

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**Evaluación in vitro de la respuesta de células macrofágicas de  
salmónidos estimuladas con postbiótico originarios de levaduras**

Elizabeth Emiliana Lara Cifuentes

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE  
SEPTIEMBRE, 2019  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

**Evaluación in vitro de la respuesta de células macrofágicas de salmónido  
estimuladas con postbiótico originarios de levaduras**

Por

ELIZABETH EMILIANA LARA CIFUENTES



Profesor guía

ALLISSON ASTUYA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

SEPTIEMBRE, 2019

**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**

Este Seminario de Título ha sido realizado en la Unidad de Biotecnología Marina,  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía:

Dra. Allisson Astuya Villalón  
Unidad de Biotecnología Marina  
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Ana Teresa Gonçalves  
Centro de Biotecnología  
Centro INCAR  
Universidad de Concepción, Concepción



Dra. Gisela Rios  
Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Universidad de Concepción, Concepción

Coordinador Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat  
Unidad de Biotecnología Marina  
Universidad de Concepción, Concepción

## DEDICATORIA



*A la pequeña niña que soñaba con ser científica...*

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi mami, no sé de dónde saca la paciencia pa aguantarme, todo el apoyo, el ánimo que día con día me fue dando junto con sus desayunitos ricos con cappuccinos, gracias mami, eres la mejor, gracias también a mi bro, por ser un apoyo fundamental en esta etapa, los amo con todo mi corazón. Muchas gracias tb a las chicas del lab, que hicieron mis días menos pesados riendo en momentos que sólo quería irme a la b... quizás muchas veces sin siquiera saberlo, pero eso fue lo mejor, amen.

También quisiera agradecer de manera muy especial a mi profesor tutor, la Dra. Allisson Astuya por su apañe y su ánimo que me consta que muchas veces se lo tenía que inventar para poder entregármelo todas y cada una de las veces que hablaba con ella, a mi cotutora la Dra Ana Gonçalves porque aprendí demasiadas cosas de ella y porque aprendí que sí puedo dar más, aunque cueste, no tiene porqué no salir!!!. Muchas gracias a ambas por darse la oportunidad de creer en mí. Mención especial a la Caro por enseñarme el hermoso trabajo de cultivar células y a la Rayen por enseñarme con tanta paciencia el trabajo molecular que realicé. Yenny por los partidores, gracias por compartir tu trabajo conmigo.

Gracias a los pocos amigos de la vida, Tatán que siempre está ahí... Angie, que me apoya incondicional, Javi, que me hace reír y reflexionar como nadie... y varios más... no quiero dejar a ninguno afuera.

Finalmente, agradecer al Programa o Proyecto Agradecer a Fondecyt 11160960 y Fondap-INCAR 15110027 de CONICYT, por financiar la presente tesis.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS


|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS   | 10          |
| ÍNDICE DE TABLAS  | 15          |
| RESUMEN   | 16          |
| ABSTRACT  | 17          |
| INTRODUCCIÓN  | 18          |
| 1.1. Salmonicultura en Chile                              | 18          |
| 1.2.- Desarrollo y control de enfermedades en acuicultura | 18          |
| 1.3.- Inmunidad de peces                                  | 18          |
| 1.3.1.- Tipos de respuesta inmune                         | 20          |
| 1.4.- Dietas funcionales en base a probióticos            | 22          |
| 1.4.1.- Probióticos                                       | 23          |
| 1.4.2.- Postbióticos                                      | 25          |
| 1.4.3.- Paraprobióticos                                   | 26          |
| 1.5.- Análisis In vitro                                   | 28          |
| <br>  |             |
| HIPÓTESIS   | 29          |
| HIPÓTESIS GENERAL   | 29          |
| HIPÓTESIS ESPECÍFICA                                      | 29          |
| OBJETIVOS   | 29          |
| OBJETIVO GENERAL  | 29          |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                     | 29          |



|   |    |
|---|----|
| MATERIALES Y MÉTODOS  | 30 |
| 2.1.- Cultivo de la levadura probiótica <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .                     | 30 |
| 2.1.1.- Cultivo en placas de agar   | 30 |
| 2.1.2.- Cultivo en medio líquido: Cinética de crecimiento                                     | 30 |
| 2.2.2.- Obtención preliminar de los postbióticos.   | 31 |
| 2.2.3.- Perfil proteico mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida – SDS | 32 |
| 2.3.- Crecimiento y Mantenimiento de líneas celulares.  | 33 |
| 2.3.1.- Mantenimiento de la línea celular RTS11   | 33 |
| 2.3.2.- Mantenimiento de la línea celular SHK1  | 33 |
| 2.3.3.- Determinación de densidades de siembra en placas                                      | 34 |
| 2.4.- Ensayo de viabilidad celular.   | 34 |
| 2.4.1.- Ensayo de alamar blue para determinar densidad de análisis y vehículo.                | 34 |
| 2.4.2.- Viabilidad celular post exposición a postbióticos de levadura                         | 36 |
| 2.5.- Análisis moleculares  | 38 |
| 2.5.1.- Extracción de ARN   | 38 |
| 2.5.2.- Síntesis de ADNc  | 39 |
| 2.5.3.- Diseño y estandarización de partidores  | 40 |
| 2.5.4.- Rango dinámico  | 41 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5.5.- Estimulación de las líneas celulares con postbióticos              | 42        |
| 2.5.6.- Selección del control endógeno                                     | 43        |
| 2.5.7.- Expresión génica en las líneas celulares RTS11 y SHK1              | 43        |
| 2.5.8.- Análisis estadístico   | 44        |
| <b>RESULTADOS</b>  | <b>45</b> |
| 3.1.- Selección del método de producción de postbióticos.                  | 45        |
| 3.1.1.- Determinación de ufc por gramo de levadura                         | 45        |
| 3.1.2.- Cultivo en medio líquido   | 45        |
| 3.2.- Visualización preliminar del contenido proteico en los postbióticos. | 48        |
| 3.3.- Selección de la densidad de siembra en placas                        | 50        |
| 3.4.- Ensayo de viabilidad celular de alamar blue                          | 51        |
| 3.4.1.- Evaluación de la toxicidad del vehículo.                           | 51        |
| 3.4.2.- Ensayo de toxicidad aguda  | 51        |
| 3.4.3.- Ensayo de viabilidad celular a las 24 horas de exposición          | 53        |
| 3.5.- Análisis moleculares   | 54        |
| 3.5.1.- Extracción de ARN para estandarización de partidores               | 54        |



|  |    |
|--|----|
| 3.5.2.- Síntesis de cDNA   | 55 |
| 3.5.3.- Estandarización de partidores  | 56 |
| 3.5.4.- Rango dinámico   | 59 |
| 3.5.5.- Estimulación de las líneas celulares con postbióticos.                     | 65 |
| 3.5.6.- Evaluación del control endógeno  | 66 |
| 3.5.7.- Expresión génica en las líneas celulares                                   | 67 |
| 3.5.7.1.- Evaluación de la respuesta de expresión de citoquinas en RTS11           | 67 |
| 3.5.7.2.- Evaluación de la respuesta de expresión de citoquinas en SHK1            | 68 |
|  |    |
| DISCUSIÓN  | 72 |
| CONCLUSIONES   | 81 |
| LITERATURA CITADA  | 82 |
| ANEXOS   | 88 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Figura N°1.-</b> Diagrama simplificado de la respuesta de producción de citoquinas en células del sistema inmune frente al reconocimiento de PAMPs.                        | 22          |
| <b>Figura N°2.-</b> Mecanismos de acción de probióticos (O'Tool et al, 2008)  | 24          |
| <b>Figura N°3.-</b> Diferencias entre postbióticos y paraprobióticos y sus efectos en el organismo (Aguilar-Toalá et al. 2018).   | 27          |
| <b>Figura N°4.-</b> Diagrama de la estrategia para evaluación de tipos de inoculación de levaduras en medio líquido.  | 31          |
| <b>Figura N°5.-</b> Tratamientos posteriores a los cultivos para la obtención de postbióticos.  | 32          |
| <b>Figura N°6.-</b> Densidades de siembra de la línea celular RTS11 elegidas en base a un análisis previo con confirmación visual de confluencia y adherencia a las 24 horas. | 35          |
| <b>Figura N°7.-</b> Identidad de los postbióticos analizados en el ensayo de citotoxicidad.   | 36          |
| <b>Figura N°8.-</b> Diagrama de los tiempos de siembra y exposición utilizados para el ensayo de citotoxicidad.   | 37          |
| <b>Figura N°9.-</b> Diseño experimental de siembra de la línea celular RTS11 y exposición a postbióticos ( <i>S. cerevisiae</i> ) sobrenadante y pellet.                      | 37          |
| <b>Figura N°10.-</b> Diagrama de los tiempos de siembra y exposición para el medir viabilidad celular luego de 24 horas de exposición.  | 38          |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura N°11.-</b> Diseño de placas utilizadas en la evaluación <i>in vitro</i> del efecto de postbióticos en la producción de citoquinas en línea celular RTS11.                                   | 42 |
| <b>Figura N°12.-</b> Placas de agar Sabouraud inoculadas con las diluciones de <i>S. cerevisiae</i> luego de 24 horas de cultivo.   | 45 |
| <b>Figura N°13.-</b> Curva de crecimiento de la levadura probiótica <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de 1UFC. Conteo en la cámara de Neubauer (Línea azul) y su densidad óptica (Línea roja). | 46 |
| <b>Figura N°14.-</b> Curva de crecimiento de la levadura probiótica <i>Saccharomyces cerevisiae</i> construida con datos de conteo celular en la cámara de Neubauer y a su densidad óptica.           | 47 |
| <b>Figura N°15.-</b> Curva de crecimiento de la levadura probiótica <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPD inoculado con 0.1g de levadura seca.   | 48 |
| <b>Figura N°16.-</b> Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de proteínas en los distintos postbióticos obtenidos desde el cultivo de <i>S. cerevisiae</i> .   | 49 |
| <b>Figura N°17.-</b> Gel de poliacrilamida SDS Page de contenidos proteicos desde postbióticos y paraprobóticos obtenidos desde el cultivo de <i>S. cerevisiae</i> .                                  | 50 |
| <b>Figura N°18.-</b> Viabilidad medida con el ensayo de alamar blue con distintas densidades de siembra y expuestas a vehículos.  | 51 |
| <b>Figura N°19.-</b> Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a postbiótico, recolectados del sobrenadante medido de levaduras.   | 52 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura N°20.-</b> Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a postbióticos recolectados desde el pellet lisado mediante disrupción ultrasónica.   | 52 |
| <b>Figura N°21.-</b> Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a distintas cantidades de postbióticos, recolectados del sobrenadante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , la viabilidad fue medida con el ensayo de alamar blue. | 53 |
| <b>Figura N°22.-</b> Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a distintas cantidades de postbiótico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , la viabilidad fue medida con el ensayo de alamar blue.                                 | 54 |
| <b>Figura N°23.-</b> Gel de integridad MOPs de agarosa al 1.2% de formaldehído de las muestras de ARN de la línea celular RTS11.  | 55 |
| <b>Figura N°24.-</b> Gel TBE 1% del producto PCR del <i>factor de elongación alpha</i> (EF- $\alpha$ ) y su correspondiente control negativo para verificar el cDNA sintetizado.  | 56 |
| <b>Figura N°25.-</b> Gel TBE 1% del producto PCR del <i>factor de elongación alpha</i> (EF- $\alpha$ ), para los partidores diseñados, con controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.  | 57 |
| <b>Figura N°26.-</b> Gel TBE 1% del producto PCR de la $\beta$ -actina para los partidores diseñados, se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.  | 57 |
| <b>Figura N°27.-</b> Gel TBE 1% del producto PCR del <i>factor alpha de necrosis tumoral</i> (TNF- $\alpha$ ) con sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.  | 58 |

**Figura N°28.-** Gel TBE 1% del producto PCR de la *Interleuquina 1-β* (IL-1β), a la izquierda se sembró el primer par de partidores y a la derecha el segundo en 3 temperaturas, también se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado. 58

**Figura N°29.-** Gel TBE 1% del producto PCR de la *Interleuquina 11* (IL-11) en 3 temperaturas, con sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado. 59

**Figura N°30.-** Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para el *Factor de elongación alpha* (EF-α). 60

**Figura N°31.-** Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para β-actina. 61

**Figura N°32.-** Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para TNF-a. 62



**Figura N°33.-** Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para IL-1β. 63

**Figura N°34.-** Curva de amplificación (A), curva estándar (B) y curva de melting (C) para IL-11. 64

**Figura N°35.-** Gel de integridad MOPs de agarosa al 1.2% de formaldehído de las muestras de ARN de la línea celular RTS11, de izquierda a derecha la identidad de las muestras corresponde a: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2. 65

**Figura N°36.-** Gel TBE, de verificación visual del cDNA sintetizado a partir del ARN extraído de la línea celular RTS11. Se observa la amplificación del producto PCR del Factor de Elongación de las muestras: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2. 66

**Figura N°37.-** Expresión del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-11 en la línea celular RTS11 estimuladas con LPS, probióticos, paraprobóticos y postbióticos, las diferencias significativas se muestran con letras, los datos fueron analizados con ANOVA considerando significativo una diferencia  $<0.05$ . 68

**Figura N°38.-** Gel de integridad MOPs de agarosa al 1.2% de formaldehído de las muestras de ARN de la línea celular SHK1, de izquierda a derecha la identidad de las muestras corresponde a: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2. 69

**Figura N°39.-** Gel TBE, de verificación visual del cDNA sintetizado a partir del ARN extraído de la línea celular SHK1. Se observa la amplificación del producto PCR del Factor de Elongación de las muestras: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2. 70

**Figura N°40.-** Expresión del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y de la IL-8 en la línea celular SHK1 estimuladas con LPS, probióticos, paraprobóticos y postbióticos, las diferencias significativas se muestran con letras, los datos fueron analizados con ANOVA considerando significativo una diferencia  $<0.05$ . 71

## ÍNDICE DE TABLAS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Tabla N°1.-</b> Fase y cantidad de levaduras que tenía el cultivo al momento de tomar las muestras.  | 36          |
| <b>Tabla N°2.-</b> Programa estandarizado para la utilización de PCR tiempo final   | 40          |
| <b>Tabla N°3.-</b> Características utilizadas para el diseño de los partidores  | 40          |
| <b>Tabla N°4.-</b> Concentración y pureza de la muestra de ARN extraído desde un frasco de cultivo T75 para la estandarización de partidores. | 55          |
| <b>Tabla N°5.-</b> Partidores estandarizados para RTS11   | 64          |
| <b>Tabla N°6.-</b> Concentración y relación entre la absorbancia a 260 y 280nm y 260 y 230nm en la línea celular RTS11.                       | 65          |
| <b>Tabla N°7.-</b> Valor de estabilidad de los partidores evaluados   | 67          |
| <b>Tabla N°8.-</b> Concentración y relación entre la absorbancia a 260 y 280nm y 260 y 230nm en la línea celular SHK-1.                       | 69          |
| <b>Tabla N°9.-</b> Partidores para SHK1.  | 70          |

## RESUMEN

Los alimentos funcionales son aquellos que de forma natural o procesada, contienen componentes que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición. Uno de los alimentos funcionales que mejores resultados ha demostrado en salmonicultura son los probióticos, los que se definen como “Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud al hospedador”, pero debido a los inconvenientes que genera el incluir un microorganismo vivo en el proceso de producción del pellet para salmónidos y que este siga viable luego de su proceso y almacenamiento ha derivado en la necesidad de buscar nuevas alternativas.

Datos recientes ha sugerido que parte del efecto beneficioso que generan los probióticos en el hospedador no sólo se deben a su presencia, sino a los compuestos que estos generan, los que han sido denominados como “Postbióticos”.

En estudios realizados en otras especies, han demostrado que efectivamente son capaces de generar un efecto positivo, pero aun no se han probado en salmónidos. Es por eso que es interesante generar datos que aporten en conocer parte de los efectos de la interacción de esos compuestos con los salmónidos.

Uno de los beneficios que más se buscan en salmonicultura es el de fortalecer la respuesta inmune de los peces, ya que se ven constantemente expuestos a condiciones que podrían facilitar la proliferación de enfermedades. Es por lo que en este estudio se evaluó de forma in vitro la interacción de las soluciones postbióticas con líneas celulares del sistema inmune de salmónidos – específicamente, del tipo macrofágicas - y se demostró que los postbióticos aumentan la proliferación de células del sistema inmune, y estimulan su respuesta innata, la que fue medida en expresión de genes que codifican para citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria.



## ABSTRACT

Functional foods are those that naturally or processed contain components that have beneficial health effects that go beyond nutrition. One of the functional foods that has shown the best results in salmon farming are the probiotics, which are defined as “Live microorganisms that when administered in adequate amounts confer health benefits to the host”, but due to the inconvenience generated by including a live microorganism in the production process of the pellet for salmonids and that this remains viable after its process and storage has resulted in the need to seek new alternatives.

Recent data has suggested that part of the beneficial effect generated by probiotics in the host is not only due to its presence, but also to the compounds they generate, which have been referred to as "Postbiotics."

In studies in other species, they have shown that they are indeed capable of generating a positive effect, but have not yet been tested in salmonids. That is why it is interesting to generate data that contribute in knowing part of the effects of the interaction of these compounds with salmonids.

One of the most sought benefits in salmon farming is to strengthen the immune response of fish, as they are constantly exposed to conditions that could facilitate the proliferation of diseases. This is why in this study the interaction of postbiotic solutions with salmonid immune system cell lines - specifically, of the macrophage type - was evaluated in vitro and it was shown that postbiotics increase the proliferation of immune system cells, and they stimulate their innate response, which was measured in the expression of genes that code for cytokines involved in the inflammatory response.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- Salmonicultura en Chile**

El cultivo de salmónidos en Chile es una actividad que desde sus inicios ha presentado un aumento sostenible en aspectos tales como la producción (FAO, 2010) y exportaciones (Banco central, 2017), llegando a posicionar al país como el cuarto productor de peces de acuicultura marina en el mundo (FAO, 2018). Este crecimiento abre muchas oportunidades de desarrollo para el país, pero también impone un conjunto de desafíos tanto de carácter industrial, productivo como de carácter medioambiental y sanitario (Prospectus Spa. 2016). El mayor desafío de la salmonicultura intensiva es el control de enfermedades, las cuales han estado presentes desde los inicios de la actividad (Stentiford et al. 2017, The World Bank, 2014).

### **1.2.- Desarrollo y control de enfermedades en acuicultura**

Las enfermedades se desarrollan como una interacción entre el hospedador, el ambiente propicio y un agente patógeno capaz de producirla (Pérez-Sánchez et al., 2018) y en salmonicultura intensiva estos factores están siempre presentes. El hospedador susceptible se puede obtener como resultado del constante estrés que sufren los peces, ya sea por las condiciones de hacinamiento, por la manipulación indebida, el ataque de lobos, los bloom de algas, entre otros (Sung et al., 2011). Uno de los efectos del constante estrés es el aumento del cortisol en el plasma sanguíneo y la exposición prolongada al cortisol tiene un efecto supresor del sistema inmune (Yada and Tort 2016). Otro ejemplo de cómo afecta el ambiente en la susceptibilidad del hospedador se ve en la trucha arcoíris, se ha demostrado que el fotoperiodo afecta la respuesta inmune a través de una reducción en el número de leucocitos circulantes causada por el aumento de las horas de luz solar (Esteban et al., 2006). El ambiente propicio se ha dado en parte por la modelación del ecosistema debido a la constante adición de nutrientes y antibióticos, los últimos han favorecido a las cepas patogénicas resistentes por sobre la microbiota nativa mientras que los nutrientes favorecen la aparición de algunas especies microbianas que los consumen (Quiñones et al. 2019). Bajo las condiciones

mencionadas, un agente patógeno, no sólo es capaz de producir enfermedades, sino que cada vez se hace más difícil combatir (Choudhury and Kamilya 2018).

Todos estos factores hacen que sea cada vez más difícil para el sistema inmune de los peces protegerle de las distintas enfermedades que le puedan atacar.

### **1.3.- Inmunidad de peces.**

Se define como sistema inmune al conjunto de estructuras y procesos biológicos en el interior de un ser vivo que tiene como función protegerle contra injurias, identificando y matando células patógenas, para ello detecta una amplia variedad de agentes foráneos, desde microorganismos hasta parásitos multicelulares y necesita distinguirlos del tejido propio que se encuentre sano para funcionar correctamente (Uribe et al., 2011). Los sistemas inmunológicos de los vertebrados constan de muchos tipos de moléculas, células, órganos y tejidos, los que se relacionan en una elaborada y dinámica red y se divide en inmunidad innata, la que es considerada como un tipo de respuesta más primitivo e inmunidad adquirida (también llamada inmunidad adaptativa), como parte de esta respuesta inmunológica más compleja, el sistema inmunitario se adapta con el tiempo para reconocer patógenos específicos más eficientemente, se caracteriza por ser capaz de poder crear una memoria inmunológica. La memoria inmunológica creada desde una respuesta primaria a un patógeno específico, proporciona una respuesta mejorada a encuentros secundarios con ese mismo patógeno específico. Este proceso de inmunidad adquirida es la base de la vacunación. Aunque los peces constan con ambos mecanismos (inmunidad innata y adaptativa), la respuesta adaptativa es limitada, debido a la restringida colección de anticuerpos, lenta maduración, memoria y proliferación de linfocitos (Whyte 2007). Los componentes del sistema inmune innato en teleósteos se pueden clasificar en tres niveles: barreras físicas, componentes humorales y componentes celulares presentes incluso antes de que se produzca una infección y que están preparados para responder con rapidez ante esta (Rauta et al., 2012)

Las barreras físicas son por ejemplo la piel y los tejidos mucosales. La respuesta inmune innata humoral está compuesta por diversos elementos solubles disueltos en el plasma, tales como péptidos antibacterianos, lisozimas, proteínas de fase aguda y las moléculas del sistema del complemento (Chia et al., 2010). La inmunidad celular no específica en los

teleósteos incluye la presencia de células morfológica y funcionalmente equivalentes a las de mamíferos, tales como: células dendríticas, monocitos, macrófagos neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos (Kordon et al., 2018).

La respuesta inmune innata es gatillada por alguna lesión o mediante el reconocimiento de algún microorganismo patógeno que haya logrado atravesar las barreras físicas del sistema e ingresado en el hospedador. Este reconocimiento se lleva a cabo por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (MacKenzie et al. 2006) que identifican proteínas características de microorganismos patógenos altamente conservadas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como polisacáridos, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos (PG), ADN bacteriano, ARN viral y otras moléculas que no se encuentran normalmente en los organismos multicelulares (Elward and Gasque 2003). Estos PRRs pueden ser proteínas circulantes del torrente sanguíneo (inmunidad humoral) o receptores de membrana que son expresados por células del sistema inmune como los macrófagos (inmunidad celular) (Kumar, Kawai, and Akira 2009). Un tipo importante de éstos PRRs son los Toll-like receptor (TLR), los que son proteínas transmembrana presentes en macrófagos y células dendríticas, se encuentran presentes tanto en mamíferos como en peces y que al reconocer un PAMPs activan una cascada de señalización que genera una serie de respuestas, como el marcaje del patógeno para ser fagocitado, la fagocitosis en sí y la producción de citoquinas (Magnadóttir 2010).

### **1.3.1.- Tipos de respuesta inmune**

Dentro de los mecanismos celulares de la inmunidad innata, la fagocitosis juega un rol importante en la defensa antibacteriana, especialmente para los organismos poiquilotermos, ya que es un proceso independiente de temperatura (Magnadóttir 2006), esta inicia por la interacción de los receptores en la superficie del fagocito con la sustancia a fagocitar que da como resultado la internalización de las partículas dentro de una vacuola llamada fagosoma (Rieger et al., 2010).

