *Flexibacter psychrophilum*) (Bernardet *et al.*, 1996) pueden llegar a producir procesos septicémicos muy serios (Padrós y Furones, 2002) originados por la necrosis ulcerativa asociada a la “enfermedad bacteriana del agua fría” (BCWD) (Holt *et al.*, 1993) de la cual es responsable y que afecta a especímenes juveniles, aunque se han reportado casos en peces adultos (Gijón y Zarza, 2006).

La defensa frente a la invasión de microorganismos patógenos en animales multicelulares está mediada por la oportuna reacción de los mecanismos inespecíficos de la respuesta inmune. La respuesta inmune inespecífica tiene barreras físicas (piel, mucus y pH), químicas (lisozima, proteína C reactiva, citoquinas, transferrina, sistema de complemento, etc) y celulares (células natural *killer*, fagocitos, etc) (Abbas y Litchman, 2003).

Los peces presentan una respuesta inmunológica bien desarrollada e integrada, y en el caso de los teleósteos, con algunas similitudes respecto a los vertebrados superiores (Olabuenaga, 2000).

El componente inespecífico humoral del sistema inmune de peces, comprende al mucus que es la secreción del epitelio que forma la barrera primaria de defensa entre el pez y su ambiente. El mucus presenta proteínas y carbohidratos con función protectora que bloquea la colonización por organismos extraños a través de un mecanismo de pérdida y reemplazo (Ourth, 1980). También presenta componentes secretorios (entre ellos la lisozima); los cuales constituyen una barrera de defensa química primaria (Fletcher, 1981). La lisozima, enzima mucolítica con propiedades antimicrobianas, ha sido detectada en el suero, el mucus y en otros tejidos ricos en leucocitos, como el riñón, el bazo y el intestino, tanto en peces de agua de mar como de agua dulce (Grinde *et al.*, 1988; Lie *et al.*,

1989). Tiene la capacidad de degradar mucopolisacáridos de la pared celular de bacterias, principalmente Gram positivas, causando su lisis (Ellis, 1990).

El sistema de complemento también es un componente humoral de la respuesta inmune inespecífica. Éste participa tanto en la inmunidad humoral como en la celular contra diferentes patógenos y en el proceso inflamatorio (Ingram, 1990 y Yano, 1992). También juega un rol importante en la modulación de la respuesta inmune adaptativa por la unión a receptores específicos de la superficie de linfocitos de mamíferos y células dendríticas foliculares (Fearon y Locksley, 1996; Carrol y Prodeus, 1998; Sahu y Lambris, 2001). Además participa como nexo entre la respuesta inmune adaptativa e innata.

Se ha descrito su presencia en el mucus de la piel, actuando como primera barrera de defensa (Lambris, 1993 y Sakai, 1992). Los peces teleósteos poseen complemento semejante al de los mamíferos. Se ha demostrado que ambas vías (alternativa y clásica) están presentes en especies como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa (*Cyprinus carpio*), la tilapia (*Tilapia nilotica*) y el bagre (*Ictalurus punctatus*) (Nonaka *et al.*, 1981; Matsuyama *et al.*, 1988 a, b; Lobb y Hayman, 1989).

En cuanto a la respuesta celular inespecífica, se encuentran las células NK o células citotóxicas inespecíficas y las células fagocíticas. Estas últimas, realizan la ingestión y digestión de material extraño particulado (reacción de defensa ampliamente distribuido en vertebrados e invertebrados). En peces teleósteos se describen diferentes células con capacidad fagocítica (Mac Arthur y Fletcher, 1985; Finn, 1970).

El fortalecimiento de los componentes del sistema inmune de los peces mediante la aplicación de medidas preventivas es un apoyo directo, a fin de que, éstos reaccionen favorablemente al embate, y por ende, disminuyan los riesgos de transmisión de agentes infecciosos. Por una parte, el sistema inmune específico se refuerza con la aplicación de vacunas para cada enfermedad y la respuesta inmune inespecífica, que por cierto en los peces es la más desarrollada, se potencia con la incorporación de inmunoestimulantes en la dieta (Aguilar, 2004).

2.2. INMUNOESTIMULANTES EN EL CAMPO DE LA ACUICULTURA

En las últimas décadas se han desarrollado numerosos estudios que han permitido establecer la utilidad de algunos suplementos dietéticos en el campo de la acuicultura, éstos son los denominados inmunomoduladores o inmunoestimulantes (Anderson y Jeney, 1992; Blazer, 1992 y Sakai, 1999).

Los inmunoestimulantes son sustancias que activan el sistema inmunológico de los animales, de forma que les hacen más resistentes a las infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos. Desde hace años se conoce la propiedad de algunos fragmentos de las paredes celulares de microorganismos, los cuales les confieren resistencia frente a las infecciones microbianas (Kiser *et al.*, 1956).

Algunos de los beneficios que manifiestan los inmunoestimulantes en la acuicultura son: reducción de la tasa de mortalidad debido a patógenos oportunistas, prevención contra enfermedades virales, incremento de la resistencia a enfermedades en los cultivos de camarones, reducción de la mortalidad de peces juveniles, aumento de la eficacia de sustancias antimicrobianas, incremento en la resistencia a parásitos y eficacia de las vacunas (Raa, 2000).

Se ha demostrado que existen resultados positivos en la potenciación del efecto de la vacunación debido a la administración de inmunoestimulantes en la dieta de un grupo de peces, así como, en su resistencia a enfermedades y rendimiento productivo. (Aguilar, 2004)

Los inmunoestimulantes pueden ser agrupados en agentes químicos, suspensiones bacterianas, polisacáridos, extractos de plantas y animales, factores nutricionales y citoquinas (Sakai, 1999). La aplicación de estos inmunoestimulantes va dirigida a que cumplan una acción conjunta al proceso de vacunación, tomando en cuenta que los primeros sean utilizados como suplementos dietéticos de uso periódico (Sánchez, 2004).

El levamisol es un fenilimidazol de origen sintético usado para tratar infecciones con nemátodos en medicina humana y veterinaria. Accidentalmente se estableció su capacidad inmunomoduladora en mamíferos a nivel de linfocitos T y macrófagos, aunque exactamente no se conoce su modo de acción (Rodríguez *et al.*, 2003). Los efectos del levamisol en el sistema inmune de *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch* y *Sparus aurata* han sido demostrados en ensayos *in vivo* (Anderson y Jeney 1992; Baba *et al.*, 1993; Findlay y Mundlay, 2000; Ispir y Dorucu, 2005; Mulero *et al.*, 1998; Siwicki 1987, 1989). Aunque el levamisol y otros inmunoestimulantes sintéticos son drogas registradas y aceptadas por la Comunidad Europea y la FDA de los Estados Unidos, se debe tomar en cuenta que sus niveles de biocompatibilidad y su capacidad para ser biodegradadas no son aún conocidos. Además se ha reportado la toxicidad del levamisol en cantidades traza acumulados en los tejidos de animales (no reportado en peces)(Cuesta *et al.*, 2002a).

Por ello, se ha puesto énfasis en la investigación de inmunoestimulantes naturales como es el caso de los glucanos, los probióticos, la quitina, el quitosano,

etc. Los cuales no tienen efectos acumulativos en los animales, ya que la mayoría de ellos son nutrientes habituales de la dieta (Rondón, 2004).

2.2.1. INMUNOESTIMULANTES NATURALES

Aunque por mucho tiempo el uso de antibióticos y promotores de crecimiento de origen sintético han sido utilizados en producción animal, en los últimos años existe una presión a nivel internacional para disminuir su uso, lo que ha conllevado a establecer límites máximos de residuos en los productos animales con el consiguiente establecimiento de periodos de retirada para tales sustancias. Además ha aumentado la demanda por parte del consumidor de productos cada vez más naturales, biocompatibles y biodegradables, que orienten a la acuicultura a establecer medidas preventivas dirigidas a fortalecer el sistema inmunológico de los peces.

Los glucanos son inmunoestimulantes naturales muy utilizados (en especial el β -1.3 / 1.6 glucano), debido a que en la superficie de los fagocitos existen receptores de alta especificidad para esta molécula. Estos receptores se encuentran muy distribuidos en los animales (desde los invertebrados hasta el hombre). El reconocimiento de estas moléculas por sus respectivos receptores produce un aumento en la actividad fagocitaria y en la producción de citoquinas. Estas últimas estimulan la formación de nuevos leucocitos, lo que hace aumentar la producción de anticuerpos (Bonaldo *et al.*, 2007).

Existe evidencia experimental que sugiere que los β -glucanos administrados en la dieta o por vía intraperitoneal pueden modificar la actividad de algunos componentes del sistema inmunitario (Anderson, 1996; Secombes, 1996; Galeotti, 1998; Robertsen, 1999 y Sakai, 1999).

Los probióticos son definidos como preparaciones microbianas que mejoran la salud y el bienestar de sus organismos hospederos (Gatesoupe, 1999; Verschuer *et al.*, 2000 y Schrezenmeir y De Vrese, 2001). También son considerados inmunoestimulantes naturales. Esto se puede demostrar debido a que existen trabajos recientes vinculando su aplicación en el área de la acuicultura (Bly *et al.*, 1997; Gómez Gil *et al.*, 2000; Spangaard *et al.*, 2001; Raida *et al.*, 2003; y Al Harbi *et al.*, 2004) específicamente en especies como *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*, etc; e inclusive, la aplicación en el cultivo de estadios larvales (Gómez Gil *et al.*, 2000).

El quitosano, derivado de la quitina, ha sido utilizado como un inmunoestimulante en “trucha arco iris”, incrementando la resistencia frente a infecciones causadas por *Aeromonas salmonicida* (Cuesta *et al.*, 2002b, 2004, Sakai, 1999 y Tokura *et al.*, 1999). Posee actividades biológicas como inmunoadyuvante o actividad protectora contra la infección (Kim *et al.*, 2003). El quitosano inoculado por inyección intraperitoneal incrementa la producción de anión superóxido en leucocitos de peces (Jeney y Anderson, 1993).

La aplicación de estos productos también confiere a los animales tratados, y en concreto a su sistema inmunitario, un estado fisiológico mucho más idóneo para afrontar cualquier situación adversa, como enfermedades y situaciones de estrés. Esto es permitido, ya que existe un incremento de los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, demostrado fehacientemente en mamíferos en los cuales se observó la inducción de la hematopoyesis, incremento de la inmunidad y una mayor resistencia a las enfermedades infecciosas (Di Luzio, 1985). Estas características le permiten convertirse en agentes profilácticos primarios no curativos sino preventivos de importancia en animales de producción (Rodríguez *et al.*, 2002, 2003; Anderson y Jeney, 1992).

2.2.2. QUITINA

La quitina se encuentra formando parte del exoesqueleto de crustáceos y la pared celular de algunos hongos (*Saccharomyces cerevisiae*). Manifiesta un probado efecto inmunoestimulante en mamíferos y peces (aunque en éstos últimos escasamente documentado) debido a su alta tasa de biodegradabilidad y otras características (Aranaz *et al.*, 2009).

La inoculación de quitina a especímenes de trucha arco iris y *yellowtail* estimuló la actividad de sus macrófagos, además de aumentar la resistencia contra la infección de *Vibrio anguillarum* y *Pseudomonas piscida*, respectivamente (Sakai *et al.*, 1992 y Kawakami *et al.*, 1998).

La actividad fagocítica fue incrementada en leucocitos de carpa inyectadas con quitina (Sakai *et al.*, 1992), sin embargo, los trabajos existentes sólo describen su acción después de ser suministrada mediante inyección, aumentando las respuestas celulares inespecíficas (Sakai *et al.*, 1992; Kawakami *et al.*, 1998; Esteban *et al.*, 2000) y solamente existe un estudio en el que se suministró esta sustancia de forma oral (Esteban *et al.*, 2001).

