

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y
Recursos Naturales



**“PRESENCIA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EL
MUCUS DEL PEZ CHAME (*Dormitator latifrons*)”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentado por:

HELENA MARITZA DE LA TORRE OLVERA

MARIO IGOR DEL ROSARIO MININA

WINER DANIEL REYES CORRAL

Guayaquil – Ecuador

2012

AGRADECIMIENTO

Queremos hacer extensivas nuestros agradecimientos:

A Dios por bendecirnos y proveernos de fortaleza para alcanzar nuestras metas.

A nuestros padres que nos dieron la vida, que siempre nos han apoyado en nuestros estudios y nos han ayudado a perseguir nuestros sueños.

Al PhD. Marcelo Muñoz N. quien nos ha dirigido con paciencia, confianza y por compartir sus conocimientos a lo largo de estos años.

A nuestros profesores por confiar en nosotros y compartir su conocimiento: M.Sc. Jerry Landívar, M.Sc. Ecuador Marcillo, Blgo Marcos Álvarez, y de mas profesores de la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales.

A la Lcda. Liliana Lima y Blgo. Alberto Lino por habernos dado la oportunidad de desarrollar la tesis en sus instalaciones, por el apoyo y facilidades que nos fueron concedidos en la empresa CSA.

DEDICATORIA

A mis padres:

Mercedes Olvera y Guido De la Torre

A mi Tía Fátima

A mis hermanos:

Guido e Isaías

No sería quien soy, sin ustedes a mi
lado

Helena Maritza De la Torre Olvera

DEDICATORIA

A mis padres:

Mario Del Rosario y Olga Minina

A mis hermanas:

Verónica y Karina

Y a mis sobrinos Daniel y Juan Pablo

Mario Igor Del Rosario Minina

DEDICATORIA

A mis padres: Karen y Winer,
Para mi hermana Daniela

A mis abuelitas.

A mis amigos.

A Dalita

Winer Daniel Reyes Corral

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ms.C Ecuador Marcillo
PRESIDENTE

Ph.D. Marcelo Muñoz
DIRECTOR DE TESIS

Blgo. Marco Álvarez
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La Responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Helena Maritza De la Torre
Olvera

Mario Igor Del Rosario Minina

Winer Daniel Reyes Corral

RESUMEN

El presente trabajo describe la presencia de actividad antimicrobiana del mucus del pez chame (*Dormitator latifrons*) ante la presencia de diferentes bacterias de tipo Gram (+) y Gram (-). De esta forma, se demostró un efecto inhibitorio del mucus de chame sobre 2 de 3 cepas de tipo bacilo analizadas (*Bacilo sp.1*, *Bacilo sp.2* y *Bacilo sp.3*). Además, se determinó la existencia de un fuerte efecto inhibitorio del mucus de chame sobre cepas de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio harveyi*. También se observó en menor magnitud efecto inhibitorio sobre una cepa de *Vibrio anguillarum*.

La información preliminar obtenida en este estudio sugiere la presencia de agentes antibacterianos en el mucus del pez chame, los cuales podrían ser utilizados en un futuro con una aplicación en salud animal y humana.

Palabra Clave: Chame, *Dormitator latifrons*, péptidos antimicrobianos, inmunidad innata, actividad humoral, inhibición bacteriana.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	VIII
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
1.1. Características <i>Dormitator latifrons</i>	4
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	5
1.1.2 Características Morfológicas.....	5
1.1.3 Reproducción del Chame	6
1.1.4 Cortejo y desove.....	7
1.1.5 Adaptaciones Únicas.....	10
1.1.6 Hábitos Alimenticios.....	10
1.2 Distribución General	10
1.2.1 Distribución en la provincia de Manabí.....	11
1.3 Sistema inmune en peces	13
1.3.1 Generalidades.....	13
1.3.2 Ontogenia del Sistema inmune	14
1.3.3 Órganos linfoides	15
1.3.3.1 Timo	16
1.3.3.2 Riñón.....	16
1.3.3.3 Bazo	17
1.3.4 Sistema inmune adquirido.....	18
1.3.4.1 Anticuerpos	18
1.3.4.2 Memoria Inmunológica.....	19
1.3.4.3 Citotoxicidad Celular	20
1.3.5 Sistema inmune innato	21
1.3.5.1 Barreras Físicas	22
1.3.5.2 Citotoxicidad Celular no específica	22
1.3.5.3 Fagocitosis	23
1.3.5.4 Complemento	24
1.3.5.5 Factor de Necrosis Tumoral (TNF).....	25
1.3.5.6 Interferon (INF).....	25
1.3.5.7 Interleucina.....	26
1.3.5.8 Inhibidores de proteasas	27
1.3.5.9 Lisozimas	27

1.3.5.10 Anticuerpos Naturales.....	28
1.3.5.11 Pentraxinas.....	28
1.3.5.12 Transferrinas.....	29
1.3.5.13 Péptidos antimicrobianos.....	29
A. Pleurocidin.....	30
B. Mixinidina.....	30
C. Parasin I.....	31
D. Chrysophysin.....	31
E. Moronecidin.....	31
F. Oncorhyncin III.....	32
1.4 Aplicaciones de los Péptidos Antimicrobianos en la Acuicultura.....	32
1.5 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.....	34
1.6 Inmunofisiología de peces.....	37
1.6.1 Sensibilidad al estrés.....	39
1.6.2 Sensibilidad a la temperatura.....	40
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
2.1 Material biológico.....	42
2.1.1 Chame.....	42
2.1.2 Bacterias.....	43
2.2 Ensayos de actividad antibacteriana por halos de inhibición.....	44
2.3 Ensayos turbidométricos.....	45
2.4 Análisis estadísticos.....	46
3. RESULTADOS.....	47
Ensayos con <i>Bacillus sp</i>	49
Ensayos con Vibrios.....	56
4. DISCUSIÓN.....	65
RECOMENDACIONES.....	69
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	73