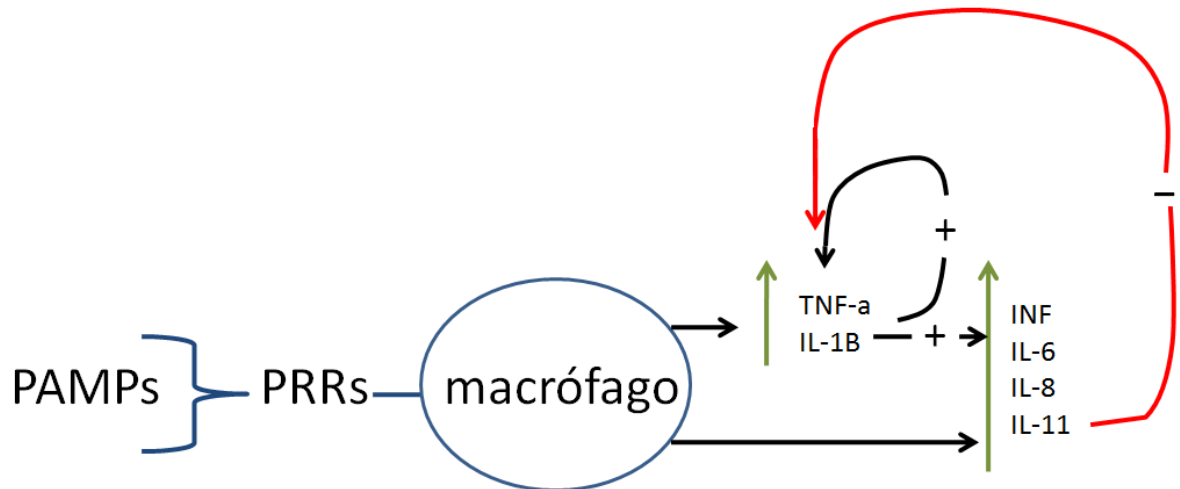
Otra de las respuestas más importantes de la activación del sistema inmune es la producción de citoquinas, las citoquinas son proteínas encargadas de la comunicación, ya sea entre leucocitos o con otros tipos celulares, que guían y coordinan la respuesta inmune, las

principales citoquinas involucradas en la respuesta temprana son aquellas de tipo proinflamatoria, una de las primeras en producirse es el *factor alpha de necrosis tumoral* (TNF- $\alpha$ ), la que se produce como una proteína transmembrana o glucoproteína que se eleva en el dominio extracelular para liberar un péptido maduro biológicamente activo (Hong et al., 2013), otra de las primeras citoquinas en producirse es la *interleuquina-1Beta* (IL-1 $\beta$ ) (Zou et al., 1999) ambas son del grupo de las citoquinas proinflamatorias la que al ser reconocida por las células del sistema inmune causa una serie de efectos sobre ellos; activa la maduración de macrófagos, recluta leucocitos al sitio de infección, aumenta la fagocitosis, estallido respiratorio, producción de otras citoquinas, entre otros (Qin et al. 2001), (Huising et al., 2004).

Dentro de las citoquinas que son producidas, tanto por presencia de PAMPs como por el aumento de *TNF- $\alpha$*  y de *IL-1 $\beta$*  en el plasma se encuentra la *interleuquina 6* (IL-6), su función es la estimulación de la síntesis de las proteínas de fase aguda, también estimula la producción de neutrófilos a partir de células progenitoras (Abbas, 2006), otro ejemplo es la *interleuquina-8* (IL-8) (Mukaida et al. 1991) tiene la capacidad de regular el tráfico de células del sistema inmune al sitio de infección o de injuria, favorece su maduración y activación (lo que provoca un aumento en el estallido respiratorio, fagocitosis, entre otro) (Laing et al. 2001). La IL-8 atrae principalmente a neutrófilos, los cuales además se activan en respuesta a esta citoquina, activándose la liberación de su contenido granular, la adherencia a células endoteliales y la producción de óxido nítrico (Nourshargh et al. 1992), y la *interleuquina 11* (IL-11) (Wang et al., 2005), la que es una citoquina de la familia de la *interleuquina 6* que actúa como citoquina antiinflamatoria, actúa sobre muchos tipos celulares, por ejemplo se ha visto que en intestino tiene una actividad de protección y restauración de la mucosa intestinal (Orazi et al., 1996).

Los *interferones* (IFN) son citoquinas que tienen papeles clave en la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas, exhiben una amplia gama de actividades que incluyen funciones antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras (Boehm et al., 1997). Hay tres tipos de IFN conocidos en mamíferos (I – III); sin embargo, hasta la fecha solo se han identificado los tipos I y II en peces (Martin et al. 2007), es una citoquina que orquesta la

respuesta de patógenos intracelulares, mediante la activación de macrófagos impulsándolos a producir especies reactivas de oxígeno para matar bacterias intracelulares y la inducción de proteínas antivirales (Zou et al. 2005).



**Figura N°1.-** Diagrama simplificado de la respuesta de producción de citoquinas en células del sistema inmune frente al reconocimiento de PAMPs

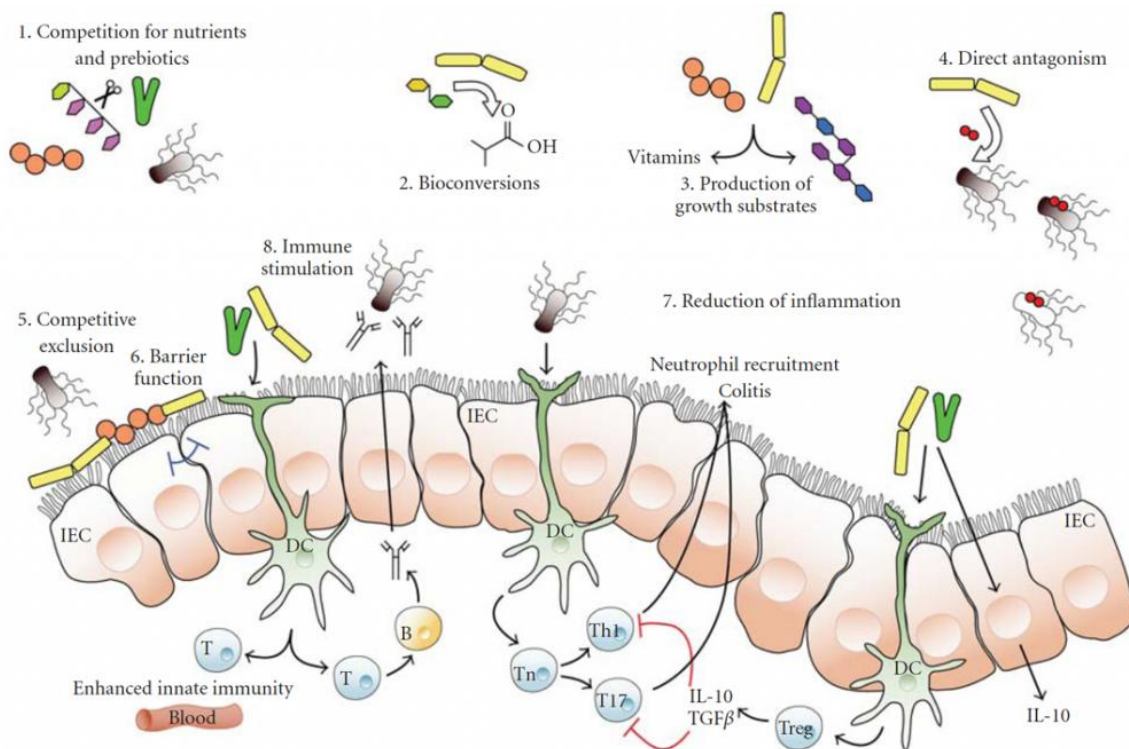
Estos parámetros y muchos otros involucrados en la respuesta inmune se ven afectados de manera negativa cuando el hospedador se ve expuesto de forma prolongada a agentes estresantes, es por eso que para minimizar el impacto de este sobre los organismos en cultivo, y la salmonicultura pueda seguir creciendo de manera no sólo sostenible, sino también sustentable se ha hecho necesaria la búsqueda de distintas alternativas al tratamiento y en especial a la prevención de enfermedades como por ejemplo las dietas funcionales (Hoseinifar et al. 2016), las que se definen como una dieta normal suplementada con un componente activo que genera beneficios fisiológicos para quien las consuma, algunos de los beneficios buscados son el aumento de la tasa de crecimiento, mejor digestión de los alimentos y por consiguiente la absorción de nutrientes, mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal (Dimitroglou et al., 2011; Harikrishnan et al., 2011; Heidarieh et al., 2012) y mejorar la respuesta del sistema inmune para preparar al organismo frente a una posible agresión (Tacchi et al. 2011).

## **1.4.- Dietas funcionales en base a probióticos**

La relación entre la nutrición y el estado del sistema inmune es ampliamente reconocida estos días, es por eso que existe una gran variedad de dietas funcionales que se han probado en acuicultura, más específicamente en salmónica, de los cuales lo que han dado mejores resultados son las dietas suplementadas con compuestos provenientes de microorganismos beneficiosos para el consumidor (Nayak 2010) dentro de las que se encuentran las dietas suplementadas con probióticos (Dawood et al. 2018), postbióticos (Tsilingiri and Rescigno 2013) y paraprobóticos (Choudhury and Kamilya 2018).

### **1.4.1.- Probióticos**

Probióticos se definen como: “Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud al hospedador” (FAO, WHO 2001). Los mecanismos de acción de los probióticos para conferir estos beneficios han sido ampliamente estudiados con hospedadores humanos, es por eso que los modelos de estudio están basados en mamíferos (fig. 2), entre estos mecanismos de acción se encuentra la competencia por nutrientes y sitios de adhesión, el aporte de enzimas digestivas o de sustancias antagonistas a los organismos patógenos y la activación del sistema inmune mediante el reconocimiento de los PAMPs presentes en los microorganismos probióticos (Dawood et al. 2018).



**Figura N°2.-** Mecanismos de acción de probióticos (O'Tool et al, 2008)

En peces existen muchos estudios que comprueban los efectos beneficiosos de las dietas con inclusión de probióticos, como por ejemplo el estudio hecho por Adel et al. (2017), donde se observó que la inclusión de dos especies de levadura en la dieta convencional de salmónidos durante cuatro semanas aumentó su tasa de crecimiento, la cantidad de microorganismos que se consideran beneficiosos en el intestino de los peces, la producción de proteínas en el mucus de la piel, producción de lisozimas, entre otros. También está el estudio realizado por Castro-osses et al. (2017) que demostró el potencial inmunoestimulador de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* aun en altas densidades de cultivo. Otro ejemplo es el trabajo de Pérez-Sánchez et al. (2011) donde, luego de alimentar por 21 días a trucha arcoíris con una dieta suplementada con distintos tipos de bacterias probióticas, disminuyó su tasa de mortalidad al desafiarla con un patógeno en comparación con el grupo control, análisis moleculares demostraron que los peces alimentados con probióticos habían aumentado su producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en comparación a los que no fueron alimentados con alimento



con inclusión de probióticos, pero esta expresión disminuyó significativamente luego del desafío con el patógeno, lo que sugiere que los peces alimentados con probióticos estaban mejor preparados para combatir la enfermedad, mediante la modulación del sistema inmune.

A pesar del gran número de antecedentes sobre los beneficios de incluir cepas probióticas en la dieta, actualmente sólo una empresa productora de alimentos para salmónidos las incluye en sus pellet. La inclusión de probióticos en el alimento de los salmónidos puede verse fuertemente desalentada debido a lo complicado que resulta incluir un microorganismo vivo en el alimento y que permanezca viable luego de su procesamiento y almacenamiento (Tripathi and Giri 2014). Otro factor que podría afectar la viabilidad de los microorganismos probióticos son los parámetros fisicoquímicos del agua donde son cultivados los peces como la temperatura, pH y salinidad del agua, ya que las condiciones ideales de los peces no son las mismas que las de los probióticos (mundo acuícola, 2018). Esto por esto que en los últimos años se han buscado alternativas al uso de los probióticos que generen el efecto deseado, pero sin necesidad de incluirlos directamente.



#### **1.4.2.- Postbióticos**

Muchos de los beneficios que se observan al administrar dietas suplementadas con probióticos se hacen evidentes cuando el microorganismo ha logrado llegar vivo al intestino y lo logra colonizar, esto podría sugerir que algunos de los efectos beneficiosos observados después de la administración de probióticos pueden estar mediados no necesariamente por la presencia del microorganismo, sino por las moléculas que son secretadas por el metabolismo de ellos (Aguilar-Toalá et al. 2018), estas moléculas que parecen ser suficientes para obtener el efecto deseado han sido llamadas “postbióticos” (Tsilingiri and Rescigno 2013). Ejemplos de postbióticos son proteínas, enzimas digestivas, sacáridos, ácidos grasos de cadena corta, entre otros.

Existen ya estudios que evidencian el efecto beneficioso de las dietas suplementadas con postbióticos, como por ejemplo en *Gallus gallus domesticus* (Kareem et al., 2017) y en lechones (Thu et al., 2011) donde se obtuvieron los postbióticos del sobrenadante de una

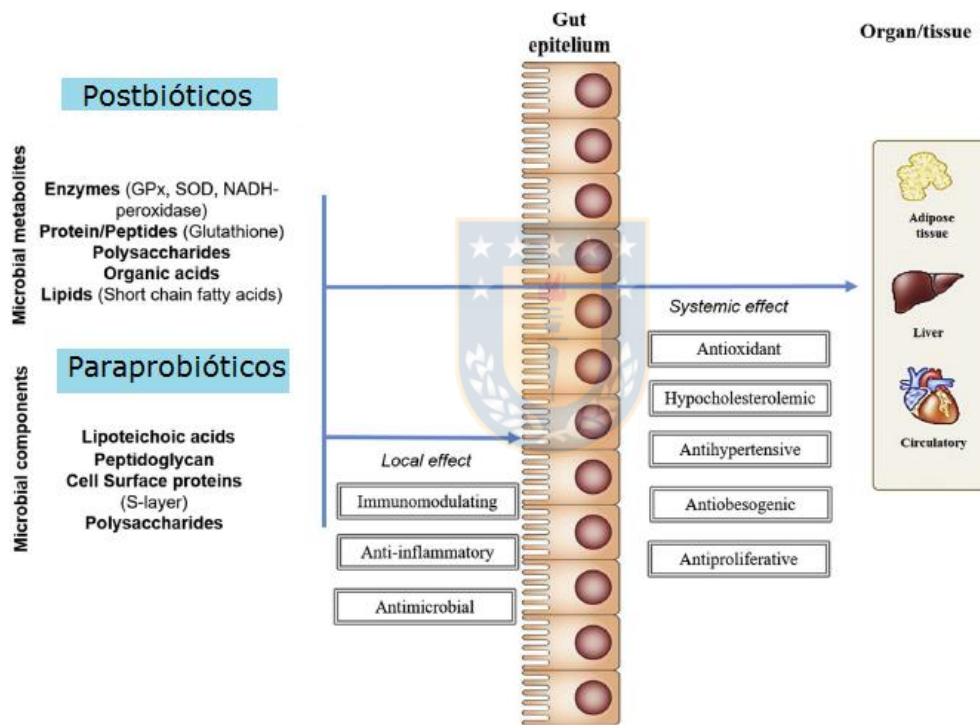
bacteria probiótica (*Lactobacillus plantarum*) cultivada durante la noche en caldo de cultivo MRS, separada por centrifugación y agrega al alimento en distintos porcentajes de peso/volumen, se observó que la inclusión de postbióticos en la dieta resultaron en un aumento en la tasa de crecimiento, conversión de alimento, aumento de la cantidad y diversidad de la microbiota intestinal beneficiosa y regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta temprana a enfermedades. Otros ejemplos de estudios en animales alimentados con dietas suplementadas con postbióticos es el de Loh et al. (2014), donde se ve una mejora en los parámetros alimenticios de los huevos producidos por aves alimentadas con una dieta con inclusión de postbióticos durante 12 semanas, estos postbióticos fueron obtenidos del sobrenadante de un cultivo de una bacteria probiótica. Estudios en peces con postbióticos hechos a base de fermentados de la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* demuestran que en *Dicentrarchus labrax* (Róbalo) (Goda et al., 2018) luego de 12 semanas de alimentación, las dietas con inclusiones postbióticas tienen un aumento sobre la conversión de alimento, tasa de sobrevivencia y carga bacteriana intestinal beneficiosa.

En la actualidad no existen estudios que revelen si las dietas con inclusiones postbióticas tengan o no algún efecto beneficioso en especies salmonídeas, es por eso que es importante hacer estudios que permitan dilucidar si estos estimula la respuesta inmune para considerarlos como una alternativa dentro de las dietas funcionales con capacidades inmunorreguladoras.

#### **1.4.3.- Paraprobióticos**

Otra alternativa al uso de probióticos que se ha estado investigando últimamente es la del uso de paraprobióticos, los que han sido definidos como “Microorganismos no viable que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud al hospedador” (Taverniti and Guglielmetti 2011). Un ejemplo de su efecto en salmónidos es el análisis realizado en trucha arcoíris por Irianto & Austin, (2003) donde se alimentaron alevines de *O. mykiss* por 14 días con una dieta suplementada con paraprobióticos de *V. fluvialis*, *Aeromonas hydrophila* y *Carnobacterium*, inactivadas con formaldehído para luego ser desafiados con *A. salmonicida*, luego de 14 días después del desafío, los alevines

alimentados con paraprobióticos mostraron una disminución significativa de la tasa de mortalidad, en el porcentaje de macrófagos muertos en el riñón y un aumento en la capacidad fagocítica de estos. Otro ejemplo es el análisis *in vitro* realizado por Lee et al., (2002) en la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 en este estudio se cultivó una bacteria probiótica (*Bifidobacterium*) para luego inactivarla por calor a 95°C y resuspenderla en PBS, se estimuló la línea celular con una alícuota de esta preparación y para comprobar la inmunoestimulación se le realizaron qPCR para medir la expresión de citoquinas como el TNF- $\alpha$ , IL-6, los resultados de este trabajo nos indican que los paraprobióticos estimulan la producción de citoquinas *in vitro* para esa línea celular.



**Figura N°3.-** Diferencias entre postbióticos y paraprobióticos y sus efectos en el organismo (Aguilar-Toalá et al. 2018).

Para evaluar el efecto de los postbióticos sobre la respuesta inmune en salmónidos existen muchas alternativas que contemplan el uso de distintos sistemas, entre los cuales se encuentran los análisis *in vivo*, es decir, cultivar peces en estanques, alimentarlos con dietas

con inclusiones postbióticas y posteriormente realizar los análisis que puedan comprobar si tienen o no los efectos deseados, pero antes de escalar a complicados sistemas de recirculación acuática, existen análisis previos, como por ejemplo los análisis *in vitro*, el que tiene entre sus ventajas, el poder estudiar la interacción directa del compuesto (postbiótico) sobre un tipo celular específico.

### **1.5.- Análisis In vitro**

Existen muchos tipos de líneas celulares dependiendo de lo que se quiera probar, en salmónidos, por ejemplo, existen líneas celulares aisladas de branquias (RTGill), de tejido embrionario (CHSE-214) y líneas celulares aisladas de tejido hematopoyético, como es el caso de la línea celular RTS11, la que es del tipo celular monocito/macrófagos aislados de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) que surgió de un cultivo a largo plazo de células del bazo (Ganassin and Bols 1998) y la línea celular SHK1, que se trata de células del tipo macrófago, aisladas desde el riñón posterior de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Dannevig et al. 1997). RTS11 ha demostrado ser un buen modelo para estudiar compuestos que gatillan la respuesta inmune, como por ejemplo mediante la expresión de distintas citoquinas proinflamatorias al ser expuestas a flagelina, principal componente del flagelo de bacterias (Wangkahart et al., 2016) o a la vitamina C, donde al ser expuesta a esta por 24h se pudo ver un aumento significativo en el estallido respiratorio y en la capacidad fagocítica (Leal et al., 2017). Por su parte, SHK-1, también ha sido utilizada para comprobar efectos de compuestos inmunoestimulantes, como por ejemplo en el trabajo de Hernández et al. (2016), donde se midió la producción de citoquinas en células estimuladas con compuestos herbales y derivados de algas como inmunoreguladores frente a un desafío con *P. salmonis*.

En la búsqueda de nuevas estrategias para el control de enfermedades en acuicultura, los postbióticos aparecen como una alternativa viable para su inclusión en dietas funcionales como estimuladores del sistema inmune, pero aun no existen estudios que nos proporcionen si estos resultados son reproducibles en salmónidos, es por eso que mediante la evaluación de algunos parámetros involucrados en la respuesta inmune temprana de la línea celular ser expuesta tanto a la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* como con los postbióticos

que ésta produce, se verificará si es necesaria la presencia del probiótico completo para inducir la respuesta inmune de células de salmónidos o si también se puede estimular con los compuestos que estas producen.



## **HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS GENERAL**

Los postbióticos producidos de la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* estimulan la respuesta inmune temprana de células macrofágicas de salmónidos comparable al que producen los probióticos que los secretan.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta de células macrofágicas de salmónidos estimuladas con postbiótico originarios de levaduras

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Seleccionar un método de obtención de postbióticos a partir de levaduras
2. Evaluar la respuesta inmunomoduladora mediante la expresión de citoquinas en líneas celulares de salmónidos estimuladas con postbióticos

## 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### Objetivo 1.- Seleccionar un método de obtención de postbióticos a partir de levaduras

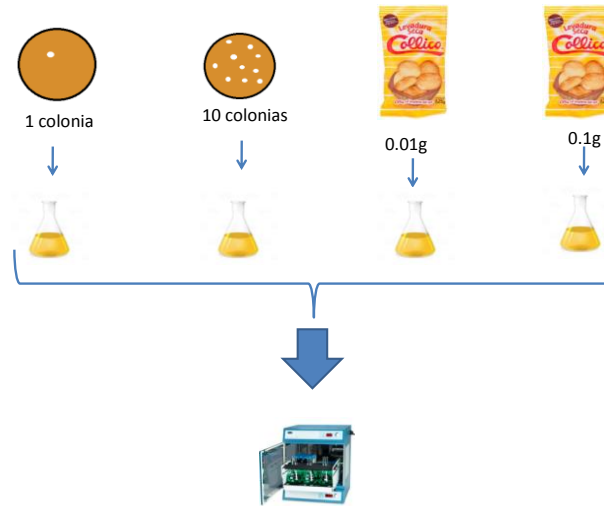
#### 2.1.- Cultivo de la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae*

##### 2.1.1.- Cultivo en placas de agar

Se cultivó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de marca comercial Collico (Collico M.R.) Para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de levadura seca se pesó 0.1g de levadura y se llevó a un tubo eppendorf junto con 1mL agua autoclavada se aplicó vortex por 2 minutos con el fin de lavar el emulsionante (monoesterato de sorbitán) luego se centrifugó para separar el sobrenadante del pellet a 2000xg y se eliminó el sobrenadante, repitiendo el lavado 2 veces. Luego del lavado, se resuspendió el pellet en 1mL de agua autoclavada y se hicieron 6 diluciones seriadas en tubos eppendorf una relación de 10:1, de cada dilución se sembraron en duplicado 100µL en la placas petri con agar Sabouraud (Merck) y se incubaron a 37°C durante 24 horas, para cuantificar las unidades formadoras de colonias.

##### 2.1.2.- Cultivo en medio líquido: Cinética de crecimiento.

Para determinar el método para la producción de postbióticos desde *Saccharomyces cerevisiae* se probaron distintos métodos de inoculación en 100mL de caldo de Yeast Peptone Dextrose, (YPD) (Fig. 4), compuesto de un 10% de extracto de levadura (Merck), 20% de peptona (Merck) y 20% de dextrosa (Winkler), previamente esterilizado, se cultivó por 24 horas a 37° C con agitación de 90rpm en matraces de 100mL. Para tal se evaluaron cuatro tipos de inóculo 1) se inoculó 1 colonia desde una placa petri crecidas en agar Sabouraud a 37°C por 24 horas. 2) se inocularon 10 colonias desde una placa petri crecidas en agar Sabouraud a 37° por 24 horas, 3) se inoculó 0.01 gramo de levadura seca Collico y 4) se pesaron 0.1g de levadura seca Collico para inocular el cultivo.



**Figura N°4.-** Diagrama de la estrategia para evaluación de tipos de inoculación de levaduras en medio líquido

Todos los tratamientos contaron con una réplica y un matraz con caldo de cultivo YPD sin inoculación como control negativo. Se tomó una muestra de cada uno de los cultivos cada 2 horas durante 12 horas con el fin de determinar la cantidad de levaduras en el cultivo mediante dos métodos de conteo, el primero en una cámara de Neubauer, tiñendo la muestras con azul de metileno al 0.01%, y el segundo mediante su densidad óptica, la que se determinó midiendo su absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro (Torres et al., 2017). Con esos datos se construyeron curvas de la cinética de crecimiento de la levadura en el caldo de cultivo.