La administración de quitina en la dieta de *Sparus aurata L.* produjo un aumento de la citotoxicidad natural de sus leucocitos, que llegó a duplicar la actividad correspondiente a los leucocitos de ejemplares del grupo control de forma dosis dependiente luego de 2 semanas de aplicación (Cuesta *et al.*, 2002b). Además los leucocitos de riñón anterior propiciaron un efecto considerable en la inmunidad celular innata luego de fagocitar quitina particulada (< 10µ de diámetro) (Cuesta *et al.*, 2001).

La aplicación de quitina en el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, (10.4 ± 0.7 g) origina un efecto protector contra *Vibrio alginolyticus*. Además existe un aumento significativo de la bomba respiratoria y el recuento de hemocitos totales después de un periodo de tratamiento de 2 días a una concentración de 4 y 6 µg/g de peso (Wang y Chen, 2005).

La quitina puede ser utilizada como suplemento dietético para cultivos intensivos en piscicultura, ya que se ha demostrado que los peces poseen la enzima quitinasa que desdobla la N-acetil -D-glucosamina o quitina por los enlaces 1,4 -glucosamina. Esta actividad permite que el sistema inmune de los peces reconozca previamente antígenos de posibles agresores semejantes al del inmunoestimulante, lo cual no es raro, ya que la mayoría de los patógenos presentan los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos o PAMP's, su papel importante en la supervivencia microbiana se relaciona con su estabilidad genética (Medzhitov, 2001).

Actualmente, los procesos de inmunoestimulación emplean con mayor frecuencia vías de inoculación de naturaleza estresante e invasiva; por lo que, el empleo de la vía oral, aplicando el producto juntamente con el alimento permite su administración en grandes cantidades de peces, con un bajo esfuerzo y costo, ya que no requiere de personal entrenado, éste ha sido el motivo por el cual para el presente estudio se seleccionó la vía oral.

El cultivo de truchas es muy utilizado para la cría industrial en todo el mundo por su adaptabilidad al manipuleo, condiciones de alta densidad, alimentación artificial y por su adaptabilidad a rangos de temperaturas y requerimientos de oxígeno disuelto a diferencia de otros salmónidos. Dentro de este grupo, la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, prefiere aguas más frías

(temperatura óptima entre 13 – 21 °C) y bien oxigenadas (9 a 11 mg O₂ / L) (Sánchez, 2004). En este último caso debe ser suficiente para no afectar la tasa de respiración individual, existiendo recomendaciones estandarizadas para que no sean nunca inferiores a 8 mg O₂ /L (Leitritz y Lewis, 1976). Las condiciones descritas permitieron elegir a *Oncorhynchus mykiss* como material biológico de trabajo, además de su fácil adaptación a condiciones de laboratorio.

En el Perú, no se han encontrado antecedentes sobre el uso de inmunoestimulantes en acuicultura, por lo cual el presente, es un trabajo pionero en el área.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

La quitina administrada como suplemento dietético a los especímenes juveniles de trucha arco iris, incrementa las principales actividades humorales y celulares de su sistema inmunitario innato.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad inmunoestimulante de la quitina sobre el sistema inmunitario de especímenes juveniles de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, alimentados con pienso comercial suplementado y desafiados con *Flavobacterium psychrophilum*.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad de la quitina sobre la inmunidad humoral innata: complemento sérico por vía alternativa y actividad de lisozima sérica.
- Demostrar el efecto de la quitina sobre la inmunidad celular innata: producción de óxido nítrico y la actividad fagocitaria *in vitro* de leucocitos de riñón anterior.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1. OBTENCIÓN DE LA QUITINA

La quitina fue extraída a partir de exoesqueletos de camarones, *Litopenaeus vannamei*, utilizando el método de Kurita (1997). Para esto, la materia prima fue lavada con abundante agua, licuada y posteriormente mezclada con HCl 2N, por 10 – 12 horas a temperatura ambiente, luego se mezcló con NaOH 2N a 80 °C por 4 horas, en agitación constante; a partir de este procedimiento se extrajo la quitina. Para la eliminación del pigmento del exoesqueleto se mezcló con hipoclorito de sodio 1% a 40 °C por 5 minutos, para retirar los restos de hipoclorito de sodio, se enjuagó la muestra periódicamente con agua destilada (7 veces) finalmente la quitina fue secada a 25 °C por 1h (Figura 1).

La incorporación de la quitina en el alimento balanceado fue a la proporción de 100g/kg de alimento. Para ello se trituraron ambas en un mortero hasta obtener una mezcla granulada, posteriormente se volvió a armar el pellet y se secó a 40 °C. Luego fue almacenada para su posterior uso (Figura 2).

4.1.2. ESPECÍMENES JUVENILES DE *Oncorhynchus mykiss*

Se emplearon especímenes juveniles de trucha arco iris procedentes de una piscigranja ubicada en el distrito de Tambo en Canta. Los peces fueron adaptados a condiciones de laboratorio por 5 días en acuarios de 300 litros de capacidad, con aireación permanente y provistos de un circuito cerrado de agua a un rango de temperatura de 14 – 15 °C.

El agua fue previamente declorada y renovada cada 6 días. Los peces seleccionados tuvieron un peso promedio de 27.3 g y una longitud de 10 cm (Figura 3). Para realizar las inoculaciones y la obtención de las muestras de sangre (Figura 4) los peces fueron previamente anestesiados empleando MS-222 (tricaína metanosulfonato-SIGMA) 1: 15, 000 (Figura 5).

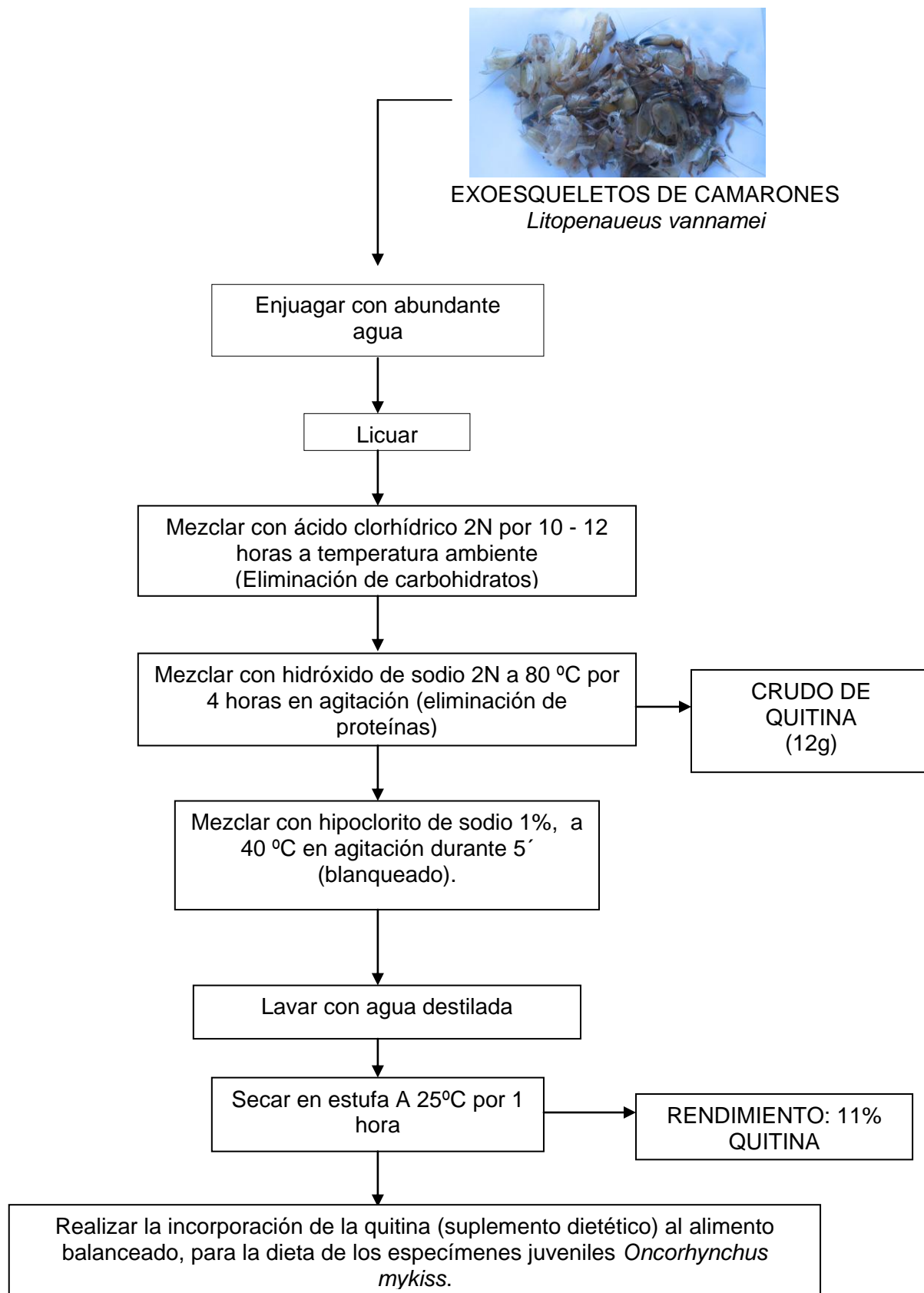


Figura 1. Protocolo de extracción de quitina a partir de exoesqueletos de camarones, *Litopenaeus vannamei*, por el método de Kurita.

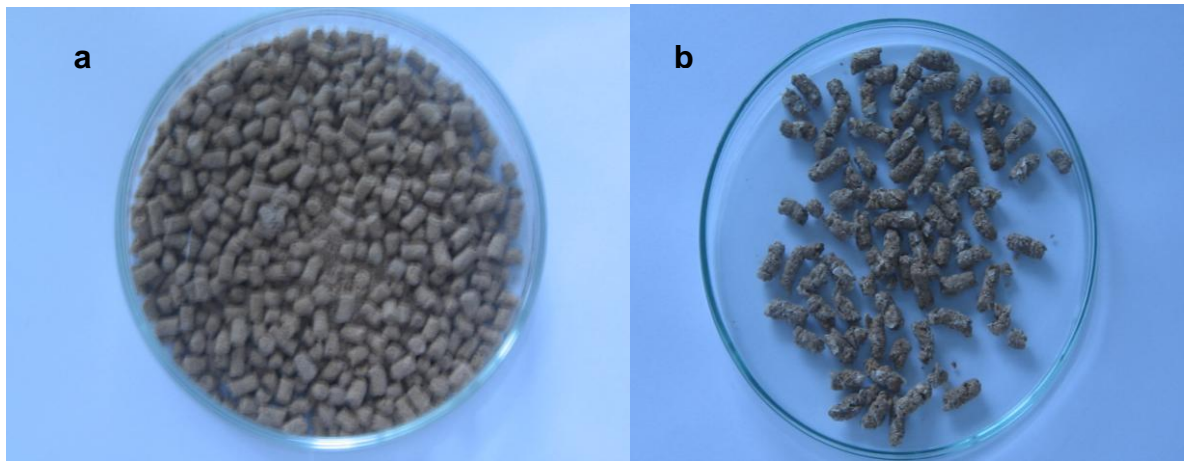


Figura 2. (a) Pienso comercial granulado “truchina”; **(b)** pienso comercial suplementado con quitina granulado utilizado en los tratamientos