ABREVIATURA

AMP	Péptidos antimicrobianas		Infección Hematopoyética
ANOVA	Análisis de Varianza	INF	Interferon
CD3	Cúmulo de Diferenciación	IPNV	Virus Pancreático Infeccioso
CD8	Cúmulo de Diferenciación	ISAV	Virus Anemia Infecciosa del Salmón
CMM	Centros melanomacrófagos	MC	Mucus Chame
CRP	Proteína C-reactiva	MHC	Complejo Mayor Histocompatibilidad
CT	Control (+)(-)	ml	Mililitro
DO	Densidad Óptica	mm	Milímetro
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético	mRNA	dsRNA, RNA
ELISA	Ensayo por Inmuno absorción ligado por enzimas	NK	Natural Killer
HPA	Eje adrenal-pituitario-hipotalámico	nm	nanometro
HPF	Horas post Fertilización	OAS	Sintetasa 2,5 oligoadenilada
HPI	Interrenal-pituitario-hipotalámico	PKR	Proteína Kinasa dsRNA activada
IC	Interleukina	PPM	Partes por millón
Ig+	Inmunoglobulinas +	SAA	Proteína amiloides de suero
IgD	Inmunoglobulinas D	TCR	Receptor célula T
IgM	Inmunoglobulina M	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IHNV	Virus Necrosis de	UFC	Unidades formadoras de colonias
		VHSV	Virus Hemorrágico Septcemia
		μM	Micromolar

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I Número de células por ml por cepa _____	49
Tabla II Resumen de la tasa de crecimiento de las diferentes especies de <i>Bacillus sp</i> _____	55
Tabla III Resumen de los porcentajes de inhibición de los tratamientos _____	56
Tabla IV Resumen de la tasa de crecimiento de las diferentes especies de vibrios: <i>V.alginolyticus, V. harveyi, V.vulnificus, V.anguillarum</i> _____	64
Tabla V Resumen de los porcentajes de inhibición de los tratamientos hacia las diferentes hacia las especies de <i>Vibrio</i> _____	64

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Esquema del mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos y la formación del poro _____	36
Gráfico 2 Tasa de crecimiento del <i>Bacillus sp</i> 1 _____	50
Gráfico 3 Porcentaje de Inhibición del mucus frente al <i>Bacillus sp</i> 1 _____	51
Gráfico 4 Crecimiento medido por absorbancia del <i>Bacillus sp</i> 2 _____	52
Gráfico 5 Porcentaje de inhibición del <i>Bacillus sp</i> 2 _____	53
Gráfico 6 Tasa de crecimiento medido por absorbancia del <i>Bacillus sp</i> 3 _____	54
Gráfico 7 Porcentaje de Inhibición del <i>Bacillus sp</i> 3 _____	55
Gráfico 8 Determinación de la absorbancia del vibrio <i>V.alginolyticus</i> _____	57
Gráfico 9 Porcentaje de inhibición del mucus hacia el <i>V.alginolyticus</i> _____	57
Gráfico 10 Determinación de la absorbancia del vibrio <i>V.harveyi</i> _____	59
Gráfico 11 Porcentaje de inhibición de los tratamientos frente al <i>V.harveyi</i> _____	59
Gráfico 12 Determinación de la absorbancia del vibrio <i>V.vulnificus</i> _____	61
Gráfico 13 Porcentaje de inhibición <i>V.vulnificus</i> _____	61
Gráfico 14 Determinación de la absorbancia del vibrio <i>V.anguillarum</i> _____	63
Gráfico 15 Porcentaje de inhibición de los tratamientos frente al <i>V.anguillarum</i> _____	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de método de inhibición	44
Figura 2 Fotografía Halo de Inhibición	48

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1	Mapa de la zona de la Segua	_____	13
---------------	-----------------------------	-------	----

INTRODUCCIÓN

El chame (*Dormitator latifrons*), perteneciente a la familia Eleotridae es de amplia distribución a lo largo de las costas del Pacífico de nuestra América, que comprende desde el sur de California hasta el norte del Perú. En nuestro país se lo encuentra en: el estuario de San Lorenzo y delta del río Esmeraldas, delta del río Chone, río Portoviejo, delta del río Guayas y estuario de Santa Rosa. Este pez dado a las bondades que presenta para los cultivos acuícolas, es producido de una manera artesanal en especial en la provincia de Manabí en las tradicionales chameras (1). El presente trabajo aborda una temática suscripta al aspecto microbiológico relacionado con la acción de las células mucosas glandulares que se extienden hasta dentro de la dermis del animal y se encuentra ampliamente distribuida entre las células planas de la epidermis del chame. Estas células secretan mucus, este producto glandular cumple múltiples funciones: permite al animal un mejor desplazamiento en su medio, la mucosidad puede ser que tenga la misión de expulsar microorganismos, sustancias irritantes, el olor característico del chame está contenido en el mucus. Además, el mucus complementaría una acción inter-específica de comunicación dentro de los cardúmenes de los peces (2).

En condiciones naturales de las ciénagas, hábitat preferido por estos peces, son espacios abiertos que no brindan una buena calidad de agua, con flora circundante abundante, es propicia para la propagación de agentes patógenos peyorativos a estos

nichos ecológicos y que el chame a través de una hipersecreción de mucus por sus células glandulares bloquearían la acción de virus y bacterias nocivas.

En otras especies de peces se ha determinado la presencia de actividad antimicrobiana en extractos de proteicos de mucus (3,4), además la actividad de ciertas enzimas como la L-amino oxidasa ácida con propiedades antibacterianas se ha puesto de manifiesto en *Sebastes schelegeli* (5). Estos trabajos demuestran que el mucus de los peces puede funcionar como parte de su sistema inmune innato. En donde, este sistema sería la primera barrera de defensa de estos peces, protegiéndolos en cierto modo de algunos microorganismos presentes en sus hábitat. En otros trabajos se ha demostrado la presencia de péptidos antimicrobianos presentes en el mucus y células epiteliales de diferentes especies de peces como las pleurocidinas en el lenguado (6), oncorhycina en la trucha (7) , moronecidina en striped bass (8), myxinidin en el mixino (9) y parasina en el bagre (10,11).

El presente trabajo intenta demostrar la presencia de actividad antibacteriana en el mucus secretado por las células epidermales del pez chame (*Dormitator latrifrons*) utilizando para este fin bacterias de tipo Gram (+) y Gram (-). El uso de ambos tipos de bacterias tiene el objetivo de demostrar que la actividad antibacteriana en el mucus del chame tiene un amplio espectro de acción.