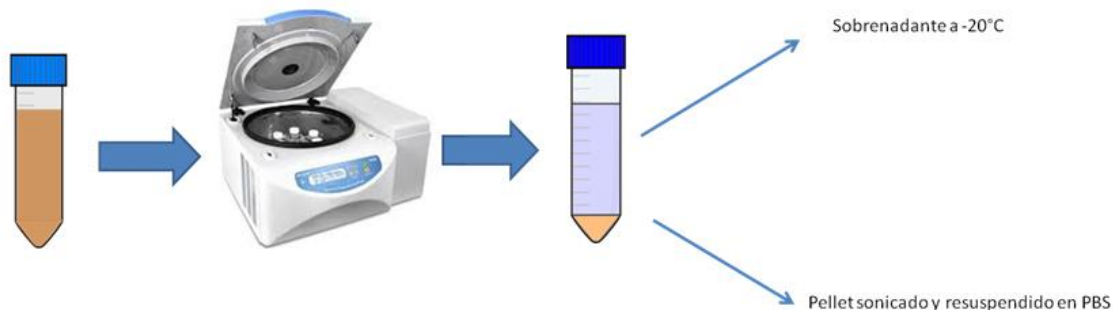
### 2.2.2.- Obtención preliminar de los postbióticos

De cada cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, inoculados con los distintos métodos, se tomaron 3 muestras, una a las 2 horas de cultivo, otra a las 6 horas de cultivo y otra a las 10 horas de cultivo en las condiciones previamente descritas y estas muestras fueron utilizadas para la obtención de postbióticos propuestos en literatura:

1.- **Separación del sobrenadante y del pellet** (Tsilingiri et al. 2012); para ello se centrifugó el cultivo de levaduras a 8000rpm por 10 minutos (Foo et al. 2003) (Fig 5), posteriormente el sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su posterior utilización.



**2.- Mediante lisis celular para liberar los contenidos intracelulares;** luego de centrifugar el cultivo, el pellet se lavó y se resuspendió en PBS y se utilizó el disruptor ultrasónico para romper la levadura (Fig 5) (Amaretti et al., 2013, Lee, Zang, Choi, Shin, & Ji, 2002), se volvió a separar el pellet (levaduras que no se lisaron) y la fase líquida con los compuestos liberados por las levaduras.



**Figura N°5.-** Tratamientos posteriores a los cultivos para la obtención de postbióticos.

El pellet de las levaduras sonicadas que no se rompieron se volvió a resuspender en PBS para analizar el efecto de los paraprobióticos en las líneas celulares.

### **2.2.3.- Perfil proteico mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida – SDS**

Para realizar una primera aproximación de los diversos contenidos proteicos de los distintos postbióticos se hizo una separación de proteínas en gel de poliacrilamida sembrando 20 $\mu$ L de los postbióticos obtenidos en el paso 2.2.2 en cada carril en una relación de 1:3 con el sampler buffer. El gel denaturante fue preparado al 6% de SDS y el gel concentrador al 12%. El ladder utilizado fue 4-20% Tris-glisina

Se dejó correr el gel por 100 minutos a 100 Volt en la cámara de electroforesis de proteínas (Bio-rad), luego se le agregó una cantidad suficiente de GelCode Blue Safe Protein Stain (Thermo) hasta cubrir el gel, al día siguiente se lavó con abundante agua destilada y se observó en un sistema digital de fotodocumentación bajo luz ultravioleta.

## **Objetivo 2.- Evaluar la respuesta de la línea celular estimuladas con postbióticos**

### **2.3.- Crecimiento y Mantenimiento de líneas celulares.**

#### **2.3.1.- Mantenimiento de la línea celular RTS11**

La línea celular RTS11 proveniente de un cultivo estable desde el bazo de *Oncorhynchus mykiss* que se encontraban dentro de la colección del laboratorio de Cultivo Celular y Genómica Marina de la Universidad de Concepción, fue mantenida en frascos T-75 e incubadas a  $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en medio Leibovitz's L-15 (Gibco) suplementado con un 10% de suero bobino fetal (SBF) (Biowest), 2% de glutamina,  $\beta$ -mercaptoetanol 40  $\mu\text{M}$ , penicilina 40 U/ml, estreptomycin 40  $\mu\text{g/ml}$ , amfotericina-B 2,5  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **2.3.2.- Mantenimiento de la línea celular SHK1**

La línea celular SHK-1 (ECACC N° 97111106) provenientes de riñón posterior de *Salmo salar* que se encontraban dentro de la colección del laboratorio de Cultivo Celular y Genómica Marina de la Universidad de Concepción, fueron mantenidas en frascos T75, e incubadas a  $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con medio Leibovitz's L-15 (Gibco) y suplementadas con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (HyClone), L-glutamina 2% (Gibco),  $\beta$ -mercaptoetanol 40  $\mu\text{M}$ , penicilina 40 U/ml, estreptomycin 40  $\mu\text{g/ml}$ , amfotericina-B 2,5  $\mu\text{g/ml}$ .

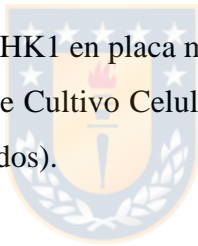
Al observar confluencia de ambas líneas celulares de un 90–95%, se realizaron trasposos, eliminando el medio contenido, lavando con tampón fosfato salino (PBS) y finalmente separando las células del frasco, mediante la adición de Tripsina/EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 0.25%/0.2%. Esta reacción enzimática fue detenida con medio completo en relación 1:3. Las células fueron contabilizadas mediante la técnica de exclusión de azul de tripán, con ayuda de hemocitómetro de Neubauer y microscopio óptico convencional. La suspensión generada fue utilizada para generar subcultivos para mantención de las líneas celulares y la amplificación para realizar los bioensayos celulares, como se detalla

más adelante. Todos los procedimientos realizados con ambas líneas celulares se llevaron a cabo en gabinete de bioseguridad tipo II, en condiciones estériles.

### **2.3.3.- Determinación de densidades de siembra en placas**

Para determinar la densidad óptima de siembra en placas de cultivo, se sembraron distintas densidades de células en placas de 96 pocillos (rango de  $5 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  células por pocillo con intervalos de  $1.5 \times 10^4$ ) en 200  $\mu$ l de medio L-15 completo. En placas de 6 pocillos se sembraron con un rango de  $1 \times 10^6$  a  $6 \times 10^6$  células por pocillo con intervalos de  $5 \times 10^5$ ) en 200  $\mu$ l de medio L-15 completo. Luego de la siembra, las placas fueron dejadas en la cámara de cultivo a  $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , siendo evaluadas a las 24 horas post siembra con un microscopio invertido, con el fin de evaluar visualmente la adherencia y confluencia celular obtenida en los tiempos definidos post siembra.

La densidad de siembra para SHK1 en placa multipocillo de 6 pocillos fue determinado en análisis previos en el laboratorio de Cultivo Celular y Genómica Marina de la Universidad de Concepción (resultados no publicados).

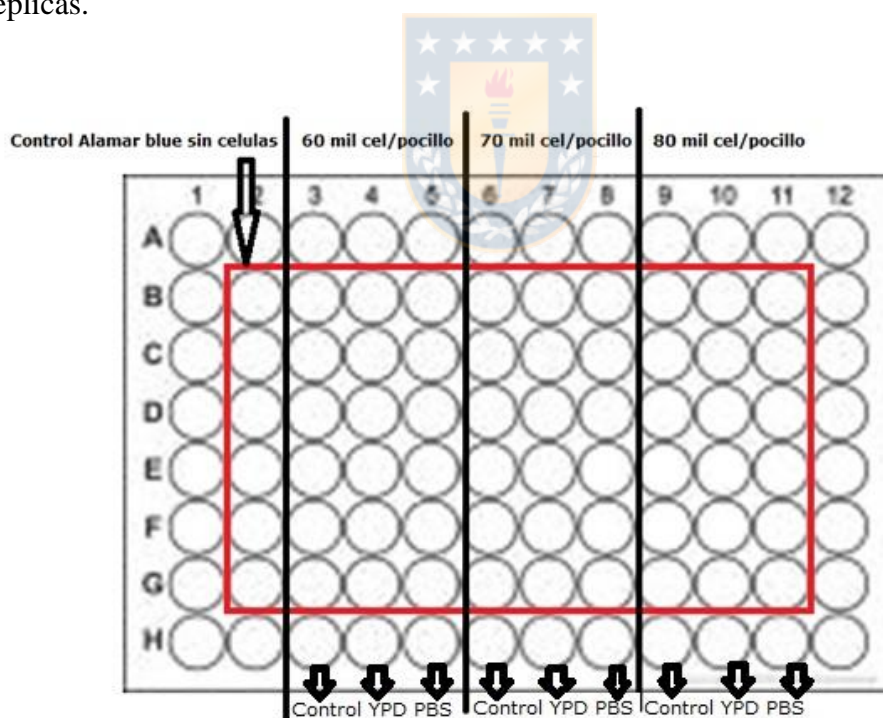


## **2.4.- Ensayo de viabilidad celular.**

### **2.4.1.- Ensayo de alamar blue para determinar densidad de análisis y vehículo.**

El ensayo de alamar blue (Invitrogen) es un ensayo de viabilidad celular que utiliza como colorante vital resazurina, este indicador azul es permeable, no tóxico y débilmente fluorescente, además el kit incluye compuestos adicionales para evitar la reducción excesiva de resazurina a un producto no fluorescente. Alamar blue marca registrada es un kit comercial no tóxico alternativo al ensayo de viabilidad celular MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenilo -bromuro de tetrazolio) (O'Brien et al. 2000), que permite amplificar la señal en células de compleja manipulación. Este ensayo fue estandarizado en la línea celular RTS11 durante esta tesis, para lo cual se requiere determinar la densidad óptima y selección de los vehículos que no afecten la viabilidad de la levadura y sus derivados e inocuos para la

línea celular RTS11; Resumidamente, se sembró una placa de 96 pocillos con 3 densidades distintas, las que se escogieron mediante un análisis visual de confluencia y adherencia celular (descrito en el paso 2.1.3), se dejó incubando la placa por 24 horas a  $18^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , tras lo cual se a cada densidad se agregó 50 $\mu\text{L}$  de medio para levaduras YPD y 50 $\mu\text{L}$  de PBS (Fig. 6), ambos vehículos de los postbióticos a analizar, se dejó la placa incubando por 4 horas en las condiciones estandarizadas anteriormente y se analiza la toxicidad por alamar blue, para ello se eliminó el medio completó y se reemplazó con 100 $\mu\text{L}$  de alamar blue diluido 1:50 en medio L-15 sin suplementar, esta mezcla también fue sembrada en pocillos sin células (control negativo), para determinar que la lectura dada no sea un interferente del medio del colorante. Se incubó por 1 hora (según instrucciones del fabricante). Finalmente se procedió con la cuantificación del producto de reacción en el lector de microplacas Synergy H1 Hibrid reader (Biotek) a 530 nm de excitación y 590 de emisión. Se eligió la densidad que presentaba una mayor diferencia con respecto al compuesto solo (sin células) y menor dispersión de datos entre replicas.



**Figura N°6.-** Densidades de siembra de la línea celular RTS11 elegidas en base a un análisis previo con confirmación visual de confluencia y adherencia a las 24 horas.

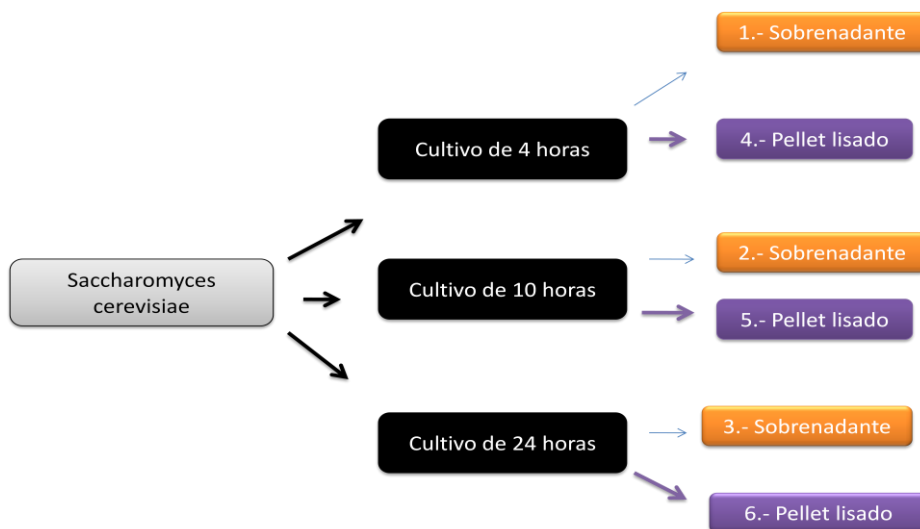
## 2.4.2.- Viabilidad celular post exposición a postbióticos de levadura

### Ensayo toxicidad aguda

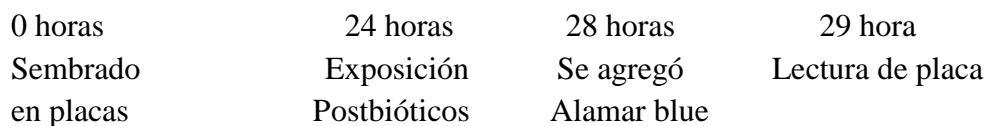
Para conocer el efecto de los distintos postbióticos sobre la viabilidad de las células del sistema inmune de salmónidos, se sembró una placa de 96 pocillos con una densidad de  $7 \times 10^4$  células por pocillo y se incubó durante 24 horas a  $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  hasta alcanzar confluencia, luego se le agregó cantidades crecientes de postbióticos obtenidos desde el sobrenadante del cultivo de 0.1g de *Saccharomyces cerevisiae* en 100mL de medio YPD y del pellet lisado del mismo cultivo en 3 puntos de la curva de crecimiento, se incubó 4 horas y se procedió con el protocolo del alamar blue previamente descrito.

**Tabla N°1.-** Fase y cantidad de levaduras que tenía el cultivo al momento de tomar las muestras

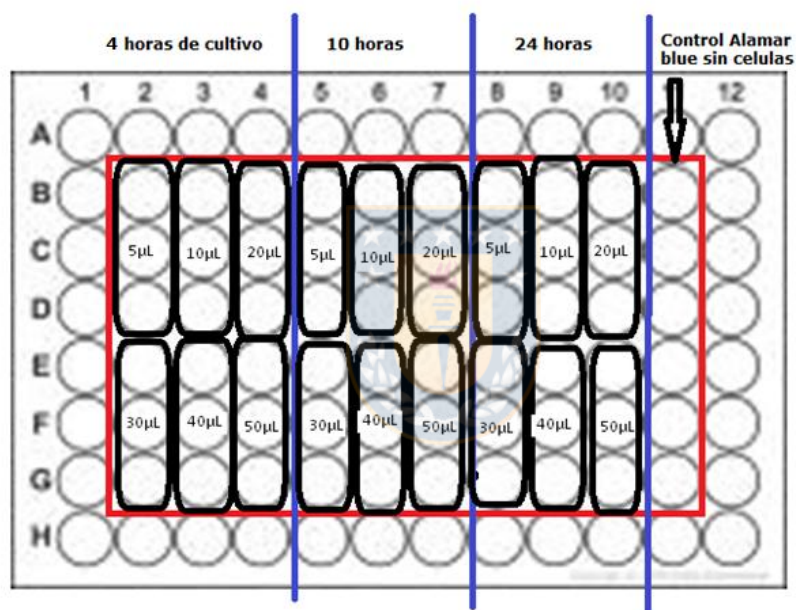
| horas de cultivo | Fase de crecimiento | N° de levaduras/mL |
|------------------|---------------------|--------------------|
| 4                | exponencial         | 381400             |
| 10               | estacionaria        | 148200             |
| 24               | muerte celular      | 107200             |



**Figura N°7.-** Identidad de los postbióticos analizados en el ensayo de citotoxicidad.



**Figura N°8.-** Diagrama de los tiempos de siembra y exposición utilizados para el ensayo de citotoxicidad

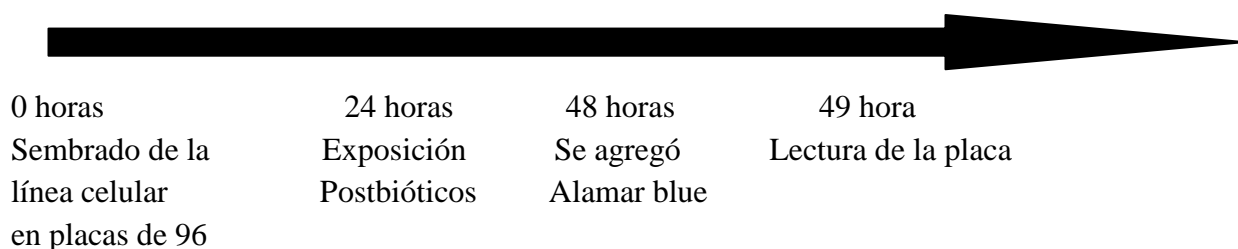


**Figura N°9.-** Diseño experimental de siembra de la línea celular RTS11 y exposición a postbióticos (*S. cerevisiae*) sobrenadante y pellet.

### Ensayo viabilidad celular a las 24 horas de exposición

Una vez determinado si los postbióticos presentaban algún tipo de citotoxicidad aguda, se evaluó el efecto de estos sobre la viabilidad celular en periodos más prolongados, para ello se cultivó 0.1g de levadura en 10mL de medio y se tomaron muestras a distintas

horas de sobrenadante (separado mediante centrifugación), se tomo una muestra a las 4 horas, 10 horas y 24 horas de sobrenadante y del pellet, el cual fue lisado por sonicación como se indicó anteriormente, los postbióticos fueron sembrados en una placa multipocillos de la forma descrita anteriormente (fig 9) y luego de 24 horas de incubación se realizó el ensayo de alamar blue



**Figura N°10.-** Diagrama de los tiempos de siembra y exposición para el medir viabilidad celular luego de 24 horas de exposición



## 2.5.- Análisis moleculares

### 2.5.1.- Extracción de ARN

Para realizar la estandarización de partidores diseñados para la línea celular RTS11 se tomo un frasco T75 que se encontraba confluyente y se le realizó una extracción de ARN. Se retiró el medió de cultivo del frasco y se le agregó 1mL de TRIzol Reagent (Invitrogen). Se soltaron y se rasparon las células con un scrapel, se tomó la fase acuosa y fue pasada a tubos de 2mL, los que almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización, para entonces las muestras fueron descongeladas, se le agregó 200µL de cloroformo y se mezcló en vortex vigorosamente. Se centrifugó a 12.000xg por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a tubos de 1.5mL y se le agregó 500 µL de isopropanol. Se incubo a -80°C durante 1 hora y luego a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 12.000xg por 15 minutos a 4°C Se centrifugo a 12.000g por 10 minuta 4°C. Luego el sobrenadante se eliminó, y el precipitado (pellet) se lavó con 1 mL de etanol 75%, se agitó vigorosamente utilizando un vortex hasta que el pellet se desprendiera. Se centrifugo a 7500g por 5 minutos a 4°C, se eliminó el

sobrenadante. El lavado con etanol se repitió dos veces. El pellet se resuspendió con 20  $\mu$ L de agua milli-Q. Finalmente la concentración y pureza del ARN total se determinó con un nanodrop, midiendo a 280, 260 y 230 nm. Estos valores que corresponden respectivamente a la absorbancia de compuestos orgánicos, de ARN o ADN y de las proteínas, por lo que, cuando la relación de absorbancia de A260/A230 está entre los valores 1,8 y 2,0 se considera óptima, es decir ausencia de contaminación con fenoles o compuestos orgánicos utilizados durante el proceso de extracción. Mientras, cuando la relación A260/A280 está entre los valores 1,8 y 2,2, se considera óptima, es decir ausencia de contaminación con proteínas. La integridad del ARN se analizó mediante una electroforesis en gel MOPS de agarosa-Formaldehído 1,2%. El gel se preparó con 0,6 gramos de agarosa y 50 mL de buffer MOPS 1X, el que contiene 10% de buffer MOPs 10X (200mM 3-N-morphidino propano sulfonic Acid, 50mM de acetato de sodio y 10mM EDTA), 2% de formaldehído y 88% de agua libre de ARNasas. Para el sembrado se utilizó 1  $\mu$ L de Buffer MOPS y 1  $\mu$ L de muestra de ARN. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1.000 pb. El gel fue corrido a un voltaje de 100 volt por 30 minutos. Para visualizar el gel se utilizó un sistema digital de fotodocumentación bajo luz ultravioleta.

Los partidores utilizados para la línea celular SHK-1 fueron previamente estandarizados en el laboratorio de genómica acuícola (resultados no publicados).

### **2.5.2.- Síntesis de ADNc**

Se llevaron las muestras de ARN a una concentración de 500 ng/ $\mu$ L para la síntesis de cADN, para esto se realizó una Transcripción Reversa (RT) mediante el kit ReverAid H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit (Fermentas), acorde a las instrucciones del proveedor. Para la transcripción reversa (RT) se utilizó el termociclador Swift MaxiTM de ESCO®, con un programa previamente establecido para la transcripción reversa (Tabla N°2).

Se realizó un PCR tiempo final para verificar la *amplificación* de cada cDNA, utilizando el control endógeno *factor de elongación alpha* (EF- $\alpha$ 1) Forwad: TGCTGGTGGTGTGGGTGAGT; Reverse: CCTCAAACCGCTTCTGGCTGT



**Tabla N°2.-** Programa estandarizado para la utilización de PCR tiempo final

|           | Etapa | Temperatura            | Tiempo      |
|-----------|-------|------------------------|-------------|
| 35 ciclos | 1     | 90°C                   | 2 min, 30 s |
|           | 2     | 95°C                   | 30 s        |
|           |       | 60°C o gradiente de T° | 30 s        |
|           |       | 72°C                   | 45 s        |
|           | 3     | 72°C                   | 7 min       |
|           |       | 4°C                    | Indefinido  |

### 2.5.3.- Diseño y estandarización de partidores

A partir de los genes que codifican proteínas de la especie *Oncorhynchus mykiss* involucrados en la respuesta inmune temprana; *factor alpha de necrosis tumoral* (GenBank: AJ401377.1); *Interleuquina 1-Beta* (GenBank: NM\_001124347.2); *Interleuquina 6* (GenBank: IL-6ORF 1); *Interleuquina 10* (GenBank: NM\_001245099.1); *Interleuquina 11* (GenBank: AJ535687.1); *Interleuquina 17* (GenBank: KJ921977.1); y los genes normalizadores *Factor de elongación alpha* (GenBank: AF498320) y *Beta actina* (GenBank: AJ438158.1), se procedió al diseño de partidores. Utilizando el software Geneious Prime 2019 usando el algoritmo primer3 .0, se realizó un alineamiento de cada gen las secuencias descargadas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se identificaron los marcos abiertos de lectura y se diseñaron 2 pares de partidores para cada secuencia seleccionada que fueran específicos para cada gen con características descritas en la tabla 3. Los partidores fueron sintetizados a MacroGen Inc (Corea).