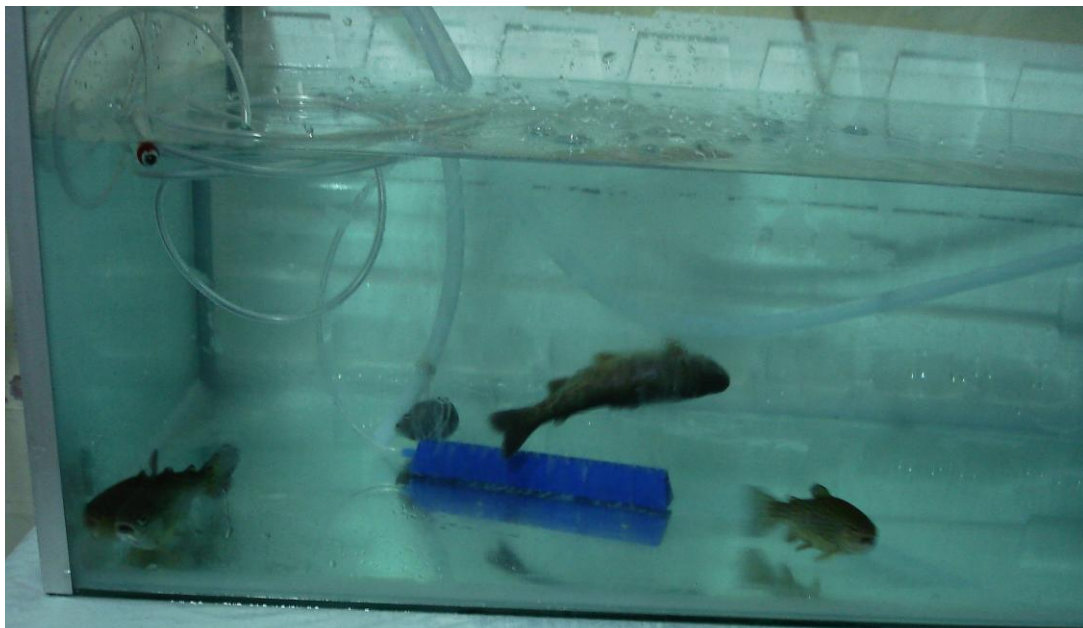


Figura 3. Juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) adaptándose a condiciones de laboratorio. La adaptación se realizó durante cinco días, se relacionó con el movimiento normal, ausencia en el cambio de color de la piel (oscurecimiento) de las truchas en los acuarios.

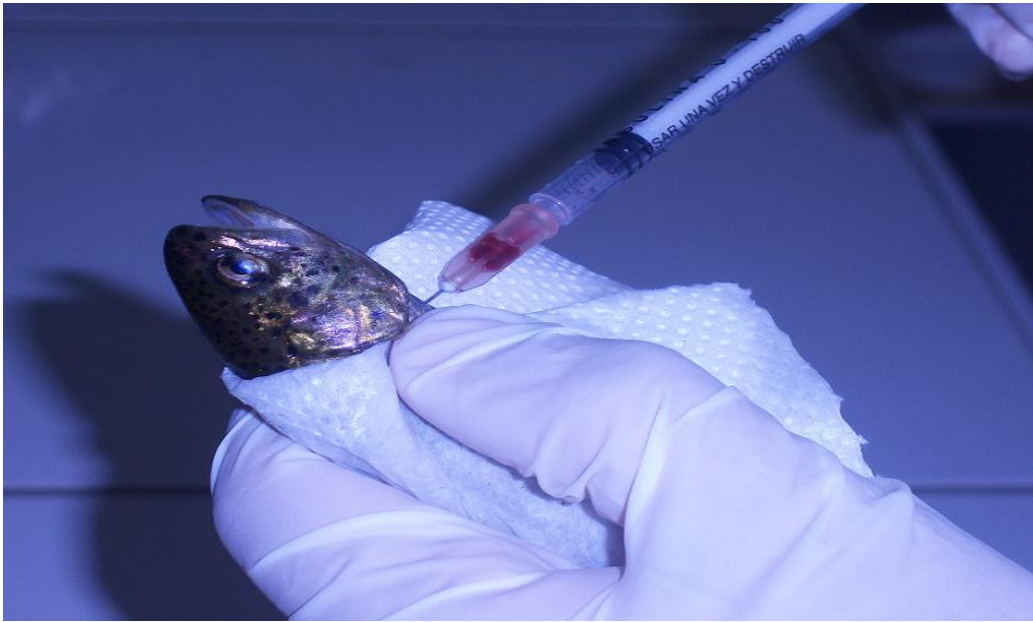


Figura 4. Sangría por punción cardiaca. Se realizó empleando jeringas tuberculina heparinizadas debido a que la coagulación es muy rápida.



Figura 5. Los peces fueron anestesiados empleando el MS-222 (tricaína metanosulfonato- SIGMA) a una concentración de 1: 15, 000. Este procedimiento permitió realizar las inoculaciones y la obtención de muestras de sangre.

4.2. MÉTODOS EMPLEADOS

4.2.1. TRATAMIENTO CON QUITINA

Los especímenes juveniles de trucha arco iris fueron alimentados diariamente al 1% de su biomasa, con pienso comercial en forma de *pellet* (truchina) y fueron distribuidos en grupos de tratamiento.

Los periodos de tratamiento fueron de 2 y 4 semanas. Al cabo de este tiempo se tomaron al azar 5 ejemplares de cada grupo, los cuales fueron anestesiados, medidos y pesados. Para luego obtener muestras de sangre y leucocitos de riñón anterior.

4.2.2. INMUNOSUPRESIÓN

A las 2 semanas de tratamiento con quitina, los 15 peces restantes (Grupo I o II) fueron inmunosuprimidos por vía intraperitoneal (Figura 6) con una dosis de 50 mg/Kg de peso de ciclofosfamida, y a los dos días de la inmunosupresión se desafiaron infectándolas por vía intramuscular a nivel de la aleta dorsal (Figura 7). El desafío se realizó empleando 0.1mL de un cultivo en *fase log* de *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T a una densidad óptica de 0.6, equivalente a 6.25×10^7 microorganismos/mL (La Frenz *et al.*, 2004).

La cepa 1947^T, es una cepa estándar de comprobado efecto patogénico, en condiciones experimentales (Figura 8). A partir de la inmunosupresión se suspendió el tratamiento con quitina y se las alimentó igual que al control. Los peces se observaron permanentemente y se tomaron muestras de sangre para la evaluación de los parámetros inmunológicos (Rodríguez *et al.*, 2002).



Figura 6. Inmunosupresión de las truchas por vía intraperitoneal. Para la Inmunosupresión se utilizó la ciclofosfamida a una concentración de 50 mg/Kg de peso



Figura 7. Infección *in vitro* de los especímenes por vía intramuscular. La infección se realizó empleando 0.1mL de un cultivo en fase log de *F. psychrophilum* 1947^T.

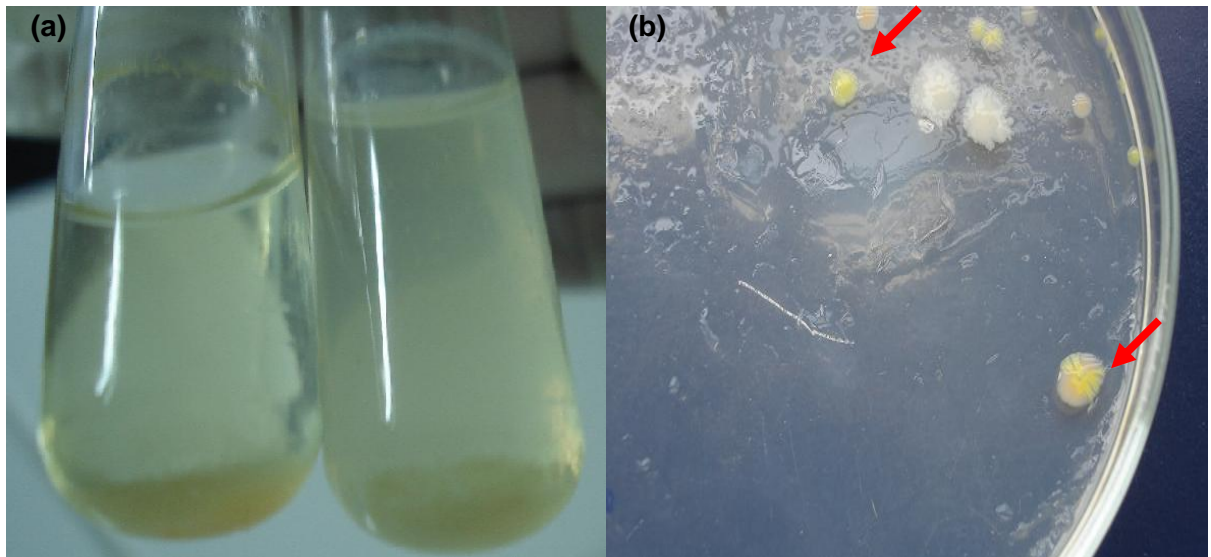


Figura 8. Comportamiento cultural de *F. psychrophilum* 1947^T. (a) Cultivo en fase log de *Flavobacterium psychrophilum* NMCD 1947^T a una densidad óptica de 0.6 que es equivalente a 6.25×10^7 microorganismos/mL; (b) Colonias (señaladas por la flecha) de *F. psychrophilum* en agar *Cytophaga* modificado.

El esquema seguido fue: Tratamiento – Inmunosupresión – Infección (Figura 9). Se establecieron los siguientes grupos:

QISD: Especímenes tratados con quitina, inmunosuprimidos y desafiados con *F. psychrophilum* 1947^T.

CISD: Especímenes no tratados, inmunosuprimidos y desafiados con *F. psychrophilum* 1947^T.

QN: Especímenes tratados, no inmunosuprimidos.

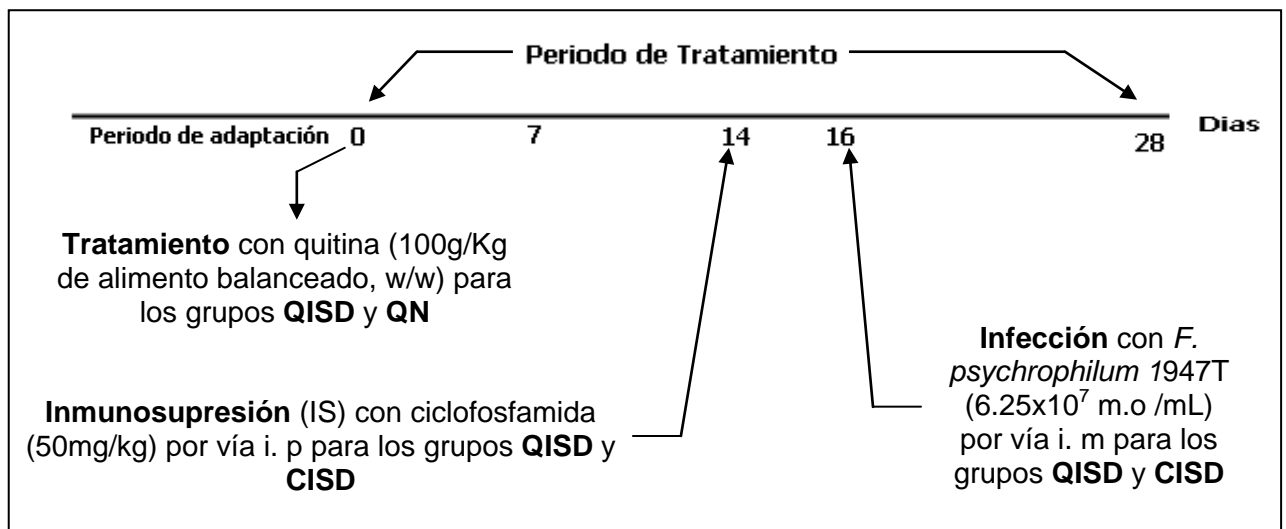


Figura 9. Esquema representativo del tratamiento, inmunosupresión y desafío de los especímenes de trucha arco iris empleados.