El presente trabajo pretende servir como base para recuperar el interés en el cultivo de esta y otras especies tradicionales olvidadas. No solo aprovechando su carne, sino demostrando usos no tradicionales en peces cultivados, otorgando nuevos principios sobre diversos usos no explotados anteriormente, y gracias a ello, reactivar este sector, beneficiando a la población al promover el interés por esta especie. De ese modo, se le daría un impulso al sector acuícola para buscar nuevos usos de nuestros recursos explotados y sin explotar, y así, aprovechar todos los recursos tradicionales y no tradicionales de nuestro país.

Además, este trabajo da la pauta a que se eduque a la población y se la incentive a mantener sus tradiciones, especialmente a las nuevas generaciones y que se busque nuevas utilidades para las especies locales aumentando su valor comercial.

CAPITULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. Características *Dormitator latifrons*

El Chame, también conocido como Chalaco (*Dormitator latifrons*) es un pez del litoral ecuatoriano que se caracteriza por presentar un:

“Cuerpo corto y robusto, ligeramente comprimido, con una coloración azul verdoso oscuro; su cabeza ancha con 4 barras oscuras irregulares por detrás del ojo y una barra oblicua a continuación, el maxilar llega al margen anterior de la órbita. Aletas pares con puntuaciones oscuras; dorsal con manchas oscuras regulares; caudal con las membranas interradiales muy oscuras”. (1).

Estos ejemplares también reciben el nombre de “peces dormilones” o “sleepers” debido a que permanecen en el fondo del agua en una actitud de reposo. Debido a su amplia distribución esta misma especie tiene diferentes nombres, a continuación mencionaremos unos cuantos.

Nombres comunes del Chame en diferentes países:

California <i>Broad headed sleeper</i> –	California <i>Western Sleeper</i>
México <i>Pujeque, Popoyote, Chame</i>	Guatemala <i>Pupo Negro</i>
El Salvador <i>Sambo</i>	Panamá <i>Poroco</i>
Ecuador <i>Chame, Chalaco</i>	Perú <i>Monemque</i>

(Fuente: Elaborado por los autores)

1.1.1 Clasificación taxonómica

Phylum *Chordata*

Serie *Pices*

Clase *Teleostei*

Subclase *Actinopterygii*

Orden *Perciformes*

Suborden *Gobioidea*

Familia *Eleotridae*

Género *Dormitator*

Especie *Dormitator latrifrons*

(Fuente: Elaborado por los autores)

1.1.2 Características Morfológicas

Este pez puede llegar a pesar hasta 2,500 gramos; y medir una longitud de hasta 61 cm.

Estos peces se desarrollan en su ambiente de manera muy tranquila, pues no son agresivos son de hábitat estuarinos, es decir se pueden desarrollar tanto

en agua salada como en agua dulce. Pueden tolerar temperaturas que van desde los 10 hasta aproximadamente 40 grados centígrados. Y soportan amplias oscilaciones en lo que respecta a las concentraciones salinas del agua; lo cual lo hace resistente a vivir en aguas con 40 ppm de salinidad e inclusive puede ser cambiado repentinamente al agua dulce en cuestión de minutos(1).

1.1.3 Reproducción del Chame

Las especies hembra y macho del chame se pueden reconocer fácilmente. Además del color que los diferencia, los machos son rojizos y tienen una papila genital triangular sin filamentos. Durante la época de reproducción el vientre es de color rojizo y abultado, y se observa en la cabeza una prominencia de consistencia suave. Al presionar el vientre sale esperma por la papila genital(1).

En cambio las hembras son de color más oscuro, y se puede observar que la papila genital es cuadrangular y está provista de pequeños filamentos. Durante la época de reproducción el vientre es amarillento y bastante abultado. Al presionar el vientre salen los óvulos por la papila genital(1).

El ciclo reproductivo del chame dura aproximadamente 12 meses, y comprende de 4 fases. La primera fase es la juvenil: los peces nacidos en ese año. La segunda fase es la de crecimiento de la gónada hasta alcanzar su

maduración. Luego viene una tercera fase donde se produce una liberación de gametos (desove) y la última fase donde los gametos que no fueron expulsados son absorbidos.

No se conoce con exactitud la duración exacta de cada una de estas fases. Sin embargo se sabe que en los peces adultos la fase de crecimiento y la de reabsorción de los gametos tienen períodos más largos que la fase de expulsión de los gametos. También se ha observado sincronización de las fases en ambos sexos de esta especie.

Se estima que los ovarios de una hembra del chame sexualmente madura y en fase de crecimiento poseen un promedio de seis millones de oocitos. Existe una relación entre el tamaño del pez y el número de oocitos presentes en los ovarios, es decir que a mayor longitud mayor número de oocitos. También existe una relación directa entre la longitud del pez y peso. Además de presentar un aumento de peso a partir de los 150 mm de longitud. Lo que se considera un chame maduro sexualmente a partir de esa longitud (12).

1.1.4 Cortejo y desove

El chame al igual que otras especies migratorias responden con cambios fisiológicos a ciertos factores ambientales como la lluvia, temperatura,

salinidad. Los cuales están relacionados con aumento y variedad de alimento y condiciones óptimas para la supervivencia de larvas.

Con las lluvias en los meses de invierno aumenta la cantidad de alimento y usan esta energía para su desarrollo gonadal. Se puede anotar que en el momento de la reproducción el macho adquiere una coloración más viva, rojiza en el vientre, negra azulada en la porción inferior del opérculo y presenta un abultamiento en la cabeza, mientras que el vientre de la hembra se vuelve más amarillo y abultado hacia la papila genital, la cual se encuentra dilatada y acompañada por movimientos vibrátiles. No se observa abultamiento en la cabeza.

Durante el cortejo el macho tiene movimientos circulares ascendentes alrededor de la hembra y por momentos se observan movimientos contráctiles del cuerpo. El macho presenta comportamiento territorial impidiendo que se acerque ningún otro macho. Cuando la hembra trata de alejarse él la atrae al lugar donde estaban antes(1)(12).

Por su parte la hembra también presenta pequeños movimientos circulares, la papila genital rastrea el sustrato más cercano con movimientos vibrátiles, la cabeza se mantiene dirigida hacia abajo(1)(12).