**Tabla N°3.-** Características utilizadas para el diseño de los partidores

| Características            | Mínimo | Máximo | Óptimo |
|----------------------------|--------|--------|--------|
| Tamaño partidador (pb)     | 18     | 24     | 20     |
| Temperatura annealing (°C) | 57     | 63     | 60     |
| %Citosina/Guanina          | 20     | 45     | 60     |
| Tamaño amplicon            | 100    | 200    | 150    |

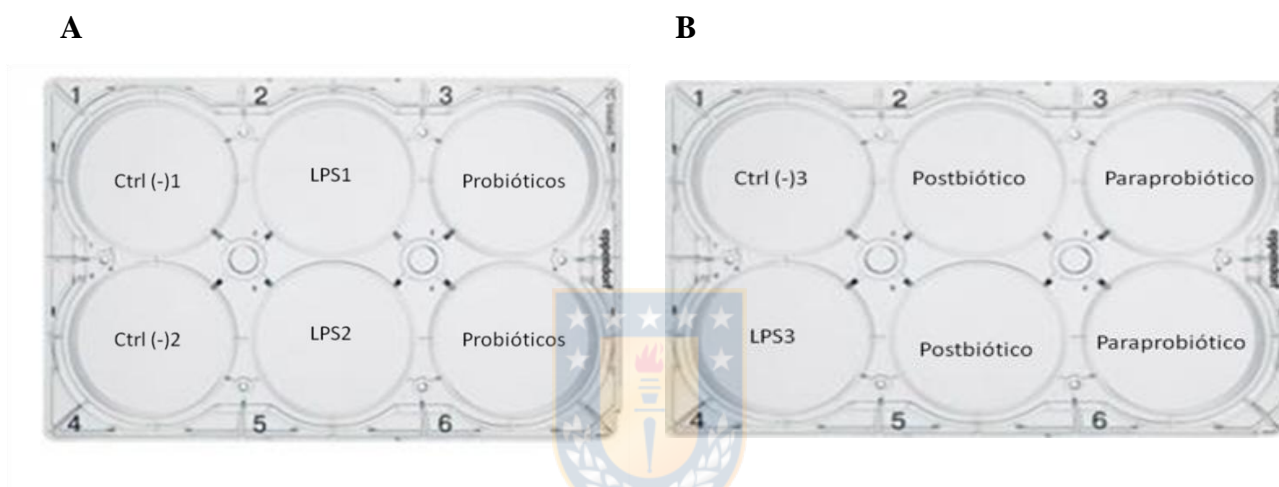
Para la obtención de la temperatura de annealing a la cual cada partididor funciona con mayor eficiencia, se realizó un PCR tiempo final de 35 ciclos en el equipo Termociclador Veriti (Applied Biosystems), la reacción de PCR fue la siguiente; 94°C por 2 minutos y 30 segundos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos a temperatura correspondiente al partididor utilizado, (en este caso de estandarización, se realizaron 3 reacciones con un gradiente 3 temperaturas con diferencia de 2°C para cada partididor, es decir 56°C, 58°C y 60°C), y 72°C por 45 segundos y finalmente 72°C por 5 minutos el mix de reacción contenía Buffer (1X), BSA (0,2µg/µL), dNTP's (0,2mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), partididores (0,5 µM cada uno), Taq polimerasa (0,06U/µL), cADN (13ng/µL) y agua PCR. Para verificar los resultados se hizo un gel de agarosa TBE1X al 2%, que fue corrido a 90V por 40 minutos.

#### **2.5.4.- Rango dinámico**

Para determinar la dilución más adecuada para la óptima eficiencia del partididor, se analizaron los rangos dinámicos por PCR en tiempo real en el equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Para ello se realizó una dilución seriada de 1:3 de las muestras de cDNA para la realización de una curva estándar para determinar la dilución óptima. La reacción se realizó en un volumen de 10 µL (2 µL de muestra y 8 µL de Master Mix), utilizando el kit Maxima® SYBR Green/ROX Opcr Master Mix (Fermentas). Según las instrucciones del proveedor. La reacción de q-PCR fue realizada en el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystem), considerando una primera etapa a 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 30 segundos a la temperatura de annealing de cada partididor seleccionada en el RT-PCR en tiempo final y 30 segundos a 72°C. Luego se realizó una curva de melting de 95°C a 60°C donde finalmente la temperatura sube gradualmente cada 0,3°C hasta los 95°C. Finalmente la estandarización de partididores dará como resultado la dilución óptima de las muestras para cada gen con el fin de utilizar las mejores condiciones de los partididores en el análisis de expresión génica.

### 2.5.5- Estimulación de las líneas celulares con postbióticos.

La estimulación para la producción de citoquinas en RTS11 y SHK1 las líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos con una densidad de  $2 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  respectivamente en 3mL de medio y se dejaron en la estufa de cultivo por 24 horas o hasta alcanzar 80% de confluencia, pasado ese tiempo fueron estimuladas con las distintas muestras durante 4 horas de la siguiente manera:



**Figura N°11.-** Diseño de placas utilizadas en la evaluación *in vitro* del efecto de postbióticos en la producción de citoquinas en línea celular RTS11

- A) Placa 1: Pocillo #1 y #4 Control (-); las células sin estimulación, Pocillo #2 y #5; Control positivo LPS,  $10 \mu\text{g/mL}$  para RTS11 y  $50 \mu\text{g/mL}$  para SHK1. Pocillo #3 y #6; Células estimuladas con la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en YPD, separada por centrifugación y resuspendida en PBS.
- B) Placa 2: Pocillo #1: células sin estimular para ser utilizadas como control negativo, Pocillo #4 control positivo LPS,  $10 \mu\text{g/mL}$  para RTS11 y  $50 \mu\text{g/mL}$  para SHK1. Pocillo #2 y #5: células estimuladas con postbióticos de levadura. Pocillo #3 y #6; Células estimuladas con paraprobióticos de levadura.

Luego se procedió a la extracción de ARN se retiró el medio de cultivo, se centrifugaron las RTS11, y luego ambas fueron lavadas con PBS, se retiró el PBS y se siguió con el protocolo detallado en el punto 2.5.1

#### **2.5.6.- Selección del control endógeno**

Para realizar el análisis de expresión relativa de los genes de interés, se necesitó selección y verificar un control endógeno, de modo que se pueda comparar con éste la expresión del gen de interés.

Los genes candidatos para la evaluación del control endógeno en la línea celular RTS11 fueron:  *$\beta$ -actina* y *factor de elongación* (EF). El mejor gen candidato se obtuvo mediante la realización de un rango dinámico por PCR en tiempo real utilizando el equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystems, USA). Para esto se evaluaron 6 muestras de cADN, que correspondieron a un cultivo hecho en una placa de 6 pocillos, 3 pocillos sin estimular y 3 estimulados por 4 horas con  $10\mu\text{g mL}^{-1}$  de LPS. Los datos obtenidos fueron analizados en el algoritmo Normfinder®, el cual determinó el control endógeno más estable para la línea celular RTS11 en este estudio.

#### **2.5.7.- Expresión génica en las líneas celulares RTS11 y SHK1**

Estandarizados los partidores en RTS11 y utilizando partidores previamente estandarizados para SHK1 en el laboratorio de biotecnología y genómica acuícola, se prosiguió a la realización de la expresión génica de las muestras. Para ello se empleó el método de cuantificación relativa, el que analiza los cambios de expresión de un gen respecto a un gen. En esta investigación se utilizó el control endógeno, *Factor de elongación apha*. Con estos resultados se aplicó el método comparativo  $\Delta\Delta\text{Ct}$  comparativo el que se basa en la diferencia de expresión entre del gen de interés y el control endógeno, con lo que se determina cuantas veces más se expresa el de interés (Livak & Shmittgen 2001), para luego transformar los datos de  $\Delta\Delta\text{Ct}$  a fold change, para ello se tomó el valor de expresión del control como cero

y los valores de los distintos grupos se expresaron en cuantas veces era mayor al del grupo control.

### **2.5.8.- Análisis estadístico**

Los datos obtenidos por el análisis de expresión en fold change fueron analizados mediante el software estadístico JMP (Versión 11.0. SAS Institute. USA), donde se evaluó la normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos mediante el análisis de la curtosis y la simetría de los datos. Para cumplir con los requisitos mencionados y así poder realizar un análisis estadístico paramétrico, se debió transformar los datos de expresión de genes, realizado mediante la transformación BoxCox. Además a modo de verificar las diferencias significativas entre los grupos experimentales, se utilizó un t-student, seguida de un test post-hoc de tukey. Los resultados se consideraron significativos cuando  $p < 0,05$ . Los datos fueron graficados a través del software GraphPad Prims (Versión 6.0. GraphPad Software, Inc®).



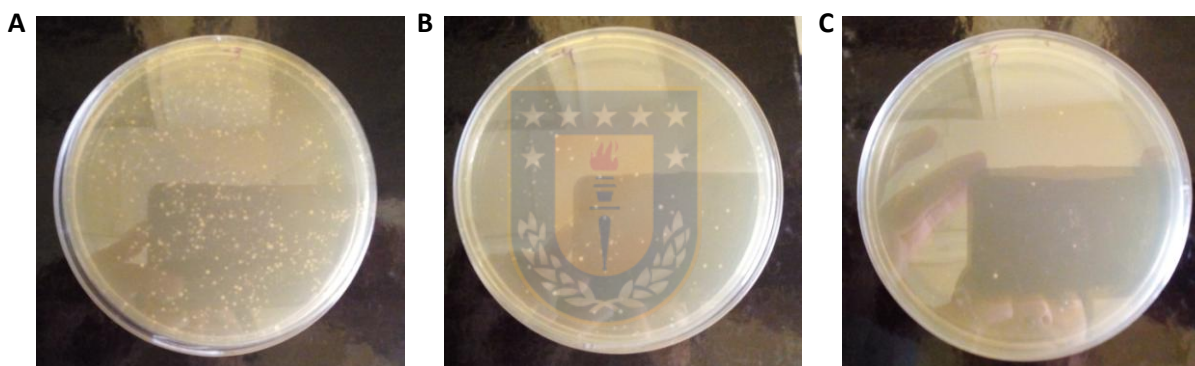
### 3.- RESULTADOS

#### Objetivo 1.- Seleccionar un método de obtención de postbióticos a partir de levaduras

#### 3.1.- Selección del método de producción de postbióticos.

##### 3.1.1.- Determinación de ufc por gramo de levadura

Mediante el crecimiento de colonias en placas de agar se determinó la viabilidad de la levadura comercial utilizada para producir los postbióticos. A partir de la placa que fue inoculada con la quinta dilución (Fig 12 B) calculando con el factor de dilución, se determinó que en un gramo de levadura equivale a  $1.7 \times 10^7$  ufc.

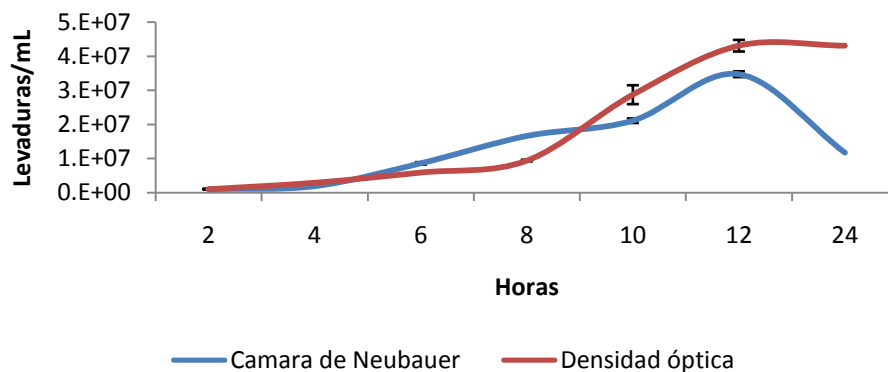


**Figura N°12.-** Placas de agar Sabouraud inoculadas con *S. cerevisiae* con distintos factores de dilución luego de 24 horas de cultivo. (A) cuarta dilución, la que se consideró incontable, en (B) la quinta dilución con un promedio de 17 ufc y en (C) la sexta dilución.

##### 3.1.2.- Cultivo en medio líquido

Los resultados del cultivo de una ufc en medio líquido muestran que la curva de crecimiento tiene las mismas tendencias ya sea por métodos ópticos (microscopía) y espectrofotométrico, alcanzando un máximo a las 12 h de cultivo sin llegar a fase estacionaria (Fig. 13)

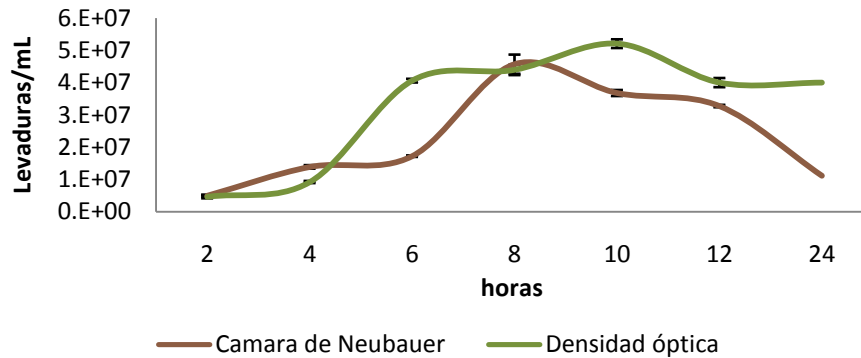
## Crecimiento 1 colonia en 100mL de medio



**Figura N°13.-** Curva de crecimiento de la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* a partir de 1UFC. Conteo en la cámara de Neubauer (Línea azul) y su densidad óptica (Línea roja)

Los resultados del crecimiento de la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* cuando se sembró 10 ufc en 100mL de YPD mostró que la fase exponencial se alcanzó a partir de las 4h con densidad de de  $1.1 \times 10^7$  levaduras/mL, el cual fue coincidente para ambos métodos de cuantificación (cámara de Neubauer y densidad óptica), fase que se mantiene hasta aproximadamente las 8h para luego entrar en fase estacionaria (Fig 14).

## Curva de crecimiento de 10ufc en 100mL de medio



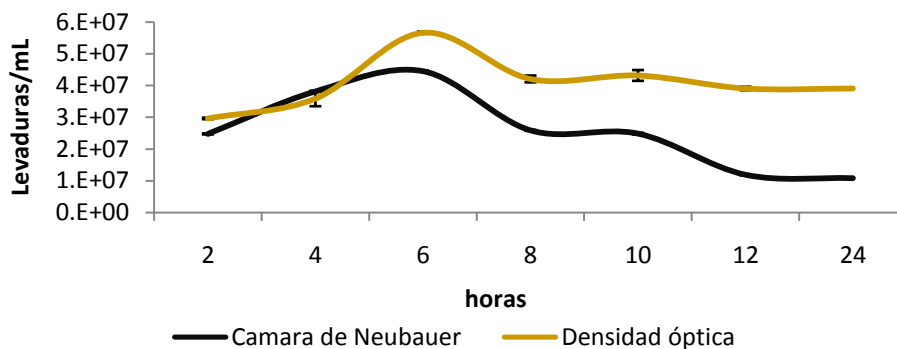
**Figura N°14.-** Curva de crecimiento de la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* construida con datos de conteo celular en la cámara de Neubauer y a su densidad óptica.

Cada replica sembrada con 0.01 gramo de levadura seca en 100mL de medio presentó contaminación, visualizada a trabajos de microorganismos que no correspondían a *S. cerevisiae* en la cámara de Neubauer así que se descartó ese método.

A partir de la curva de crecimiento del cultivo realizado desde 0.1g de levadura seca se puede observar que entra inmediatamente en fase estacionaria, alcanzando la fase exponencial a las 4 horas con un máximo de  $3.7 \times 10^7$  levaduras/mL (Fig 15), lo que coincide en ambos métodos de cuantificación (óptico y espectrofotométrico), luego de las 4 horas, la curva realizada con los datos obtenidos con la cámara de Neubauer muestra un rápido paso de la fase estacionaria a la de muerte celular, por el contrario la curva construida con los datos de densidad óptica muestran un aumento hasta las 6 horas para luego entrar en fase estacionaria (Figura 15)



## Crecimiento de 0.1g de levadura seca en 100mL de medio



**Figura N°15.-** Curva de crecimiento de la levadura probiótica *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD inoculado con 0.1g de levadura seca.

### 3.2.- Visualización preliminar del contenido proteico en los postbióticos.

Una primera aproximación de los potenciales compuestos activos contenidos en los postbióticos, se realizó caracterizando el contenido proteico producido por el microorganismo probiótico, lo que permite seleccionar el método de producción más eficiente de este y qué fase del cultivo presenta una mayor riqueza y diversidad de proteínas. Con este objetivo se analizó el contenido proteico mediante separación por tamaño en geles de poliacrilamida que permiten determinar de una forma muy general el perfil de proteínas de cada postbiótico. En la Figura 16 se puede observar los vehículos (carriles 1, 2 y 3), medio YPD sin inocular (carril 1), PBS (carril 2) y medio L-15 sin suplementar (carril 3) en cada uno se observa ausencia de señal, lo que sugiere que ninguno de los vehículos utilizados para análisis de postbióticos interfiere en la detección de proteínas.

Las columnas 4, 5 y 6 corresponden al postbiótico obtenido del sobrenadante del cultivo inoculado con 1ufc tomadas a las 4, 10 y 24 horas de cultivo respectivamente, mientras que las columnas 7, 8 y 9 corresponden al sobrenadante del cultivo inoculado con 10ufc cultivada por las mismas horas, ninguna de estas mostraron bandas en el gel.

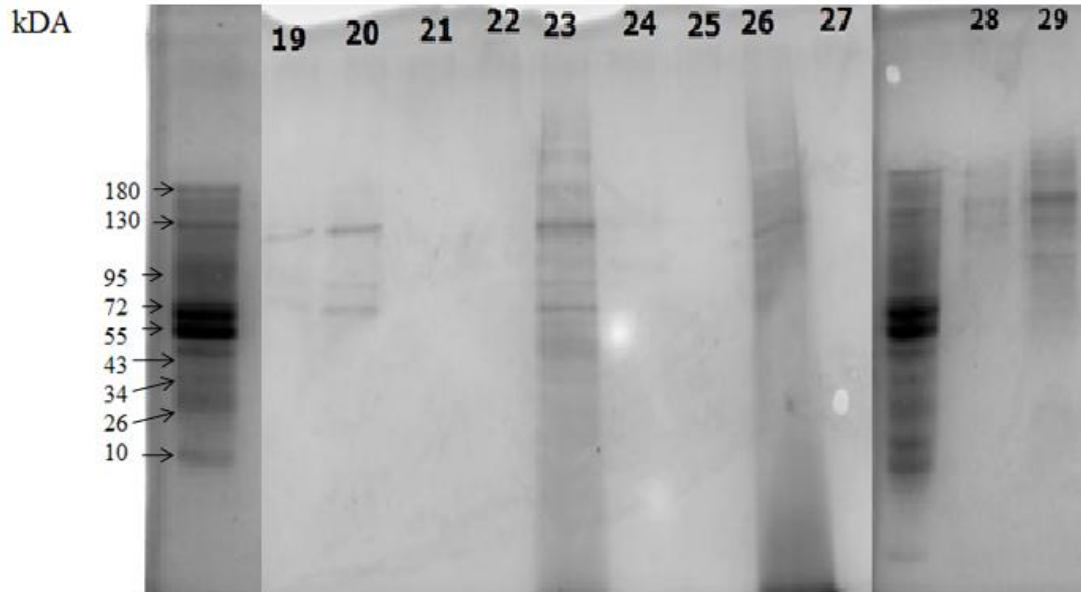
Las columnas 10, 11 y 12 corresponden al sobrenadante de un cultivo de 0.01g de levadura seca en los mismos tiempos de incubación, sólo el de mayor tiempo muestra unas bandas muy

leves. Las columnas 13, 14 y 15 corresponden al sobrenadante de 0.1g de levadura seca cultivada en los mismos tiempos mencionados anteriormente, sólo el carril 15 se observan bandas notoriamente marcadas. Finalmente en los carriles 16, 17 y 18 se puede observar la huella proteica del postbiótico obtenido de la ruptura de la levadura probiótica del cultivo inoculado 0.1g de levadura seca, el pellet fue resuspendido en buffer, sonificado y separado de los restos celulares por centrifugación para él cual se observa un contenido proteico visible en el carril 18.



**Figura N°16.-**Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de proteínas en los distintos postbióticos obtenidos desde el cultivo de *S.cerevisiae*.

En la Figura 17 se observan postbióticos y paraprobióticos obtenidos mediante disruptión ultrasónica, en los carriles 19 y 20 corresponden a los postbióticos obtenidos por lisis celular pellet de 10ufc por 10 y 24 horas de cultivo respectivamente, se observan bandas similares, pero muy tenues. Los carriles 21 y 22 al postbiótico de 1ufc obtenido de la misma manera y en los mismos tiempos resuspendida en PBS, mientras que los carriles 24 y 25 están resuspendidas en medio L-15, en ninguno de ellos se observan bandas claras. El mayor número de bandas es observado en los carriles 23 y 26 los que corresponden a paraprobióticos de un cultivo de 24 horas resuspendido en PBS y en L-15 respectivamente, se observa una mayor claridad en el paraprobiótico de levadura resuspendido en PBS. Finalmente los carriles 28 y 29 corresponden al sobrenadante de un cultivo de 24 horas inoculado con 10 ufc y 0.1g respectivamente



**Figura N°17.-**Gel de poliacrilamida SDS Page de contenidos proteicos desde postbióticos y paraprobióticos obtenidos desde el cultivo de *S cerevisiae*.

**Objetivo 2.-** Evaluar la respuesta de la línea celular estimuladas con postbióticos.

### 3.3.- Selección de la densidad de siembra en placas

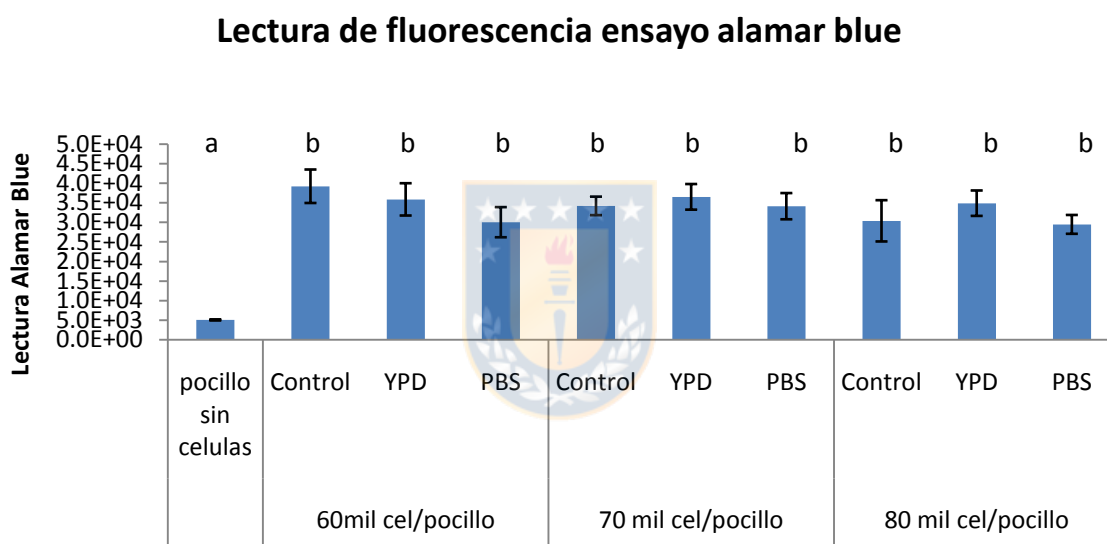
Se realizó una determinación visual de la densidad óptima de siembra para los experimentos en placas de 96 y 6 pocillos, la línea celular RTS11 evaluada en el rango de densidades celulares crecientes desde  $5 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  células por pocillo con intervalos de  $1.5 \times 10^4$ , para placa de 96 pocillos en  $200 \mu\text{L}$  de medio por pocillo y entre  $1 \times 10^6$  y  $6 \times 10^6$  para las placas de 6 pocillos en  $2 \text{mL}$  de medio por pocillo. Se observó que la densidad celular óptima, basado en una mayor adherencia y confluencia el rango de  $6 \times 10^4$  y  $8 \times 10^4$  células por pocillo para la de 96 pocillos, mientras que en la placa de 6 pocillos fue de  $2 \times 10^6$  células por pocillo.

La densidad óptima de siembra de SHK1 en placa de 6 pocillos fue determinada en análisis previos realizados en el laboratorio y se observó que la densidad celular óptima es de  $1 \times 10^6$  células por pocillo.

### 3.4.- Ensayo de viabilidad celular de alamar blue

#### 3.4.1.- Evaluación de la toxicidad del vehículo.

Los resultados de la evaluación de las distintas densidades celulares muestras que, tanto los controles como aquellas células expuestas al vehículo, no muestran diferencias significativas entre sí, la densidad que presentó una menor dispersión de datos es la de  $7 \times 10^4$  células por pocillo en  $200 \mu\text{L}$  de medio, lo que permite descartar el efecto tóxico del vehículo a las dosis utilizadas ( $50 \mu\text{L}$ ) y por los tiempos de exposición evaluados (4 h).

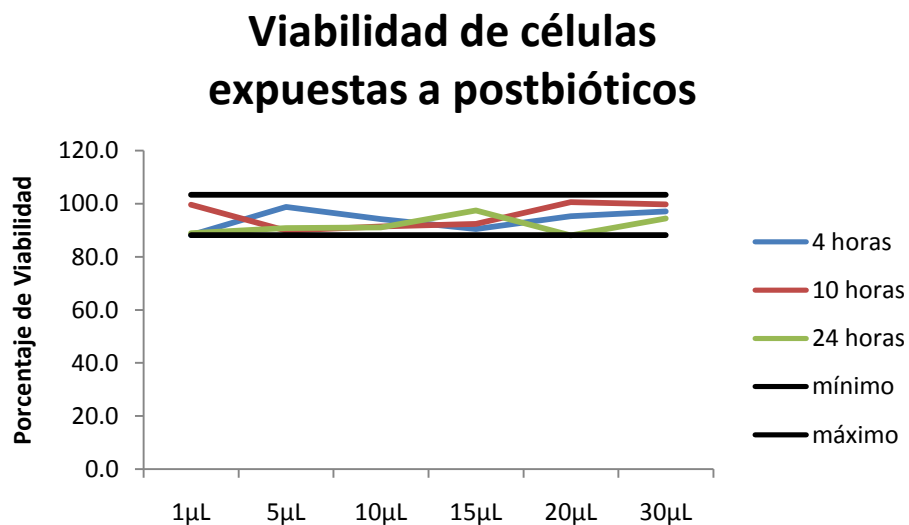


**Figura N°18.-** Viabilidad medida con el ensayo de alamar blue con distintas densidades de siembra y expuestas a vehículos.