4.2.3. EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL INNATA

Las muestras de sangre se extrajeron por punción cardiaca, se dejaron coagular y se separó el suero que se almacenó a -30 °C.

4.2.3.1. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL COMPLEMENTO POR VÍA ALTERNATIVA

Se utilizaron glóbulos rojos de carnero (GRC) al 2% en buffer fosfato pH 7.2, que se agregaron a diluciones seriadas del suero de las truchas, de 1: 2 hasta 1: 8 en microplacas de 96 pocillos, empleando 100 µL de cada suero, luego se adicionaron 100 µL de GRC al 2%. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 2 horas, se hizo la lectura cualitativa, los sobrenadantes se colectaron y almacenaron en refrigeración, la absorbancia fue cuantificada (hemoglobina liberada) a 540nm (Rodríguez *et al.*, 2002). Los valores máximo (100%) y mínimo de hemólisis (hemólisis espontánea) se obtuvieron mediante la adición de agua destilada y PBS 1X pH 7.2 en lugar de suero, respectivamente.

El porcentaje de hemólisis (H) fue determinado mediante la ecuación:

$$H=100 \times (\text{Absorbancia A} - \text{Absorbancia B})/(\text{Absorbancia C} - \text{Absorbancia B})$$

Donde las absorbancias fueron evaluadas a 540 nm, A es la muestra problema, B es la muestra de hemólisis espontánea (valor mínimo) y C es la muestra de hemólisis máxima (valor máximo).

4.2.3.2. ACTIVIDAD DE LISOZIMA SÉRICA

La actividad de la lisozima en sueros de trucha se determinó por la técnica turbidimétrica, según Parry *et al.*, 1965. Ésta consistió en adicionar 25 µL del suero a 175 µL de una suspensión de *Micrococcus luteus* en buffer fosfato pH 8.0 a una absorbancia inicial de 0.8 - 0.9 a 450 nm. Las medidas de absorbancia se realizaron partiendo de los 0 a los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Las unidades de lisozima presentes en el suero fueron calculadas usando una curva estándar realizada con lisozima de huevo de pollo (SIGMA L7651-1G). La unidad de actividad de lisozima fue definida como una reducción de 0.001/ minuto a pH 8.0 a temperatura ambiente.

4.2.4. EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR INNATA

4.2.4.1. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS DEL RIÑÓN ANTERIOR

Para llevar a cabo el aislamiento de los leucocitos procedentes de suspensiones celulares de riñón anterior (Figura 10), a los especímenes se les realizó una incisión abdominal, comprendida entre la abertura anal y el opérculo (Figura 11), el riñón anterior fue extraído y tamizado con 1.5 mL de PBS 1X, la suspensión fue sometida a un gradiente de *Fycoll – Histopaque* y centrifugada a 3500 rpm por 30 minutos (Figura 12). Los leucocitos presentes en la interfase fueron recogidos y lavados 2 veces en medio de cultivo RPMI – 1640, a 1500 rpm por 10 minutos.

Los leucocitos fueron contados en cámara de *Neubauer*, siendo su viabilidad determinada por el método de exclusión de azul de tripán y fueron ajustados a 1×10^6 cel/mL, en medio de cultivo RPMI – 1640, suplementado con suero fetal de ternera (SFT) al 10% y antibióticos (estreptomina y penicilina) a pH de 7.4. Los leucocitos del riñón anterior extraídos se emplearon para evaluar la producción de óxido nítrico y evidenciar la fagocitosis *in vitro*, esto se puede observar en la Figura 13.



Figura 10. Riñón anterior de *Oncorhynchus mykiss*. Posición anatómica del riñón anterior. La flecha señala el inicio del riñón anterior.

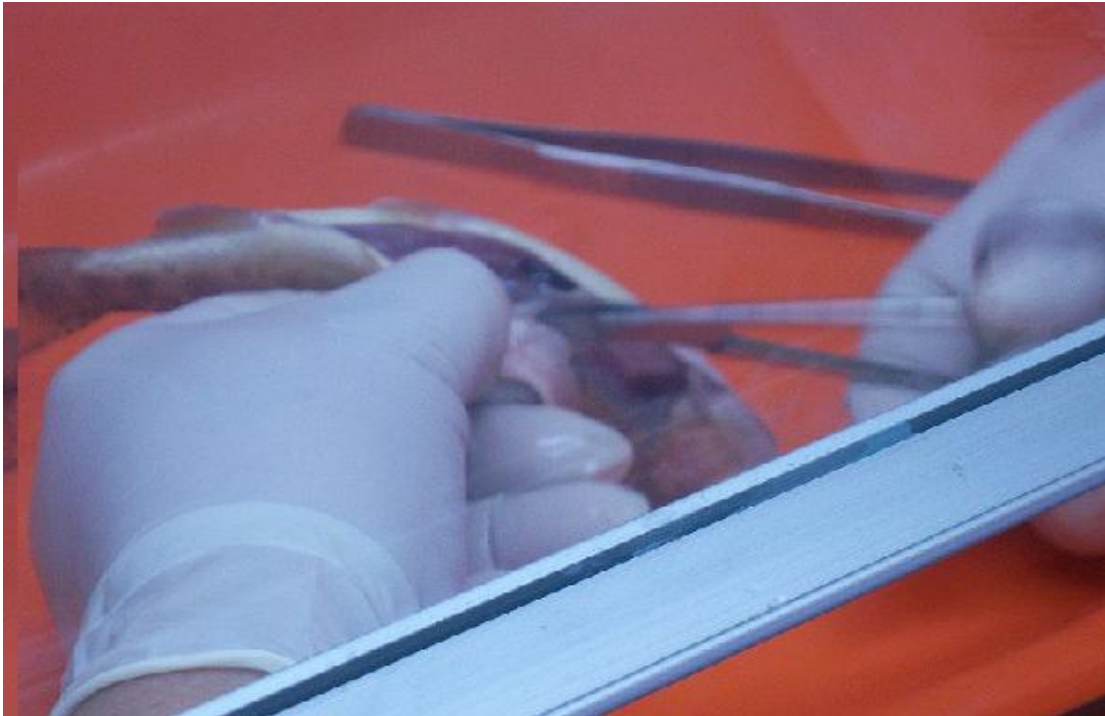


Figura 11. Extracción del riñón anterior. Se realizó por una previa incisión abdominal de los especímenes desde la abertura anal hasta el opérculo. Permite el aislamiento de leucocitos para la evaluación de parámetros de inmunidad celular.

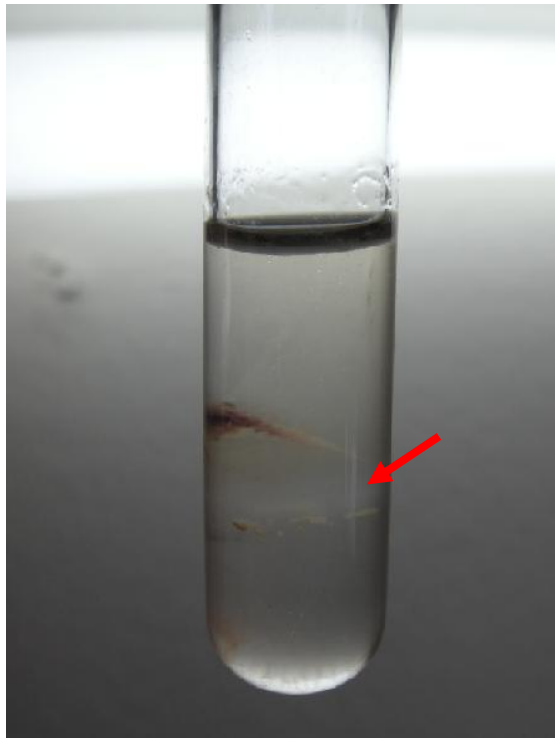


Figura 12. Células mononucleares del riñón anterior de *Oncorhynchus mykiss* aisladas con Fycoll-Hypaque, la flecha señala el anillo de células: monocitos y linfocitos.

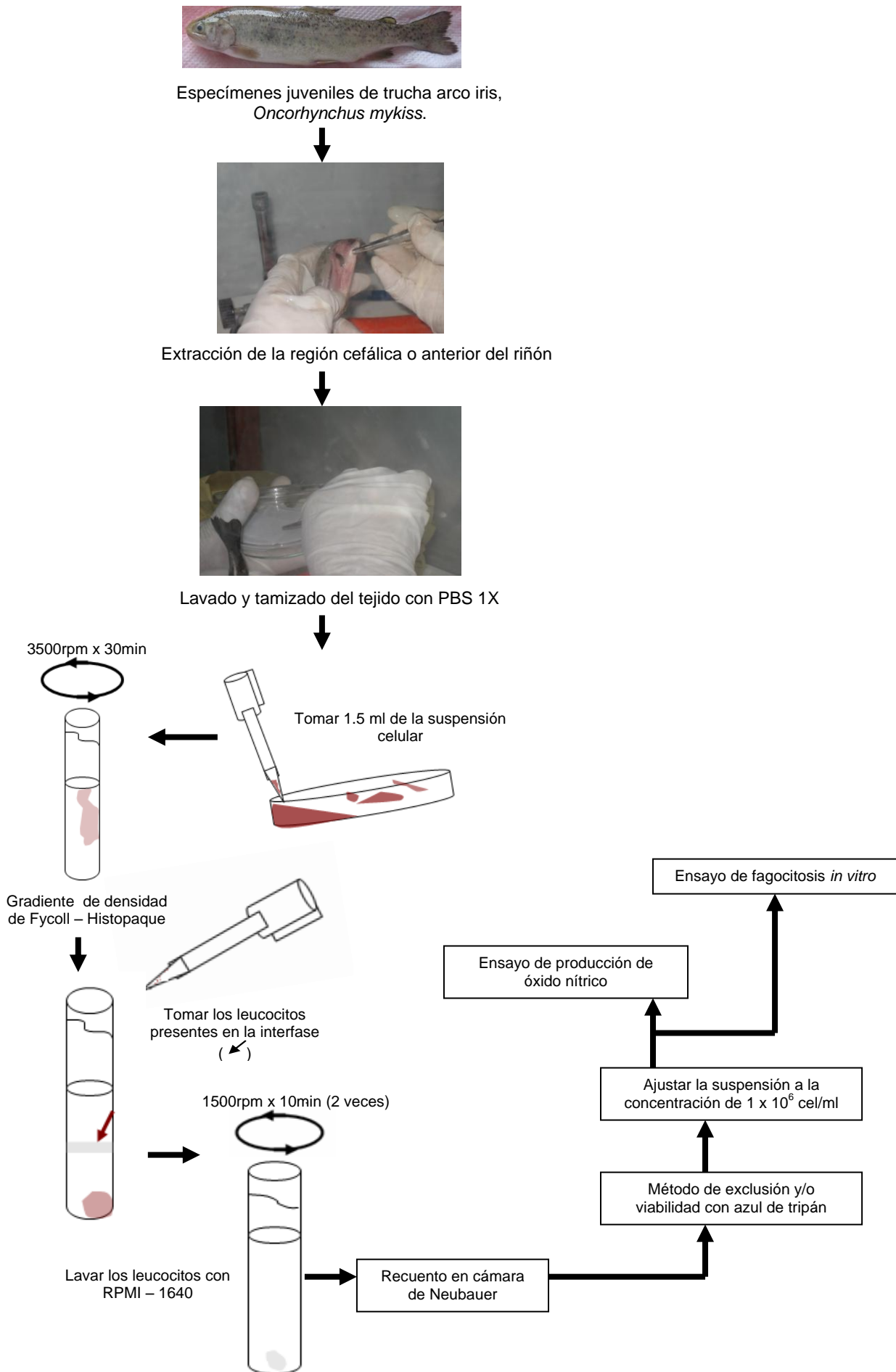


Figura 13. Flujograma para el aislamiento de leucocitos de riñón anterior de juveniles de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*

4.2.4.2. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR LEUCOCITOS AISLADOS

Se utilizó la acumulación de nitritos en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos, como un indicador de la producción del óxido nítrico por células residentes o activadas. Los cultivos se hicieron por triplicado en un volumen final de 200 μL por vial de cultivo, los cuales contenían 10^6 cel/mL. La incubación se hizo a 15 °C por 18 horas. Al término del periodo de incubación se obtuvieron los sobrenadantes, centrifugando los cultivos a 1000 rpm por 5 minutos y se determinaron los niveles de nitritos mediante el uso del reactivo de Peter Griess. Se graficó una curva estándar empleando nitrito de sodio (Gómez Flores *et al.*, 1997). Las densidades ópticas se determinaron a 540 nm por espectrofotometría.

