



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y  
OCEANOGRÁFICAS**



**“INFLUENCIA MODULADORA DEL FOTOPERIODO  
ARTIFICIAL EN LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES  
ASOCIADOS AL SISTEMA INMUNE DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*)”**

**JORGE ANDRÉS SAAVEDRA CABRERA**

Seminario de Título presentado al  
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA  
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de  
BIÓLOGO MARINO

Concepción-Chile

Marzo 2024

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS**

Este Seminario de Título ha sido realizado en Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática y en el Laboratorio de Biología Molecular (Cabina 3), pertenecientes al Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía

\_\_\_\_\_  
Dr. Ariel Valenzuela Saldías

Profesor Co Guía

\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Cruzat Cruzat

Comisión Evaluadora

\_\_\_\_\_  
Dr. Sebastián Escobar Aguirre

\_\_\_\_\_  
Dra. Jannel Acosta Alba

Jefe de Carrera

\_\_\_\_\_  
Dr. Ariel Valenzuela Saldías

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Ariel Valenzuela por permitirme entrar al Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática, y ser un fidedigno guía para la realización de mi seminario de título. Del mismo modo, agradecer al personal del LPPA: Niza, Bastián, Bernardo, Verónica y Paulina por apoyarme incondicionalmente en el mantenimiento de los peces y por el cariño recibido.

También, al Dr. Fernando Cruzat por aceptar ser profesor co guía de este trabajo, por brindarme el soporte, materiales y conocimientos necesarios en el área molecular. Y a mi amigo Gabino Gómez, tesista de IBMA quien sin esperar nada a cambio me prestó ayuda en múltiples ocasiones dentro del laboratorio de Biología Molecular.

## ÍNDICE

Índice de figuras .....	vi
Índice de tablas.....	viii
Índice de anexos .....	viii
Resumen.....	ix
Abstract .....	x
1. Introducción .....	1
1.1 Contexto acuícola mundial y nacional .....	1
1.2 Uso de fotoperiodo artificial en la salmonicultura y su efecto en la fisiología de teleósteos .....	3
1.3 Sistema inmune en teleósteos .....	7
1.4 Fotoperiodo estacional y sistema inmune.....	17
2. Hipótesis .....	20
3. Objetivos .....	21
3.1 General .....	21
3.2 Específicos .....	21
4. Materiales y métodos.....	22
4.1 Peces .....	22
4.2 Diseño experimental .....	22
4.3 Índices de crecimiento .....	25
4.3.1 SGR .....	25
4.3.2 FCR .....	25
4.3.3Factor de condición de Fulton .....	26
4.4 Extracción y purificación de RNA .....	26
4.5 Diagnóstico de concentración e integridad del RNA.....	28

4.6 Síntesis cDNA .....	28
4.7 RT-qPCR .....	29
4.8 Análisis estadístico .....	30
5. Resultados .....	32
5.1 Efecto de los fotoperiodos artificiales sobre el crecimiento de los peces .....	32
5.1.1 Aumento de peso corporal .....	32
5.1.2 FCR .....	34
5.1.3 SGR.....	36
5.1.4Factor de condición de Fulton.....	38
5.2 Expresión génica luego de la exposición a fotoperiodo artificial.....	40
5.2.1 Sistema inmune específico .....	40
5.2.2 Sistema inmune inespecífico .....	44
6. Discusión.....	49
7. Conclusiones .....	57
8. Bibliografía .....	59
9. Anexos .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de la acuicultura y de la pesca de captura.....	1
Figura 2. Diagrama de componentes de un sistema de recirculación de agua para la acuicultura.....	3
Figura 3. Utilización de fotoperiodo artificial en balsas jaula para la producción de Salmónidos.....	5
Figura 4. Diferenciación de células T colaboradoras (Th) en las distintas subpoblaciones Th .....	13
Figura 5. Diseño experimental esquematizado del ensayo. ....	25
Figura 6. Porcentaje de aumento en peso de los grupos luego de 45 días de exposición a diferentes regímenes de fotoperiodo artificial .....	32
Figura 7. Porcentaje de aumento en peso de los grupos durante el segundo periodo de ensayo .....	33
Figura 8. (A), (B), (C) Aumento de peso de los grupos 24L:0D, 14L:10D y 12L:12D respectivamente. (D) Peso promedio de los grupos al inicio y al final de la exposición a los fotoperiodos (día 0 y día 45) .....	34
Figura 9. Factor de conversión alimenticia de los diferentes grupos de estudio, durante el periodo de ensayo (45 días).....	35
Figura 10. Factor de conversión alimenticia de los diferentes grupos de estudio, durante el segundo periodo de ensayo .....	36
Figura 11. Tasa específica de crecimiento de los diferentes grupos de estudio, durante el periodo de ensayo (45 días). ....	37
Figura 12. Tasa específica de crecimiento de los diferentes grupos de estudio, durante el segundo periodo de ensayo .....	38
Figura 13. Factor de condición (K) de los diferentes grupos de estudio, durante el periodo de ensayo (45 días).....	39
Figura 14. Factor de condición (K) de los diferentes grupos de estudio, durante el segundo periodo de ensayo .....	40

Figura 15. Expresión transcripcional relativa del factor de transcripción maestro de los Linfocitos Th1, comparada entre inicio del fotoperiodo (T0) y final del fotoperiodo (T3). .....	41
Figura 16. Expresión transcripcional relativa del factor de transcripción maestro de los Linfocitos Th1, comparada entre último día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4) .....	42
Figura 17. Expresión transcripcional relativa de IL-17 $\alpha$ , comparada entre inicio del fotoperiodo (T0) y final del fotoperiodo (T3). .....	43
Figura 18. Expresión transcripcional relativa de IL-17, comparada entre el último día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4) .....	44
Figura 19. Expresión transcripcional relativa de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$ comparada entre inicio del fotoperiodo (T0) y final del fotoperiodo (T3) .....	45
Figura 20. Expresión relativa de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$ comparada entre el último día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4) .....	46
Figura 21. Expresión transcripcional relativa de IL-1 $\beta$ 1 comparada entre inicio del fotoperiodo (T0) y final del fotoperiodo (T3).....	47
Figura 22. Expresión transcripcional relativa de IL-1 $\beta$ 1 comparada entre el último día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4) .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

Listado de partidores utilizados en la RT-qPCR .....	30
--	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Boxplot de T-bet interpretado para hallar diferencias significativas entre los fotoperiodos comparando T0 y T3.....	63
Anexo 2. Boxplot de TNF $\alpha$ interpretado para hallar diferencias significativas entre los fotoperiodos comparando T0 y T3 (inicio y final de fotoperiodo) .....	63
Anexo 3. Boxplot de IL-1 $\beta$ interpretado para hallar diferencias significativas entre los fotoperiodos comparando T3 y T4.....	64

## RESUMEN

El fotoperiodo artificial es una herramienta de manejo ampliamente utilizada en la industria salmonera con el objetivo de controlar aspectos fisiológicos de los peces como la reproducción y el crecimiento, y con ello mejorar el rendimiento productivo. En este estudio se investigó la influencia reguladora de distintas configuraciones de fotoperiodo artificial sobre algunos mecanismos de la respuesta inmune de alevines de *Oncorhynchus mykiss*. A partir de tejido hematopoyético obtenido de la cabeza del riñón se cuantificó mediante RT-qPCR el nivel de transcritos de genes implicados en la respuesta Th1 y Th2 de linfocitos T colaboradores (T-bet e IL-17 $\alpha$ , respectivamente), y de genes que codifican citoquinas proinflamatorias de la respuesta inmune inespecífica (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ 1). Los grupos experimentales, los cuales estuvieron bajo la exposición de fotoperiodo 24L:0D y 14L:10D, al compararlos con el estado inicial de los peces, mostraron una regulación negativa de T-bet, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ 1 luego de 45 días de aplicación de luz artificial, mientras que el grupo control mantenido bajo 12L:12D no mostró variaciones en ninguno de los genes analizados durante el ensayo. En términos generales, esta tesis logra evidenciar y sugiere que el fotoperiodo artificial tiene la capacidad de interferir en algunos mecanismos de la respuesta inmune que son claves para generación de memoria inmunológica y la defensa frente a organismos patógeno en alevines de trucha arcoíris.

## ABSTRACT

Artificial photoperiod is a management tool widely used in the salmon industry to control physiological aspects of fish such as reproduction and growth, and thereby improve production performance. In this study, the regulatory influence of different artificial photoperiod settings on some mechanisms of the immune response of *Oncorhynchus mykiss* fry was investigated. From hematopoietic tissue obtained from the kidney head, the level of transcripts of genes involved in the Th1 and Th2 response of T-helper T lymphocytes (T-bet and IL-17 $\alpha$ , respectively), and genes encoding proinflammatory cytokines of the non-specific immune response (TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) were quantified by RT-qPCR. The experimental groups, which were under 24L:0D and 14L:10D photoperiod exposure, when compared to the initial state of the fish, showed a negative regulation of T-bet, TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  after 45 days of artificial light application, while the control group maintained under 12L:12D showed no variations in any of the genes analyzed during the assay. In general terms, this thesis provides evidence and suggests that artificial photoperiod has the capacity to interfere in some mechanisms of the immune response that are key to the generation of immunological memory and defense against pathogenic organisms in rainbow trout fry.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Contexto acuícola mundial y nacional

Desde hace décadas la situación pesquera a nivel global se encuentra en un estado de plena explotación, llegando al borde del colapso en algunos de los recursos que la sustentan, generando así un estancamiento en los rendimientos de captura. Sumado a esto, la demanda de recursos hidrobiológicos por parte de la población ha provocado que la acuicultura, definida como el “cultivo de organismos acuáticos, en particular peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas” (FAO), tenga un papel crucial en la producción alimentaria al punto que ya suministra más del 50% de pescado para consumo humano a nivel global. (FAO, 2020).

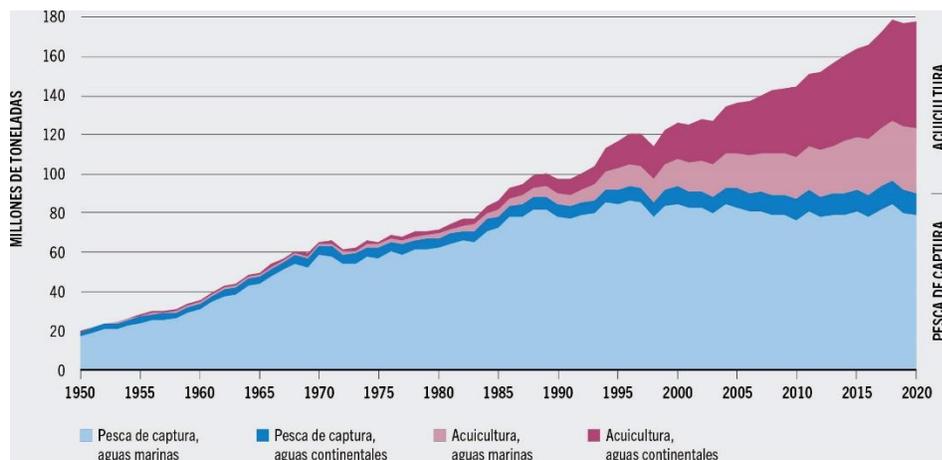


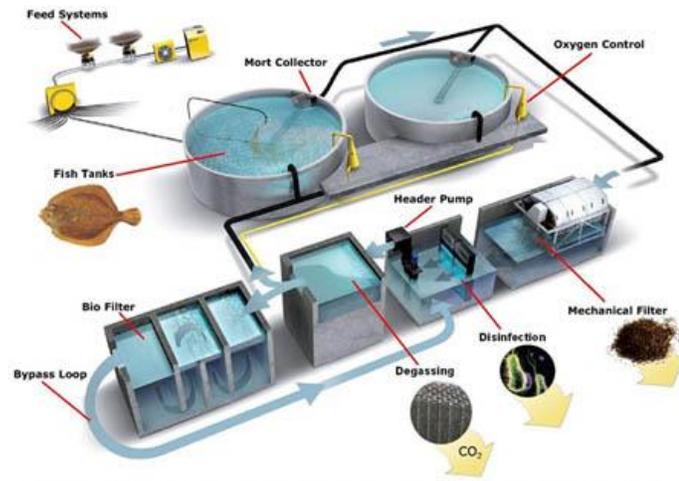
Figura 1. Producción mundial de la acuicultura y de la pesca de captura. (FAO, 2022)

En este aspecto, Chile se posiciona como un actor importante en la acuicultura mundial, siendo el segundo mayor productor de salmón, después Noruega, concentrando el 28% de la producción global con una cosecha anual acumulada a diciembre del año 2022 de 1,044 millones de toneladas, de las cuales el 50,6% correspondió a salmón del atlántico (*Salmo salar*), 14,4% a salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) y 4,9% a trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (SERNAPESCA, 2022).

Acompañado de este incremento en la producción acuícola, se han desarrollado y perfeccionado nuevas tecnologías y sistemas productivos como estrategia de adaptación a los requerimientos y problemáticas actuales asociadas al cultivo intensivo.