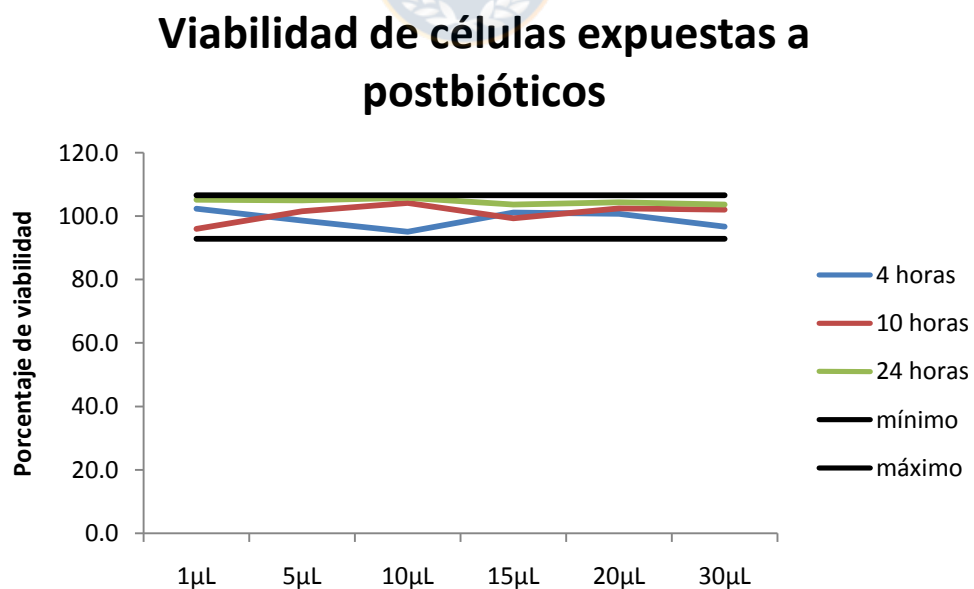
#### 3.4.2.- Ensayo de toxicidad aguda

Los resultados del análisis de citotoxicidad celular luego de la exposición aguda a postbióticos (4 horas), donde la exposición del sobrenadante del cultivo de levadura (postbiótico) muestran inocuidad en las condiciones evaluadas, pudiendo observar una viabilidad similar en todas las condiciones estudiadas, no observando diferencias significativas en ninguna de las condiciones de postbióticos (dentro del rango mínimo y máximo de la viabilidad de las células

control tanto sobrenadante del cultivo de levadura (Fig. 19), como de los contenidos intracelulares liberados mediante disrupción ultrasónica (Fig. 20).



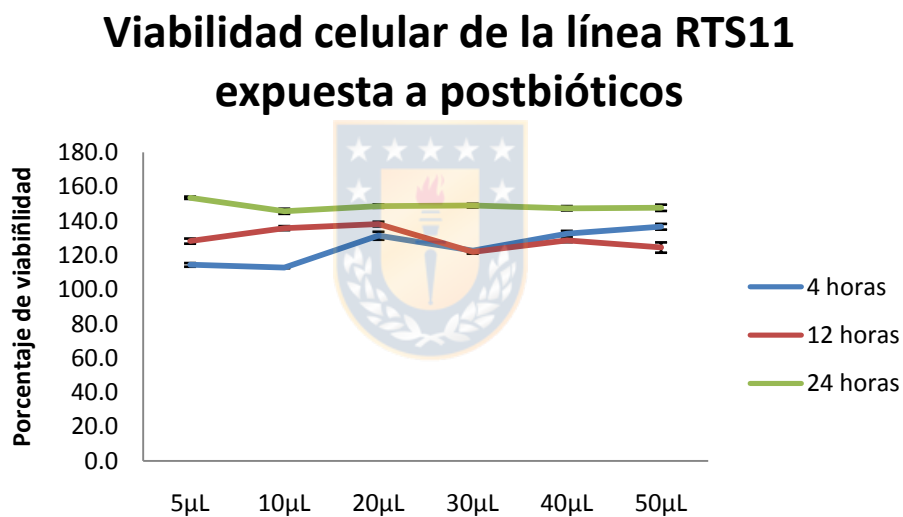
**Figura N°19.-** Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a postbiótico, recolectados del sobrenadante medido de levaduras



**Figura N°20.-** Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a postbióticos recolectados desde el pellet lisado mediante disrupción ultrasónica.

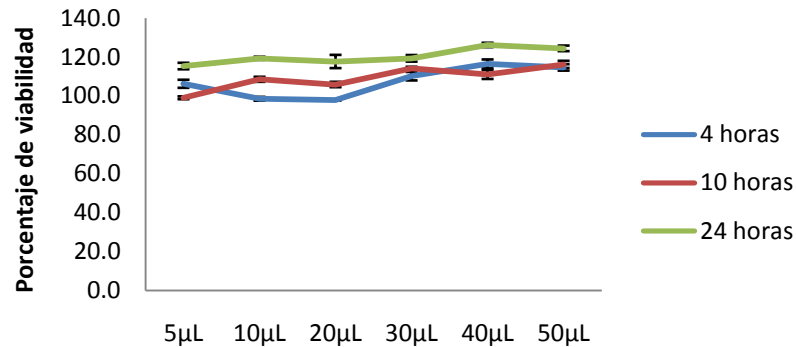
### 3.4.2.- Ensayo de viabilidad celular a las 24 horas de exposición

Se evaluó también el efecto que los distintos postbióticos de levadura tenían sobre la viabilidad de la línea celular RTS11 expuesta por periodos más prolongados, tanto el sobrenadante (Fig 21), como el contenido intracelular liberado por disrupción ultrasónica (Fig 22) en todas las cantidades y en todos los postbióticos obtenidos de *S. cerevisiae* se obtuvieron viabilidades sobre las obtenidas en el control (células no tratadas) las que se consideran el 100% de viabilidad, ambos postbióticos aumentan la proliferación de macrófagos, pero en el postbiótico obtenido del sobrenadante luego de 24 horas de cultivo de *S. cerevisiae* fue el que más aumentó la viabilidad de la línea celular RTS11 a las 24 horas de exposición.



**Figura N°21.-** Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a distintas cantidades de postbióticos, recolectados del sobrenadante de *Saccharomyces cerevisiae*, la viabilidad fue medida con el ensayo de alamar blue

## Viabilidad celular RTS11 expuestas a postbióticos



**Figura N°22.-** Porcentaje de Viabilidad celular de la línea RTS11 expuestas a distintas cantidades de postbióticos de *Saccharomyces cerevisiae*, la viabilidad fue medida con el ensayo de alamar blue

En base a los resultados obtenidos de la primera aproximación al contenido proteico de los postbióticos y del efecto de estos sobre la viabilidad celular en la línea de monocitos/macrófagos RTS11, se elige el postbiótico obtenido del sobrenadante del cultivo de *S. cerevisiae* luego de 24 horas de cultivo para proceder con la estimulación de la respuesta inmune, medido mediante la cuantificación de genes relacionados con respuesta inmune innata mediante qPCR, tanto para RTS11 como para la línea celular tipo macrofágica SHK1 aislada desde el riñón posterior de *Salmo salar*.

### 3.5.- Análisis moleculares

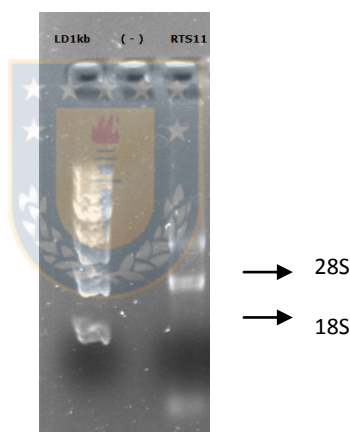
#### 3.5.1.- Extracción de ARN para estandarización de partidores.

Para la estandarización de los partidores diseñados para RTS11 se realizó una extracción de ARN de un frasco T75 con la línea celular RTS11 que se encontraba confluyente (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células).

**Tabla N°4.-** Concentración y pureza de la muestra de ARN extraído desde un frasco de cultivo T75 para la estandarización de partidores.

| Identidad | ng/ $\mu$ L | A260/A280 | A260/A230 |
|-----------|-------------|-----------|-----------|
| RTS11     | 2757.5      | 2.04      | 2.09      |

Como se detalla en el paso 2.5.1 la pureza de ARN total extraído es considerada optima, pues los valores de la relación entre la absorbancia a 260/280 está dentro del rango, al igual que el valor de la relación entre las absorbancias a 260/230, es decir, entre 1.8 y 2.2. La integridad del ARN se observa en la foto de la electroforesis al 1.2%, donde se distinguen las bandas del ARN ribosomal 28s y 18s (Fig. 23).

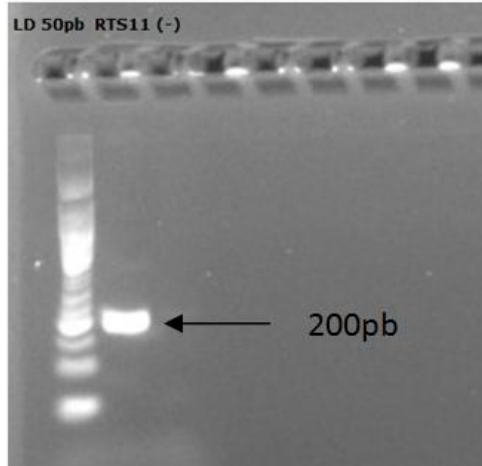


**Figura N°23.-**Gel de integridad MOPs de agarosa al 1.2% de formaldehido de las muestras de ARN de la línea celular RTS11

### 3.5.2.- Síntesis de cDNA

El gel TBE muestra un producto PCR de aproximadamente 200pb, lo que corresponde con lo diseñado para los partidores para el *factor de elongación alpha* (EF- $\alpha$ 1), lo que comprueba una correcta síntesis de cDNA (Fig 24)





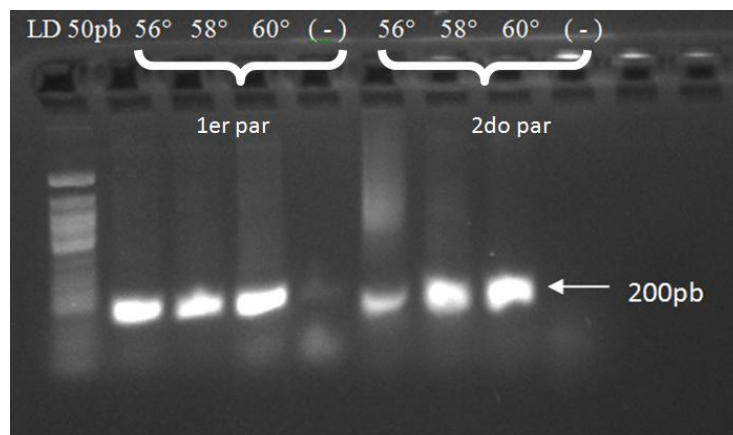
**Figura N°24.-**Gel TBE 1% del producto PCR del *factor de elongación alpha* (EF- $\alpha$ 1) y su correspondiente control negativo para verificar el cDNA sintetizado.

### 3.5.3.- Estandarización de partidores

Los partidores diseñados en el software geneious prime fueron analizados mediante RT-PCR para comprobar si amplificaban para los productos diseñados, basándonos en primer lugar que el partidor sea específico para la secuencia de DNA diseñado, luego en el tamaño del amplicón y en la especificidad (que no muestre productos inespecíficos).

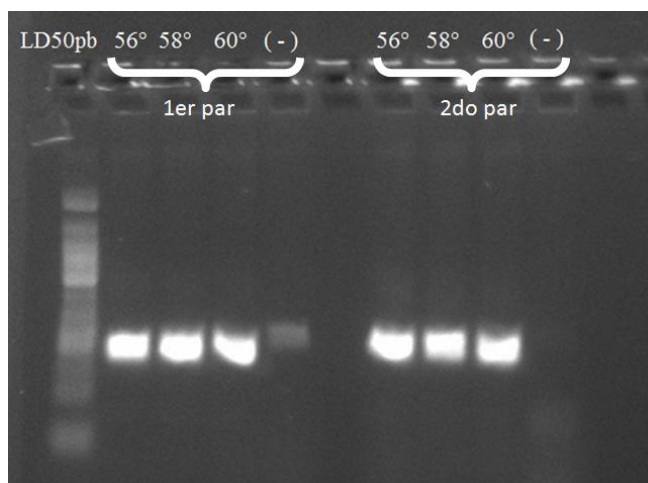
Los resultados de la estandarización de la temperatura de annealing son presentados mediante imágenes de electroforesis de los productos PCR, cada gel presenta dos pares de primers y el amplicón obtenido por PCR a diferentes temperaturas. Los partidores que fueron descartados, presentaron producto inespecífico, en la *interleuquina 6* se observan amplicones de tamaño que no corresponde al diseñado (Anexo, Fig. 41), iNOS presenta múltiples bandas, es decir productos inespecíficos para un partidor, mientras que el otro amplifica un producto de un tamaño no correspondiente al de diseño (Anexo, Fig. 42). De los partidores que seleccionador se escogió la temperatura óptima considerando aquella que se observó una mayor intensidad de banda.

En base a esto para el *factor de elongación alpha* se seleccionó el segundo par de partidores con una temperatura de annealing de 60°C (Figura 25)



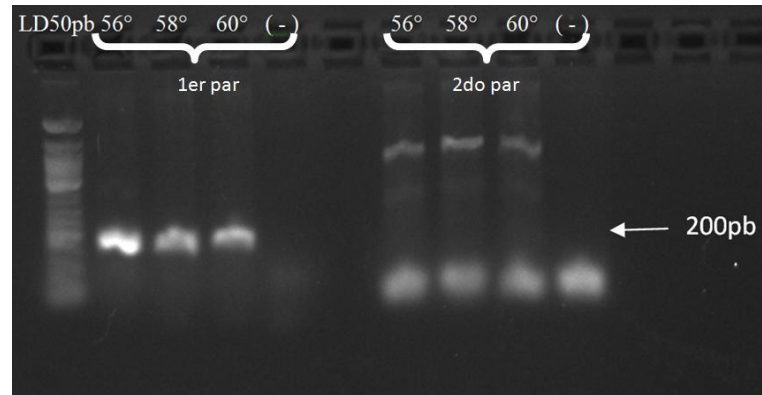
**Figura N°25.-**Gel TBE 1% del producto PCR del *factor de elongación alpha* (EF- $\alpha$ ), para los partidores diseñados, con controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

Ambos partidores diseñados para  $\beta$ -actina amplificaron un segmento del tamaño correspondiente, se eligió el segundo par con la temperatura de annealing de 56°C al tener una banda más marcada (Fig. 26)



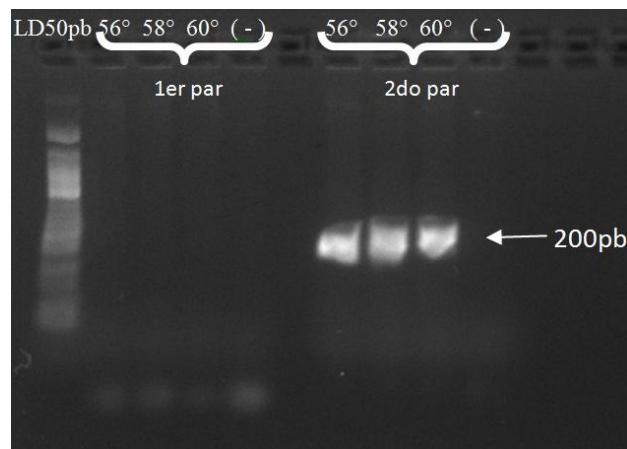
**Figura N°26.-**Gel TBE 1% del producto PCR de la  $\beta$ -actina para los partidores diseñados, se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

El gel del producto PCR de los partidores diseñados para el *factor alpha de necrosis tumoral* muestra que solo el primer par de partidores amplifica para el segmento diseñado, basándonos en el tamaño del amplicón (Fig. 27), de este par de partidores se observa una mayor banda con 56°C como su temperatura de annealing.



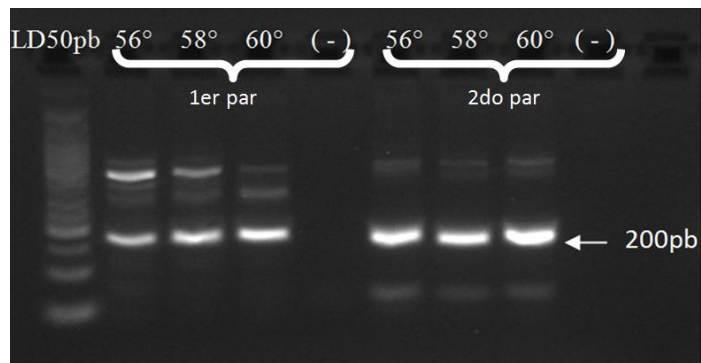
**Figura N°27.-**Gel TBE 1% del producto PCR del *factor alpha de necrosis tumoral* (TNF- $\alpha$ ) con sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

El gel del producto PCR de los partidores diseñados para interleuquina 1 $\beta$  muestra que solo el segundo par de partidores amplifica un segmento del tamaño diseñado (Fig. 28), se observa una mayor banda con 56°C como su temperatura de annealing.



**Figura N°28.-**Gel TBE 1% del producto PCR de la *Interleuquina 1- $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), a la izquierda se sembró el primer par de partidores y a la derecha el segundo en 3 temperaturas, también se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

El gel del producto PCR de los partidores diseñados para interleuquina 11 muestra que ambos partidores amplifican para el segmento diseñado (Fig. 29), pero en ambos partidores se observan múltiples bandas (productos inespecíficos), sin embargo en el segundo par las bandas inespecíficas presentan una menor intensidad y mayor distancia del amplicón, por lo cual se selecciona el segundo par de partidores con una mayor banda con 60°C como su temperatura de annealing.



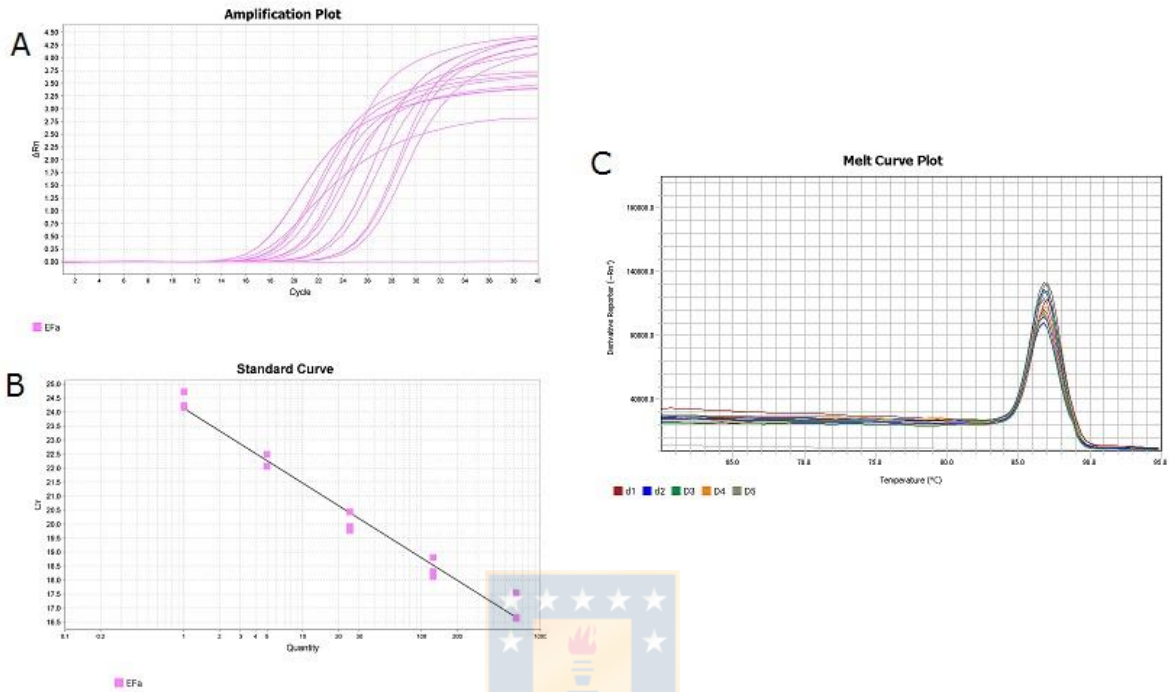
**Figura N°29.-**Gel TBE 1% del producto PCR de la *Interleuquina 11* (IL-11) en 3 temperaturas, con sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

### 3.5.4.- Rango dinámico

Para determinar los patrones de expresión génica, primero es necesario determinar la eficiencia de la amplificación de los partidores, lo que fue establecido a partir de un rango dinámico, que permite determinar la dilución a la cual la amplificación da inicio a la fase exponencial, mediante una curva de amplificación, teniendo en cuenta que el óptimo es entre 18 y 24, también nos permite conocer la eficiencia del partidador, mediante una curva estándar y saber si existe contaminación o producto inespecífico mediante la curva de fusión, mediante estos parámetros, fueron descartados la *interleuquina 10* y la *17* (Anexo, Tabla 10)

La curva de amplificación del *factor de elongación alpha* (EF- $\alpha$ ) muestra que en la tercera dilución (1:3) amplifica en el ciclo 20 (Fig. 30 A) la eficiencia de la amplificación de las diluciones es de un 137% y la curva estándar muestra que tiene una buena correlación de

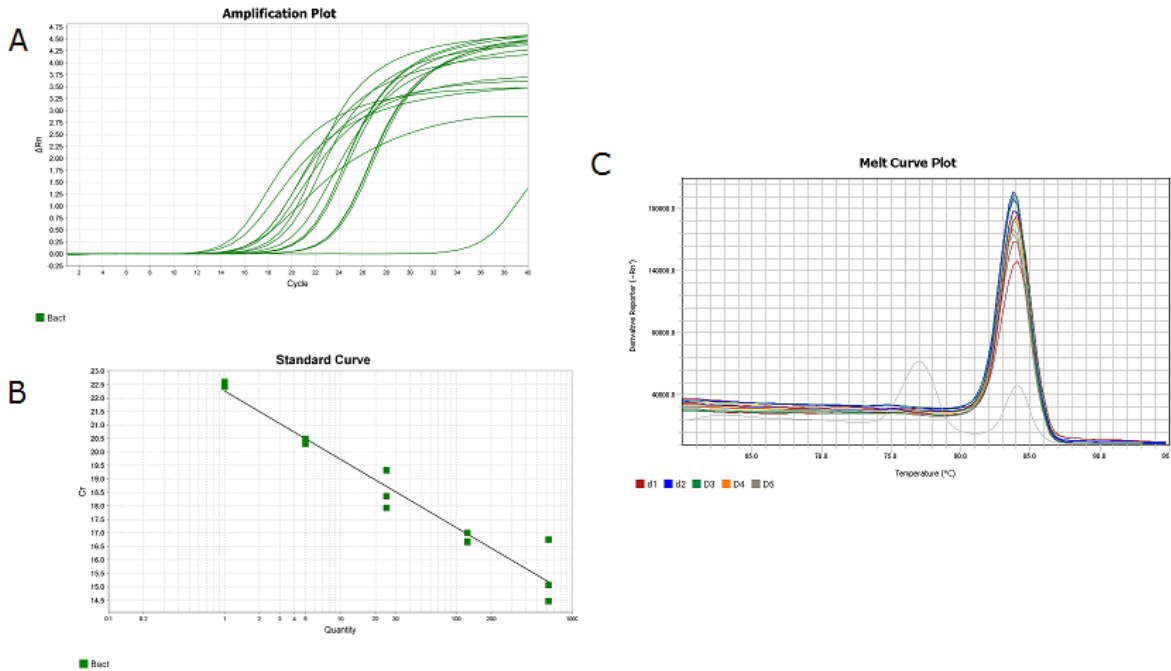
datos con un  $R^2$  de 0.98 (Fig. 30 B) mientras que la curva de melting muestra un único pico (cercano a los 87°C), es decir, la amplificación fue específica.