4.2.4.3. FAGOCITOSIS *IN VITRO* DE LEUCOCITOS AISLADOS

Los leucocitos (10^6 cel/mL) fueron enfrentados a suspensiones celulares provenientes de cultivos de *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T (6.25×10^7 microorganismos/mL). Éstos se incubaron a 15°C por 1 hora, se hizo un frotis y se coloreó con Giemsa para observar los fagocitos a un aumento de 100X (Figura 14 y 15).

4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos fueron realizados por duplicado. A partir de los datos obtenidos se obtuvo una media \pm error estándar para cada grupo experimental y variable medida. Estos valores se representaron gráficamente. Para detectar diferencias significativas debido al tiempo o al tratamiento se aplicó el test de análisis de la varianza (Anova). Cuando el Anova denotó diferencias significativas se aplicó el test de Bonferroni, para comparar los distintos grupos experimentales entre sí. En ambos casos (Anova y test de comparación de medidas) se consideraron que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Para establecer la curva estándar y correlacionar los niveles de producción de óxido nítrico *in vitro* se utilizó el programa SPSS v. 15.0.

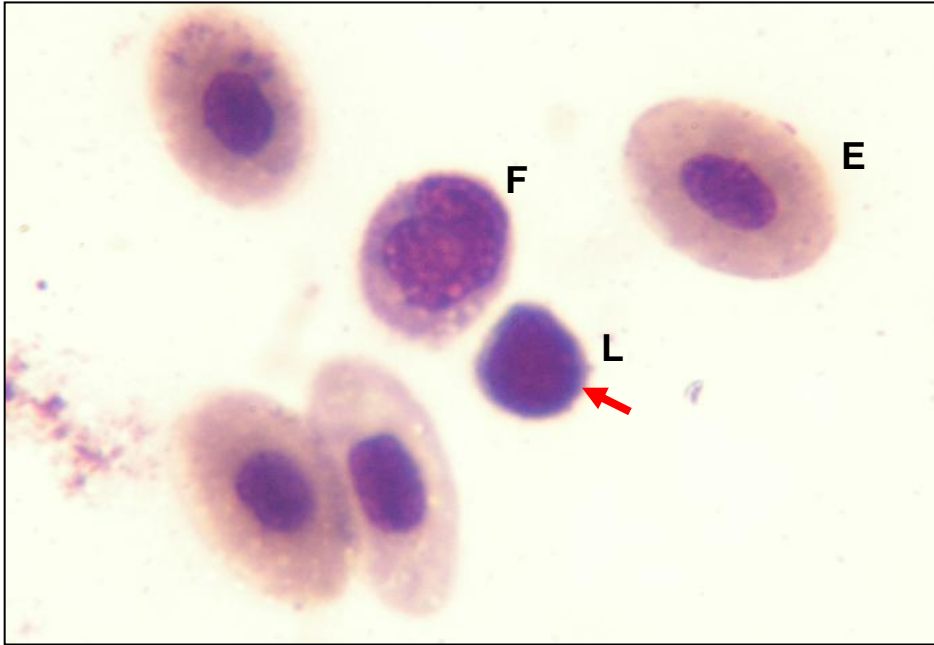


Figura 14. Fagocito (F) de ejemplar de *Oncorhynchus mykiss* perteneciente al grupo QISD. La flecha señala un linfocito (L). En el campo también se observan eritrocitos (E).

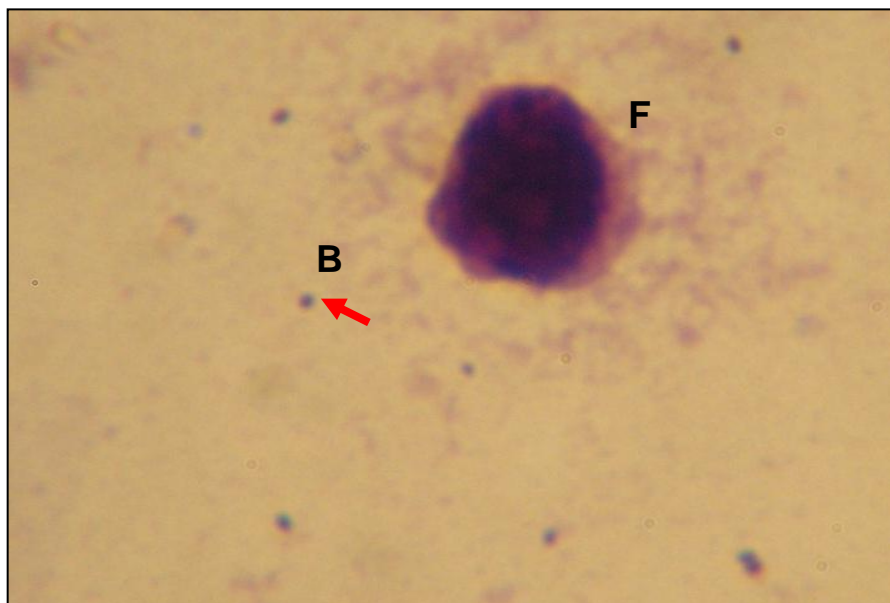


Figura 15. Fagocito (F) próximo a *Flavobacterium psychrophilum*. La flecha señala a la bacteria (B). Coloración Giemsa (100X).

V. RESULTADOS

5.1. INMUNIDAD HUMORAL INNATA

5.1.1. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL COMPLEMENTO POR VÍA ALTERNATIVA

En la Figura 16, se muestran los valores de porcentaje de hemólisis correspondientes a los grupos de tratamiento: QISD, CISD y QN, los cuales no presentan un porcentaje de hemólisis mayor que el 50% a las 2 semanas de tratamiento. El grupo QISD (inmunosuprimidos) presenta un mayor porcentaje de hemólisis en comparación con los otros grupos.

En la segunda (1/4) y tercera dilución empleada (1/8) la actividad hemolítica del grupo CISD no es evidenciable.

En la Tabla 1, se señala que el grupo QISD presentan un título superior (1/8) en comparación con el grupo CISD (1/ 2) a las 2 semanas de tratamiento.

A las 4 semanas de tratamiento no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

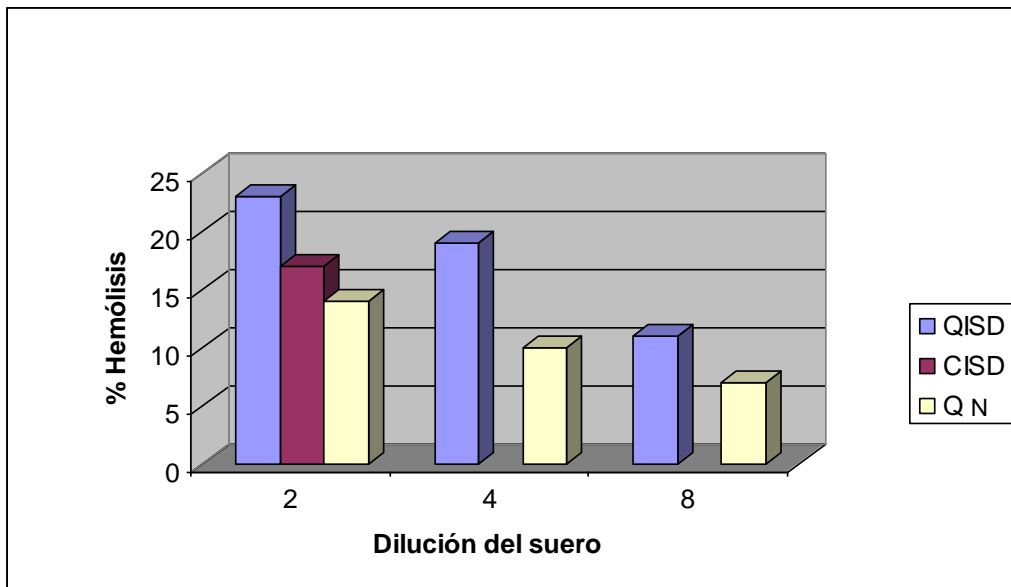


Figura 16. Actividad hemolítica del complemento por vía alternativa. Porcentaje de hemólisis de sueros de trucha alimentados con pienso mezclado con quitina, inmunosuprimidos y desafiados (QISD), controles inmunosuprimidos y desafiados (CISD) y QN.

QISD: Truchas tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T

CISD: Truchas no tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T.

QN: Truchas tratadas con quitina, no inmunosuprimidas ni desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T.

Tabla 1. Actividad hemolítica del complemento por vía alternativa.

Muestras de suero	Dilución del suero con actividad de complemento (+)
QISD	1:8
CISD	1:2

QISD: Truchas tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T

CISD: Truchas no tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T.

5.1.2. ACTIVIDAD DE LA LISOZIMA SÉRICA

En la Tabla 2, se señala que los grupos de tratamiento alimentados con el suplemento dietético, QN y QISD, presentan un rango de actividad de 50 (valor mínimo) y 150 UI/mL (valor máximo), respectivamente.

El grupo QISD presenta una mayor actividad de lisozima sérica en la primera dilución en comparación con los grupos CISD y QN.

En la Figura 16, los promedios de actividad de lisozima evidencian que el grupo QISD (inmunosuprimidos e infectados) presenta una mayor actividad (113UI/mL) en comparación con el grupo QN (83UI/mL) (inmunocompetentes no infectados).

Estos valores indican que este parámetro muestra una variación significativa favorable en los especímenes tratados, pero en condiciones de inmunosupresión.

Los especímenes correspondientes a los controles no mostraron actividad de lisozima evidenciable.

Tabla 2. Actividad de lisozima (U /mL) en sueros de truchas QN (alimentadas con quitina pero no inmunosuprimidas) y QISD (alimentadas con quitina, inmunosuprimidas y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947^T).

Truchas QN y QISD	Reducción en la absorbancia por la lisozima sérica	Actividad de la lisozima en Unidades / mL
1	0.001	50
2	0.001	50
3	0.003	150

QISD: Truchas tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947^T

QN: Truchas tratadas con quitina, no inmunosuprimidas ni desafiadas con *F. psychrophilum* 1947^T.