Es así como los sistemas de recirculación acuícola (RAS), han destacado como alternativa tecnológica teniendo en cuenta la sostenibilidad y la susceptibilidad de la industria frente a los efectos del cambio climático. Por su parte, un sistema RAS se caracteriza por su alta productividad y eficiencia (<90%) en la reutilización del agua (Badiola *et al.*, 2012 ; Murray *et al.*, 2014) la que es tratada de manera física, química y biológica antes de volver a circular por las unidades de cultivo. Además, cuando son correctamente

diseñados y empleados suministran un ambiente favorable para el desarrollo de los cultivos a través del control y monitoreo de parámetros.



**Figura 2. Diagrama de componentes de un sistema de recirculación de agua para la acuicultura.**

## **1.2 Uso de fotoperiodo artificial en la salmonicultura y su efecto en la fisiología de teleósteos**

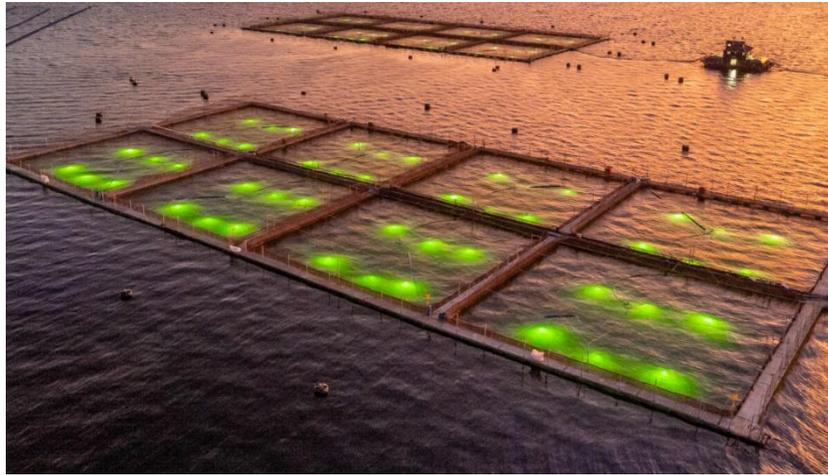
En la salmonicultura, el monitoreo y control de los factores ambientales son de vital importancia para alcanzar el rendimiento y los objetivos productivos proyectados. Así, la utilización de fuentes luminosas artificiales de manera continua se considera una herramienta de manejo frecuentemente empleada, que busca conseguir ciclos productivos más eficientes. Factores nutricionales, genéticos, fisiológicos y ambientales pueden ejercer presión

sobre el crecimiento y desarrollo de las especies animales, siendo la temperatura y el fotoperiodo los factores ambientales primordiales capaces de regular el desarrollo y sincronizar la reproducción de los peces de cultivo (Aragón Flores *et al.*, 2014).

El fotoperiodo es una señal ambiental cíclica correspondiente a la exposición de horas luz en un periodo de 24 horas en un lugar determinado, conllevando un ritmo endógeno que ejecuta un papel en la organización circadiana. Esto mediante la sincronización de procesos diarios como la alimentación, sueño-vigilia y actividad locomotora, además de procesos estacionales como la reproducción y el crecimiento. (Pévet *et al.*, 2006; Falcón *et al.*, 2010).

La aplicación de fotoperiodo artificial en sistemas de cultivo de peces corresponde a un factor extrínseco sustancial para estimular el apetito y mejorar la conversión alimenticia, aumentando así la tasa de crecimiento de los organismos y reducir el tiempo de producción (Ergün *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2006; Koskela, 1996; Önder *et al.*, 2016). En salmónidos se ha observado la influencia del fotoperiodo artificial en el tiempo y ajuste de los desoves (Bromage *et al.*, 1992), en la inhibición de la madurez sexual, en

parámetros hematológicos (Valenzuela *et al.*, 2008) y en el sistema inmune (Leonardi y Klempau, 2003).



**Figura 3. Utilización de fotoperiodo artificial en balsas jaula para la producción de Salmónidos.**

En comparación con el resto de los teleósteos, que disponen de un oscilador o “reloj” circadiano autosuficiente que estimula la secreción de melatonina, en los salmónidos la síntesis de esta hormona está regularizada por el fotoperiodo y por la dirección del cambio en el ciclo luz-oscuridad (Ekstrøm y Meissl, 1997). La glándula pineal en vertebrados dispone de suficiencia fotorreceptora siendo capaz de gestar una respuesta neuro-endocrina mediante la síntesis de melatonina regulada fóticamente y que tiene lugar durante las horas de oscuridad puesto que la arilaquilamina N-acetil transferasa (AANAT), enzima limitante en el proceso de síntesis, es inhibida

por la luz. La producción de melatonina ocurre a partir de la serotonina (5-hidroxitriptamina) mediante dos etapas catalizadas por la enzima mencionada anteriormente, la que transforma la serotonina en *N*-acetilserotonina, siendo esta posteriormente metilada por el biocatalizador hidroxindol-*O*-metiltransferasa dando lugar a la secreción de melatonina, cuyo patrón de síntesis es proporcional a la duración de la noche, por lo que los niveles en circulación de esta hormona son portadores del mensaje circadiano y estacional en sus tejidos diana. (Caride, 2008). Además, la melatonina también es capaz coordinar la estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada/tejido interrenal (h-h-g-t), encargado de articular la reproducción, asimismo el aumento de actividad hipofisiaria afecta directamente la secreción de prolactina y hormona del crecimiento. (Valenzuela, 2006; Falcón *et al.* 2003). Por lo tanto, la glándula pineal ejecuta la función de “reloj y calendario” proporcionando información al eje (h-h-g-t) a través de la traducción de los ciclos diarios y estacionales en una señal neuro-hormonal.

### **1.3 Sistema inmune en teleósteos**

El desarrollo e integridad del sistema inmune de los teleósteos permite que su idoneidad y funcionalidad sea comparable con la respuesta inmune de los vertebrados superiores, siendo posible distinguir dos mecanismos de respuesta, el sistema de defensa innato, también llamado inespecífico, y el sistema adquirido o específico. Ambos corresponden a mecanismos de defensa celular y humoral inducido por un agente extraño, el antígeno. Por otra parte, teniendo en cuenta la tendencia evolutiva, en las especies con un mayor grado de desarrollo, la respuesta inmunoespecífica ha sido considerada proporcionalmente más importante que la respuesta inespecífica.

El sistema inmune específico es distinguido principalmente por una sucesión de cambios adaptativos que suceden dentro de las líneas celulares B y T. Estas poblaciones linfoides se encargan del reconocimiento específico del antígeno y de la generación de memoria inmunológica (Gogensen 2009), ejecutando así una respuesta capacitada para la detección y combate de infecciones con especificidad.

Aquella especificidad y amplia variabilidad en los dominios de reconocimiento se logra mediante los receptores de antígeno de las células B

y T (BCR Y TCR respectivamente). (Nishana y Raghavan 2012). En los linfocitos B, los receptores de células B (BCR) corresponden a inmunoglobulinas (Igs), las cuales son capaces de reconocer antígenos específicos. Cuando las Igs son secretadas se denominan anticuerpos, que son los encargados de inducir una respuesta inmunitaria de carácter humoral. Por contraparte, en la otra población linfoide, los receptores de células T (TCR) reconocen antígenos ya procesados y presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para luego proveer señales coestimuladoras impulsando la activación y diferenciación de los linfocitos B, acción realizada por los linfocitos T CD4+ o colaboradores. Igualmente pueden desempeñar una función citotóxica (Linfocitos T citotóxicos o CD8+) a través de la mediación de respuestas celulares orientadas a la destrucción de patógenos situados intracelularmente por medio de la liberación de citotoxinas como perforina, granzimas y granulicina como consecuencia al reconocimiento de péptidos presentados mediante moléculas MHC-I.

Como ya se ha mencionado, según la funcionalidad de las células T, estas pueden ser clasificadas en dos poblaciones generales. Los linfocitos T auxiliares expresan el correceptor CD4 que interactúa con el MHC clase II y por su parte los linfocitos T citotóxicos expresan el correceptor CD8 que

interacciona con MHC clase I. Estos correceptores se encargan de normalizar y estabilizar la intercomunicación entre las moléculas MHC y el TCR.

Cuando están en maduración, las células T reciben el nombre de timocitos, puesto que este desarrollo ocurre en el timo. En dicha etapa, los timocitos suelen expresar CD4 y CD8 sincrónicamente y experimentan un proceso de selección positiva en donde solo aquellos que reconocen moléculas MHC propias sobreviven (Fowlkes y Schweighoffer, 1995), obteniendo como resultado una población de linfocitos T “ $\alpha\beta$  naive” que evacuan el timo e iniciarán una recirculación entre la sangre y los órganos linfoides a fin de encontrar un antígeno específico a través de su TCR. (Takahama, 2006). En el contexto de las células T auxiliares (Th), luego de su activación pueden diferenciarse en subpoblaciones específicas caracterizadas por patrones específicos de secreción de citoquinas, por lo tanto, gozan de acciones diversificadas en las respuestas inmunes. Dentro de las categorías Th, se adjuntan los subconjuntos Th1, Th2, Th17 y T-reguladoras inducibles (T-reg).

### **Th1**

La subpoblación Th1 organiza la respuesta inmune mediada por células frente a patógenos bacterianos o víricos de carácter intracelular. El desarrollo

hacia este subgrupo es impulsado por IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-12 e IL-18 y controlado por los factores de transcripción t-bet, STAT1 y STAT4. Luego de su activación secretan principalmente IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha/\beta$ , siendo estas citoquinas un patrón distintivo de la subpoblación las que a su vez inducen la activación de los macrófagos y proliferación de linfocitos citotóxicos.

### **T-bet**

T-bet corresponde al factor de transcripción más representativo de los linfocitos Th1, ya que determina genéticamente la ruta de polarización direccionando las células T no estimuladas hacia el linaje Th1 y simultáneamente silencia el programa genético Th2. Se ha evidenciado que en manifestación de T-bet se aumenta la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-12, disminuyendo la secreción de IL-4 e IL-5. (Szabo et al., 2000).

### **IFN- $\gamma$**

Dentro de las múltiples funciones que posee, esta citoquina efectora se encarga de regular el incremento en la expresión MHC-II y la secreción de IL-12 que promueve la diferenciación hacia Th1, además de activar macrófagos y células dendríticas fomentando la diferenciación de linfocitos

T citotóxicos. Todo lo anterior sugiere que IFN- $\gamma$  juega un papel considerable en el aumento de la presentación de antígenos.

## **Th2**

Los linfocitos T colaboradores de la clase Th2 se encargan de efectuar una respuesta inmunitaria frente a patógenos extracelulares, específicamente contra parásitos helmínticos (Paul y Zhu, 2010). La diferenciación hacia esta subpoblación es inducida por la citoquina polarizante IL-4 y regulada por los factores de transcripción GATA3 y STAT6. Una vez activadas estas células secretan IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-17E/IL-25. La IL-4 junto con IL-13 favorecen la secreción de anticuerpos y la activación de los macrófagos y por su parte la IL-5 estimula la activación de eosinófilos. En salmónidos, los genes con homología compartida entre la IL-4 e IL-13 denominada IL-4/13 modula la expresión de genes Th2 (Wang et al, 2016).

## **Th17**

Las células Th17 median la respuesta inmunitaria contra patógenos bacterianos y fúngicos extracelulares. La diferenciación Th17 es efectuada por los factores de transcripción de la familia ROR, siendo ROR $\gamma$ t el principal. Una vez activadas, estas células secretan IL-17A, IL-17F, IL-21 e

IL-22, estas citoquinas inducen el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a los sitios de inflamación por medio de la secreción de quimicinas.

## **IL-17**

La IL-17A es la citocina prototipo del recién identificado grupo de células T cooperadoras Th17. Esta familia se encuentra integrada por 6 miembros, que van de la IL-17A a la IL-17F. La IL-17A y la IL-17F son las que presentan una mayor homología en su secuencia de aminoácidos, sin embargo, desarrollan funciones opuestas. La IL-17A participa en el desarrollo de la autoinmunidad, inflamación e inmunidad tumoral, además de participar en la defensa del hospedero en contra de infecciones bacterianas y fúngicas, en cambio, la IL-17F participa principalmente en la inmunidad a mucosas. La IL-17E es un amplificador de la respuesta de tipo Th2 y la función de los miembros restantes es aún desconocida.

## **RORyt**

RORyt es el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th17, pertenece a la familia de receptores nucleares huérfanos (ROR) y desempeña un papel en la diferenciación hacia la subpoblación Th17. Además, coopera en la regulación de ritmos circadianos. La desregulación de estos ritmos conduce

a un desajuste de las células Th17 y a una mayor susceptibilidad a la patología inflamatoria. (Eberl, 2016)

## Treg

La subpoblación linfocida Treg tiene como función principal el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria, por medio del control de reconocimiento de lo propio frente a lo no propio, evitando la actividad excesiva del sistema inmune. Estas células se caracterizan por la secreción de IL10 y TGF- $\beta$  y cuya diferenciación está regulada por el factor de transcripción FOXP3.