Target: EFa Slope: -2.669 Y-inter: 24.126  $R^2$ : 0.98 Eff% 136.958 Error: 0.107

**Figura N°30.-**Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para el *Factor de elongación alpha (EF- $\alpha$ )*

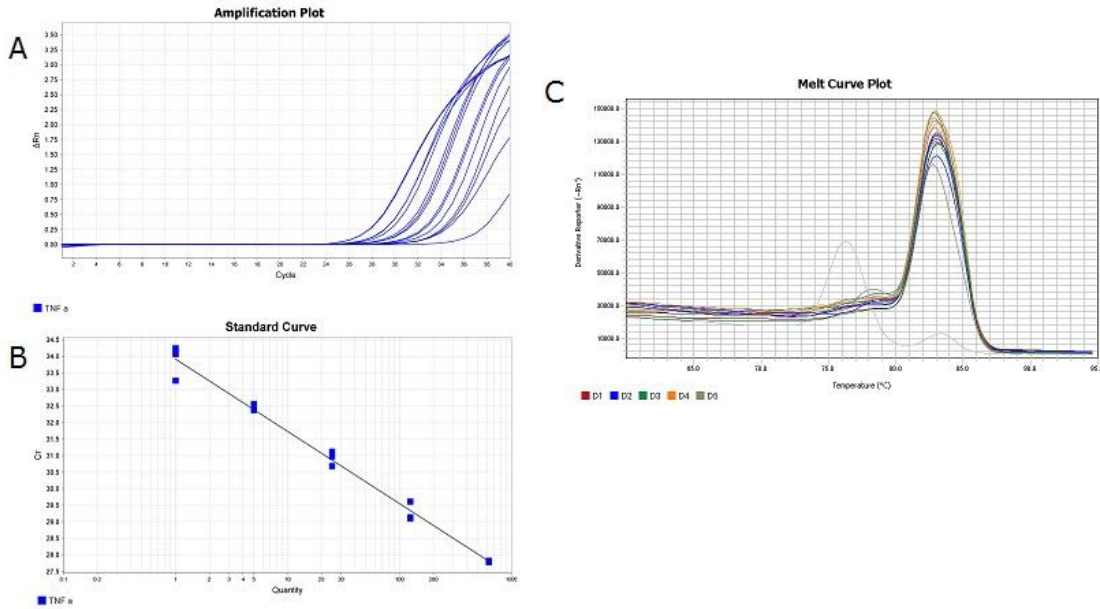
Los resultados del rango dinámico para el partidor que amplifica para la  *$\beta$ -actina* (Fig. 31) muestra que tiene una eficiencia del 148%, a pesar de eso muestra una buena correlación de datos con un  $R^2$  de 0.95 (A), con una amplificación en el ciclo 19 en la tercera dilución (B), mientras que la curva de melting (C) muestra un único pico, es decir, la amplificación fue específica.



Target: B-act Slope: -2.532 Y-Inter: 22.258 R<sup>2</sup>: 0.954 Eff%: 148.273 Error: 0.154

**Figura N°31.-**Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para  $\beta$ -actina

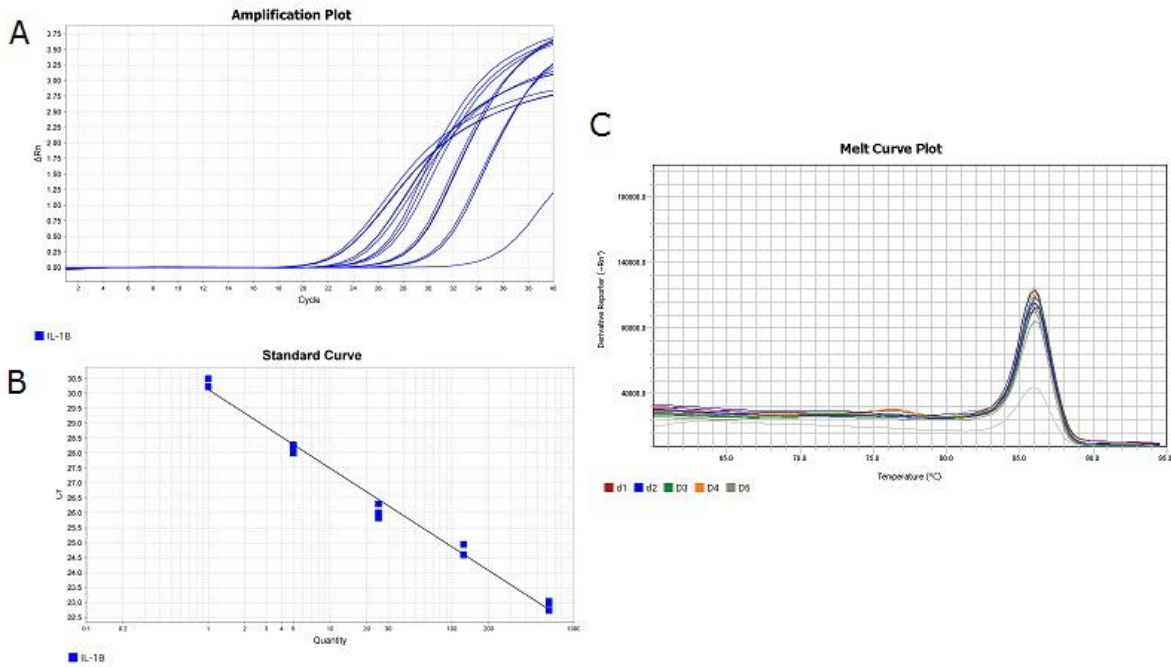
Los resultados del rango dinámico para el partidor que amplifica para el TNF- $\alpha$  (Fig 32) muestra que tiene una eficiencia del 187%, a pesar de eso muestra una buena correlación de datos con un R<sup>2</sup> de 0.99 (A), con una amplificación en el ciclo 27 en la primera dilución (B), mientras que la curva de melting (C) muestra un único pico, es decir, la amplificación fue específica.



Target: TNF- $\alpha$  Slope: -2.184 Y-inter: 33.911 R<sup>2</sup>: 0.987 Eff%: 187.01 Error: 0.071

**Figura N°32.-**Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para TNF-a

Los resultados del rango dinámico para el partidor que amplifica para el IL-1 $\beta$  (Fig. 33) muestra que tiene una eficiencia del 139%, a pesar de eso muestra una buena correlación de datos con un R<sup>2</sup> de 0.99 (A), con una amplificación en el ciclo 22 en la primera dilución (B), mientras que la curva de melting (C) muestra un único pico, es decir, la amplificación fue específica.

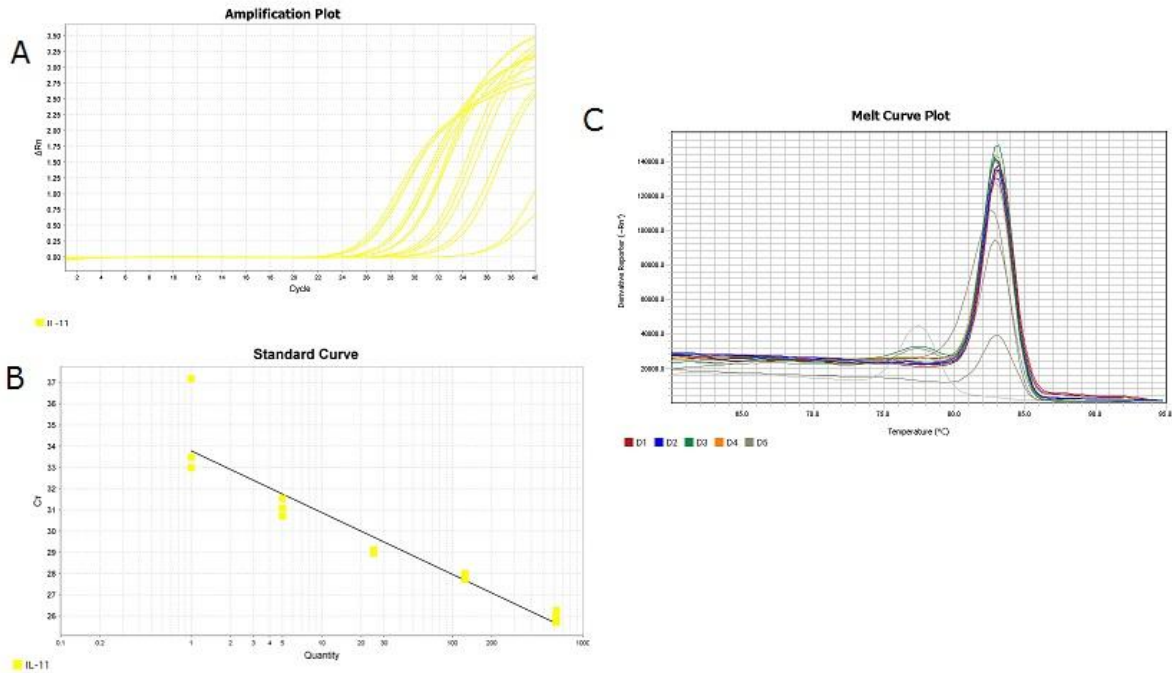


Taget: IL-1 $\beta$  Slope: -2.635 Y-inter: 30.129 R<sup>2</sup>: 0.988 Eff%:139.611 Error: 0.079

**Figura N°33.-**Curva de amplificación (A) curva estándar (B) y curva de melting (C) para IL-1 $\beta$

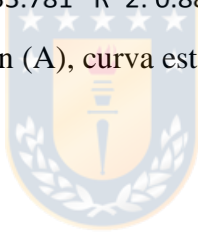
Los resultados del rango dinámico para el partidor que amplifica para el IL-11 (Fig. 34) muestra que tiene una eficiencia del 120%, lo que se considera dentro del rango aceptable (A), con una amplificación en el ciclo 25 en la primera dilución (B), mientras que la curva de melting (C) muestra un único pico, es decir, la amplificación fue específica.





Target: IL-11 Slope: -2.908 Y-inter: 33.781 R<sup>2</sup>: 0.886 Eff%: 120.763 Error: 0.289

**Figura N°34.-** Curva de amplificación (A), curva estándar (B) y curva de melting (C) para IL-11



**Tabla N°5.-** Partidores estandarizados para RTS11

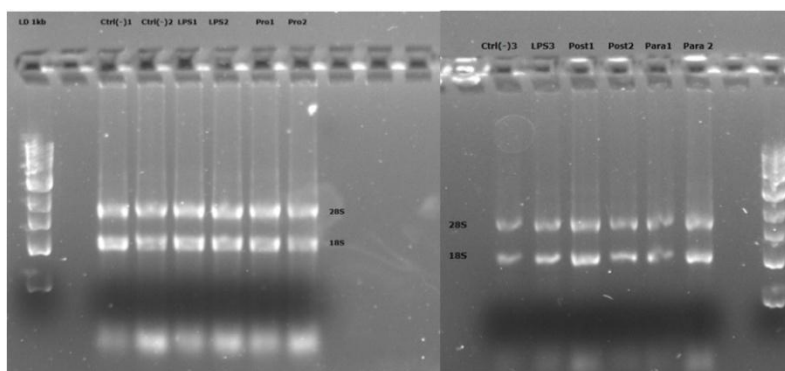
| Gen                              |   | Secuencia            | T° Annealing | Partidor | Dilución |
|----------------------------------|---|----------------------|--------------|----------|----------|
| Factor de elongación alpha       | F | GGGATGGAAGGTCGAACGTA | 60°          | 2do par  | D1       |
|                                  | R | ACTGTTCCAATACCGCCGAT |              |          |          |
| Factor alpha de necrosis tumoral | F | ACACTGGGCTCTTCTTCGTT | 56°          | 1er par  | D3       |
|                                  | R | CTGACCTTACCCCGCTAAGT |              |          |          |
| Interleuquina 1- Beta            | F | CCAACCTCTACCTGTCCTGC | 56°          | 2do par  | D3       |
|                                  | R | TGATGTCAACCCCGGTGTTC |              |          |          |
| Interleuquina 11                 | F | CTGGTTGAGCAGAGCGTCAA | 60°          | 2do par  | D3       |
|                                  | R | ATCGAGGGAGAGGGAGGAGA |              |          |          |

### 3.5.5- Estimulación de las líneas celulares con postbióticos.

Luego de la estimulación de la línea celular (descrita en 2.5.5) se procedió a la extracción de ARN de las muestras, según protocolo descrito, las concentraciones y purezas de la muestra se muestran en la tabla 6, mientras que la integridad del ARN se muestra en la Figura 35.

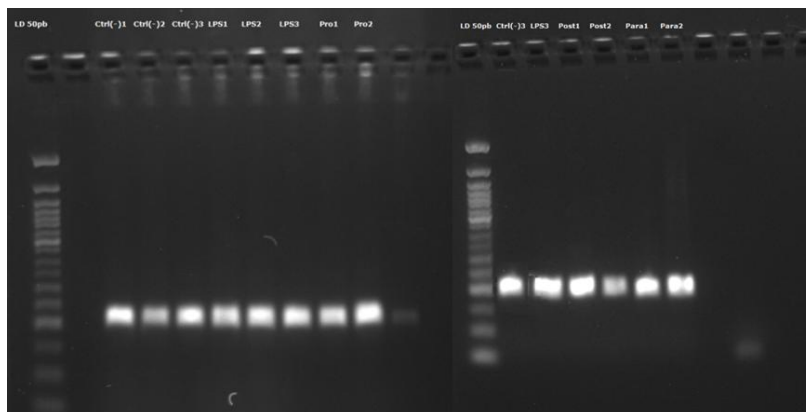
**Tabla N°6.-** Concentración y relación entre la absorbancia a 260 y 280nm y 260 y 230nm en la línea celular RTS11

| Muestras | ng/ $\mu$ L | A260/A280 | A260/A230 |
|----------|-------------|-----------|-----------|
| Ctrl1    | 513.2       | 1.97      | 2.34      |
| Ctrl2    | 743.6       | 2.00      | 2.24      |
| Ctrl3    | 597.1       | 1.96      | 2.23      |
| LPS1     | 516.8       | 1.97      | 2.14      |
| LPS2     | 629.8       | 2.00      | 2.18      |
| LPS3     | 465.9       | 2.01      | 1.98      |
| Pro 1    | 435.8       | 1.98      | 2.30      |
| Pro 2    | 563.4       | 2.01      | 2.22      |
| Post 1   | 457.7       | 1.98      | 2.24      |
| Post 2   | 643.8       | 2.06      | 1.80      |
| Para1    | 519.5       | 2.00      | 2.04      |
| Para2    | 602.7       | 1.97      | 2.25      |



**Figura N°35.-** Gel de integridad MOPs de agarosa al 1.2% de formaldehído de las muestras de ARN de la línea celular RTS11, de izquierda a derecha la identidad de las muestras corresponde a: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2.

La síntesis de cDNA fue comprobada con una reacción en cadena de la polimerasa con el housekeeping estandarizado (*factor de elongación alpha*)



**Figura N°36.-**Gel TBE, de verificación visual del cDNA sintetizado a partir del ARN extraído de la línea celular RTS11. Se observa la amplificación del producto PCR del Factor de Elongación de las muestras: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2.



### 3.5.6.- Evaluación del control endógeno

Para evaluar qué partidor se utilizaría como control endógeno, se hizo una prueba de estabilidad, para ello se usaron los tres controles y las tres muestras estimuladas con LPS y se hizo un qPCR, se utilizó el software Normfinder para evaluar el gen que varía menos entre las distintas condiciones.

Los resultados de este análisis permitieron definir que el gen que menos varía (Tabla 7) es el del *factor de elongación alpha*, por lo tanto se utilizará como control endógeno.

**Tabla N°7.-** Valor de estabilidad de los partidores evaluados

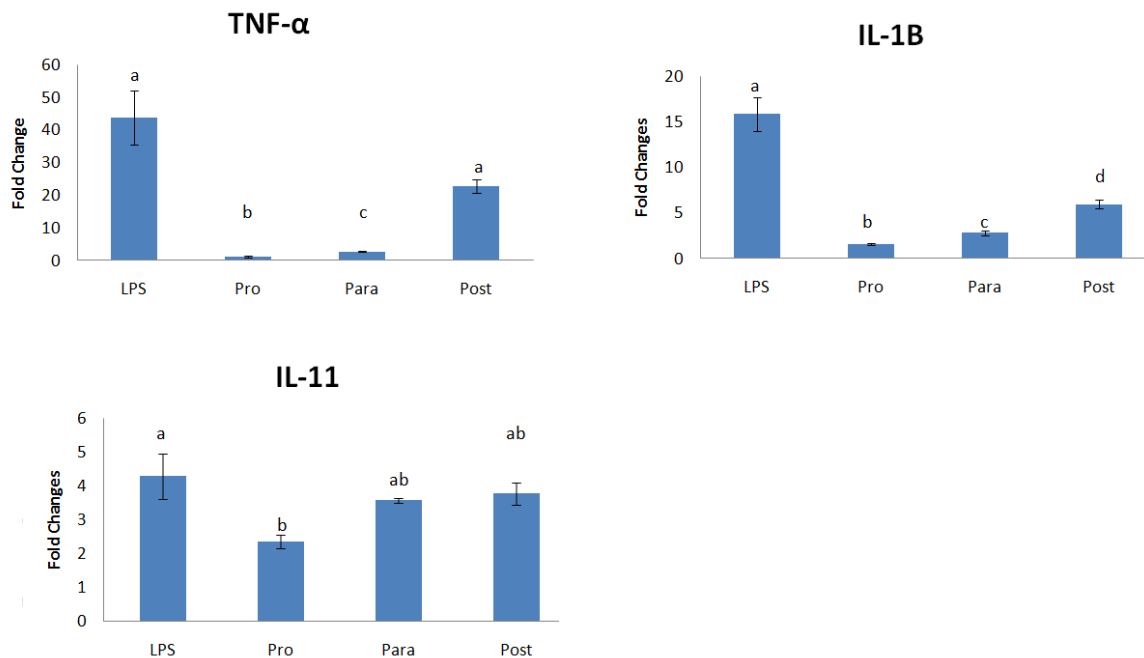
| <b>Gene name</b> | <b>Stability value</b> |
|------------------|------------------------|
| b-Actin          | 0.047                  |
| ELF              | 0.010                  |
| IL1B             | 0.136                  |

### **3.5.7.- Expresión génica en las líneas celulares**

Luego de realizar los PCR en tiempo real los datos fueron graficados y analizados estadísticamente para cada línea celular.

#### **3.5.7.1.- Evaluación de la respuesta de expresión de marcadores de respuesta inmune en RTS11**

Inicialmente se observa que las células activan la producción de las citoquinas seleccionadas en el punto anterior (tabla N°5) frente a su control positivo LPS, este resultado confirma la viabilidad y funcionalidad del modelo celular. Adicionalmente estas células (RTS11) responden a los tratamientos (Probiótico (Pro), Paraprobióticos (Para) y Postbióticos (Post) aumentando en todas las condiciones la expresión en todos los genes evaluados (expresión positiva). La expresión de las células estimuladas con LPS muestran un aumento de 40 veces frente al control en la expresión de TNF- $\alpha$ , 15 veces mayor para IL-1 $\beta$  y 4 veces mayor para IL-11. En el caso de células expuestas a postbióticos la expresión de TNF- $\alpha$  y de IL-11 del es estadísticamente similar a la expresión del grupo estimulado con LPS, mientras que para la IL-1B es significativamente inferior a LPS control. Es importante destacar que la expresión de citoquinas TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  en todos los casos, las células estimuladas con postbióticos fue significativamente mayor que la de los grupos estimulados con probióticos y paraprobióticos, mientras que la expresión de IL-11 no muestra diferencias significativas comparativamente con la estimulada con probióticos, paraprobióticos y postbióticos.



**Figura N°37.-**Expresión del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-11 en la línea celular RTS11 estimuladas con LPS, probióticos, paraprobióticos y postbióticos, las diferencias significativas se muestran con letras, los datos fueron analizados con ANOVA considerando significativo una diferencia  $<0.05$

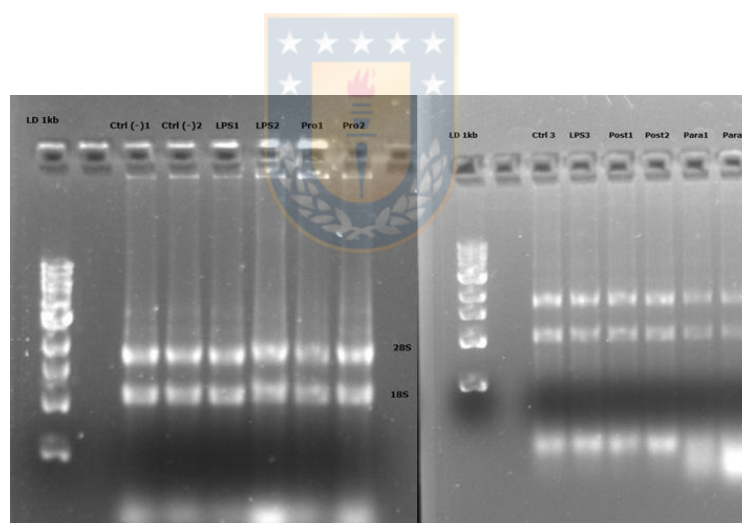
### 3.5.7.1.- Evaluación de la respuesta de expresión de citoquinas en SHK1

De igual manera como se analizó la respuesta mediada por la expresión de citoquinas post estimulación con postbióticos en RTS11, se evaluó la respuesta inmunomoduladora de los postbióticos en la línea linfocitaria SHK-1. Posterior a la estimulación de la línea celular (descrita en 2.5.5) se procedió a la extracción de ARN de las muestras, según protocolo descrito, las concentraciones y purezas de la muestra se muestran en la tabla 8, mientras que la integridad del ARN se muestra en la Figura 38.

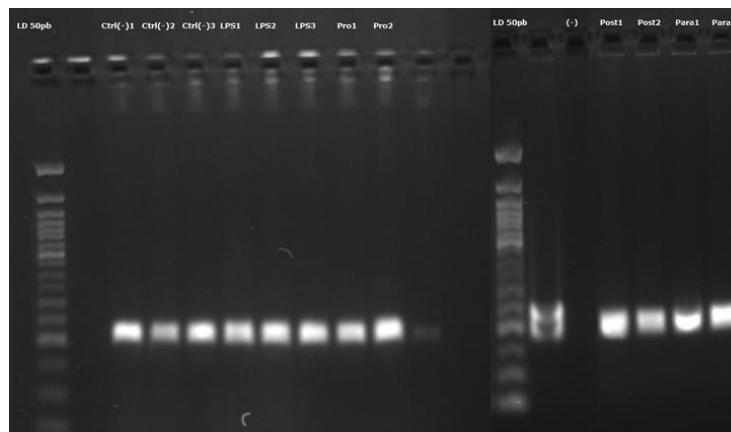
Según lo anteriormente establecido, la relación entre las absorbancias a 260/280 y 260/230 se encuentran dentro del rango óptimo, para continuar con las actividades de estandarización y evaluación de la expresión de los genes de interés

**Tabla N°8.-** Concentración y relación entre la absorbancia a 260 y 280nm y 260 y 230nm en la línea celular SHK-1

| Muestra   | ng/ $\mu$ L | A260/A280 | A260/A230 |
|-----------|-------------|-----------|-----------|
| Ctrl (-)1 | 673.4       | 1.97      | 2.35      |
| Ctrl (-)2 | 696.7       | 1.98      | 1.93      |
| Ctrl (-)3 | 543.8       | 1.98      | 2.30      |
| LPS1      | 544.4       | 1.99      | 2.02      |
| LPS2      | 847.6       | 1.96      | 2.33      |
| LPS3      | 548.7       | 1.98      | 2.30      |
| Pro1      | 702.8       | 1.96      | 2.17      |
| Pro2      | 743.2       | 1.87      | 2.04      |
| Para1     | 600.9       | 2.00      | 2.10      |
| Para2     | 533.9       | 2.01      | 2.20      |
| Post1     | 496.9       | 1.98      | 1.90      |
| Post2     | 533.9       | 2.01      | 1.89      |



**Figura N°38.-**Gel de integridad MOPs de agarosa al 1.2% de formaldehído de las muestras de ARN de la línea celular SHK1, de izquierda a derecha la identidad de las muestras corresponde a: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2.