En el momento del desove, aproximadamente dos horas después de iniciado el cortejo, la hembra empieza a liberar, sobre el sustrato, a los óvulos que salen en grupo como listones. Algunos no logran adherirse al sustrato y flotan en la columna de agua. La hembra no deja que el macho se acerque rechazándolo con golpes de cabeza. Una vez que la hembra se ha retirado, el macho se acerca al lugar de puesta y con movimiento vibrátiles de la papila genital expulsa el semen sobre los huevos.

Además de las lluvias la corriente de los ríos cumple un papel importante ya que al aumentar la cantidad de agua tanto en los ríos como en las ciénegas y con la corriente los peces son arrastrados río abajo, hasta el manglar, donde ocurre el desove. Los huevos quedan sostenidos con delgados filamentos adherentes a raíces de las plantas acuáticas y al eclosionar las larvas se pueden observar que remontan río arriba hasta el área nodriza ubicada en el estuario, donde encuentran todas las condiciones necesarias para la alimentación y crecimiento.

Aquí las larvas alcanzan un promedio de 20 mm de longitud e inician la migración hacia el agua dulce en busca del hábitat del chame adulto. La migración de los juveniles coincide con las mareas y los que no lograron salir detienen su crecimiento (12).

1.1.5 Adaptaciones Únicas

Se aprecia que en la región dorsal posee una alta vascularización, que al ser presionada levemente sangra con facilidad. A través de esta zona el chame realiza intercambio gaseoso con el aire solventando la hipoxia del medio. El chame soporta concentraciones bajas de oxígeno desde 1 ppm y sus branquias no colapsan cuando están fuera del agua; se mantienen húmedas y en intercambio gaseoso es cutáneo. Esta adaptación le permite al chame vivir fuera del agua, en ambiente húmedo, de tres a cinco días. Comportándose de manera normal después de un tiempo en el que es devuelto al agua.

1.1.6 Hábitos Alimenticios

Es un pez que se alimenta básicamente del detritus natural de su hábitat. Es también filtrador, sus branquiespinas se encuentran muy desarrolladas.

1.2 Distribución General

La distribución geográfica del chame se extiende a lo largo de la costa del Pacífico, desde el sur de California (Palos Verdes), atravesando México; América Central, y llegando hasta el norte de Perú.

En nuestro país, el *D. latifrons* se encuentra ampliamente distribuido en los estuarios del litoral. En la provincia de Esmeraldas (Estuario del río Esmeraldas); en la provincia de Manabí (río Chone, río Portoviejo, en zonas colindantes con el cantón Chone, Calceta, Tosagua, Pedernales, Charapotó, Barquero, Simbocal); en la provincia del Guayas (márgenes del Estero Salado, río Guayas, y muy escasamente, en el río Babahoyo y Vinces); finalmente en la provincia de El Oro (estuario de Santa Rosa)(1).

Se lo semicultiva y consume de manera especial en la provincia de Manabí, donde tiene gran aceptación en el consumo humano.

1.2.1 Distribución en la provincia de Manabí

En la Provincia de Manabí hay zonas naturales de reproducción y crecimiento de chame. El humedal La Segua es una zona principalmente de crecimiento. Mientras que las zonas de reproducción y/o desove se ubican en las zonas de influencia del estuario de Chone, estos son: Larrea, Simbocal, Barquero y zonas cercanas a las camaroneras que se encuentran en el estuario de Chone, lugares propicios para la reproducción del chame. Los pescadores locales se dedican a la captura de semillas o de adultos para crecimiento engorde o para su comercialización directa.

Se sabe que en algunos peces de las zonas estuarinas, la salinidad es un factor que tiene influencia en la activación de la maduración de los oocitos. Esta situación podría ser válida para el chame debido a que se encuentra tanto en agua dulce como en salobre.

Los pescadores locales refieren que la semilla capturada en recintos naturales de la zona de la Segua y demás zonas cercanas, es la más idónea para el cultivo debido a que según ellos, crece más rápido que la capturada en piscinas camaroneras como ocurre en la Provincia de Esmeraldas. Chone es uno de los cantones donde se cultiva el chame en piscinas, mientras que en el cantón Tosagua se lo cultiva en albarradas que son encierros adaptados en medios naturales donde vive el chame(1).