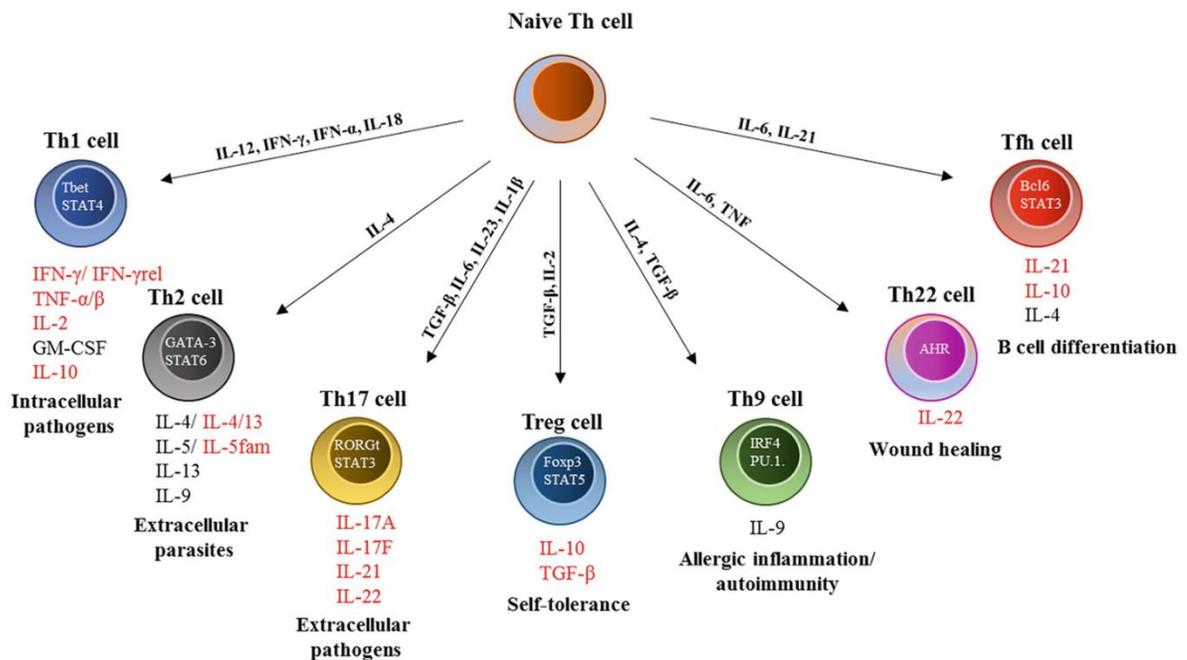


Figura 4. Diferenciación de células T colaboradoras (Th) en las distintas subpoblaciones Th. Esta diferenciación es regulada por factores de transcripción, mostrados dentro de las células. Secretan un patrón característico de citoquinas,

**indicadas bajo las células. Y participan, cada una, en la respuesta inmune frente a diferentes tipos de patógenos. Obtenido de *Principles of fish immunology*, Buchmann & Secombes (2022).**

Por otro lado, en la respuesta inmune inespecífica o innata, la piel junto con las membranas mucosas que recubren las branquias y el tracto gastrointestinal, constituyen la primera línea de defensa frente a patógenos, puesto que el mucus que las reviste contiene una variedad de compuestos antimicrobianos.

Los elementos celulares de la defensa inmunitaria inespecífica integran a las células fagocíticas móviles, como macrófagos/monocitos, granulocitos: neutrófilos, basófilos y células de Rodlet; a las células citotóxicas no específicas, funcionalmente equivalentes a las células *natural killer* de los mamíferos; y a las células eosinofílicas granulares presentes en sitios mucosos. (Rubio-Godoy, 2010)

Sumado a ello, los componentes humorales se pueden diferenciar en sus funciones efectoras o en sus patrones de reconocimiento específicos (Zhu *et al.*, 2012). Dentro de los cuales se puede resaltar la lisozima y proteasas, proteína C reactiva, lectinas, quitinasas, sistema del complemento y péptidos antimicrobianos como agentes microbicidas y bacteriostáticos como la

transferrina, piscidinas, somatostatina, ACTH y  $\alpha$ -precipitina; los anticuerpos naturales y las citoquinas. (Rieger *et al.*, 2011). En relación a estas últimas, se destacan una serie de moléculas de señalización celular de carácter proinflamatorias.

La inflamación es una reacción innata que tiene lugar inmediatamente después de una exposición a estímulos nocivos, como una infección o una herida. Su objetivo es eliminar patógenos potenciales en el sitio del daño, ello involucra el flujo de granulocitos y macrófagos a la zona, dirigido por la liberación de una cascada de quimiocinas, desencadenando mecanismos antimicrobianos posteriores y activación celular. (Hessle *et al.* 2005; Skovbjerg *et al.* 2010).

Las citoquinas proinflamatorias son secretadas principalmente por los linfocitos T colaboradores y macrófagos. Estas células producen péptidos antimicrobianos y la activación celular por medio de la secreción de dichas citoquinas, en las que se incluyen IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18, entre otras. (Sher, 1992).

## **IL-1 $\beta$**

Se sabe que la interleuquina 1 beta participa en una variedad de procesos biológicos de carácter sistémicos y/o localizados. Siendo primordial para la regulación y comienzo de la respuesta inmune e inflamatoria, por medio de la mejora de la fagocitosis, la secreción de lisozima, modulación de actividad de antiproteasa, quimioatrayente de leucocitos y la mejora de la citotoxicidad tumoral mediada por monocitos (Hong *et al.*, 2003).

## **TNF $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral alfa, es una citoquina producida por macrófagos y ejerce múltiples funciones inmunológicas, principalmente en el proceso de inflamación sistémica, apoptosis, mejora la fagocitosis y citotoxicidad de neutrófilos, mejora la síntesis de prostaglandina y óxido nítrico y modula la expresión de otras citoquinas, incluidas IL-1. (Wiens y Glenney 2011; Zou *et al.*, 2003).

Ambas citoquinas, IL-1 y TNF $\alpha$ , pueden provocar una respuesta de fase aguda mediante la producción de pentraxinas como el amiloide A sérico (SAA) y la proteína C reactiva, ambas consideradas proteínas de fase aguda,

las que tienen función reguladora limitando la infección y restableciendo el equilibrio fisiológico.

#### **1.4 Fotoperiodo estacional y sistema inmune**

Es sabido que en los vertebrados ectotérmicos las variaciones estacionales, entre ellas el fotoperiodo, generan un efecto sobre la estructura y función del sistema inmunológico (Zapata *et al.* 1996). En estudios previos, se ha observado en *O. mykiss*, una influencia estacional sobre algunos parámetros inmunes innatos y hematológicos, tales como actividad de lisozima plasmática y recuento de glóbulos blancos y rojos, detectando los valores más altos de estos parámetros en verano y los más bajos en invierno. (Morgan *et al.* 2008). Por contraparte, en un estudio realizado en *Salmo trutta*, se descubrieron variaciones en el número de linfocitos en órganos linfoides a lo largo del año, concluyendo que los linfocitos en el riñón anterior y en el bazo siguen el mismo patrón con un aumento significativo en primavera y otoño en comparación con invierno y verano. (Álvarez *et al.* 1998).

En cuanto al efecto de la aplicación del fotoperiodo artificial sobre parámetros inmunológicos, se ha informado en truchas arcoíris expuestas a régimen 14:10 una disminución en el número de linfocitos y trombocitos,

resultados probablemente relacionados con un aumento en el desarrollo gonadal vinculado al fotoperiodo artificial (Valenzuela, 2006). También se ha logrado detectar en el régimen de luz constante (24L:0D) cambios en el número de trombocitos y la presencia de estrés, acompañado de inmunosupresión (Leonardi, 2003). En este ámbito, autores han podido llegar a resultados que difieren considerablemente entre sí, ya que luego de la exposición a fotoperiodo artificial en *Salvelinus fontinalis*, se señala un aumento en la resistencia a enfermedades infecciosas, en este caso frente a *Saprolegnia* sp. (Lundova *et al.*, 2019). Sin embargo, en *O. mykiss* se ha evidenciado un aumento en la mortalidad en peces sometidos a fotoperiodo artificial y desafiados a una infección bacteriana, especialmente en aquellos expuestos a régimen 14L:10D (Valenzuela *et al.*, 2012).

Por otro lado, en un análisis del efecto del fotoperiodo artificial sobre la respuesta de células T de *O. mykiss*, se encontró la mayor cantidad de estos linfocitos en peces mantenidos bajo 16L:8D, además, luego de inmunizar con rVP1, se logró evidenciar que cada fotoperiodo fomenta un sello único de respuesta de células T. (Goldstein *et al.* 2023). Siendo esta última investigación, una de las primeras en analizar el fotoperiodo artificial sobre los mecanismos de inmunidad adaptativa de los peces.

En esta tesis de investigación se evaluó la expresión de genes inmunológicos correspondientes a aquellos implicados en la diferenciación de los linfocitos T colaboradores de tipo Th1 y Th 17 (*t-bet* e *IL-17a* respectivamente), además de genes que codifican para citoquinas que contribuyen en la respuesta inmune innata en alevines de trucha arcoíris (*IL-1 $\beta$ 1* y *TNF $\alpha$* ) al inicio, durante y posterior a la exposición a fotoperiodo artificial 24L:0D, 14L:10D y 12L:12D.

## **2. HIPÓTESIS**

H0: La aplicación de fotoperiodo artificial no genera una subexpresión de genes relacionados con la diferenciación de las subpoblaciones y tipos de respuesta de linfocitos Th, y de citoquinas proinflamatorias representativas de la respuesta inmune inespecífica.

H1: La aplicación de fotoperiodo artificial genera una subexpresión de genes relacionados con la diferenciación de las subpoblaciones y tipos de respuesta de linfocitos Th, y de citoquinas proinflamatorias representativas de la respuesta inmune inespecífica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General:

Analizar el efecto de la exposición a fotoperiodo artificial sobre la respuesta de algunos parámetros del sistema inmune en alevines de *O. mykiss*.

#### 3.2 Específicos:

- I. Aplicar fotoperiodo artificial a alevines de trucha, evaluar índices de crecimiento y relacionarlos con los cambios en los parámetros inmunes.
- II. Cuantificar la expresión relativa de genes que codifican citoquinas proinflamatorias del sistema inmune inespecífico, y de aquellos genes vinculados con el tipo de respuesta Th1 y Th17 de linfocitos T colaboradores, mediante RT-qPCR en tejido hematopoyético de truchas arcoíris mantenidas bajo diferentes regímenes de fotoperiodo artificial.
- III. Determinar por medio de la evaluación del nivel de transcritos la regulación de los genes de interés, y con ello sugerir la calidad del estado inmunológico de los peces.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Peces**

Un total de 1020 alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con un peso corporal inicial de 2,86 gramos, fueron obtenidos de la piscicultura Salmones Pangué.

La mantención de los peces se llevó a cabo en las dependencias del laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática de la Universidad de Concepción. Se comenzó aclimatando a los alevines por 26 días, en el cual se alimentó a razón del 6% del peso corporal con pellet comercial. Los parámetros de calidad del agua se monitorearon diariamente manteniéndose la temperatura a 10,5° C, oxígeno disuelto 8,2-9,8 mg/L, pH 6.9-7.6 y caudal de 4 litros por minuto en cada estanque.

### **4.2 Diseño experimental**

Una vez finalizada la etapa de aclimatación, los alevines con un peso promedio de  $5,67 \pm 0,54$  gramos se distribuyeron en tres grupos con diferentes condiciones de fotoperiodo artificial (n=152 peces/estanque; 14 kg/m<sup>3</sup>), cada uno mantenido en estanques circulares de fibra de vidrio de 50 litros. El grupo 1 estuvo bajo régimen de fotoperiodo 24L:0D simulando las

condiciones de luz artificial constante utilizada intensivamente en los sistemas acuícolas. El grupo 2, expuesto a fotoperiodo artificial 14L:10D imitando las condiciones de luz en días de verano, y por último el grupo 3, correspondiente al grupo control, se mantuvo 12L:12D simulando las horas luz durante el equinoccio de primavera. Se mantuvieron los peces en estas condiciones por 45 días, siendo esta la primera etapa del ensayo. Luego, para dar inicio a la segunda etapa, todos los estanques volvieron a fotoperiodo control 12L:12D durante un periodo de 15 días.

Cada uno de los grupos contó con su respectiva réplica y ambos fueron ubicados en sistemas de recirculación independientes de los otros tratamientos, evitando así la mezcla de aguas en cada grupo experimental. Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron en las mismas condiciones (temperatura a 10,5° C, oxígeno disuelto 8,2-9,8 mg/L, pH 6.9-7.6 y caudal de 4 litros por minuto en cada estanque) y la alimentación se redujo para todos los estanques a una tasa de 4% del peso corporal.

Los estanques fueron cubiertos externamente con polietileno negro para evitar la entrada de luz, y para la puesta en funcionamiento del fotoperiodo se emplearon lámparas Led de luz blanca (Ekoline, 5W, 240V y  $\lambda$  575 nm)

situadas a 10 cm sobre la superficie, controladas con temporizadores programables que regulaban la cantidad de horas luz en cada estanque.

Antes del inicio del ensayo se realizó un muestreo (tiempo 0) para establecer la condición basal de los peces en cada uno de los estanques (n=8 peces/grupo). Con dicho propósito, los peces fueron sacrificados con sobredosis de anestesia aplicando p-amino-benzoato de etilo (Benzocaína 20%, BZ-20®, Veterquímica) en una inmersión en 3,0 mL de benzocaína en 2 litros de agua. Posteriormente se registró el peso (g) y longitud horquilla (cm) de los individuos para evaluar índices de crecimiento y se realizó la extracción de la porción anterior de riñón, muestras que fueron almacenadas en tubos eppendorf de 1,5 mL con 1,25 mL de solución estabilizadora de RNA (RNA save, Biological Industries) a -20°C para su posterior análisis de expresión génica mediante RT-qPCR. Se repitieron los mismos protocolos de muestreo para los días 15 (T1), día 30 (T2), día 45 (T3) y en el día 60 (T4) correspondiente al último día del experimento.