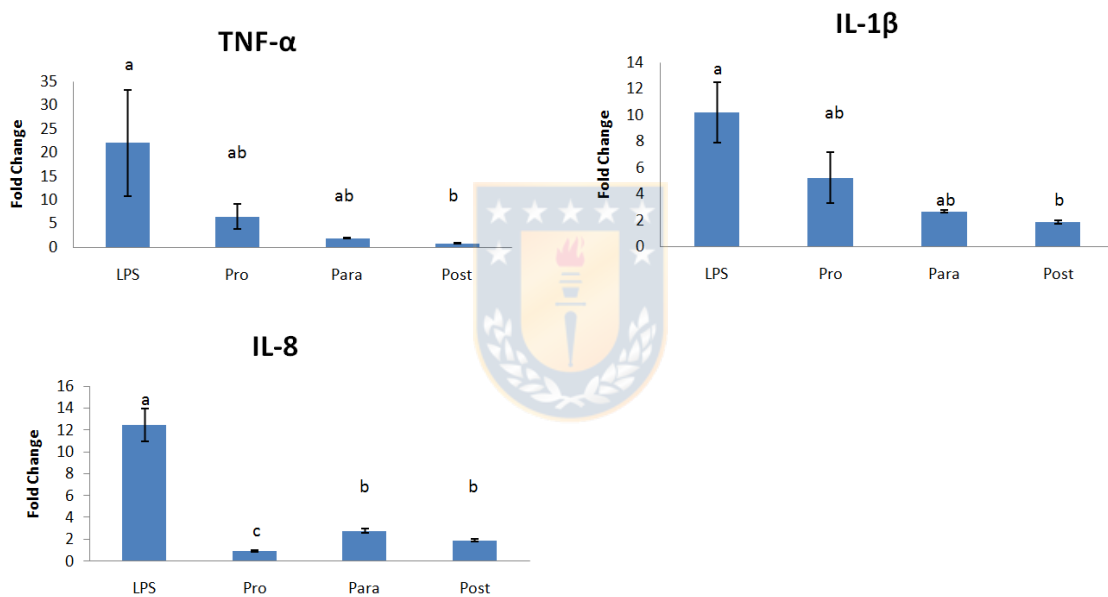
**Figura N°39.-**Gel TBE, de verificación visual del cDNA sintetizado a partir del ARN extraído de la línea celular SHK1. Se observa la amplificación del producto PCR del Factor de Elongación de las muestras: Ctrl1, Ctrl2, LPS1, LPS2, Pro1, Pro2, Ctrl3, LPS3, Post1, Post2, Para1, Para2.

Los partidores utilizados para la línea celular SHK-1 fueron previamente estandarizados en el laboratorio de genómica acuícola, en la Tabla 9 se detalla su secuencia y temperatura de annealing.

**Tabla N°9.-** Partidores para SHK1

| Partidor |   | Secuencia             | T° Annealing |
|----------|---|-----------------------|--------------|
| TNF-a    | F | AGGCTTTTCCAGGGC       | 60°C         |
|          | R | GAGTCCGAATAGCGCAA     |              |
| IL-1B    | F | ACAAGTGCTGGGTCCTGATG  | 60°C         |
|          | R | TAGGGCTACAGGTCTGGCTT  |              |
| IL8      | F | AGAATGTCAGCCAGCCTTGT  | 60°C         |
|          | R | TCTCAGACTCATCCCCTCAGT |              |

Se observa que la línea celular SHK1 aumenta la expresión (positiva) en todas las citoquinas para todos los genes evaluados, durante todos los tratamientos; Probióticos (Pro), Paraprobióticos (Para) y Postbióticos (Post), la expresión de las células expuestas a LPS muestran un aumento de expresión de TNF- $\alpha$  de 20 veces, 10 veces en IL-1 $\beta$  y 12 veces en la IL-8 frente a células no estimuladas. La expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  del grupo expuesto a postbióticos es significativamente (estadísticamente) menor que la expresión del grupo expuesto a LPS, pero similar a la expresión del grupo expuesto a probióticos y a paraprobióticos, mientras que la expresión de IL-8 es mayor que en el grupo expuesto a probióticos, pero similar al del paraprobiótico.



**Figura N°40.-**Expresión del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y de la IL-8 en la línea celular SHK1 estimuladas con LPS, probióticos, paraprobióticos y postbióticos, las diferencias significativas se muestran con letras, los datos fueron analizados con ANOVA considerando significativo una diferencia <0.05



## 4.-DISCUSIÓN

Los postbióticos son compuestos que resultan del metabolismo celular de los microorganismos probióticos (Tsilingiri et al., 2012), que son secretados al medio o liberados luego de la muerte y posterior lisis celular (Tomar et al. 2015). En los últimos años se han sumado a la gama de alimentos funcionales disponibles para nutrición. Estos suplementos pueden mejorar una serie de parámetros de quienes lo consumen, entre los que se encuentra el desempeño de la respuesta inmune. Hasta la fecha no se han realizado estudios de evaluación de su potencial en salmónidos. En el presente estudio se realizó una primera aproximación de su efecto sobre las células del sistema inmune, donde se evaluó la exposición directa de los postbióticos de levadura en dos líneas celulares macrófagicas de salmónidos y se demostró que estimulan la expresión de genes que codifican para citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata.

No existen muchos estudios en los que se han evaluado los postbióticos de levadura (Senthilraja and Kathiresan 2015), por ende, establecer un método para la obtención de estos es muy relevante para evaluar su potencial.

Para esto se utilizó la levadura de marca comercial Collico la que según los resultados de siembra en placas de agar, se determinó que tenía un promedio de  $1.7 \times 10^7$  ufc/gramo de levadura seca, mientras que para definir el mejor método de cultivo en medio líquido, no sólo se inocularon los caldos de cultivo con colonias desde las placas, sino también se probó inocular directamente desde el producto seco comercial (el cual ya es producido a escala industrial), se observó crecimiento sin necesidad de activar la levadura previamente en placas de agar, el máximo número de levaduras por mililitro que se observó en el cultivo líquido fue aproximadamente de  $4 \times 10^7$  con velocidades de crecimiento dependiente de la cantidad de inóculo inicial.

De los postbióticos obtenidos desde estos cultivos, se realizó una primera aproximación de su contenido proteico en el gel de poliacrilamida mediante un SDS-PAGE. Este reveló que todos los postbióticos obtenidos desde el sobrenadante, independientemente de la distinta forma de inoculación y de la fase en que se encontraba, tendían a mostrar bandas similares (marcadas dentro del mismo peso en kDA), pero diferentes a los postbióticos obtenidos de la lisis celular. Esto sugiere que independientemente de cantidad inicial de ufc y

de la fase de cultivo en la que se encontraban, las levaduras podrían estar secretando las mismas proteínas al medio. Esto es concordante con lo reportado por Mitterdorfer et al., (2002), donde distintas cepas de *S. cerevisiae* presentan una huella proteica similar, lo que sugiere una estabilidad en el proteoma de la levadura probiótica *S. cerevisiae* independiente de la cantidad de inoculo.

Debido al carácter reciente de este tipo de suplementos, su proceso de obtención se encuentra en constante desarrollo. En este estudio la evaluación de postbióticos se realizó con parámetros limitados, solo un tipo de medio, temperatura, pH, nutrientes, etc). Sin embargo existen registros que indican que cambios nutricionales del caldo de cultivo influyen en la cantidad y tipo de exudados que general las levaduras al medio (Giardina et al., 2014), lo que sugiere la necesidad de estudios extras para optimizar el proceso de obtención y selección de postbióticos. Lo obtenido en este estudio se considera una base importante para una primera aproximación a su utilización en salmónidos.

A pesar de la inocuidad de *S. cerevisiae*, era necesario determinar si sus postbióticos presentan toxicidad en distintos porcentajes de inclusión al exponerlos directamente en células macrofágicas de salmónidos (el modelo de este estudio). Mediante un ensayo de viabilidad se determinó que las distintas cantidades de solución postbiótica administradas (1 $\mu$ L - 30 $\mu$ L) presentaron una rango de viabilidad similar a la del grupo control luego de 4 horas de exposición. Yanez et al., (2009) analizó la toxicidad de *S. cerevisiae* mediante el ensayo de ratón, inyectando distintas cepas de *S. cerevisiae* y ninguna presentó toxicidad. En salmónidos, por ejemplo, Gonçalves et al. (2017) alimentó salmónidos por 30 días con una dieta con un 0.5% de inclusión de *S. cerevisiae* y no reportó mortalidad. Sin embargo, en estudios *in vitro* postbióticos originarios de bacterias han mostrado toxicidad dependiente de la dosis, por ejemplo, Dinić et al. (2017) en la línea celular hepática de humanos HepG2, reportó que postbióticos producidos a partir de *Latobacillus* disminuían su porcentaje de viabilidad luego de 4 horas de exposición. En la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7, Lee et al. (2002) observó una disminución de hasta un 50% en la viabilidad celular a mayor dosis expuesta a postbióticos obtenidos de una bifidobacteria durante 3 horas de exposición. Las diferencias de inocuidad encontradas en los estudios mencionados se pueden deber a que las células de mamíferos pueden presentar una mayor sensibilidad. Además hay evidencias de que

postbióticos de bacterias tienen propiedades diferentes a los originarios de levadura. Senthilraja & Kathiresan, (2015) reportó un aumento superior al 100% en el porcentaje de viabilidad celular en la línea VERO (Riñón de mono verde africano) tras ser expuestas a extractos proteicos (postbióticos) obtenidos desde un cultivo de *S cerevisiae* después de 24 horas de exposición, concordante con lo obtenido en el ensayo de viabilidad a largo plazo, donde se observó un aumento en hasta un 50% más que la de las células control, lo que sugiere que los postbióticos de levadura tienen un efecto positivo en la proliferación de células del sistema inmune y estimulación del metabolismo de estas incluso en las dosis más bajas.

En salmónidos, el efecto positivo de las dietas con inclusión de levaduras en la respuesta inmune ha sido reportado por Gonçalves et al. (2017) y Castro-osses et al. (2017). En base a estos estudios, en el presente trabajo se evaluó el efecto inmunoestimulante del postbiótico originario de la misma levadura.

Esto se estudió en líneas celulares del tipo macrofágicas de trucha arcoíris y de salmón del atlántico como modelo de estudio para estas especies de interés comercial. Las líneas celulares utilizadas fueron RTS11 y SHK1, la primera del tipo monocito/macrófago proveniente de un cultivo a largo plazo de tejido hematopoyético del bazo de *Oncorhynchus mykiss* (Ganassin and Bols 1998), y la segunda, línea celular del tipo macrofágica aislada del riñón posterior de *Salmo salar* (Dannevig et al. 1997). Ambas líneas celulares demostraron un aumento significativo en la expresión de citoquinas al ser estimuladas con LPS como control positivo. Esto es concordante con el estudio de Costa et al., (2011) donde se observó un aumento en la expresión de *Interleuquina 6* (citoquina proinflamatoria) en la línea RTS11 al ser estimulada con distintas dosis de LPS, también Wangkahart et al., (2016) evaluó el efecto de la exposición en la línea celular RTS11 a la flagelina –agente proinflamatorio que es el principal componente del flagelo bacteriano- por 4 horas y observó un aumento significativo en la expresión de citoquinas como *IL-1 $\beta$*  y *TNF- $\alpha$* . Idéntica respuesta se ha reportado en la línea celular SHK1 a las 4 horas de exposición al LPS (Fast et al., 2005). La respuesta inmune es gatillada por un estímulo, que en una primera fase es de carácter agudo. A las 4 horas de exposición de las líneas celulares al LPS, a los pro-, para- y postbióticos se esperaba que la respuesta fuera de este tipo, que es caracterizada por el aumento de producción de citoquinas como *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-11* y *IL-8*, entre otras (Magnadóttir 2006).

Tanto en RTS11 como en SHK1 se observó una respuesta activa –que en este estudio se midió por cambios en la expresión de genes que codifican para estas citoquinas-.

El *factor alpha de necrosis tumoral* y la *interleuquina 1 beta* son citoquinas del tipo proinflamatorias, son las primeras citoquinas secretadas por células del sistema inmune (como los macrófagos) en respuesta de algún daño o luego del reconocimiento de PAMPs por parte de los receptores de membrana de estas células. Su reconocimiento genera una cascada de señalización en el proceso inflamatorio, y son capaces de gatillar tanto su propia producción, como la de otras citoquinas tanto *in vivo* como *in vitro* (Zou et al. 2003), esta capacidad de regulación del sistema inmune innato le permite al organismo estar preparado y mantener su salud.

El aumento de estas citoquinas, genera también el aumento de la *interleuquina 8 (IL-8)* (Mukaida et al., 1991), así como de la *IL-11* (Wang et al. 2005), entre otras. La *IL-8* es una quimioquinas las que al aumentar su concentración en un tejido, induce a los leucocitos a viajar por el torrente sanguíneo y entrar en el tejido circundante (Laing et al., 2002). En líneas celulares macrofágicas de salmónidos (SHK-1) se ha inducido su expresión de forma positiva al exponer las células durante 4 horas a LPS (Astuya et al. 2017), así como se observó en el presente estudio. Por otra parte, la *interleuquina 11 (IL-11)* es una citoquina multifuncional, es de la familia de la *IL-6*, pero también cumple una función del tipo antiinflamatoria, fue clonada por primera vez en un organismo no mamífero el 2004, hasta entonces se creía que era exclusiva de ellos, pero en ese año se reportó la primera *IL-11* en células de trucha arcoíris, una vez producida, la *IL-11* actúa sobre múltiples tipos de células, incluyendo células hematopoyéticas, hepatocitos, adipocitos, células epiteliales intestinales, células tumorales, macrófagos, entre otros, al actuar como una citoquina antiinflamatoria inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias (Trepicchio et al., 1996) y hasta puede actuar con una función de protección y restauración de la mucosa epitelial, como lo reportado en mucosa intestinal por Orazi et al., (1996).

La utilización de probióticos como inmunoestimulantes en peces ha sido reportada con éxito (Núñez-Acuña et al. 2017, Gauthier et al. 2019, Safari et al. 2016). Sin embargo, su aplicación en acuicultura ha sido limitada por las dificultades que representa utilizar un microorganismo vivo a escala industrial. Por eso, la evaluación de los postbióticos derivados

de los mismos probióticos como nuevo suplemento, presentan una ventana de posibilidades que elude esos problemas. En el presente estudio se observó un aumento de la expresión de marcadores de respuesta inmune de fase aguda en líneas celulares de salmónidos tras ser expuestas a postbióticos de levadura. Esto se encontró en niveles comparables o incluso superior a lo observado en células estimuladas con los probióticos que los producen. Estos resultados concuerdan con lo observado por Kareem et al. (2017) que reportó un aumento en IL-6 en *Gallus gallus domesticus* al ser alimentados con postbióticos obtenidos del sobrenadante de la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum*. Izuddin et al. (2019) reportó también una regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune en corderos recién destetados al ser alimentados con postbióticos provenientes de la misma bacteria probiótica luego de 60 días. Sin embargo, otro estudio ha reportado resultados antagónicos, Lee et al. (2002) expuso a la línea celular RAW 264.7 (Macrófagos de ratón) a postbióticos del sobrenadante de una bacteria probiótica y no se observó un aumento significativo en la expresión de *TNF- $\alpha$*  y *IL-6*, mientras que la expresión en células estimuladas con la bacteria viva fueron significativamente mayores, esta diferencia se puede deber al organismo en el que se probó, ya que otros estudios in vivo en ratones alimentados con postbióticos no han presentado diferencias en los parámetros medidos (como el peso, talla, conversión de alimento) con respecto al grupo alimentado sin inclusiones postbióticas (Foo et al., 2003).

A pesar que la composición de la solución postbiótica es desconocida, esto incluye una gran cantidad de metabolitos, pero también posiblemente fracciones celulares resultantes de la lisis de las levaduras, como lo es el  $\beta$ -Glucano que pueden estar aportando para conseguir la estimulación observada. Sin embargo si sólo se tratara de estos fragmentos celulares, se esperarían ver los mismos niveles de estimulación en las células expuestas a los pro- y paraprobióticos, estos resultados son interesantes, puesto que hay varios estudios que demuestran el potencial inmunoestimulante de los pro- y paraprobióticos

Por ejemplo, se alimentaron salmónidos durante 21 días con una dieta con inclusión de distintas bacterias probióticas del género *Lactobacillus*, para luego medir la expresión de citoquinas, y se encontró que la expresión del *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  y *IL-8* aumentaron significativamente en este grupo con respecto al grupo control (peces no alimentados con inclusión de probióticos), (Pérez-Sánchez et al. 2011). Además este aumento de expresión fue

acompañado de una importante disminución en la mortalidad acumulada al final de un desafío con *Lactococcus garvieae*, lo que sugiere que el grupo alimentado con probióticos, al estar inmunológicamente más activo que el grupo control, pudo responder de mejor manera al desafío con el patógeno. una regulación que mejore su desempeño frente a una infección. Dong et al. (2018) evaluó el efecto de la alimentación con otro suplementos probióticos (*Lactococcus lactis*) durante 42 días carpa (*Carassius carassius*), y observó un aumento en la expresión de *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  y *IL-11* consecuentemente con una disminución significativa de colonización del *Aeromonas hydrophila* en el intestino y además presentaban una mayor integridad del intestino en comparación con el grupo alimentado sin probióticos. Li et al., (2019), en otra especie de carpa dorada, (*Carassius auratus*), realizó un desafío con herpesvirus, luego de ser alimentada por 4 semanas con una dieta con inclusión de probióticos (*Clostridium butyricum*), tras lo que reportó un aumento en la expresión de *IL-11*, en el grupo alimentado con probióticos, no sólo se observó un aumento significativo en la expresión de esta citoquina al sexto día de desafío, sino que se observó una disminución significativa en la tasa de mortalidad con respecto al grupo que no fue alimentado con inclusión de probióticos.

Con células de origen similar también se han reportado efectos inmunoestimuladores de los probióticos, Román et al. (2013) encontró que al estimular un cultivo primario de leucocitos del riñón posterior de Róbalo (*Dicentrarchus labrax*) con bacterias probióticas vivas e inactivadas por calor y por radiación uv (paraprobióticos), la expresión de *TNF- $\alpha$*  y *IL-1 $\beta$*  aumentaba con respecto al grupo control (células no estimuladas) en las primeras horas de exposición. De un modo similar, Kim and Austin (2006) realizó un cultivo primario de leucocitos desde el riñón posterior de salmónido y fue estimulado con dos bacterias probióticas distintas y una patógena, y observó un aumento significativo en la expresión de *TNF- $\alpha$*  y la *IL-1 $\beta$*  a las pocas horas de exposición, mientras que la expresión de la *IL-8* sólo aumentó en presencia de la bacteria patógena sin encontrar diferencias significativas al ser estimuladas con probióticos.

Lo mismo se observó en el presente estudio donde sí se obtuvo un aumento en la expresión de *TNF- $\alpha$*  y *IL-1 $\beta$*  y *IL-11* (para RTS11), así como *IL-8* para SHK1 al comparar la expresión con el grupo control (sin estimular). Cabe destacar que la respuesta a los postbióticos en RTS11 fue superior a la respuesta obtenida con pro-y paraprobiótico, mientras que en SHK1 en las células expuestas a postbióticos se obtuvo una respuesta similar a la

obtenida en las expuestas a probióticos. Esto es indicador del gran potencial de esta matriz en salmónidos.

Sin embargo es importante aumentar el conocimiento en los métodos de obtención de estos compuestos, como de su composición y efectos sobre los salmónidos al administrarlo vía alimentación, de modo de poder evaluar sus futuras utilidades.



## CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que los postbióticos obtenidos desde el cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* estimulan la respuesta inmune innata – evaluada en esta tesis en expresión de citoquinas – en macrófagos de salmónidos sin la necesidad de la presencia de la levadura viva que los produce, y esta respuesta puede ser comparable o incluso mayor que la que produce tanto la levadura viva como la levadura inviable (paraprobióticos), sin llegar a ser una respuesta exacerbada como la que se observa con el agente proinflamatorio LPS. Estos datos pueden resultar relevantes para continuar estudiando el efecto de estos compuestos in vitro y conocer mejor su mecanismo de acción o in vivo y dilucidar si presentan el mismo efecto al ser incorporados en la dieta de los salmónidos.





## LITERATURA CITADA

- Abdel Rahman, Afaf N., Alshimaa A. Khalil, H. M. Abdallah, and Mohamed ElHady. 2018. "The Effects of the Dietary Supplementation of Echinacea Purpurea Extract and/or Vitamin C on the Intestinal Histomorphology, Phagocytic Activity, and Gene Expression of the Nile Tilapia." *Fish and Shellfish Immunology* 82: 312–18. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.024>.
- Adel, Milad, Carlo C. Lazado, Reza Safari, Sakineh Yeganeh, and Mohammad Jalil Zorriehzahra. 2017. "Aqualase®, a Yeast-Based in-Feed Probiotic, Modulates Intestinal Microbiota, Immunity and Growth of Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*." *Aquaculture Research* 48 (4): 1815–26. <https://doi.org/10.1111/are.13019>.
- Aguilar-Toalá, J. E., R. Garcia-Varela, H. S. Garcia, V. Mata-Haro, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, and A. Hernández-Mendoza. 2018. "Postbiotics: An Evolving Term within the Functional Foods Field." *Trends in Food Science and Technology* 75(June 2017):105–14.
- Amaretti, Alberto, Mattia Di Nunzio, Anna Pompei, Stefano Raimondi, Maddalena Rossi, and Alessandra Bordoni. 2013. "Antioxidant Properties of Potentially Probiotic Bacteria: In Vitro and in Vivo Activities." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(2):809–17.
- Ángeles Esteban, M., Alberto Cuesta, Alejandro Rodríguez, and José Meseguer. 2006. "Effect of Photoperiod on the Fish Innate Immune System: A Link between Fish Pineal Gland and the Immune System." *Journal of Pineal Research* 41(3):261–66.
- Astuya, Allisson, Javiera Ziehe, Alejandra Rivera, Sebastián Ortiz, Viviana Ulloa, Marlene Roedel, Estrella Aspé, and Katherina Fernández. 2017. "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Pinus Radiata* Bark Extract in Salmonid Cell Lines." *Aquaculture Research* 48(7):3568–78.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annual review of immunology*, 15(1), 749-795.
- Castro-osses, Darlyng, Crisleri Carrera-naipil, Cristian Gallardo-esc, and Ana Teresa Gonçalves. 2017. "Fish & Shell Fi Sh Immunology Functional Diets Modulate the Acute Phase Protein Response in *Oncorhynchus Mykiss* Subjected to Chronic Stress and Challenged with *Vibrio Anguillarum*." 66:62–70.
- Chia, Ta Jui, Yu Chi Wu, Jyh Yih Chen, and Shau Chi Chi. 2010. "Antimicrobial Peptides (AMP) with Antiviral Activity against Fish Nodavirus." *Fish and Shellfish Immunology* 28(3):434–39.
- Choudhury, Tanmoy Gon and Dibyendu Kamilya. 2018. "Paraprobiotics: An Aquaculture Perspective." *Reviews in Aquaculture* 1–13.
- Costa, Maria M., Tanja Maehr, Patricia Diaz-Rosales, Christopher J. Secombes, and Tiehui Wang. 2011. "Bioactivity Studies of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Interleukin-6: Effects on Macrophage Growth and Antimicrobial Peptide Gene Expression." *Molecular Immunology* 48(15–16):1903–16.