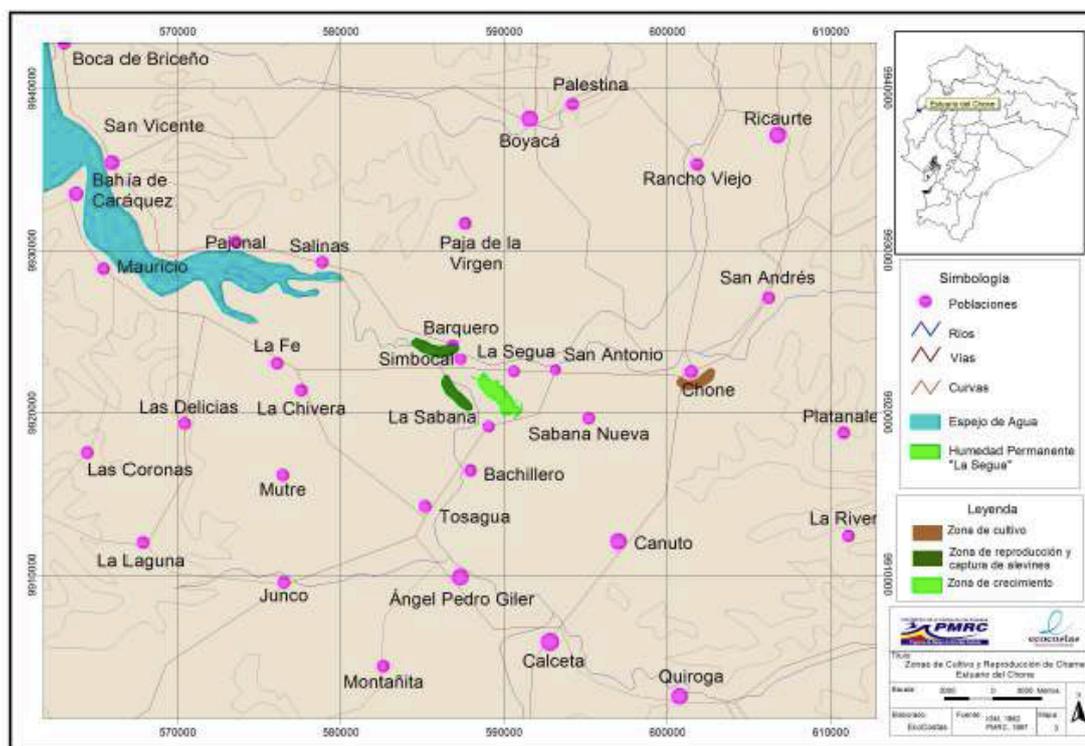


Ilustración 1 Mapa de la zona de la Segua

Mapa de la zona de La Segua, principal zona de recolección de chame en Manabí, la zonas de color café indican zonas de cultivo en Chone, la zona verde oscuro indican las zonas de reproducción y captura de chame, mientras que las zonas de color verde claro son las zonas de crecimiento (12). (Fuente: Tomado del Informe final del proyecto chame, Campos).

1.3 Sistema inmune en peces

1.3.1 Generalidades

Al encontrarse los peces en el paso evolutivo intermedio, estos poseen una mezcla entre los sistemas inmunes innatos o no específicos y adquiridos o específicos de animales mas complejos. Los peces al encontrarse en medios tanto marinos como dulce acuícolas, sumergidos en estos desarrollaron medios de defensa en las vías mas sensibles al ingreso de patógenos como son la boca, branquias ,

intestino y piel.

1.3.2 Ontogenia del Sistema inmune

La ontogenia del sistema inmune de los peces teleósteos, ha sido estudiada en diversas especies, incluyendo a la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre (*Ictalurus punctatus*), pez zebra (*Danio rerio*) y meros (*Acanthistius brasiliensis*). Estos peces, han sido descritos como modelos primitivos de hematopoyesis. El primer órgano hematopoyético es llamado la masa intermedia de células. Con respecto al desarrollo de los órganos involucrados en la respuesta inmune, se considera que el riñón anterior y el timo se completan antes de que la eclosión ocurra en truchas arcoiris y salmón Atlántico (13), pero esto no ha sido clarificado al final de la incubación en muchas especies marinas principalmente.

A pesar de estas diferencias, la secuencia del desarrollo de los órganos linfomieloicos en teleósteos es la siguiente: riñón, bazo y timo (14,15). Las células de linaje mielóico pueden ser encontradas alrededor del saco vitelino a partir de las 24 horas post fertilización (hpf), pero no han sido observadas en la masa intermedia de células. Los mieloblastos y mielocitos neutrófilos han sido observados entre 34 y 48 hpf. Por otra parte numerosos eritrocitos circundantes en vasos sanguíneos y granulocitos maduros han sido encontrados en el sistema sanguíneo en el tejido

conectivo que envuelve el saco vitelino a las 34 hpf, y luego a los primeros túbulos renales adyacentes a las 48hpf.

Adicionalmente, mielocitos y neutrófilos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos durante el mismo periodo. Los neutrófilos maduros son descritos en varios tejidos a las 72 hpf (16)(17).

Por otra parte, las primeras apariciones de IgM (Inmunoglobulina M) en linfocitos varían considerablemente entre especies de peces (18)(19)(20)(21). Sin embargo, la primera aparición de linfocitos B e inmunoglobulinas es tardía en especies marinas, en comparación con especies de agua dulce (22).

Adicionalmente, se ha notado la transferencia de anticuerpos maternos a huevos y embriones en distintas especies (23). Adicionalmente, se ha sugerido que el rol primario de los anticuerpos maternos es el de proteger los huevos contra la transferencia vertical de ciertos patógenos o que los IgM maternos podrían ayudar a la fagocitosis o la activación de las rutas complemento en las etapas tempranas del desarrollo; incluso IgM podrían funcionar como proteínas nutritivas del saco vitelino (20)(21).

1.3.3 Órganos linfoides

El timo, riñón (anterior y medio) y el bazo son los órganos linfoides mas grandes en los teleósteos (24). En teleósteos de agua dulce, el timo es el primer

órgano en volverse linfóico, pero antes de este evento, el riñón anterior podría contener progenitores hematopoyéticos, pero no linfocitos (25).

1.3.3.1 Timo

Este órgano tiene dos lóbulos, es homogéneo y está representado por una delgada hoja de tejido linfóico oval que está arreglada subcutáneamente en la comisura dorsal del opérculo y está linealizada por tejido mucoso del epitelio faringeo (26). La estructura que caracteriza el timo de un pez, es la cápsula que envuelve la corteza del tejido linfóico. Básicamente, el timo puede ser considerado como un agregado de macrófagos que promueve la proliferación encapsulada de células T (27). La diferenciación de la estructura tímica es altamente variable en los teleosteos; y en muchas especies, no es posible observar una diferencia clara entre la corteza y médula que es encontrada en vertebrados superiores (28).

Otros estudios describieron la aparición de nidos focales de epitelio, también conocidos como corpúsculos de Hassal (24). El timo es el responsable por la producción de células T. En los peces cebras, el desarrollo del timo involucra las células de la cresta neural derivadas del neuroectodermo, el cuál migra a la tercera y cuarta bolsa faríngea, la cual interactúa con el endodermo (29).

1.3.3.2 Riñón

El riñón en peces teleosteos es el equivalente de la médula ósea en vertebrados y es el mayor sitio de hematopoyesis hasta la adultez (24). En la trucha

arcoiris, el riñón esta bien desarrollado antes de eclosionar, cuando principalmente produce células sanguíneas rojas y granulocitos. Estudios sugieren la presencia de células linfoideas que liberan IgM entre 12 y 14 dpf (días después de fecundado)(30) y ha demostrado dos variantes de IgM por ELISA en embriones 8 días antes de la terminación del periodo de incubación (31). Este hallazgo sugiere que la fuente de células B existen antes del final del periodo de incubación en el riñón o en otros sitios hematopoyéticos. Estructuralmente, el riñón anterior esta compuesto de una red de fibras reticulares que proveen soporte para el tejido linfático y que son encontradas dispersadas entre las células del sistema hematopoyético (32).