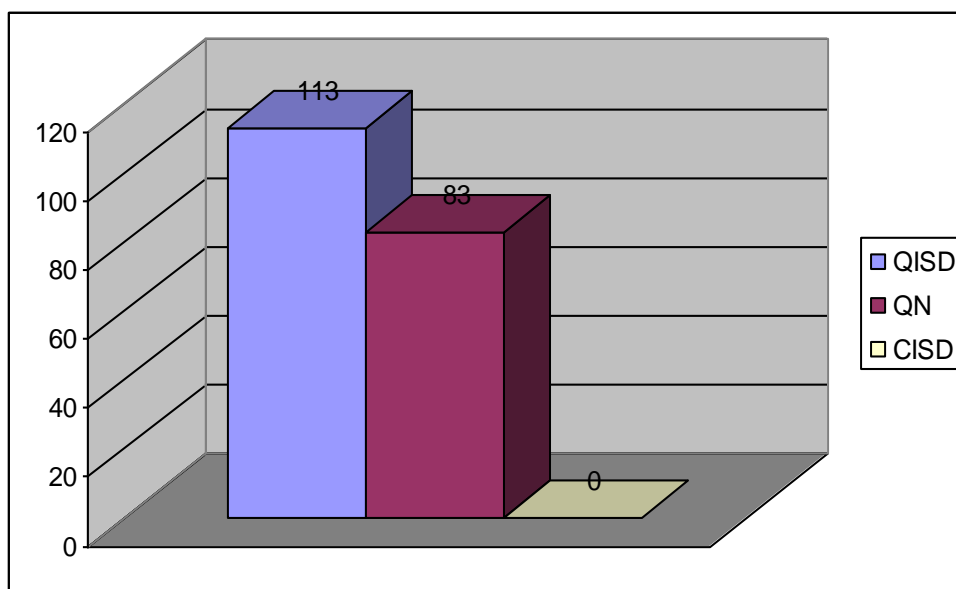


Figura 17. Actividad de lisozima sérica de truchas. Promedio de la actividad de la lisozima (U/mL) en sueros de trucha QN y QISD. Los controles (CISD) no aparecen en la figura porque no mostraron actividad de la lisozima evidenciable.

QISD: Truchas tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T

CISD: Truchas no tratadas con quitina, inmunosuprimidas con ciclofosfamida y desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T.

QN: Truchas tratadas con quitina, no inmunosuprimidas ni desafiadas con *F. psychrophilum* 1947T.

5.2. INMUNIDAD CELULAR INNATA

5.2.1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Como se muestra en la Tabla 3, se observó que el grupo QISD presenta un valor promedio de producción de óxido nítrico de $18.74 \pm 4.17 \mu\text{M}$ y el grupo CISD de $14.35 \pm 2.19 \mu\text{M}$.

Tabla 3. Producción de óxido nítrico por células de riñón anterior de *Oncorhynchus mykiss* desafiados con *Flavobacterium psychrophilum*.

Grupo de truchas	Promedio de producción de óxido nítrico (μM)
QISD	18.74 ± 4.17
CISD	14.35 ± 2.19

$p = 0.0003616$ ($p < 0.001$)

5.2.2. FAGOCITOSIS *IN VITRO* DE LOS LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR

Se ha observado la presencia de fagocitos en los peces de los grupos QISD y CISD con 2 y 4 semanas de tratamiento con quitina y sin quitina respectivamente, aunque no se evidencia un aumento estadísticamente significativo entre ambos periodos de tratamiento.

VI. DISCUSIÓN

Los inmunoestimulantes son sustancias que activan el sistema inmunitario de animales proporcionándoles resistencia frente a diferentes tipos de infecciones (Kiser *et al.*, 1956). Éstos están incluidos dentro del grupo de sustancias utilizadas para la prevención y el tratamiento de enfermedades de peces, e inclusive, es la alternativa que está alcanzando un desarrollo considerable en estos últimos años (Siwicki *et al.*, 1994; Robertsen, 1999 y Sakai, 1999). Dentro de este grupo los que han adquirido un especial interés son los de origen natural por ser compatibles con el medio ambiente y por presentar una alta tasa de biodegradabilidad.

Las ramificaciones de glucosa que se encuentran en los compuestos de naturaleza polisacárida (β -glucanos, quitina, quitosano, etc) manifiestan un potencial inmunoestimulante que puede ser utilizado en el área de acuicultura (Engstad, 1994; Santomá, 2000; Anderson, 2004 y Robertsen, 1999). Debido a esto, estas sustancias se encuentran categorizadas como sustancias de naturaleza preventiva.

Entre los inmunoestimulantes más estudiados se encuentran los β -glucanos (Ellis, 1977; Yano *et al.*, 1989; Matsuyama *et al.*, 1992; Engstad y Robertsen, 1993), aunque también se han probado lentinanos, eschizofilanos, quitina y quitosano (Yano *et al.*, 1989; Robertsen *et al.*, 1994 y Esteban *et al.*, 2000).

La quitina ha manifestado un efecto inmunoestimulante probado en mamíferos (Diamantstein *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1984, 1987) y ha sido escasamente probado en peces (Sakai *et al.*, 1992; Esteban *et al.*, 2000 y Kawakami *et al.*, 1998). Esta es la primera vez que se estudia la influencia de la quitina utilizada como suplemento dietético y suministrada por vía oral en especímenes juveniles de trucha arco iris en nuestro país.

Aunque existen varios protocolos de administración de los inmunoestimulantes para establecer su efecto inmunopotenciador (inmersión, inyección u oral), los más utilizados son la aplicación por vía endovenosa e intraperitoneal; sin embargo, la elección de la vía oral nos permite disminuir los niveles de estrés y los costos para su administración a grandes cantidades de peces lo que lo hace más apropiado en el área de acuicultura.

La quitina utilizada en este trabajo fue obtenida a partir de exoesqueletos de camarones, *Litopenaeus vannamei*, y suministrada por vía oral como suplemento dietético durante 2 y 4 semanas de tratamiento a la concentración de 100g/Kg de alimento balanceado; permitiendo evidenciar el aumento significativo de algunos parámetros inmunológicos innatos en especímenes juveniles de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Estos resultados son similares a los descritos por Rodríguez *et al.*, 2002.

En el caso de la actividad del complemento por vía alternativa se ha demostrado una mayor actividad en el grupo tratado con el suplemento dietético (QISD y QN) en comparación con el grupo no tratado, CISD, durante 2 semanas. El tratamiento de 4 semanas no demostró diferencias estadísticamente significativas. Un caso similar fue reportado por Rodríguez *et al.*, 2002; los cuales determinaron que en doradas alimentadas con quitina se presentó un aumento significativo de la actividad hemolítica del complemento por vía alternativa a las 2 semanas de tratamiento, aunque con el aumento del periodo de tratamiento de 4 a 6 no se observaron diferencias significativas. Otro caso similar fue reportado por Balcázar *et al.*, 2007; los cuales demostraron que el alimento mezclado con bacterias lácticas incrementaron significativamente la actividad del complemento por vía alternativa en relación al control al final de la segunda semana de tratamiento.

La actividad de la lisozima sérica es un importante parámetro de defensa inmune innato en vertebrados e invertebrados. Esta enzima actúa como opsonina y activador del sistema del complemento, además de regular la actividad fagocitaria (Magnadóttir, 2006). Las actividades de la lisozima correspondiente a los sueros de los especímenes de los grupos tratados (QISD y QN) mostraron una actividad mínima de 50 y máxima de 150 UI/mL respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Laiz Carrión *et al.*, 2005, los cuales evidenciaron que en doradas alimentadas con pienso comercial enriquecido con un complejo vitamínico, existen niveles más elevados de actividad de la lisozima (media 150 ± 52) que en el grupo control (media 81.3 ± 15.7), aunque se debe aclarar que los autores trabajaron sólo con especímenes en condiciones de inmunocompetencia.

Los valores de actividad de la lisozima fueron superiores en los especímenes QISD (113UI/mL) en comparación con los QN (83UI/mL). Aunque existe escasa información sobre la modulación de la actividad de lisozima en peces se conoce que el aumento de la concentración y/o actividad de la lisozima en sangre es causado por inoculaciones de sustancias extrañas o infecciones (Mock y Peters, 1990). Esto puede explicar a que se deben los valores superiores en los especímenes que fueron desafiados con la cepa estándar *F. psychrophilum* 1947^T. Un caso similar no muy apartado fue reportado por Kubilay y Ulukoy, 2002; quienes determinaron en trucha arco iris una elevada actividad de lisozima en condiciones de estrés agudo (causados por variaciones controladas en sus parámetros físico-químicos) con una mínima actividad de 140 UI/mL y un máximo de 900 UI/mL. A diferencia de Möck y Peters, 1990; quienes encontraron una significativa disminución de esta actividad en relación a las variaciones de otros parámetros en los mismos especímenes.

Aunque la quitina administrada en el alimento o por vía intraperitoneal (Rodríguez *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 1992) no afecta aparentemente la actividad de la

lisozima ni la del complemento por vía alternativa, en el presente estudio se observó que concentraciones mayores de quitina aumentan su actividad.

Algunos investigadores determinaron que la quitina no afectó la actividad de la lisozima en suero de dorada (Rodríguez *et al.*, 2002; Lie *et al.*, 1989) y en el suero de trucha arco iris (Sakai *et al.*, 1992). Otros autores como Engstand *et al.*, 1993, han determinado un incremento de la actividad de lisozima después de una inyección intraperitoneal de glucanos obtenidos a partir de levaduras, en salmón, trucha (Rodríguez *et al.*, 2002) y turbot (*Scophthalmus maximus*) (Santarém *et al.*, 1997). También existen varios reportes que verifican el efecto positivo en la actividad de lisozima sérica cuando se administran glucanos por vía oral (De Baulny *et al.*, 1996; Verlhac *et al.*, 1996; Jeney *et al.*, 1997).

En el presente trabajo se reporta el incremento de la actividad fagocítica, la misma que no fue significativa lo cual podría estar relacionado con el tiempo de tratamiento. Esteban *et al.*, 2001; realizaron experimentos para evaluar fagocitos de *Sparus aurata L* (pez dorada) tratadas durante seis semanas sin que esta actividad se afecte; sin embargo, dichos investigadores emplearon peces normales (inmunocompetentes). Otro caso similar fue reportado por Ispir y Jonar, 2007; quienes demostraron que especímenes juveniles y saludables de *O. mykiss* tratados con levamisol (10µg/mL) no existe un aumento significativo de la actividad fagocitaria en la primera semana de tratamiento.

Los resultados obtenidos difieren de Rodríguez *et al.*, 2002 quienes demostraron que cuando se alimenta a *S. aurata* con paredes de levadura a las dosis de 5 y 10 g/Kg existe un aumento significativo de la actividad fagocitaria a partir de la cuarta semana de tratamiento. Aunque no existen diferencias significativas entre ambas dosis.

Sang-Hoon *et al.*, 2008; además determinaron que existe un incremento significativo en la actividad fagocítica de los leucocitos extraídos de riñón anterior de *O. mykiss* (inmunocompetentes) después de 2 semanas de tratamiento con una cepa Pdp11 (cepa de levaduras con potencial probiótico inactivada por calor) utilizado como suplemento dietético. Esta actividad no presentó variaciones significativas después de 3 y 4 semanas de tratamiento.

Con respecto a la producción de óxido nítrico, se evidencia que el grupo tratado con el suplemento dietético, QISD y QN, y en particular el grupo QISD presenta valores superiores y estadísticamente significativos que el grupo CISD coincidiendo con lo reportado por Villamil *et al.*, 2002; los cuales observaron en ensayos acerca de la producción de óxido nítrico en peces no inmunoestimulados que este radical no se incrementa significativamente por la simple incubación de macrófagos con *Lactobacillus lactis*.