- Dannevig, B. H., B. E. Brudeseth, T. Gjøen, M. Rode, H. I. Wergeland, Evensen, and C. Mc L. Press. 1997. "Characterisation of a Long-Term Cell Line (SHK-1) Developed from the Head Kidney of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.)." *Fish and Shellfish Immunology* 7(4):213–26.
- Dawood, Mahmoud A. O., Shunsuke Koshio, Mohamed M. Abdel-Daim, and Hien Van Doan. 2018. "Probiotic Application for Sustainable Aquaculture." *Reviews in Aquaculture* 1–18.
- Dinić, Miroslav, Jovanka Lukić, Jelena Djokić, Marina Milenković, Ivana Strahinić, Nataša Golić, and Jelena Begović. 2017. "Lactobacillus Fermentum Postbiotic-Induced Autophagy as Potential Approach for Treatment of Acetaminophen Hepatotoxicity." *Frontiers in Microbiology* 8(APR):1–10.
- Dong, Yuhao, Yuanyuan Yang, Jin Liu, Furqan Awan, Chengping Lu, and Yongjie Liu. 2018. "Inhibition of Aeromonas Hydrophila-Induced Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier Function Damage in Crucian Carp by Oral Administration of Lactococcus Lactis." *Fish and Shellfish Immunology* 83(September):359–67.
- Elward, Kristina and Philippe Gasque. 2003. "'Eat Me' and 'Don't Eat Me' Signals Govern the Innate Immune Response and Tissue Repair in the CNS: Emphasis on the Critical Role of the Complement System." *Molecular Immunology* 40(2–4):85–94.
- Fast, M. D., N. W. Ross, and S. C. Johnson. 2005. "Prostaglandin E2 Modulation of Gene Expression in an Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Macrophage-like Cell Line (SHK-1)." *Developmental and Comparative Immunology* 29(11):951–63.
- FAO. 2014. "Parte I Visión Sintetica y Principales Indicadores." *Perfiles de Pesca y Acuicultura Por Países. Chile (2010). Hojas de Datos de Perfiles de Los Países. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de La FAO [En Línea]. Roma. Actualizado 2010.* <http://www.fao.org/fishery/facp/CHL/es>.
- Foo, H. L., Loh, T. C., Lai, P. W., Lim, Y. Z., Kufli, C. N., & Rusul, G. (2003). Effects of Adding Lactobacillus plantarum I-UL4 Metabolites in Drinking Water of Rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(5), 283–288. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.283.288>
- Foo, H. L., T. C. Loh, F. L. Law, Y. Z. Lim, C. N. Kufli, and Gulam Rusul. 2003. "Effects of Feeding *Lactobacillus Plantarum* I-UL4 Isolated from Malaysian Tempeh on Growth Performance , Faecal Flora and Lactic Acid Bacteria and Plasma Cholesterol Concentrations in Postweaning Rats." *Food Science Biotechnology* 12(4).
- Ganassin, Rosemarie C. and Niels C. Bols. 1998. "Development of a Monocyte/Macrophage-like Cell Line, RTS11, from Rainbow Trout Spleen." *Fish and Shellfish Immunology* 8(6):457–76.
- Gauthier, Jeff, Camille Lavoie, Steve J. Charette, and Nicolas Derome. 2019. "Microbial Communities in Aquaculture Ecosystems." *Microbial Communities in Aquaculture Ecosystems* 21–50.

- Giardina, Bennett J., Bruce A. Stanley, and Hui Ling Chiang. 2014. "Glucose Induces Rapid Changes in the Secretome of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Proteome Science* 12(1):1–21.
- Goda, A. M., E. A. Omar, and T. M. Srour. 2018. "Effect of Diets Supplemented with Feed Additives on Growth , Feed Utilization , Survival , Body Composition and Intestinal Bacterial Load of Early Weaning European Seabass , *Dicentrarchus Labrax* Post-Larvae." 169–83.
- Hernández, Adrián J., Alex Romero, Roxana Gonzalez-Stegmaier, and Patricio Dantagnan. 2016. "The Effects of Supplemented Diets with a Phytopharmaceutical Preparation from Herbal and Macroalgal Origin on Disease Resistance in Rainbow Trout against *Piscirickettsia Salmonis*." *Aquaculture* 454:109–17.
- Hoseinifar, Seyed Hossein, Einar Ringø, Alireza Shenavar Masouleh, and Maria Ángeles Esteban. 2016. "Probiotic, Prebiotic and Synbiotic Supplements in Sturgeon Aquaculture: A Review." *Reviews in Aquaculture* 8 (1): 89–102. <https://doi.org/10.1111/raq.12082>
- Hong, S., R. Li, Q. Xu, C. J. Secombes, and T. Wang. 2013. "Two Types of TNF- Exist in Teleost Fish: Phylogeny, Expression, and Bioactivity Analysis of Type-II TNF- 3 in Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*." *The Journal of Immunology* 191(12):5959–72.
- Huisling, Mark O., René J. M. Stet, Huub F. J. Savelkoul, and B. M. Lid. Verburg-Van Kemenade. 2004. "The Molecular Evolution of the Interleukin-1 Family of Cytokines; IL-18 in Teleost Fish." *Developmental and Comparative Immunology* 28(5):395–413.
- Irianto, A. and B. Austin. 2003. "Short Communication Use of Dead Probiotic Cells to Control Furunculosis in Rainbow Trout , *Oncorhynchus Mykiss* ( Walbaum )." *Journal of Fish Diseases* 59–62.
- Izuddin, Wan Ibrahim, Teck Chwen Loh, Hooi Ling Foo, Anjas Asmara Samsudin, and Ali Merzza Humam. 2019. "Postbiotic L. Plantarum RG14 Improves Ruminal Epithelium Growth, Immune Status and Upregulates the Intestinal Barrier Function in Post-Weaning Lambs." *Scientific Reports* 9(1):1–10.
- Kareem, K. Y., T. C. Loh, H. L. Foo, S. A. Asmara, and H. Akit. 2017. "Influence of Postbiotic RG14 and Inulin Combination on Cecal Microbiota, Organic Acid Concentration, and Cytokine Expression in Broiler Chickens." *Poultry Science* 96(4):966–75.
- Kim, Do Hyung and Brian Austin. 2006. "Cytokine Expression in Leucocytes and Gut Cells of Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss* Walbaum, Induced by Probiotics." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114(3–4):297–304.
- Kumar, Himanshu, Taro Kawai, and Shizuo Akira. 2009. "Biochemical and Biophysical Research Communications Toll-like Receptors and Innate Immunity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388(4):621–25.
- Leal, Esther, Carlos Zarza, and Carolina Tafalla. 2017. "Effect of Vitamin C on Innate Immune Responses of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Leukocytes." *Fish and Shellfish Immunology*

67:179–88.

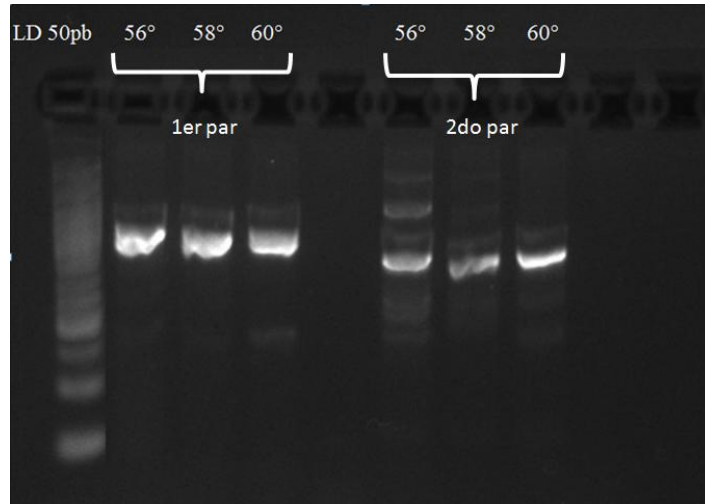
- Lee, Myung Ja, Zhenling Zang, Eui Yul Choi, Hyun Kyung Shin, and Geun Eog Ji. 2002. "Cytoskeleton Reorganization and Cytokine Production of Macrophages by Bifidobacterial Cells and Cell-Free Extracts." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12(3):398–405.
- Li, Tao, Fei Ke, Jian Fang Gui, Li Zhou, Xiao Juan Zhang, and Qi Ya Zhang. 2019. "Protective Effect of Clostridium Butyricum against Carassius Auratus Herpesvirus in Gibel Carp." *Aquaculture International* 27(3):905–14.
- Loh, Teck C., Di W. Choe, Hooi L. Foo, Awis Q. Sazili, and Mohd H. Bejo. 2014. "Effects of Feeding Different Postbiotic Metabolite Combinations Produced by Lactobacillus Plantarum Strains on Egg Quality and Production Performance, Faecal Parameters and Plasma Cholesterol in Laying Hens." *BMC Veterinary Research* 10:1–9.
- MacKenzie, S., D. Iliev, C. Liarte, H. Koskinen, J. V. Planas, F. W. Goetz, H. Mölsä, A. Krasnov, and L. Tort. 2006. "Transcriptional Analysis of LPS-Stimulated Activation of Trout (Oncorhynchus Mykiss) Monocyte/Macrophage Cells in Primary Culture Treated with Cortisol." *Molecular Immunology* 43(9):1340–48.
- Magnadottir, Bergljot. 2010. "Immunological Control of Fish Diseases." *Marine Biotechnology* 12(4):361–79.
- Magnadóttir, Bergljót. 2006. "Innate Immunity of Fish (Overview)." *Fish and Shellfish Immunology* 20(2):137–51.
- Martin, S. A. M., J. B. Taggart, P. Seear, J. E. Bron, R. Talbot, A. J. Teale, G. E. Sweeney, B. Høyheim, D. F. Houlihan, D. R. Tocher, J. Zou, and C. J. Secombes. 2007. "Interferon Type I and Type II Responses in an Atlantic Salmon (Salmo Salar) SHK-1 Cell Line by the Salmon TRAITS/SGP Microarray." *Physiological Genomics* 32(1):33–44.
- Mitterdorfer, Gabriele, Helmut K. Mayer, Wolfgang Kneifel, and Helmut Viernstein. 2002. "Protein Fingerprinting of Saccharomyces Isolates with Therapeutic Relevance Using One- and Two-Dimensional Electrophoresis." *Proteomics* 2(11):1532–38.
- Nayak, S. K. 2010. "Probiotics and Immunity: A Fish Perspective." *Fish and Shellfish Immunology* 29(1):2–14.
- Nourshargh, S., J. A. Perkins, H. J. Showell, K. Matsushima, T. J. Williams, and P. D. Collins. 1992. "A Comparative Study of the Neutrophil Stimulatory Activity in Vitro and Pro-Inflammatory Properties in Vivo of 72 Amino Acid and 77 Amino Acid IL-8." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148(1):106–11.
- Núñez-Acuña, Gustavo, Camille Détrée, Cristian Gallardo-Escárate, and Ana Teresa Gonçalves. 2017. "Functional Diets Modulate LncRNA-Coding RNAs and Gene Interactions in the Intestine of Rainbow Trout Oncorhynchus Mykiss." *Marine Biotechnology* 19(3):287–300.

- Orazi, A., X. Du, Z. Yang, M. Kashai, and D. A. Williams. 1996. "Interleukin-11 Prevents Apoptosis and Accelerates Recovery of Small Intestinal Mucosa in Mice Treated with Combined Chemotherapy and Radiation." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 75(1):33–42.
- Pérez-Sánchez, Tania, José Luis Balcázar, Daniel L. Merrifield, Oliana Carnevali, Giorgia Gioacchini, Ignacio de Blas, and Imanol Ruiz-Zarzuela. 2011. "Expression of Immune-Related Genes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Induced by Probiotic Bacteria during *Lactococcus Garvieae* Infection." *Fish and Shellfish Immunology* 31(2):196–201.
- Qin, Q. W., M. Ototake, K. Noguchi, G. I. Soma, Y. Yokomizo, and T. Nakanishi. 2001. "Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ )-like Factor Produced by Macrophages in Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*." *Fish and Shellfish Immunology* 11(3):245–56.
- Rauta, Pradipta R., Bismita Nayak, and Surajit Das. 2012. "Immune System and Immune Responses in Fish and Their Role in Comparative Immunity Study: A Model for Higher Organisms." *Immunology Letters* 148(1):23–33.
- Rieger, Aja M., Brian E. Hall, and Daniel R. Barreda. 2010. "Macrophage Activation Differentially Modulates Particle Binding, Phagocytosis and Downstream Antimicrobial Mechanisms." *Developmental and Comparative Immunology* 34(11):1144–59.
- Román, L., F. Real, D. Padilla, F. El Aamri, S. Déniz, V. Grasso, and F. Acosta. 2013. "Cytokine Expression in Head-Kidney Leucocytes of European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax* L.) after Incubation with the Probiotic *Vagococcus Fluvialis* L-21." *Fish and Shellfish Immunology* 35(4):1329–32.
- Safari, Reza, Milad Adel, Carlo C. Lazado, Christopher Marlowe A. Caipang, and Maryam Dadar. 2016. "Host-Derived Probiotics *Enterococcus Casseliflavus* Improves Resistance against *Streptococcus Iniae* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) via Immunomodulation." *Fish and Shellfish Immunology* 52:198–205.
- Senthilraja, P. and K. Kathiresan. 2015. "In Vitro Cytotoxicity MTT Assay in Vero, HepG2 and MCF-7 Cell Lines Study of Marine Yeast." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5(3):80–84.
- Taverniti, Valentina and Simone Guglielmetti. 2011. "The Immunomodulatory Properties of Probiotic Microorganisms beyond Their Viability (Ghost Probiotics: Proposal of Paraprobiotic Concept)." *Genes and Nutrition* 6(3):261–74.
- Thu, T. V., Teck Chwen Loh, H. L. Foo, H. Yaakub, and M. H. Bejo. 2011. "Effects of Liquid Metabolite Combinations Produced by *Lactobacillus Plantarum* on Growth Performance, Faeces Characteristics, Intestinal Morphology and Diarrhoea Incidence in Postweaning Piglets." *Tropical Animal Health and Production* 43(1):69–75.
- Tomar, S. K., S. Anand, P. Sharma, V. Sangwan, and S. Mandal. 2015. "Role of Probiotic, Prebiotics, Synbiotics and Postbiotics in Inhibition of Pathogens." *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* 717–32.

- Torres Garcia, Cynthia Jareth and Juan Carlos Torres Guzman. 2017. "Optimización de La Producción de Levaduras Con Interés Biotecnológico." *Verano de La Investigacion Cientifica* 3(2):586–90.
- Trepicchio, W. L., M. Bozza, G. Pedneault, and A. J. Dorner. 1996. "Recombinant Human IL-11 Attenuates the Inflammatory Response through down-Regulation of Proinflammatory Cytokine Release and Nitric Oxide Production." *The Journal of Immunology* 157(8):3627 LP – 3634.
- Tsilingiri, K. and M. Rescigno. 2013. "Postbiotics: What Else?" *Beneficial Microbes* 4(1):101–7.
- Tsilingiri, Katerina, Theolis Barbosa, Giuseppe Penna, Flavio Caprioli, Angelica Sonzogni, Giuseppe Viale, and Maria Rescigno. 2012. "Probiotic and Postbiotic Activity in Health and Disease: Comparison on a Novel Polarised Ex-Vivo Organ Culture Model." *Gut* 61(7):1007–15.
- Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez, and Gabriel Moran. 2011. "Innate and Adaptive Immunity in Teleost Fish: A Review." *Veterinarni Medicina* 56(10):486–503.
- Wang, Tiehui, Jason W. Holland, Niels Bols, and Christopher J. Secombes. 2005. "Cloning and Expression of the First Nonmammalian Interleukin-11 Gene in Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*." *FEBS Journal* 272(5):1136–47.
- Wangkahart, Eakapol, Callum Scott, Christopher J. Secombes, and Tiehui Wang. 2016. "Re-Examination of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Immune Response to Flagellin: *Yersinia Ruckeri* Flagellin Is a Potent Activator of Acute Phase Proteins, Anti-Microbial Peptides and pro-Inflammatory Cytokines in Vitro." *Developmental and Comparative Immunology* 57:75–87.
- Yada, Takashi and Lluís Tort. 2016. *Stress and Disease Resistance: Immune System and Immunoendocrine Interactions*. Vol. 35. Elsevier Inc.
- Yanez, Alberto, Celia Murciano, Silvia Llopis, Teresa Fernandez-Espinar, M. Luisa Gil, and Daniel Gozalbo. 2009. "In Vivo and In Vitro Studies on Virulence and Host Responses to *Saccharomyces Cerevisiae* Clinical and Non-Clinical Isolates." *The Open Mycology Journal* 3(1):37–47.
- Zou, J, Grabowski, P, Cunningham, C and Secombes, C. 1999. "Molecular Cloning of Interleukin 1beta from Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* Reveals No Evidence of an Ice Cut Site." *Cytokine* 11(8):552–60.
- Zou, J., S. Peddie, G. Scapigliati, Y. Zhang, N. C. Bols, and A. E. Ellis. 2003. "Functional Characterisation of the Recombinant Tumor Necrosis Factors in Rainbow Trout , *Oncorhynchus Mykiss*." 27:813–22.
- Zou, Jun, Allison Carrington, Bertrand Collet, Johannes Martinus Dijkstra, Yasutoshi Yoshiura, Niels Bols, and Chris Secombes. 2005. " Identification and Bioactivities of IFN- $\gamma$  in Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* : The First Th1-Type Cytokine Characterized Functionally in Fish ." *The Journal of Immunology* 175(4):2484–94.

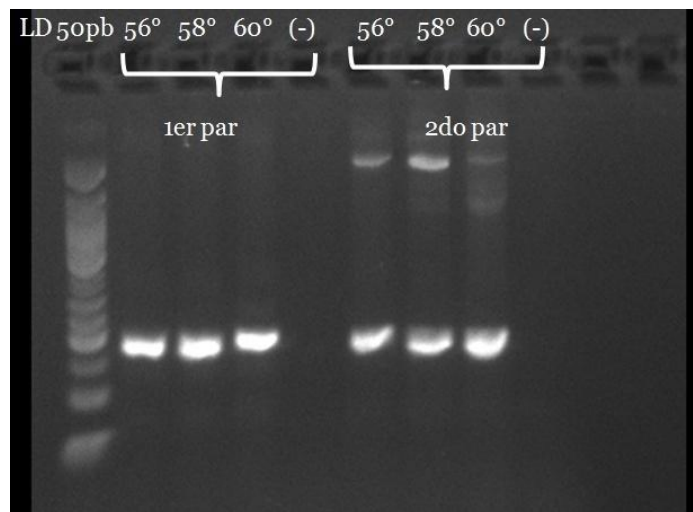
## ANEXOS

### Anexo 1



**Figura N°41.-**Gel TBE 1% del producto PCR de la *Interleuquina 6* (IL-6), a la izquierda se sembró el primer par de partidores y a la derecha el segundo en 3 temperaturas, también se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

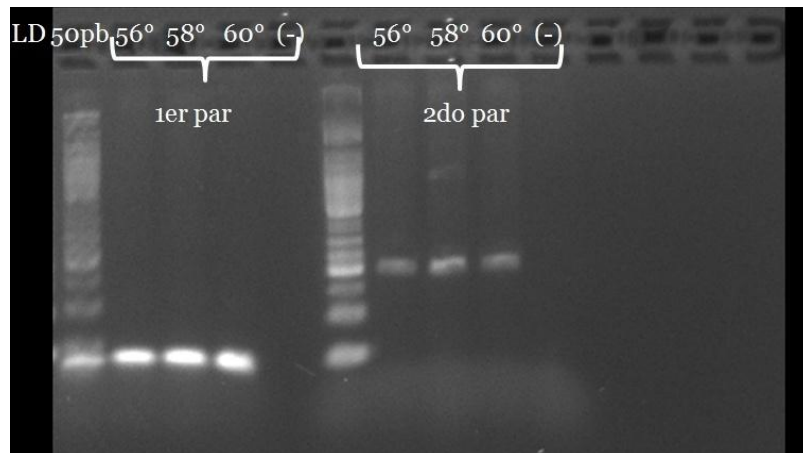
El primer par de partidores fue utilizado para comprobar rango dinámico, el segundo se descarta por presentar múltiples bandas de amplificación



**Figura N°42.-**Gel TBE 1% del producto PCR de la *Interleuquina 10* (IL-10), a la izquierda se sembró el primer par de partidores y a la derecha el segundo en 3 temperaturas,

también se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

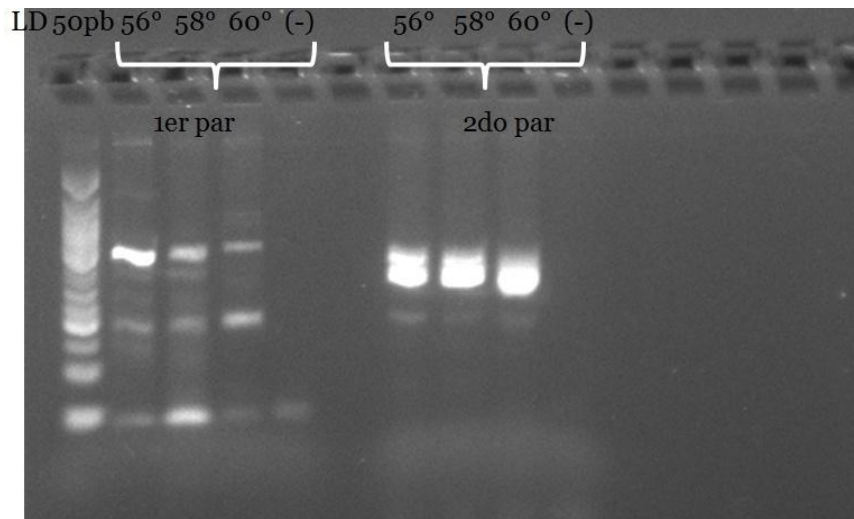
Se utilizó el primer par de partidores para probar rango dinámico por mostrar productos más específicos.



**Figura N°43.-**Gel TBE 1% del producto PCR de la *Interleuquina 17* (IL-17), a la izquierda se sembró el primer par de partidores y a la derecha el segundo en 3 temperaturas, también se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

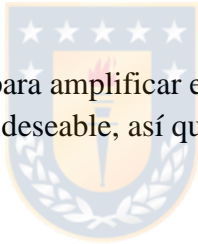
Se utilizó el segundo par de partidores ya que el primero no amplificaba para el tamaño diseñado, sino que marcaba para 50pb, se sugiere que se formaron dímeros de primers.





**Figura N°44.-**Gel TBE 1% del producto PCR del Oxido nitroso inducible (iNOS), a la izquierda se sembró el primer par de partidores y a la derecha el segundo en 3 temperaturas, también se observan sus correspondientes controles negativos para verificar el cDNA sintetizado.

Ninguno de los partidores diseñados para amplificar el RNA que codifica para Oxido nitroso inducible mostró un tamaño de banda deseable, así que ese partidador se descarta



**Tabla N°10.- Ct de los partidores diseñados para RST11**

| CT          |          |              |              |               |              |        |        |
|-------------|----------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------|--------|
| Muestra     | b-actina | EF- $\alpha$ | IL-1 $\beta$ | TNF- $\alpha$ | IL-17        | IL-10  | IL-11  |
| D1          | 16.753   | 16.635       | 23.032       | 27.809        | 30.203       | 30.518 | 25.694 |
| D1          | 15.066   | 16.658       | 22.741       | 27.819        | 29.102       | 30.212 | 26.024 |
| D1          | 14.465   | 17.541       | 22.975       | 27.777        | 29.688       | 30.481 | 26.263 |
| D2          | 16.655   | 18.304       | 24.942       | 29.091        | 30.186       | 31.634 | 27.968 |
| D2          | 16.677   | 18.123       | 24.599       | 29.135        | 33.160       | 31.277 | 27.700 |
| D2          | 17.000   | 18.802       | 24.586       | 29.607        | 31.892       | 31.669 | 28.002 |
| D3          | 17.930   | 19.772       | 25.826       | 30.967        | 32.343       | 32.405 | 29.101 |
| D3          | 19.316   | 19.911       | 26.298       | 30.675        | Undetermined | 33.328 | 28.966 |
| D3          | 18.358   | 20.435       | 26.003       | 31.117        | Undetermined | 31.890 | 29.070 |
| D4          | 20.309   | 22.487       | 28.205       | 32.554        | Undetermined | 33.417 | 31.071 |
| D4          | 20.326   | 22.058       | 28.278       | 32.367        | Undetermined | 32.279 | 30.707 |
| D4          | 20.489   | 22.076       | 28.005       | 34.068        | Undetermined | 32.393 | 31.543 |
| D5          | 22.598   | 24.162       | 30.482       | 33.263        | 36.111       | 32.025 | 33.490 |
| D5          | 22.416   | 24.724       | 30.493       | 34.236        | Undetermined | 32.268 | 37.173 |
| D5          | 22.423   | 24.235       | ★30.220★     | ★ ★           | Undetermined | 33.110 | 32.978 |
| Control (-) | 35.867   | Undetermined | ★35.591★     | 34.418        | Undetermined | 35.037 | 37.644 |

En esta tabla se observan los Cts de los partidores diseñados, según criterios del laboratorio de genómica marina, sólo se trabajaron con aquellos partidores que dieron un Ct entre 18 y 24, descartando así los que estaban fuera de ese rango para evitar falsos positivos o falsos negativos.