Las principales células encontradas en el riñón anterior son macrófagos, los cuales son agregados en estructuras llamados centros melanomacrófagos (CMMs) y células linfóicas, las cuales son encontradas en todas las etapas de desarrollo, que existen mayormente como células Ig⁺ (células B) (32).

1.3.3.3 Bazo

El bazo esta compuesto de un sistema de elipsoides esplénicas. CMMs y tejido linfático. En la mayoría de las especies, estos elipsoides están agrupados juntos y son organizados alrededor de otros dos componentes (33). Los elipsoides son capilares de paredes gruesas que se abren en la pulpa y resultan de la división de las arteriolas esplénicas. Las células a lo largo de las paredes son activamente involucradas en la fagocitosis por macrófagos de antígenos.

1.3.4 Sistema inmune adquirido

El sistema inmune específico ocurre a través del mecanismo que está involucrado en una compleja red de células especializadas, proteínas, genes y mensajes bioquímicos que proveen los medios necesarios para el cuerpo y la respuesta específica de antígenos, anticuerpos, células efectoras con una alta especificidad y afinidad.

1.3.4.1 Anticuerpos

La inmunoglobulina dominante en los teleósteos es un tetrámero de tipo IgM y contiene ocho sitios de anclaje de antígenos (34). Algunos teleósteos tienen un monómero de IgM en su suero, aunque los factores que lideran a la expresión son todavía desconocidos (35). La afinidad de unión de los monómeros y tetrámeros IgM en la trucha arcoiris son similares, pero en el tetrámero IgM, el complejo activo es más efectivo que la forma monómero debido a las diferencias estructurales en la porción Fc. (fragmento cristalizante) de la molécula (36). IgD fue el segundo isotipo de inmunoglobulinas identificados en el pez, específicamente en el bagre, debido a la secuencia similar con IgD en mamíferos, es localizado inmediatamente debajo del gen IgM y es expresado en las células B (35). Además la concentración de IgM en el suero de los salmónidos es extremadamente bajo comparado con otros teleósteos como la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (37), Cyprinidae (38) y algunos perciformes (39). Sin embargo, la cantidad de IgM en el suero de trucha café (*Salmo trutta*) y la trucha arcoiris que son infectados o aclimatados a una alta temperatura de (19°C) alcanzar esos valores similares a aquellos en el bacalao y egelefino

(*Melanogrammus aeglefinus*). Además, los niveles IgM en salmón y en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) varía con el tamaño (19)(31), temperatura (31), y la calidad del agua que varía por la estación (19,40). Los anticuerpos de los teleósteos son encontrados en la piel (41), intestino (42), mucus de las branquias (43), bilis (44,45), y en el plasma. La respuesta inmune de la piel y las branquias son importantes debido a que estos órganos están en contacto directo con el medio ambiente. Anticuerpos específicos pueden ser generados en la piel, intestino (46) y branquias (43) sin la necesidad de generar un sistema de respuesta.

1.3.4.2 Memoria Inmunológica

Los peces desarrollan una respuesta de memoria antes de una segunda exposición ante un antígeno (47)(48). La trucha arcoiris responde a una subóptima dosis de ambos linfocitos T en un antígeno-dependiente y de modo independiente después una exposición inicial ante el mismo antígeno (47). Es notable que es necesario dos exposiciones antes que el pez responda a una segunda administración de antígenos T-dependientes, contrario al antígeno T-independiente que requiere una sola exposición. Además, mientras que la respuesta es rápida y tienen una gran magnitud que la primera respuesta, el número de antígenos-específicos de las células B en el bazo es directamente proporcional a la frecuencia de las células B de antígenos específicos en el precursor. Este descubrimiento sugiere que la respuesta secundaria es causada por la expansión del grupos de la memoria de las células B (49) y no diferencias específicas en los anticuerpos. Sin embargo, la respuesta a

niveles subóptimos de anticuerpos sugiere que tal vez las células B con su gran afinidad fueron seleccionadas como células B de memoria (50).

1.3.4.3 Citotoxicidad Celular

Los leucocitos del pez son capaces de generar reacciones de citotoxicidad celular, que ha sido demostrado en varias especies de peces. Sin embargo, las células que son responsables por la intervención de las células citotóxicas en el pez son difíciles de caracterizar debido a la falta de herramientas apropiadas para el reconocimiento celular y molecular (51). En mamíferos, la respuesta inmune adaptativa implementada por CD8⁺ (cúmulo de diferenciación) citotóxica linfocitos T han demostrado ser críticos en el combate contra varias infecciones virales. Estos linfocitos reconocen y matan células con péptidos derivados de virus usando moléculas clase MHC I (complejo de múltiple histocompatibilidad).

Varios estudios indican que este mecanismo de células muertas también existen en los peces. La secuenciación de los homólogos en peces del MHC clase I y CD3⁺ células T sugieren que el CD8⁺ MHC clase I presentan una similitud que se encuentra también en los mamíferos superiores (51). Además, se ha encontrado un anticuerpo monoclonal contra la proteína recombinante Onmy-UBA*501, el MHC clase I molécula de la trucha arcoiris, las cuales son expresadas en el mismo tipo de célula que los clásicos mamíferos MHC mamífero clase I moléculas (52). Como otros vertebrados, el pez adquiere inmunocompetencia durante la ontogenia, en el róbalo (*Dicentrarchus labrax L.*), las células T aparecen temprano en el desarrollo larvario y al menos cinco días después del inicio de incubación. Han demostrado

que en la trucha arcoiris la transcripción de células CD8⁺ T y MHC clase I son detectables una semana después de la inseminación, mientras que el TCR mRNA en células T aparecen una semana después de la inseminación(51). Las moléculas MHC clase I y CD8 son expresadas desde la etapa larval, sugiriendo que desde muy jóvenes los peces pueden estar vacunados para desarrollar una inmunidad celular. En realidad, al día 14 después de terminar la incubación de las jóvenes carpas pueden destruir el injerto de piel, el proceso acompañado por la infiltración de los linfocitos T citotóxicos (53).