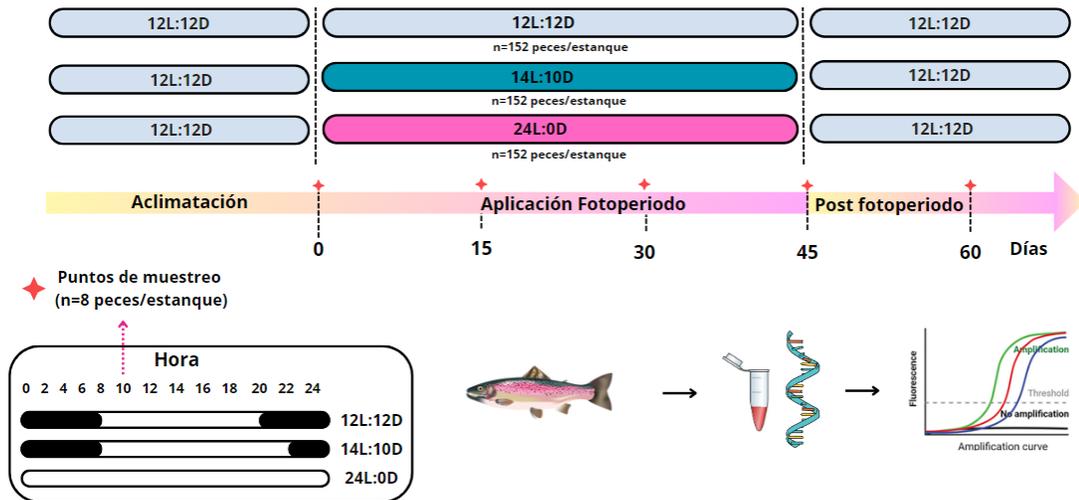


Figura 5. Diseño experimental esquematizado del ensayo.

### 4.3 Índices de crecimiento

#### 4.3.1 Porcentaje de ganancia de peso

El porcentaje de ganancia de peso de los peces sometidos a los diferentes regímenes de fotoperíodo artificial se determinó considerando el inicio y final del ensayo (día 0 y 45) y mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ganancia} = (\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{Peso final}$$

#### 4.3.2 FCR

El FCR, o Factor de Conversión de Alimento, se utiliza para medir la eficiencia de la conversión de alimento en biomasa de los peces, y se calculó con la siguiente fórmula:

$FCR = \text{Alimento consumido (kg)} / \text{Biomasa final (kg)} - \text{Biomasa inicial (kg)}$

### **4.3.3 SGR**

La tasa específica de crecimiento (SGR), utilizada para medir la tasa de crecimiento diario de los peces, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$SGR = [(\ln(\text{Peso Final (g)}) - \ln(\text{Peso Inicial(g)}) / \text{Tiempo (días)}) * 100$$

### **4.3.4 Factor de condición**

El factor de condición corporal de Fulton (K), utilizado para comparar condiciones o “bienestar” de los peces se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$K = 100 * (W/L^3)$$

Donde W corresponde al peso (g) y L a la longitud (cm).

## **4.4 Extracción y purificación de RNA**

A partir de las muestras de tejido hematopoyético se llevó a cabo el aislamiento de RNA mediante la utilización del kit de extracción E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, Omega Bio.Tek, y se ejecutó conforme al protocolo específico del producto. La extracción de RNA se realizó para un pool de muestra por estanque en cada tiempo de muestreo (n=5 individuos/pool).

Se inició quitando el RNAsave de las muestras para posteriormente agregar 700  $\mu$ L de tampón de lisis y se homogenizó el tejido renal con morteros plásticos para tubos de 1,5 mL. Se centrifugó por 5 minutos a 12 RPM en microcentrífuga (Heraeus PICO 17, ThermoFisher scientific), el sobrenadante resultante fue traspasado a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se agregó 700  $\mu$ L de etanol 70%, terminando así la etapa de lisado. Para dar inicio a la fase de unión, se transfirió 700  $\mu$ L de la muestra a una mini columna HiBind® previamente dispuesta en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó por un minuto a la misma velocidad de rotación. Se repiten estos pasos hasta que toda la muestra sea transferida a la mini columna. Seguidamente se efectuó la digestión de DNA con DNase I, para ello, se añadieron 250  $\mu$ L de RNA Wash Buffer I y se centrifugó bajo el mismo protocolo anterior. Se agregó 75  $\mu$ L de Dnase I y se mantuvo por 15 minutos a temperatura ambiente para luego volver a añadir 250  $\mu$ L de RNA Wash Buffer I y se centrifugó. Se agregaron 500  $\mu$ L de RNA Wash Buffer II diluido previamente con etanol 100% y se centrifugó por un minuto. Este paso se realiza por duplicado para terminar con la etapa de lavado. Por último, para ejecutar la elución, se transfirió la mini columna a un tubo eppendorf de 1,5

mL agregando 50  $\mu$ L de agua tratada con DEPC para evitar la degradación del RNA y se centrifugó por dos minutos a 12 RPM.

#### **4.5 Diagnóstico de concentración e integridad del RNA**

Para la cuantificación de la concentración del ARN se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific) cuya lectura se realizó a una absorbancia de 230 nm y los valores fueron cuantificados en ng/ $\mu$ L. Por contraparte, la integridad fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% en celda Wide Mini-Sub® Cell GT (BIO RAD).

#### **4.6 Síntesis cDNA**

A partir del ARN mensajero obtenido y por medio de retro transcripción, se realizó la síntesis de ADN complementario. Esto con ayuda del kit de síntesis de cDNA, ABM® All-in-one 5X RT Master Mix, siguiendo el protocolo del producto. En cada tiempo de muestreo se sintetizó cDNA a partir de cuatro muestras de ARN por estanque.

Se comenzó mezclando las cuatro muestras de ARN (100 ng c/u) luego, a este volumen con concentración final de 400 ng se le agregó 4  $\mu$ L de Master

Mix y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ L de solución.

Posteriormente se realizó la incubación de la mezcla a 37° C durante 30 minutos, seguido de 60°C durante 10 minutos y 95°C por 3 minutos. Se almacenó a -20 °C hasta su uso en RT-qPCR.

#### **4.7 RT-qPCR**

La amplificación de los DNAc se llevó a cabo por medio de RT-qPCR en un Termociclador en tiempo real (AriaMx), utilizando el kit de amplificación Brilliant II SYBR Green QPCR® master mix (Agilent Technologies). Se utilizó  $\beta$ -actina como gen house keeping. Las reacciones de PCR en tiempo real se efectuaron en un volumen total de 20  $\mu$ L, compuesto de 10  $\mu$ L de master mix, 2  $\mu$ L cada partidor, 1  $\mu$ L de ADNc y 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de grado molecular. Como control negativo se agregó 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O en lugar de ADNc. Las condiciones térmicas en las que se trabajaron las reacciones fueron las siguientes: Preincubación durante 3 minutos a 95° C, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 95°, 30 segundos a 60° y 10 segundos a 95°, curva de fusión 95 °C- 65°C- 95°C: Incremento 0,5 °C durante 5 segundos de lectura de la placa. Cada reacción se realizó por triplicado.

La expresión relativa normalizada (NRE) se determinó mediante Delta Ct, ajustado a Pfaffl, cuya corrección se ajusta a la eficiencia de los partidores, y sus respectivos valores se expresaron como la media NRE  $\pm$  desviación estándar (DE) utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia y como control el grupo expuesto a fotoperiodo 12L:12D.

**Tabla 1. Listado de partidores utilizados en la RT-qPCR.**

Nombre del gen	Secuencia 5' $\rightarrow$ 3' Forward	Secuencia 5' $\rightarrow$ 3' Reverse
$\beta$ -actina	GGACTTTGAGCAGGAGATGG	ATGATGGAGTTGTAGGTGGTCT
T-bet	GGTAACATGCCAGGGAACAGGA	TGGTCTATTTTAGCTGGGTGATGTCTG
IL-17a/f	AGGAATCAGAGGGAAACGGG	TGGTGGGGTAGACACAGTACA
TNF- $\alpha$ 1	TGTGTGGGGTCTCTTAATAGCAGGTC	CCTCAATTCATCCTGCATCGTTGA
IL-1 $\beta$ 1	CCTGGAGCATCATGGCGTG	GCTGGAGAGTGCTGTGGAAGAACATATAG

#### **4.8 Análisis estadístico**

Los análisis de los datos de crecimiento junto con los de expresión génica se realizaron con el programa estadístico Rstudio, mediante ANOVA unifactorial, seguida de la prueba post-hoc de Tukey. Sin embargo, para la realización de esta prueba paramétrica, es necesario que los datos cumplan

con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Para comprobar aquello se realizaron las pruebas de Shapiro Wilk y el test de Levene.

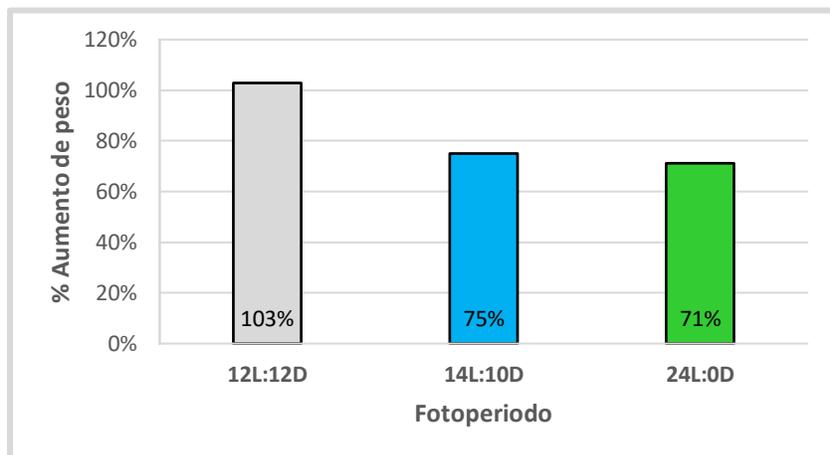
En casos donde no existía una distribución normal en los datos, pero si había homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Y en los casos donde no existía normalidad ni homocedasticidad, se analizaban las diferencias entre grupos mediante la interpretación de boxplot. Se trabajó con un intervalo de confianza del 95% y se consideraron valores significativos aquellos con un valor  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efecto de los fotoperiodos artificiales sobre el crecimiento de los peces

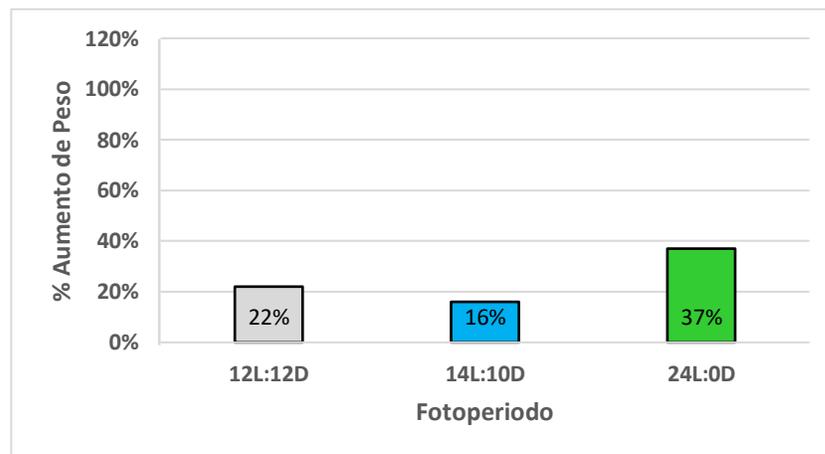
#### 5.1.1 Aumento de peso corporal

Los resultados evidencian que el mayor porcentaje de ganancia de peso corporal fue para los peces expuestos al fotoperiodo 12L:12D (grupo control) con un aumento del 103%, acompañado por el grupo sometido a fotoperiodo 14L:10D que mostró un aumento del 75%. Por contraparte, el incremento de peso más bajo fue en el grupo sometido a luz continua (fotoperiodo 24L:0D), con un aumento del 71%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos de estudio expuestos a fotoperiodo artificial. (Figura 6).