Las truchas QISD pese a las condiciones de inmunosupresión mostraron una mayor actividad de producción de óxido nítrico debido al desafío con la bacteria en comparación con las truchas QN. Aunque Sanders *et al.*, 1996 no encontraron diferencias significativas en los grupos de tratamiento al inocular por vía intraperitoneal 0.1 mL de pristane (potente inmunosupresor en mamíferos) en comparación con pristane + virus de la septicemia hemorrágica viral.

En nuestro país, no se han registrado publicaciones en esta área de investigación y la comparación de resultados ha sido limitada. El presente trabajo pondera el desarrollo de la aplicabilidad de inmunoestimulantes naturales en acuicultura, en el marco del desarrollo sostenible y uso de tecnologías limpias.

VII. CONCLUSIONES

1. La quitina suministrada durante 2 semanas como suplemento dietético a los juveniles de trucha arco iris activó el complemento por vía alternativa de manera cualitativamente superior en los peces tratados con quitina, inmunosuprimidos y desafiados con *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T en comparación con los no tratados, no observándose variaciones y diferencias significativas a las 4 semanas de tratamiento.
2. La actividad de lisozima fue superior en las truchas inmunosuprimidas tratadas con quitina y desafiadas con *Flavobacterium psychrophilum* NMCD 1947^T en comparación con los grupos no tratados inmunosuprimidos e inmunocompetentes.
3. La actividad fagocitaria *in vitro* no presentó variaciones significativas por la administración de quitina en la dieta de los peces durante los periodos de tratamiento.
4. La quitina extraída del exoesqueleto de camarones estimuló la inmunidad celular natural evidenciable por el incremento significativo de la producción de óxido nítrico de los grupos tratados en comparación con los no tratados con dicho polímero.

VIII. RECOMENDACIONES

1. El control periódico de los parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto, pH, temperatura, etc) son importantes en la viabilidad y acondicionamiento de los peces.
2. Se recomienda el empleo de levaduras en los procesos de inmunoestimulación, ya que estos organismos son de fácil manipulación y producción a escala (biomasa) en condiciones de laboratorio.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A and LITCHMAN, A. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the immune system*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2004. 322p. ISBN: 0-7216-0241.
- AGUILAR, C. Utilización de vacunas e inmunoestimulantes en la industria salmonera. *Skreting Informa Chile*, 2004, p. 5 – 6.
- AL HARBI, A and NALM UDDIM, M. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*. 2004, Vol. 229, p. 37 – 44.
- ANDERSON, D and JENEY, G. Immunostimulants added to inject *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanism and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1992, Vol. 34, p. 379 – 389.
- ANDERSON, D. Environmental factors in fish diseases: Immunological aspects. En: *The fish immune system. Organism, pathogen and environment*. G Iwama y T Nakamishi (eds). 2004, p. 289 – 310. Academic Press, Londres.
- ANDERSON, D. Immunostimulants, Vaccines and Environmental Stressors in aquaculture: NBT Assays to show Neutrophil Activity by these Immunomodulators. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 2004.
- ARANAZ, I; MENGIBAR, M; HARRIS, R; PAÑOS, I; MIRALLES, B; ACOSTA, N; GALED, G and HERAS, A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*. 2009, Vol. 3, p. 203 – 230.
- AUSTIN, B and AUSTIN, D. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of framed and wild fish*. 4th ed. Germany. Springer – Praxis Books in Aquatic and Marine Sciences. 2007. 545p. ISBN: 978-1-4020-6068-7.

- BABA, T; WATASE, Y and YOSHINAGA, Y. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakk.* 1993, Vol. 59, p. 301 – 307.
- BALCÁZAR, J; DE BLAS, I; RUIZ-ZARZUELA, I; VENDRELL, D; CALVO, A; MÁRQUEZ, I; GIRONES, O and MUZQUIZ, J. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition.* 2007, Vol. 97, p. 522 – 527.
- BERNARDET, J; SERGER, M; VANACANNEYT, F; BERTHE, K; KERSTERS, H and VAMME, P. Cutting a Gordian knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*. Emended Description of the Family *Flavobacteriaceae* and proposal of *Flavobacterium hydatis* *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1996, Vol. 46, p. 128 – 148.
- BLAZER, V. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Diseases.* 1992, Vol. 2, p. 309-323.
- BLY, J; QUINIQU, S; LAWSON, L and CLEN, L. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases.* 1997, Vol. 20, p. 35 – 40.
- BONALDO, A; THOMPSON, K; MANFRIN, A; ADAMS, A; MURANO, E; MORDENTI, A and GATTA, P. The influence of dietary β -glucans on the adaptative and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis.. *Italian Journal Animal Science.* 2007, Vol. 6, p. 151 – 164.
- CARROLL, M and PRODEUS, A, Linkages of innate and adaptative immunity. *Current Opinion Immunology.* 1998, Vol. 10, p. 36 – 40.
- CUESTA, A; MESEGUER, J and ESTEBAN, M. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata L.*). *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2004, Vol. 101, p. 203 – 210.

- CUESTA, A; ESTEBAN, M and MESEGUER, J. *In vitro* effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 2003, Vol. 15, p. 1-11.
- CUESTA, A; ESTEBAN, M and MESEGUER, J. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002, Vol. 89, p. 169-174.
- CUESTA, A; ORTUÑO, J; RODRÍGUEZ, A; ESTEBAN, M and MESEGUER J. Aplicación de sustancias naturales (vitaminas y quitina) para modular la capacidad de respuesta a infecciones víricas o protozoarias y frente a tumores de doradas *Sparus auratus* 1758 cultivadas. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 2002b, Vol. 18 (1-4), p. 183-187.
- DAUTREMPUIITS, C; BETOULLE, S and VERNET, G. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp (Cestoda). *Fish and Shellfish Immunology*. 2003, Vol. 15, p. 467 – 471.
- DE BAULNY, M; QUENTEL, C; FOURNIER, V; LAMOUR, F and LEGOUVELLO, R. Effect of long term oral administration of β – glucans as an immunostimulants or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Disease Aquatic Organism Review*. 1996, Vol. 2, p. 139 – 147.
- DIAMANSTEIN, T; KLOS, M; OSAWA, H and CHEN, Z. Chitin: an immunological adjuvant and a polyclonal β -lymphocyte activator. *International Archive. Allergy Applied Immunology*. 1982, Vol. 68, p. 377-381.
- DI LUZIO, N. Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Seminary Immunology*. 1985, Vol. 8, p. 387-400.
- ELLIS, A. Lysozyme assays. En: Stolen, J.S., T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel (Eds.). *Techniques in Fish Immunology*. New Jersey. USA. SOS Public. 1990, p. 101-103.

- ELLIS, A. The leucocytes of fish: a review. *Journal Fish Biology*. 1977, Vol. 11, p. 453-491.
- ENGSTAND, R. Immunology of Fish. Ph. D. Thesis. The Norwegian College of Fishery Science. Noruega. 1994.
- ENGSTAND, R and ROBERTSEN, B. Specificity of a β -glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Development Comp. Immunology*. 1993, Vol. 18, p. 397- 408.
- ESTEBAN, M; CUESTA, A; ORTUÑO, J and MESEGUER, J. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin in gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) innate immune response. *Fish Shellfish Immunology*. 2001, Vol. 11, p. 303-315.
- ESTEBAN, M; MULERO, V; CUESTA, J; ORTUÑO, J and MESEGUER, J. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). *Fish Shellfish Immunology*. 2000, Vol. 10, p. 543-554.
- FEARON, D and LOCKSLEY, R. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996, Vol. 272, p. 50 – 53.
- FINDLAY, V and MUNDLAY, B. Immunomodulatory effects of levamisole on the non-specific immune system of Atlantic Salmon, *Salmo salar L.* *Journal Fish Diseases*. 2000, Vol. 23, p. 369-378.
- FINN, J. The protective mechanisms in diseases of fish. *Veterinary Bulletin Weybridge*. 1970, Vol. 40, p. 873-886.
- FLETCHER, T. Non-antibody molecules and the defence mechanisms of fish. En: Pickering, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*, Academy Press. 1981, p.171-183.
- GALEOTTI, M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *Journal Applied Ichthyology*. 1998, Vol. 14, p.189-199.
- GATESOUBE, F. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 1999, Vol. 189, p. 147-165.

GIJÓN, D and ZARZA, C. Salud y prevención: Enfermedades emergentes en el cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Skreting Informa*. 2006, p. 12 – 17.

GÓMEZ FLORES, R; RODRÍGUEZ, C; METH, R; GALÁN, L; MENDOZA, E and TAMEZ, R. Nitric oxide and TNF-alpha production by murine peritoneal macrophages activated with a novel 20-KDa protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* parasporal bodies. *Journal of Immunology*.1997, Vol. 158, p. 3796-3799.

GOMEZ-GIL, B; ROQUE, A and TUMBULL, J. The use and selection of probiotics bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 2000, Vol. 191, p. 259 – 270.

GRINDE, B; LIE, O; POPPE, T and SALTE, R. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture*. 1998, Vol. 18, p. 299-304.

HOLT, R; ROHOVEC, J and FRYER, J. Bacterial cold-water disease. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford. 2003, p. 3 – 22.

INGRAM, G. Complement fixation test. En: Stolen, J.S., TC. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson y W.B. van Muiswinkel (Eds.). *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications. New Jersey. 1990, Vol. 1, p. 25-44.

ISPIR, U and JONAR, M. Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Act. Vet. Brno*. 2007, Vol. 7, p. 493-497.

ISPIR, U and DORUCU, M. A study on the effects of levamisole of immune system rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkey Journal Veterinary Animal Science*. 2005, Vol. 29, p. 1169 – 1176.

JENEY, G and ANDERSON, D. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhances the non-specific defense mechanism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 1993, Vol. 116, p. 315-329.

JENEY, G; GALEOTTI, M; VOLPATTI, D; JENEY, Z and ANDERSON, D. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucans. *Aquaculture*. 1997, Vol. 154, p. 1 – 15.

- JIN, Z. Application of immunostimulants in larviculture: feasibility and challenges. *Aquaculture Asia*. 2003, Vol. 8, N° 4, p. 19 – 22.
- KAWAKAMI, H; SHINOHARA, N and SAKAI, M. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, m-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathology*. 1998, Vol. 33, p. 287-292.
- KIM, C; KIM, H; CHO, Y; NAM, K; PARK, K and KIM, I. Effect of water soluble chitosan additives on the physicochemical properties of *Paralichthys olivaceus*. *IFT Annual Meetings Session*. 2003, Vol. 76A.
- KISER, J; LINDH, H and DE MELLO, G. Annual New York Academy. of Science. 1956, Vol. 66, p. 312 – 328.
- KUBILAY, A and ULUKOY, G. The effects of acyte stress on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkey Journal Zoology*. 2002, Vol. 26, p. 249 – 254.
- KURITA, K. Preparation of Squid β – chitin, chitin Handbook. En: RAAA Muzarelli y MG Peters Eds. European Chitin Society. 1997, p. 491 – 492.
- LAIZ CARRIÓN, R; MARTÍN DEL RÍO, M; SOENGAS, J and MANCERA, J. Efectos de una dieta inmunoestimuladora y de la permanencia en temperatura constante sobre el metabolismo hepático de carbohidratos en dorada, *Sparus aurata* L. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 2005, Vol. 21 (1-4), p. 83-88.
- LA FRENTZ, B; LA PATRA, S; JONES, G and CAIN, K. Protective immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following immunization with distinct molecular mass fractions isolated *Flavobacterium psychrophilum*. *Disease Aquatic Organism Review*. 2004, Vol. 59(1), p. 17-26.
- LAMBRIS, J. The chemistry, biology and phylogeny of C3 Complement *Today Complement Profiles*. 1993, Vol. 1, p. 16-45.
- LEITRITZ, E and LEWIS, R. Trout and salmon culture (hatchery methods). *Fish. Bulletin*. 1996, Vol. 164, p. 197.