1.3.5 Sistema inmune innato

En los peces, la respuesta innata es considerada como un componente esencial ante la respuesta frente a un patógeno debido a las limitaciones presentes en el sistema inmune adquirido . Su naturaleza ectodérmica, su limitado repertorio de anticuerpo y la baja proliferación, maduración y memoria de sus linfocitos (54). Es por eso que se ramifica en tres barreras: epitelial/barrera mucosa, respuesta humoral y los componente celulares. El epitelio y la barrera mucosa de la piel, branquias y el tracto alimenticio son extremadamente importantes como barrera contra los patógenos en los peces, debido a que estos siempre se encuentran sumergidos en medios que pueden contener agentes potencialmente dañinos (20). Este tipo de respuesta requieren una serie de mecanismos que envuelven factores humorales, células y tejidos, péptidos antimicrobianos y factores complementarios. Factores

humorales pueden ser receptores celulares o moleculares que son solubles en el plasma y en otros fluidos corporales (21)(55)(56)(57).

1.3.5.1 Barreras Físicas

Las escamas, mucus de la piel y branquias son las primeras barreras físicas ante una infección (58)(59)(26). El mucus de la piel contiene lectinas, pentraxinas, lisozima, proteínas complementarias, péptidos antibacteriales e inmunoglobulina M (IgM) quien tiene un importante rol en la inhibición de la entrada de patógenos (42)(60)(61)(62). Adicionalmente, la epidermis es capaz de reaccionar a diferentes ataques (engrosamiento e hiperplasia celular) y su integridad es gracias al balance osmótico y prevenir la entrada de agentes foráneos (63). también poseen células de defensa como son linfocitos, macrófagos y células granuladas eosinófilos (64)(26) (51).

1.3.5.2 Citotoxicidad Celular no específica

En mamíferos, las respuestas no específicas son en general ejecutadas por células citotóxicas, conocidas como células natural killer (NK). Aunque las células citotóxicas no específicas en el bagre son morfológicamente distintas de las celular linfocitos grandes granulas de los mamíferos (large granular lymphocytes), se ha sugerido que su función es similar (65). Estas células son capaces de eliminar

instantáneamente un rango de objetivos xenogénicos, incluidos parásitos de peces y los tradicionales objetivos de las células natural killer en mamíferos (66). A diferencia de las células natural killer en mamíferos, las células citotóxicas no específicas en el bagre son granulares, es común encontrar pequeños linfocitos en tejido linfoide, como en el riñón anterior y el bazo, pero es muy raro encontrarlo en la sangre (67). Adicionalmente al caso del bagre, las células citotóxicas no específicas han mostrado actividad en otras especies de peces, incluidas la trucha arcoiris, la carpa común (*Cyprinus carpio*) (68), pez damisela (*Dascyllus albisella*) (69) y tilapia (*Oreochromis* sp.) (70).

1.3.5.3 Fagocitosis

Fagocitosis es uno de los procesos mas importantes en los animales ectodérmicos debido que es el proceso menos influenciado por la temperatura (71)(72) (19) (21). La células principales envuelta en fagocitosis en los peces son losóneutrófilos y macrófagos (73). Estas células remueven bacterias principalmente por la producción de reactivos de oxígeno durante la respiración. Adicional, los neutrófilos poseen mieloperoxidasa en sus gránulos citoplasmáticos, en los cuales la presencia de haluro y peróxido de hidrógeno mata la bacteria por halogenización de la pared bacteriana. Además estas células tienen lisozimas y otras enzimas hidrolíticas en sus lisosomas (51). Similar los macrófagos pueden producir óxido nítrico en mamíferos y puede ser potente como agente bacteriano, peroxinitritos y grupo hidroxilo (74)

1.3.5.4 Complemento

El sistema complemento en teleósteos, al igual que en vertebrados superiores, puede ser activada en tres formas: la ruta clásica cual es desencadenada por la unión del anticuerpo con la superficie celular (75), la ruta alternativa cual es independiente de los anticuerpos y es activado directamente por un microorganismo foráneo, y la ruta lectinas la cual es activada por la unión del complejo proteínico consiste en el vínculo manosa/mannan lectinas en la pared celular (76). Sin embargo el mecanismo y las moléculas involucradas en el sistema en teleósteos no son bien comprendidos, con la excepción de la secuencia genética de la manosa-vínculo lectinas proteasa que es asociada con el suero (77). Estudios sugieren que la ruta alternativa del complemento es de gran importancia en el sistema inmune innato en los peces teleósteos (78).

La actividad del complemento-opsonizado en teleósteos ha sido documentado en una variedad de peces, como la carpa común (79), bagre (45) y salmónidos (80). Los anticuerpos salmónidos, en la presencia de proteínas complemento, son capaces de neutralizar la envoltura del virus, incluido el virus de necrosis de infección hematopoyética (IHNV) y el virus hemorrágico septicaemia (VHSV) (81). En infecciones bacterianas, la activación del complemento por lipopolisacárido encontrados en la pared celular de bacterias patogénicas Gram (-) estimula la producción del factor C5a, una poderosa quimioquina de macrófagos y neutrófilos que tiene receptores por C3, la molécula central del complemento, la cual

forma parte de tres rutas, y se encuentra adherida a bacterias, favoreciendo fagocitosis (45). La C3 de teleósteos está compuesto de dos cadenas disulfuro vinculadas entre sí (a y b), y una glicoproteína que contiene un enlace tioéster comparable al C3 de varias especies de vertebrados (21).

1.3.5.5 Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

Varios estudios en peces han provisto evidencia directa, sugiriendo que TNF- α y - β son importantes activadores de macrófagos. Estudios en trucha arcoiris, sea bream (*Sparus aurata*), pez dorado (*Carssius auratus*) y bagre han demostrado que TNF causa la activación de macrófagos, llevando a un incremento en la actividad respiratoria, como también la producción de fagocitosis y óxido nítrico (82).

1.3.5.6 Interferon (INF)

INF α y β son citoquinas con funciones antivirales no específicas que están basadas en la inhibición de ácidos nucleicos y replicación en el interior de células infectadas. El INF juega un rol importante en la defensa contra infecciones virales en células huésped de vertebrados, la cuál secreta INF α/β cuando reconocen los ácidos nucleicos virales (83). Estos INFs protegen otras células de infecciones virales vinculándose a diferentes receptores, lo cuál resultan en la inducción de varios cientos de genes que son estimulados por INF (ISGs).