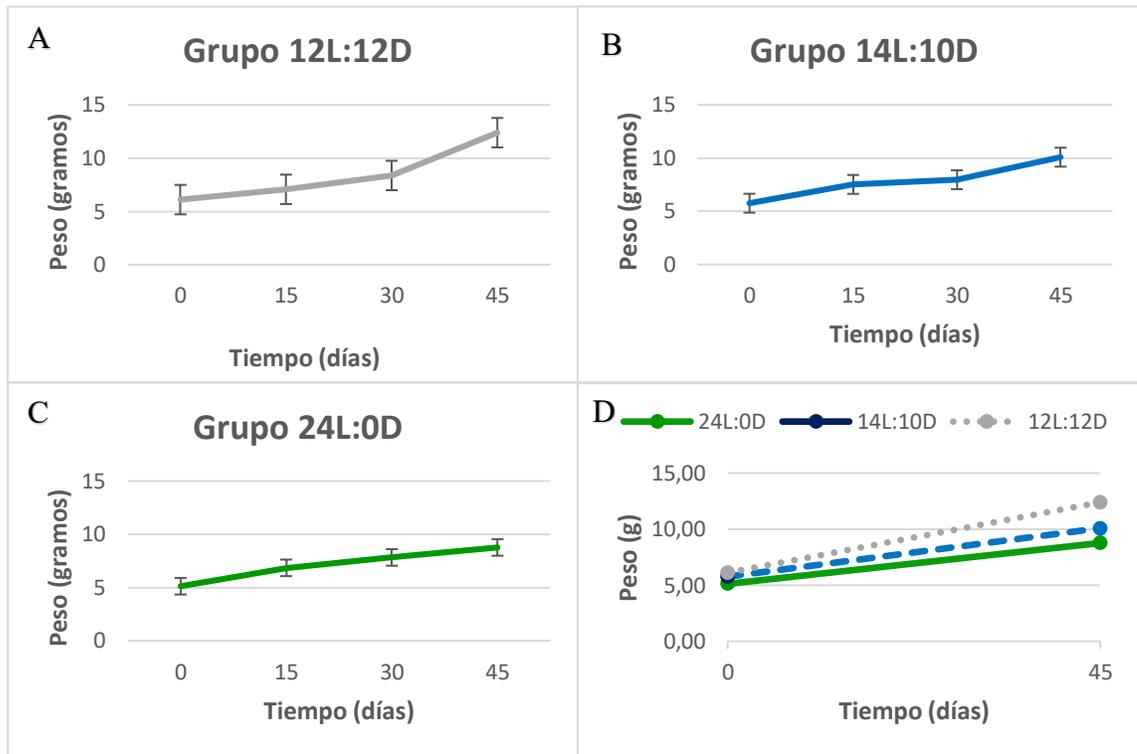


**Figura 6. Porcentaje de aumento en peso de los grupos luego de 45 días de exposición a diferentes regímenes de fotoperiodo artificial. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.**

Después de 15 días de la vuelta a fotoperiodo control (T4), se evidencia un mayor porcentaje de aumento de peso en el grupo expuesto a fotoperiodo 24L:0D, con aumento del 37%. El grupo control con fotoperiodo 12L:12D mostró un aumento del 22%, seguido del grupo fotoperiodo 14L:10D con un 16% de aumento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos de estudio. (Figura 7).



**Figura 7. Porcentaje de aumento en peso de los grupos durante el segundo periodo de ensayo (15 días post fotoperiodos artificiales). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.**

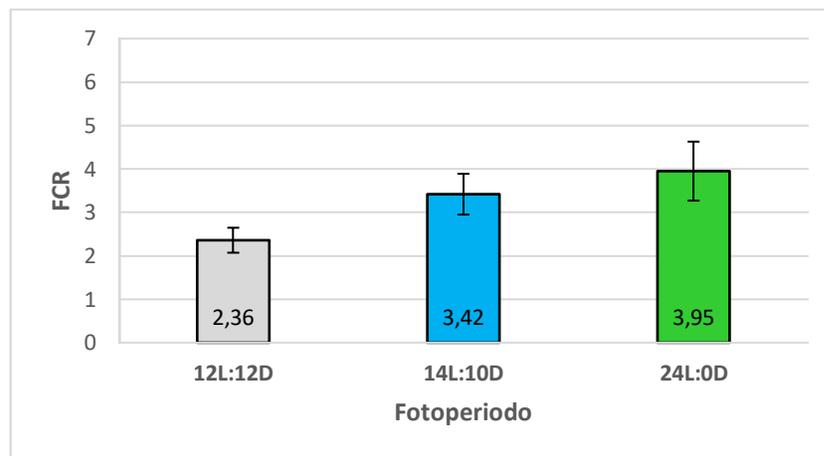


**Figura 8. (A), (B) y (C) Aumento de peso de los grupos 12L:12D, 14L:10D y 24L:0D respectivamente. (D) Peso promedio de los grupos al inicio y al final de la exposición a los fotoperiodos (día 0 y día 45).**

### 5.1.2 Factor de conversión alimenticia (FCR)

La conversión del alimento en ganancia de peso fue más eficiente en el grupo expuesto a fotoperiodo 12L:12D, el cual presentó un FCR de 2,36. De manera consecutiva, el grupo bajo fotoperiodo 14L:10D manifestó un FCR de 3,42. Por último, el grupo sometido a fotoperiodo luz continua, 24L:0D, obtuvo un

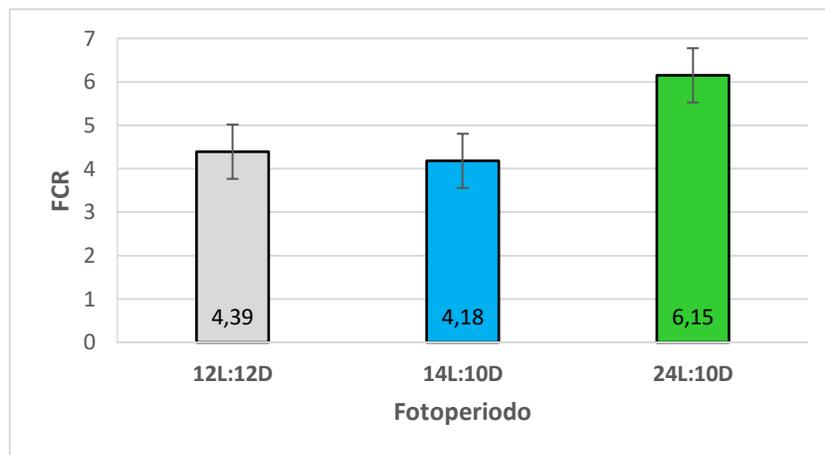
FCR de 3,95; siendo este el menos eficiente. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los FCR de los grupos. Valor  $p= 0,107$ . (Figura 9).



**Figura 9. Factor de conversión alimenticia de los diferentes grupos de estudio, durante el periodo de ensayo (45 días). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.**

Después de 15 días de la vuelta a fotoperiodo control (T4), se evidencia una mayor eficiencia en la conversión del alimento en el grupo expuesto a fotoperiodo 14L:10D, el cual presentó un FCR de 4,18 seguido del grupo control con un FCR de 4,39. Por último, el grupo sometido a fotoperiodo luz continua, 24L:0D, obtuvo un FCR de 6,15; siendo este el menos eficiente.

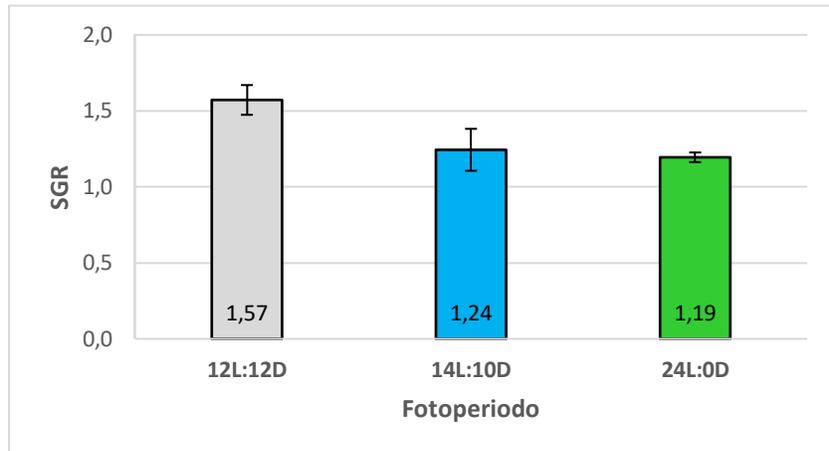
No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los FCR de los grupos. (Figura 10).



**Figura 10. Factor de conversión alimenticia de los diferentes grupos de estudio, durante el segundo periodo de ensayo (15 días post fotoperiodos artificiales). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.**

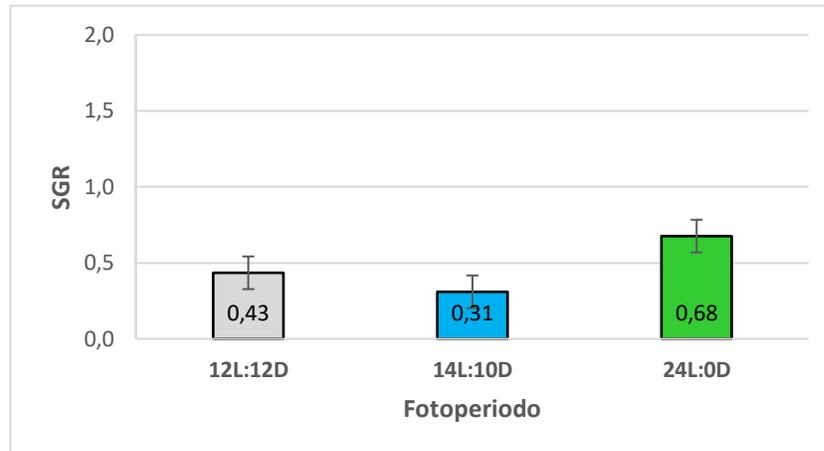
### **5.1.3 Tasa específica de crecimiento (SGR)**

La tasa específica de crecimiento fue mayor en el grupo control (12L:12D) con un SGR de 1,57. El grupo con fotoperiodo 14L:10D presentó un SGR de 1,24, y el grupo expuesto a luz continua mostró una tasa específica de crecimiento de 1,19. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los SGR de los grupos. Valor  $p= 0,0583$ . (Figura 11)



**Figura 11. Tasa específica de crecimiento de los diferentes grupos de estudio, durante el periodo de ensayo (45 días). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.**

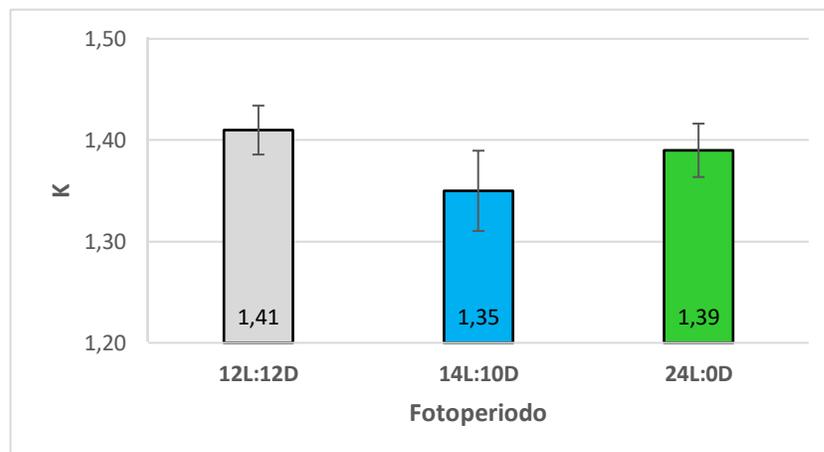
Después de 15 días de la vuelta a fotoperiodo control (T4), la tasa específica de crecimiento fue mayor en el grupo con fotoperiodo luz continua (24L:0D) con un SGR de 0,68. Seguidamente, el grupo control presentó un SGR de 0,43, y por último la configuración de fotoperiodo 14L:10D con un SGR de 0,31. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los SGR de los grupos. (Figura 12).



**Figura 12.** Tasa específica de crecimiento de los diferentes grupos de estudio, durante el segundo periodo de ensayo (15 días post fotoperiodos artificiales). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.

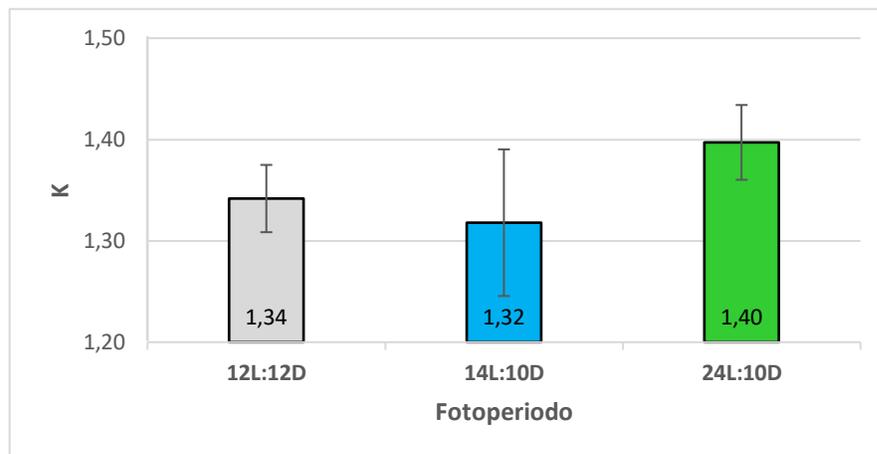
#### **5.1.4 Factor de condición de Fulton (K)**

En este caso la condición fue mayor en los peces expuestos a fotoperiodo control, seguido de fotoperiodo luz constante. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Valor  $p= 0,324$ . (Figura 13)



**Figura 13.** Factor de condición (K) de los diferentes grupos de estudio, durante el periodo de ensayo (45 días). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.