LIE, O; EVENSEN, O; SORENSEN, A and FROGSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1989, Vol. 6, p.1-5.

LOBB, C and HAYMAN, J. Activation of complement by different immunoglobulin heavy chain isotypes of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Molecular Immunology*. 1989, Vol. 26, p. 457-465.

MAC ARTHUR, J and FLETCHER, T. Phagocytosis in fish En: Manning, M.J. (Ed.). *Fish Immunology*. Academy Press NY/London. 1985, p. 29-46.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*. 2006, Vol. 20, p. 137-151.

MATSUYAMA, H; TANAKA, J; NAKAO, M and YANO, T. Characterization of the alternative complement pathway of carp. *Dev. Comp. Immunology*. 1998a, Vol. 12, p. 403-408.

MATSUYAMA, H; MANGINDAAN, E and YANO, T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*. 1992, Vol. 101, p.197-203.

MATSUYAMA, H; NAKAO, M and YANO, T. Compatibilities of antibody and complement among different fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1988b, Vol. 54, p.1993-1996.

MEDZHITOV, R. Toll like receptors and innate immunity. *Nature Reviews -Immunology Macmillan Magazines*. 2001, Vol. 1, p. 135.

MOCK, A and PETERS, G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) stressed by handling, transport and water pollution. *Journal Fish Biology*. 1990, Vol. 37, p. 873 – 885.

MULERO, V; ESTEBAN, M; MUÑOZ, J and MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Fish Shellfish Immunology*. 1998, Vol. 8, p. 49 – 62.

- NEWMAN, K. Immunity is in feeds as well as vaccines. *Poultry World*. 2003, Vol. 157, N° 3, p. 14.
- NEWMAN, K. A review of the use of non specific immune-stimulants to reduce the impact of the WSSV. Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference. October 1999. 3p.
- NONAKA, M; YAMAGUCHI, S; NATSUUME, S and TAKAHASHI, M. The complement system of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. *Journal Immunology*.1981, Vol. 126, p. 1489-1494.
- OLABUENAGA, S. Sistema inmune de peces. *Gayana* (Concepción). 2000, Vol. 64, N° 2.
- OURTH, D. Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Dev. Comp. Immunology*. 1980, Vol. 4, p. 65-74.
- PADRÓS, F and FURONES, M. Patología bacteriana en piscicultura. Temas de actualidad SEM. 2002, N° 34, p. 13-21.
- PARRY, R; CHANDAU, R and SHABANI, R. A rapid and sensitive assay of muraminidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1965, Vol. 119, p. 384 – 386.
- RAA, J. The use of immunostimulants in fish and shellfish feeds. En: Avances en Nutrición Acuícola. V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 2000.
- RAIDA, M; LANSEN, J; NIELSEN, M and BUCHMANN, K. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*. (Bioplus 2B). *Journal of Fish Diseases*. 2003, Vol. 26, p. 495 – 498.
- ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunology*. 1999, Vol. 9, p. 269-290.
- ROBERTSEN, B; ENGSTAD, R and JORGENSEN, J. β -Glucans as immunostimulants in fish. En: Modulators of Fish Immune Response. Journal Stolen (ed.): 83-99. SOS Publications. New Jersey. 1981.

- RODRÍGUEZ, A; CUESTA, J; ORTUÑO, M; ESTEBAN, A and MESEGUER, J. Immunostimulants properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to sea bream (*Spàrus aurata L*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003, Vol. 96, p. 183-192.
- RODRÍGUEZ, A; ESTEBAN, M; CUESTA, A; ORTUÑO, J; POLAINA, J and MESEGUER, J. Enriquecimiento de pienso de dorada con quitina y paredes de levadura con fines preventivos. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 2002, Vol. 18(1-4), p. 119 – 125.
- RODRIGUEZ, H and ANZOLA, E. La calidad del agua y la productividad de un estanque en acuicultura. En: Rodríguez y Victoria, Carrillo (edit.). *Fundamentos de acuicultura continental*. Colombia. INPA. 2001. Capitulo III. p 43 – 73. ISBN: 958 – 9356-06-6
- RONDÓN, I. Inmunoestimulantes en Medicina Veterinaria. *Revista Orinoquia*. 2004, Vol. 8, p. 56 – 75.
- SAHU, A and LAMBRIS, J. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and aquired immunity. *Immunology Review*. 2001, Vol. 180, p. 35 – 48.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 1999, Vol. 172, p. 63 – 92.
- SAKAI, M; KAMIYA, H; ISHII, S; ATSUTA, S and KOBAYASHI, M. The immunostimulating effects on chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. En: *Proceedings of the First Symposium in Asian Aquaculture (26-29 de November, 1990. Bali, Indonesia)*. *Diseases in Asian Aquaculture* 1: 413-417. Fish Health Section, Asian Fishery Society. Manila, Filipinas.
- SAKAI, D. Repertoire of complement in immunological defense mechanism of fish. *Annual Review Fish Disease*. 1992, p. 223-247.
- SÁNCHEZ, C. Crianza y producción de truchas. Ediciones Ripalme. 2004. Vol.1, p. 18–31.

- SANDERS, S; FARREL, A; KOCAN, R and KENNEDY, C. Investigations of the effects of environmental contamination and pathogens on immunological and hemathological parameters in pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, p. 53-58 En: B. Barton and D. MacKinlay, editors. Contaminant effects on fish symposium proceedings. American Fisheries Society, Physiology Section, 1996. Maryland.
- SANG-HOON, CH and TAEK-JOON, Y. Non- specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary heat – inactivated potential probiotics. Immune Network Article. 2008, p. 67 – 74.
- SANTARÉM, M; NOVOA, B and FIGUERAS, A. Effects of β – glucans on the non specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunology*. 1997, Vol. 7, p. 429 – 437.
- SANTOMÁ, G. Estimuladores de la inmunidad. XIV Curso de especialización: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. TECNA Barcelona. 2000.
- SCHREZENMEIR, J and DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. *The Amer. J. of Clin. Nut.* 2001, Vol. 73, p. 361-364.
- SECOMBES, C. The non-specific immune system: cellular defences. En: G. Iwawa and T. Nakanishi (Eds.). *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press, 1996. San Diego, USA, p. 63-103.
- SIWICKI, A. Immunomodulating influence of levamisole on non - specific immunity in carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev. Comp. Immunology*. 1989. Vol. 13, p. 87 – 91.
- SIWICKI, A; ANDERSON, D and RUMSEY, G. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 1994, Vol. 41, p. 125-139.
- SIWICKI, A. Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. *Journal Fish Biology*. 1987, Vol. 31, p. 245 – 246.

SPANGGAARD, B; HUBER, I; NIELSEN, J; SICK, E; PIPPER, C and MARTINUSSEN, J. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology*. 2001, Vol. 3, p. 755 – 765.

SUZUKI, K; OKAWA, Y; SUZUKI, S and SUZUKI, M. Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: the role of serine protease on the mechanism of oxygen-independent candidacidal effect. *Microbiology Immunology*. 1987, Vol. 31, p. 375-379.

SUZUKI, K; OKAWA, Y; HASHIMOTO, K; SUZUKI, S and SUZUKI, M. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiology Immunology*. 1984, Vol. 28, p. 903-912.

SVOBODA, M. Stress in fishes. *Hidrobiological Resources*. 2001, Vol. 4, p.169-191.

TOKURA, S; TAMURA, H and AZUMA, I. Chitin and chitinases. En: Jolles, E and Muzzarelli, R. (eds). *Basel*. 1999, p. 279 – 292.

VERLHAC, V; GABAUDAN, J; OBACH, A; SCHUEP, W and HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 1996, Vol. 143, p. 123 – 133.

VERLHAC, V and GABAUDAN, J. *Aquaculture Fish Management*. 1994, Vol. 25, p. 21 – 36.

VERSCHUERE, L; ROMBAUT, G; SORGELOOS, P and VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 2000, Vol. 64, p. 655-671.

VILLAMIL, L; TAFALLA, C; FIGUERAS, A and NOVOA, B. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002, Vol. 9(6), p. 1318 – 1323.

WANG, S and CHEN, J. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Department of Aquaculture, College of Life and Resource Sciences, National Taiwan Ocean University. 2005.

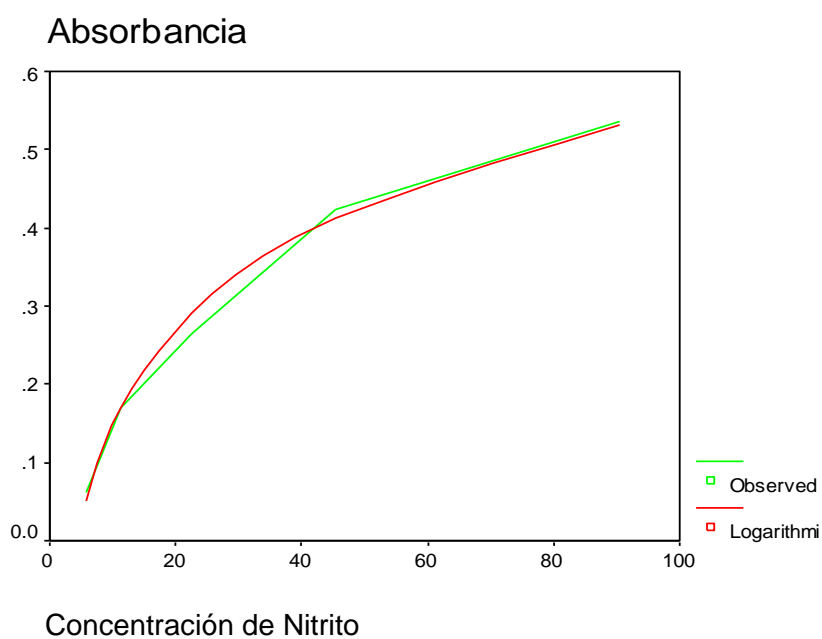
WENDELAAR, S. The stress response in fish. *Physiology Review*. 1997, Vol. 77, p. 591-625.

YANO, T. Assays of hemolytic complement activity. *En: Techniques in fish Immunology*. Stolen, J.S., T.C. Fletcher, D.P. Anderson, S.L. Kaatari y A.F. Rowley (Eds.). SOS Publications. USA. 1992, Vol. 2, p. 131-141.

YANO, T; MANGINFAAN, E and MATSUYAMA, H. Enhancement of the resistance of carp, *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 - glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1989, Vol. 55, p. 1815-1819.

X. ANEXOS

Concentración NO (μM)	Absorbancia (nm)
90.58	0.536
45.29	0.424
22.64	0.264
11.32	0.170
5.67	0.062



Ecuación logarítmica:

$$Y = -0.2501 + 0.1735 \times \ln X$$

$$\frac{Y + 0.2501}{0.1735} = \ln X$$

$$\text{Inv Ln} \left(\frac{Y + 0.2501}{0.1735} \right) = X \quad \text{Donde: } X = \text{Concentración NO}; Y = \text{Absorbancia}$$

Anexo 3. Curva estándar utilizada en la medición de óxido nítrico, empleando NaNO_2 .