Después de 15 días de la vuelta a fotoperiodo control (T4), la condición de los peces fue mejor en aquellos expuestos a fotoperiodo 24L:0D, seguido del grupo control, y por último, con una condición más baja, el grupo 14L:10D. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. (Figura 14).

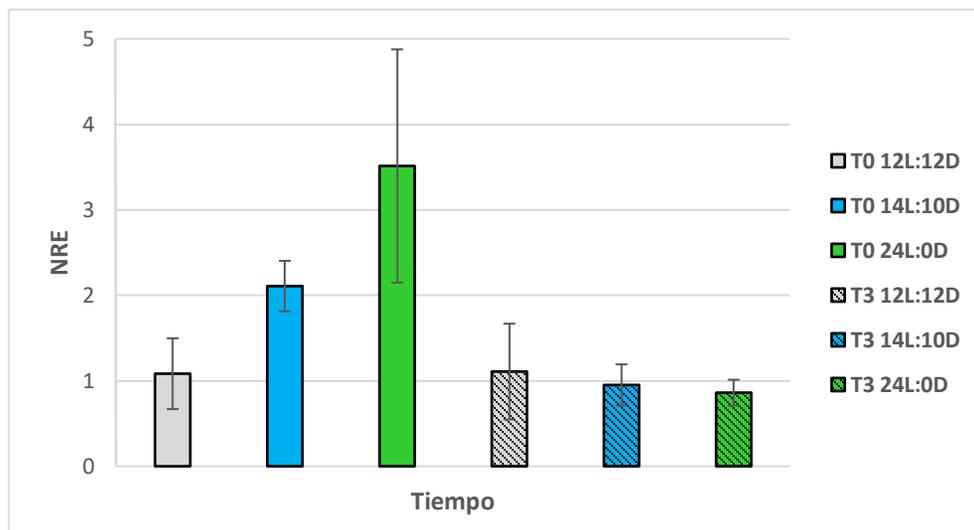


**Figura 14.** Factor de condición (K) de los diferentes grupos de estudio, durante el segundo periodo de ensayo (15 días post fotoperiodos artificiales). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.

## 5.2 Expresión génica luego de la exposición a fotoperiodo artificial

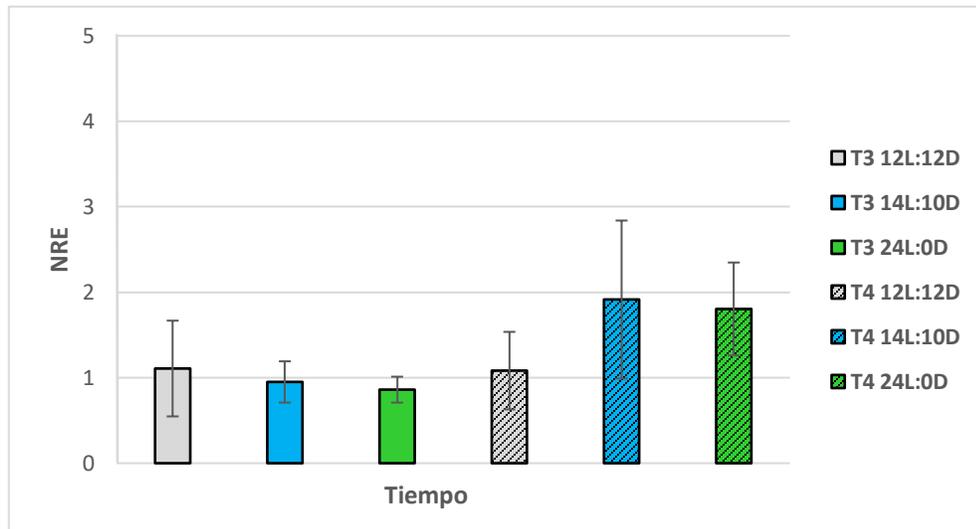
### 5.2.1 Sistema inmune específico

**a) T-bet:** Luego de 45 días de exposición a fotoperiodo artificial (T3) se evidencia una disminución en la expresión de este factor de transcripción al compararla con el estado basal de los peces (T0). Solo se consideran significativas las diferencias T0 vs T3 en el fotoperiodo 24L:0D y en el 14L:10D. (Figura 15).



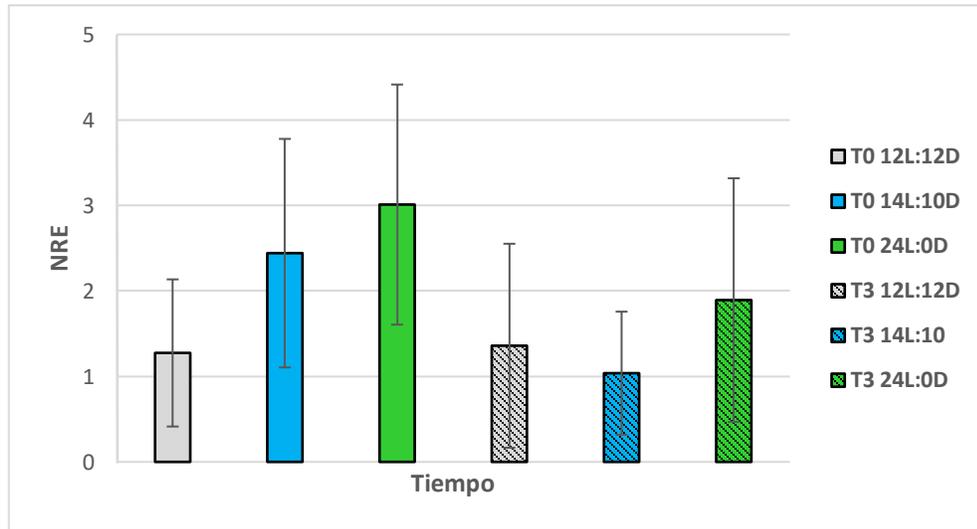
**Figura 15. Expresión transcripcional relativa del factor de transcripción maestro de los Linfocitos Th1, comparada entre inicio del fotoperíodo (T0) y final del fotoperíodo (T3). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante interpretación de boxplot, ya que los datos no cumplían con los supuestos necesarios para una prueba paramétrica.**

Después de 15 días de la vuelta a fotoperíodo control (T4) se evidencia un aumento en la expresión de este factor de transcripción al compararla con el estado de los peces luego de 45 días de exposición a fotoperíodo artificial (T3). Solo se consideran significativas las diferencias T3 vs T4 en el fotoperíodo 24L:0D y en el 14L:10D. (Figura 16).



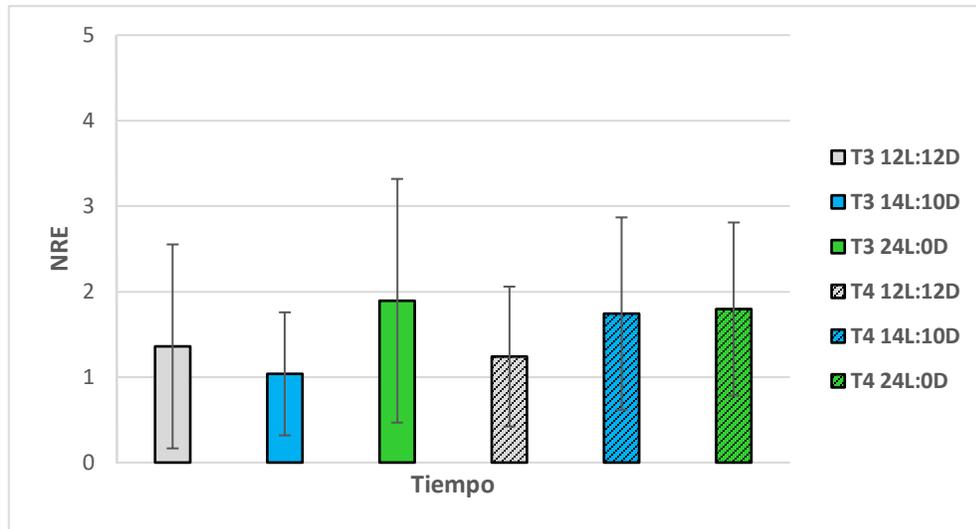
**Figura 16.** Expresión transcripcional relativa del factor de transcripción maestro de los Linfocitos Th1, comparada entre ultimo día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos. (24L:0D valor  $p = 0.0417181$ ; 14L:10D valor  $p = 0.0444078$ )

**b) IL-17:** Luego de 45 días de exposición a fotoperiodo artificial (T3) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de esta interleuquina al compararla con T0. (Figura 17).



**Figura 17. Expresión transcripcional relativa de IL-17, comparada entre inicio del fotoperíodo (T0) y final del fotoperíodo (T3). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante prueba Kruskal-Wallis.**

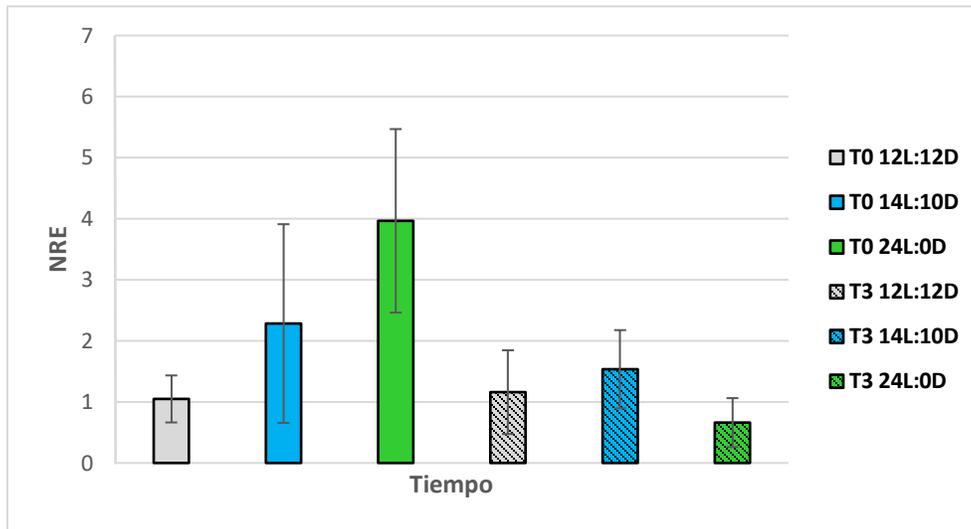
Luego de 15 días de la vuelta a fotoperíodo control (T4) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de esta interleuquina al compararla con T3. (Figura 18).



**Figura 18.** Expresión transcripcional relativa de IL-17, comparada entre el último día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos.

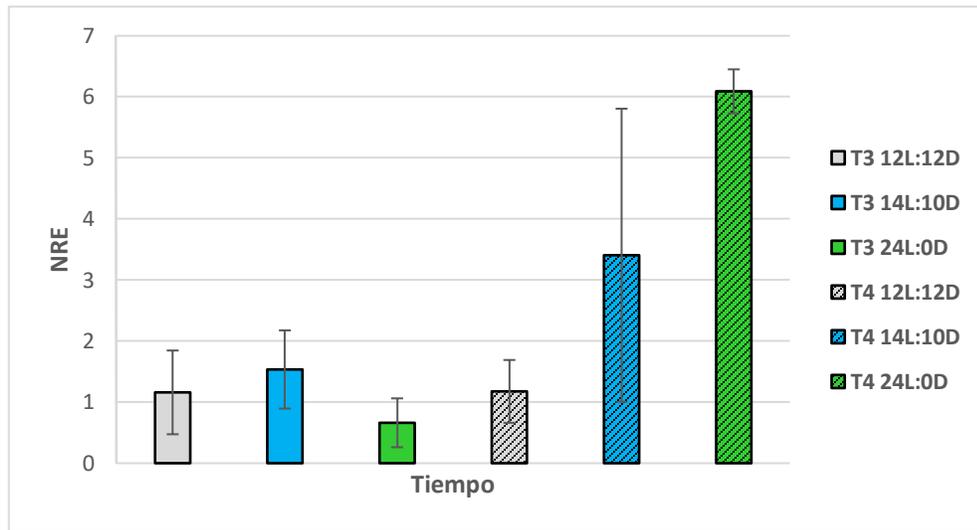
### 5.2.2 Sistema inmune inespecífico

**a)TNF $\alpha$ 1:** Luego de 45 días de exposición a fotoperiodo artificial (T3) se evidencia una disminución en la expresión de esta citoquina al compararla con el estado basal de los peces (T0). Solo se consideran significativas las diferencias T0 vs T3 en el fotoperiodo 24L:0D y en el 14L:10D. (Figura 19).



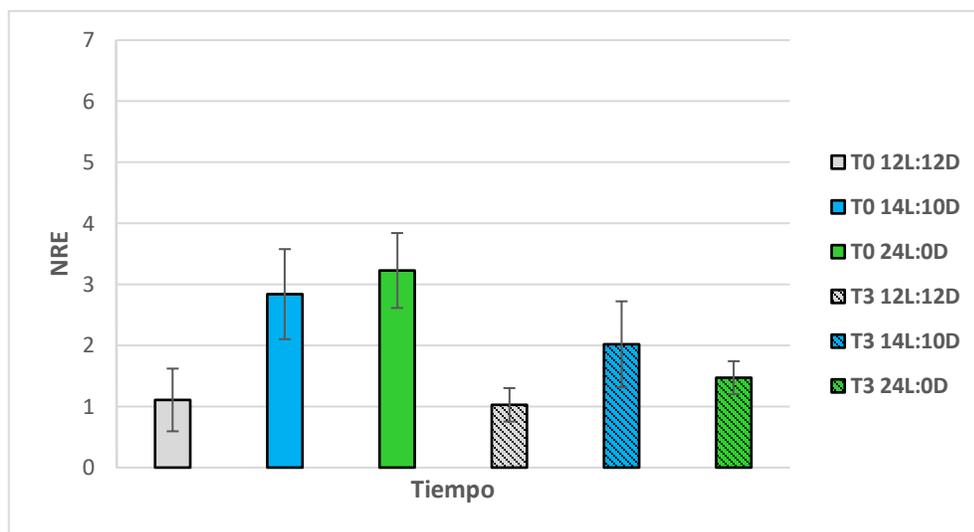
**Figura 19.** Expresión transcripcional relativa de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$  comparada entre inicio del fotoperiodo (T0) y final del fotoperiodo (T3). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante interpretación de boxplot, ya que los datos no cumplían con los supuestos necesarios para una prueba paramétrica.

Después de 15 días de la vuelta a fotoperiodo control (T4) se evidencia un aumento en la expresión del Factor de necrosis tumoral alfa, al compararla con el estado de los peces luego de 45 días de exposición a fotoperiodo artificial (T3). Solo se consideran significativas las diferencias T3 vs T4 en el fotoperiodo 24L:0D. (Figura 20).



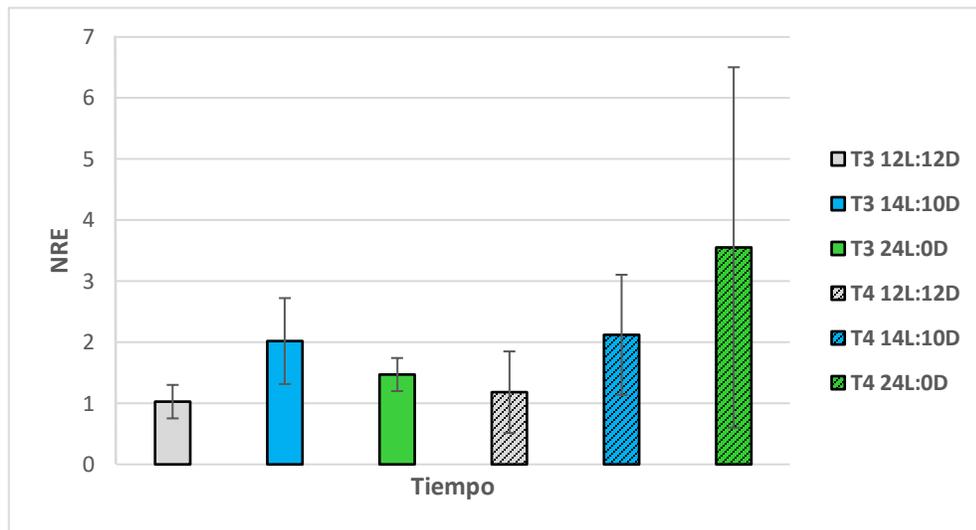
**Figura 20.** Expresión relativa de la citoquina proinflamatoria  $TNF\alpha$  comparada entre el último día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre tratamientos. (24L:0D valor  $p = 0.0000024$ )

**b) IL-1  $\beta$ 1:** Luego de 45 días de exposición a fotoperiodo artificial (T3) se evidencia una regulación negativa en la expresión de esta interleuquina al compararla con el estado basal de los peces (T0). Solo se considera significativa las diferencias T0 vs T3 en el fotoperiodo 24L:0D. (Figura 21).



**Figura 21. Expresión transcripcional relativa de IL-1 $\beta$  comparada entre inicio del fotoperíodo (T0) y final del fotoperíodo (T3). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Tukey. (24L:0D valor  $p= 0,0213848$ ).**

Después de 15 días de la vuelta a fotoperíodo control (T4) se evidencia un aumento en la expresión de Interleuquina 1 $\beta$ , al compararla con el estado de los peces luego de 45 días de exposición a fotoperíodo artificial (T3). Solo se consideran significativas las diferencias T3 vs T4 en el fotoperíodo 24L:0D y 14L:10D. (Figura 22).



**Figura 22.** Expresión transcripcional relativa de IL-1 $\beta$ 1 comparada entre el último día de fotoperiodo (T3) y la etapa posterior a la exposición de luz artificial (T4). Los resultados se expresan como expresión relativa normalizada (NRE) + DE a la expresión de  $\beta$ -actina en el fotoperíodo 12L:12D. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante interpretación de boxplot, ya que los datos no cumplían con los supuestos necesarios para una prueba paramétrica.

## 6. DISCUSIÓN

Este estudio se centró en investigar los efectos de diferentes regímenes de fotoperiodo artificial sobre algunos mecanismos partícipes de la inmunidad innata y adaptativa de trucha arcoíris.

Varios investigadores han establecido relación entre el fotoperiodo y procesos fisiológicos, como la reproducción, crecimiento, así como sobre poblaciones celulares, genes y proteínas que participan en la respuesta inmune. (Pévet *et al.*, 2006; Falcón *et al.*, 2010; Zapata *et al.* 1996; Leonardi, 2003, Valenzuela, 2006)

No obstante, estudios que hayan analizado correlaciones entre la aplicación de fotoperiodo artificial y sistema inmune adaptativo, en su magnitud y tipo de respuesta, son limitados, siendo el trabajo de Goldstein *et al.*, 2023 el primero, y único hasta la fecha en establecer que la respuesta inmune mediada por antígenos en trucha arcoíris presenta fluctuaciones respecto a diferentes regímenes de luz/oscuridad.

Respecto al crecimiento de los peces mantenidos bajo luz artificial, en la primera etapa del ensayo, aquellos expuestos a fotoperiodo de luz constante (24L:0D) curiosamente mostraron una tendencia hacia una menor ganancia de peso, siendo este el grupo que manifestó el SGR más bajo y FCR más alto.

Resultados que se contradicen con lo que se menciona en la literatura sobre la efectividad del estímulo fotoperiódico sobre la fisiología de los peces, que genera mayor consumo y eficiencia del alimento y con ello un mayor rendimiento en el crecimiento. (Türker *et al.*, 2011). Sin embargo, la explicación de este hecho, posiblemente, radica en la cantidad de alimento entregado a los peces durante el ensayo, el cual se mantuvo al 4% del peso corporal para todos los grupos. Esto significa que la cantidad disponible de energía consumible no es la suficiente para satisfacer la demanda que conlleva el aumento en la actividad locomotora, por lo que la cantidad de energía a disposición solo complace la tasa metabólica basal y sus funciones, es decir, no hay bastante energía para ser destinada al crecimiento somático. Sin embargo, estadísticamente no hubo diferencias, por lo tanto, solo podemos hablar de una tendencia.

En la segunda etapa del ensayo, se observó lo contrario, ya que el grupo expuesto a fotoperiodo 24L:0D mostró una mayor tendencia de crecimiento en comparación con los otros grupos. Este hecho se respalda por los valores de porcentaje de aumento, SGR y factor de condición. Curiosamente el FCR de este grupo indicó que la conversión del alimento fue menos eficiente.

Es sabido que el número de células de las poblaciones de leucocitos presentan diferentes patrones de ritmicidad a lo largo del año, y dichas variaciones estarían relacionadas con factores ambientales como la temperatura y el fotoperiodo natural. (Morgan *et al.*, 2008).

En concordancia con lo mencionado anteriormente, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son una de las células linfoides que presentan un mayor aumento, en términos de cantidad, en condiciones de verano (Goldstein *et al.*, 2023), y como este aumento puede llevar consigo la diferenciación de los Linfocitos T colaboradores. El trabajo desarrollado, analizó la influencia moduladora del fotoperiodo sobre factores de transcripción encargados de la polarización hacia los subconjuntos de células Th y genes de citoquinas características de las subpoblaciones linfoides.

Con respecto a la primera etapa del ensayo, los análisis de expresión transcripcional mostraron una disminución tanto en el factor de transcripción maestro que regula la diferenciación hacia Th1, T-bet, como de la citoquina IL-17 $\alpha$ , que es secretada cuando ocurre la polarización hacia Th17, sin embargo, en esta última no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, pero si una tendencia decreciente. También se observó una

regulación negativa en la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ 1 e IL-1 $\beta$ 1.

La disminución en la expresión de T-bet (en los regímenes 24L:0D y 14L.10D) puede influir negativamente en la respuesta de tipo 1 mediada por antígeno, ya que este corresponde a un regulador clave en la cascada de eventos necesarios para la diferenciación hacia Th1, además de desempeñar un papel crítico en la respuesta mediada por células, puesto que también es posible localizar expresión en los linfocitos T citotóxicos (Secombes, 2001). Asimismo, un aumento en la expresión transcripcional de T-bet aumenta el nivel de la actividad inmunitaria y acondiciona a los peces para infecciones futuras por medio de la generación de memoria inmunológica.

En otros trabajos realizados previamente con trucha arcoíris, se ha evidenciado que, en peces sometidos a un desafío inmunológico como por ejemplo una infección con *Y. ruckeri*, ocurre una regulación negativa en la expresión de T-bet, lo que se insinúa algún mecanismo por parte del agente patógeno para evadir y sortear la respuesta inmune del hospedero (Wang *et al.*, 2010).

Los niveles bajos de ARNm encontrados en T-bet sugieren que el desarrollo de las células Th1 podría verse afectado y con ello la defensa frente a

patógenos intracelulares, considerando que este factor de transcripción es un transactivador de citoquinas que participan en la regulación molecular de la polarización de la respuesta inmune, como IFN- $\gamma$  e IL-12. Estos resultados concuerdan y sostienen lo concluido por algunos autores quienes revelaron que en trucha arcoíris, los linfocitos T no responden a la estimulación con Concanavalina A, luego de la exposición a fotoperiodo artificial. (Leonardi y Klempau, 2003).

La disminución *a priori* de IL-17a sugiere nuevamente una influencia en diferentes mecanismos de defensa, puesto que esta interleuquina de actividad proinflamatoria induce otras citoquinas como IL-6, IL-8, además del péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina 3. Por otro lado, se ha descrito que bajo la presencia del mixozoo *Tetracapsuloides bryosalmonae*, agente etiológico de la enfermedad renal proliferativa (PKD), la reducción de IL-17a potencia los mecanismos de defensa reduciendo la patología y mejorando los anticuerpos específicos del parásito. (Gorgoglione *et al.*, 2013). Sin embargo, la disminución evidenciada en nuestros resultados no es lo suficientemente significativa en términos estadísticos para ser considerada.

Las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son importantes mediadores de la activación de linfocitos T y B, además de estar implicadas en las respuestas

proinflamatorias (Sher, 1992), por lo que la regulación a la baja del factor de necrosis tumoral (en fotoperiodo 24L:0D y 14L:10D) podría generar una reducción en la respuesta inflamatoria impactando así la capacidad de defensa frente a organismo patógenos, ya que se vería afectada la activación de fagocitos, como macrófagos, y la activación de otras citoquinas y moléculas señalizadoras. Además, se ha descrito que IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  frecuentemente se coexpresan con otros mediadores inflamatorios secretados por macrófagos, como IL-8, iNOS y COX-2, en el contexto de infecciones bacterianas y parasitarias. (Gorgoglione *et al.*, 2013).

Asimismo, IL-1 y TNF $\alpha$  son capaces de inducir una respuesta de fase aguda, tal y como sucede en vertebrados superiores, puesto que en presencia de una infección los peces pueden responder mediante la producción de proteínas de fase aguda. Las más comunes son la proteína C reactiva (PCR) y pentraxinas como el amiloide A sérico (SAA). La PCR puede opsonizar patógenos, poner en marcha el sistema del complemento aglutinando partículas, lo que interfiere en la producción de otras citoquinas. Por su parte, SAA neutraliza la actividad de patógenos, decrece el daño tisular y restablece la homeostasis. Ambos componentes de la respuesta de fase aguda tienen función reguladora limitando la infección y restableciendo el equilibrio fisiológico.

En virtud de lo observado y mencionado anteriormente, en peces mantenidos bajo fotoperiodo 24L:0D y 14L:10D se sugiere que la regulación negativa de  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 y T-bet influye de manera adversa en importantes mecanismos de defensa de los peces instaurando un ambiente inmunosupresor.

En la segunda etapa de este ensayo, es decir, luego de volver a fotoperiodo control (12L:12D), los valores de expresión relativa normalizada manifiestan un aumento en los genes analizados, observándose en tan solo quince días una tendencia a recuperar el estado inicial. Estos resultados posiblemente estarían demostrando la capacidad de resiliencia de los peces y la habilidad de producir cambios fisiológicos orientados a recuperar la homeostasis luego de un estímulo externo que en este caso fue la luz artificial. Nuevamente IL-17 $\alpha$  fue el único gen cuyas diferencias no son consideradas de un punto de vista estadístico.

Curiosamente la expresión de  $TNF\alpha$  bajo configuración de fotoperiodo 24L:0D en T4, fue considerablemente mayor a la encontrada en T0, por ende, sería interesante realizar un ensayo para determinar si estos parámetros del sistema inmunológico de trucha arcoíris se ven potenciados luego de la

exposición al estímulo lumínico, y con ello utilizar el fotoperiodo como una herramienta de manejo de la salud de los peces en condiciones de cultivo.

Estos resultados aportan nueva información sobre la interacción fotoperiodo/sistema inmune en alevines de trucha arcoíris, cuya interpretación es aplicable en el área industrial. Pero de igual manera, es necesario comprobarlo mediante un desafío inmunológico y evaluar nuevamente el nivel de transcritos de estos genes, pero bajo el contexto de una infección o en presencia de un antígeno y en un periodo de tiempo mayor al de este trabajo. Además, se recomienda repetir el ensayo utilizando otro gen *housekeeping*, puesto que en este caso  $\beta$ -actina mostró cierta variación en sus valores exacerbando los resultados de Delta Ct, lo que, si bien afecta la magnitud de los cambios, no afecta el hecho de que ocurre regulación a nivel transcripcional.

## 7. CONCLUSIONES

1.- La aplicación de fotoperiodo artificial en alevines de *O. mykiss* tiene influencia en el crecimiento somático, provocando diferentes ritmos de crecimiento entre los grupos de estudio, retardando, en mayor medida, el aumento de peso corporal en el conjunto de peces expuesto a fotoperiodo 24L:0D. Estos resultados se vieron reflejados en los índices de crecimiento como el SGR, FCR y Factor de condición.

2.- Respecto a la respuesta inmune innata, luego de 45 días de exposición a fotoperiodo artificial, se observó una regulación negativa en la expresión transcripcional en las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ 1 y TNF $\alpha$  en los grupos 24L:0D y 14L:10D. Esto podría desencadenar una reducción en la respuesta inflamatoria, afectando la capacidad de defensa innata frente a organismos patógenos.

3.- La evaluación en el nivel de transcritos de genes que codifican el factor de transcripción T-bet y la citoquina IL-17 $\alpha$ , presentaron una baja en la expresión, evidenciado en los fotoperiodos 24L:0D y 14L:10D siendo posible hallar perturbaciones en la respuesta inmune adaptativa, específicamente en

la diferenciación de los Linfocitos T hacia la línea Th1, es decir, en uno de los principales mecanismos de respuesta frente a patógenos intracelulares.

4.- El régimen de fotoperiodo de luz continua (24L:0D), tiene una mayor influencia, tanto en el retardo de crecimiento como en la regulación negativa de los genes evaluados.

5.- Luego de 15 días después de volver a la configuración de fotoperiodo control (12L:12D) se observa un “efecto rebote” en la expresión de los genes inmunológicos analizados, evidenciando una regulación positiva y tendencia a recuperar el estado inicial.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abós, B., Bailey, C., & Tafalla, C. (2022). Adaptive immunity. In *Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection* (pp. 105-140). Cham: Springer International Publishing.

Álvarez, F., Razquin, B. E., Villena, A. J., & Zapata, A. G. (1998). Seasonal changes in the lymphoid organs of wild brown trout, *Salmo trutta* L: A morphometrical study. *Veterinary immunology and immunopathology*, *64*(3), 267-278.

Aragón-Flores, E. A., Martínez-Cárdenas, L., & Valdez-Hernández, E. F. (2014). Efecto del fotoperiodo en peces de consumo cultivados en distintos tipos de sistemas experimentales. *Revista Bio Ciencias*, *3*(1), 17-27.

Badiola, M., Mendiola, D., & Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*, *51*, 26-35.

Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., ... & Barker, G. (1992). Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *100*(1-3), 141-166.

Buchmann, K., & Secombes, C. J. (2022). *Principles of fish immunology*. New York City, USA: Springer International Publishing.

Eberl, G. (2017). ROR $\gamma$ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal immunology*, *10*(1), 27-34.

Ekström, P., & Meissl, H. (2003). Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *358*(1438), 1679-1700.

Ekstrzm, P. E. T. E. R., & Meissl, H. I. L. M. A. R. (1997). The pineal organ of teleost fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *7*, 199-284.

Ergün, S., Yigit, M., & Türker, A. (2003). Growth and feed consumption of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to different photoperiods.

FAO. 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>

Fowlkes, B. J., & Schweighoffer, E. (1995). Positive selection of T cells. *Current opinion in immunology*, 7(2), 188-195.

Goldstein, M., Vallejos-Vidal, E., Wong-Benito, V., Barraza-Rojas, F., Tort, L., Reyes-Lopez, F. E., & Imarai, M. (2023). Effects of artificial photoperiods on antigen-dependent immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 137, 108759.

Gorgoglione, B., Wang, T., Secombes, C. J., & Holland, J. W. (2013). Immune gene expression profiling of Proliferative Kidney Disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals a dominance of anti-inflammatory, antibody and T helper cell-like activities. *Veterinary Research*, 44(1), 1-16.

Hessle, C. C., Andersson, B., & Wold, A. E. (2005). Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes. *Cytokine*, 30(6), 311-318.

Koskela, J., Jobling, M., & Pirhonen, J. (1997). Influence of the length of the daily feeding period on feed intake and growth of whitefish, *Coregonus lavaretus*. *Aquaculture*, 156(1-2), 35-44.

Leonardi, M. O., & Klempau, A. E. (2003). Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Aquaculture*, 221(1-4), 581-591.

Lundova, K., Matousek, J., Prokesova, M., Vanina, T., Sebesta, R., Urban, J., & Stejskal, V. (2019). The effects of a prolonged photoperiod and light source on growth, sexual maturation, fin condition, and vulnerability to fungal disease in brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture Research*, 50(1), 256-267.

Morgan, A. L., Thompson, K. D., Auchinachie, N. A., & Migaud, H. (2008). The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. *Fish & shellfish immunology*, 25(6), 791-799.

Murray, F., Bostock, J., & Fletcher, D. (2014). Review of recirculation aquaculture system technologies and their commercial application.

- Önder, M. Y., Başçınar, N., Khan, U., & Sonay, F. D. (2016). Effect of photoperiod on growth and efficiency of yolk-sac utilization in alevins of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Pakistan Journal of Zoology*, 48(2), 533-537.
- Paul, W. E., & Zhu, J. (2010). How are TH2-type immune responses initiated and amplified?. *Nature reviews immunology*, 10(4), 225-235.
- Rengarajan, J., Szabo, S. J., & Glimcher, L. H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology today*, 21(10), 479-483.
- Rubio-Godoy, M. (2010). Inmunología de los peces óseos: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(1), 47-57.
- Secombes, C. J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K. J., ... & Zou, J. (2001). Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 713-723.
- Secombes, C. J. (2022). Cytokines and immunity. In *Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection* (pp. 301-353). Cham: Springer International Publishing
- Sher, A., & Coffman, R. L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual review of immunology*, 10(1), 385-409.
- Skovbjerg, S., Martner, A., Hynsjö, L., Hessle, C., Olsen, I., Dewhirst, F. E., ... & Wold, A. E. (2010). Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 30(1), 23-32.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology*, 6(2), 127-135.
- Taylor, J. F., North, B. P., Porter, M. J. R., Bromage, N. R., & Migaud, H. (2006). Photoperiod can be used to enhance growth and improve feeding efficiency in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 256(1-4), 216-234.
- Türker, A., & Yıldırım, Ö. (2011). Interrelationship of photoperiod with growth performance and feeding of seawater farmed rainbow

trout,(*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(3).

Valenzuela, A., Campos, V., Yanez, F., Alveal, K., Gutiérrez, P., Rivas, M., ... & Oyarzun, C. (2012). Application of artificial photoperiod in fish: a factor that increases susceptibility to infectious diseases?. *Fish physiology and biochemistry*, 38, 943-950.

Valenzuela, A. E., Silva, V. M., & Klempau, A. E. (2007). Some changes in the haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three artificial photoperiod regimes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 35-48.

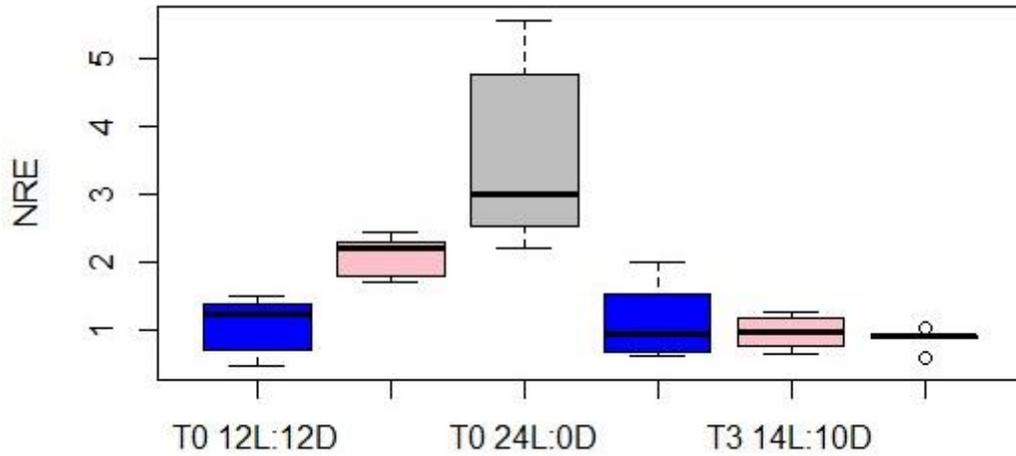
Valenzuela, A. E., Silva, V. M., & Klempau, A. E. (2008). Effects of different artificial photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 34, 159-167.

Wang, T., Holland, J. W., Martin, S. A., & Secombes, C. J. (2010). Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish & shellfish immunology*, 29(5), 705-715.

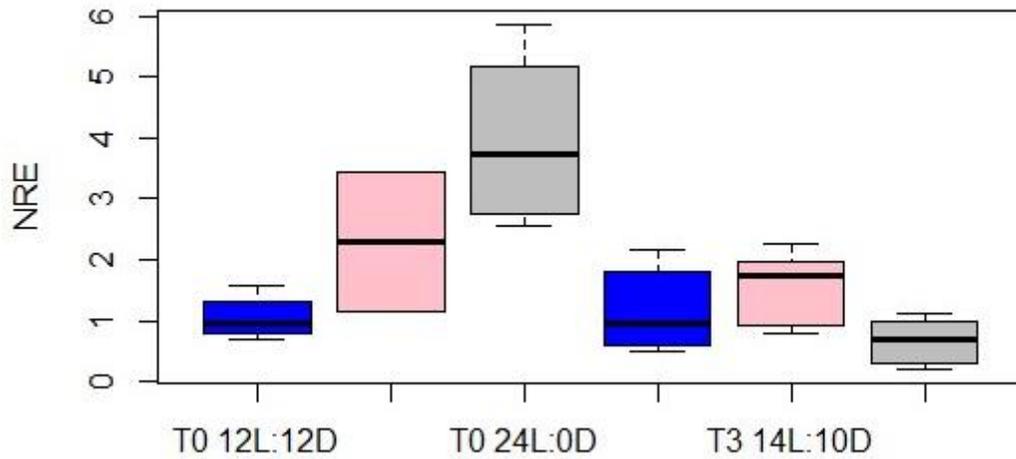
Zhu, L. Y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1-2), 39-62.

Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N. C., Ellis, A. E., & Secombes, C. J. (2003). Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(9), 813-822.

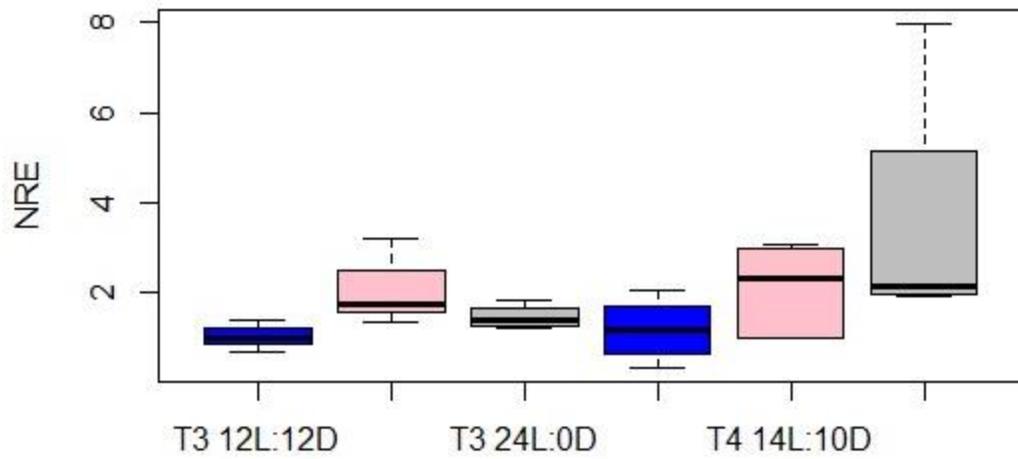
## 9. ANEXOS



**Anexo 1. Boxplot de Tbet interpretado para hallar diferencias significativas entre los fotoperiodos comparando T0 y T3.**



**Anexo 2. Boxplot de TNFα interpretado para hallar diferencias significativas entre los fotoperiodos comparando T0 y T3 (inicio y final de fotoperiodo).**



**Anexo 3. Boxplot de IL-1 $\beta$  interpretado para hallar diferencias significativas entre los fotoperiodos comparando T3 y T4.**