Algunos de estos genes codifican proteínas antivirales, como las proteínas MX, proteína quinasa dsRNA activada (PKR) y sintetasa 2,5-oligoadenilada (OAS)

(84). Dos INFs (INF α e INF α -2) han sido clonadas del salmón del Atlántico y fueron caracterizadas con respecto a sus secuencias, estructura genética, promotores e inducción de actividad viral de genes estimulados por interferon (85). The INF α -1 del salmón Atlántico, induce la expresión de MX e ISG, los cuales tienen propiedades similares a INF α / β e INF γ en mamíferos (86). INF α -1 en salmones del Atlántico inducen una actividad antiviral potente contra el virus pancreático infeccioso (IPNV) en células. Sin embargo, esta citoquina no protege al salmón del Atlántico contra el virus de la anemia infecciosa de salmón (ISAV), sugiriendo que este virus debió desarrollar mecanismos para contrarrestar la actividad antiviral de INF (85).

1.3.5.7 Interleucina

IL-1 en mamíferos esta comprometida de 10 ligandos y 10 moléculas receptoras de proteínas y juega un rol importante en la inflamación y defensa del huésped (86). IL-1 β ha sido detectada en 13 especies de peces teleósteos y están involucrados en la regulación de la inmunidad a través de la estimulación de las células T.

La función de IL-1 β en estos peces es análoga a la IL-1 β de mamíferos (87). En peces teleósteos, el receptor IL-1 han sido clonados y secuenciados de la trucha arcoiris y salmón Atlántico. La expresión del receptor IL-1 en salmones parecen ser constitutivos en todos los tejidos probados y es regulado en el riñón anterior, bazo, hígado y branquias luego de la estimulación con LPS y TNF- α ,

sugiriendo un rol para el receptor IL-1 regulando IL-1 β durante la respuesta inflamatoria (88).

1.3.5.8 Inhibidores de proteasas

Varios inhibidores de proteasas se encuentran presentes en el suero y otros fluidos del cuerpo de peces (28). La función principal de los inhibidores de proteasas es la de mantener la homeostasis de fluidos corporales. Estas moléculas se encuentran involucradas en reacciones de fase aguda y en defensas contra patógenos que secretan enzimas proteolíticas (21). La proteasa mayormente estudiada es el inhibidor de proteasa macroglobulina α -2, la cual posee una alta especificidad para inhibir la encapsulación física de proteasas (89).

1.3.5.9 Lisozimas

Las lisozimas, son enzimas bacteriolíticas que se encuentran ampliamente distribuidos a través del cuerpo, y es parte de los mecanismos de defensa no específicos en la mayoría de animales. En salmónidos, las lisozimas han sido detectadas en suero, secreciones, membranas mucosas y tejidos ricos en leucocitos, principalmente el riñón e intestinos (90). Aparentemente, las principales fuentes de lisozimas son los macrófagos/monocitos y neutrófilos. La acción bactericida de esta enzima involucra la hidrolización de la pared bacteriana de péptidos glicanos, lo cual resulta en lisis celular. Esta ha sido asociada con la defensa contra bacterias Gram (+). Esta enzima además, se la ha involucrado como un activador de las opsoninas del sistema complemento y células fagocíticas (19).

1.3.5.10 Anticuerpos Naturales

Los anticuerpos naturales que son producidos en peces, a un nivel que es regulado en la ausencia de estimulación por antígenos de células que son equivalentes a células B1. Estos anticuerpos naturales son encontrados en niveles altos en suero de peces, donde proveen amplia e inmediata protección contra patógenos virales y bacterianos, volviendo a este factor clave de la inmunidad no específica. Sin embargo, los anticuerpos naturales, también se encuentran ligados a la inmunidad adaptativa. Los peces teleósteos son capaces de generar tipos de IgM específicos como anticuerpos naturales para varios antígenos. La intensidad de esta respuesta, sin embargo, ha sido demostrada que varía ampliamente dependiendo del pez y sus condiciones ambientales (54).

1.3.5.11 Pentraxinas

Las proteínas C-reactivas (CRP) y las proteínas amiloides de suero (SAA) se encuentran presentes en fluidos corporales tanto de vertebrados como de invertebrados, y estos son comúnmente asociados con respuestas de fase aguda de inflamaciones (91) La expresión de CRP ha sido reportada en diversas especies de peces teleósteos (92). Los niveles de estas proteínas se incrementan en tejido lastimado, trauma o infección. Estas proteínas juegan un rol activo en el sistema inmune (93), en la activación de la ruta complemento clásica (94) y la remoción de células apoptóticas (95) (96).

1.3.5.12 Transferrinas

El hierro, es un elemento esencial en el establecimiento de infecciones por varios patógenos, pero la disponibilidad del hierro en fluidos de tejidos de vertebrados es extremadamente baja, debido a su alta afinidad por la proteína sanguínea transferrina. Solo bacterias con sistemas de alta afinidad por absorción de hierro son capaces de mantener suficientes niveles de hierro para crecer *in vivo* (26). Las transferrinas son glicoproteínas globulares con una alta actividad como quelador de hierro. Esta proteína es la mayor proteína transportadora de iones hierro en animales y plantas. La transferrina posee un alto grado de polimorfismo genético en todas las especies, y se encuentra en el suero y secreciones de todos los vertebrados. Bacterias patógenas han desarrollado diversos mecanismos para obtener hierro del huésped, incluso desde transferrinas. Sin embargo, debido a este alto grado de polimorfismo genético y la habilidad de ciertas bacterias patógenas de obtener hierro de transferrinas, esta proteína ha sido restringida a ciertos genotipos (97).

1.3.5.13 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y están entre los elementos desarrollados más temprano en la inmunidad innata. Estos son componentes importantes en las defensas naturales de organismos vivos contra microorganismos invasores. Varios tipos de péptidos antimicrobianos han sido encontrados en anfibios, insectos, mamíferos, plantas, microorganismos y peces.

La mayoría de estos péptidos, matan a las células blanco rápidamente y de modo específico, y además, poseen una inusual rango amplio de actividad. Se ha notado además, que también poseen otras funciones, como promover la curación de heridas, estimulación de quimiotaxis de monocitos y la inhibición de la respuesta de citoquinas (10).

A. Pleurocidin

Secreciones de piel del pez winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) fueron probados como péptidos antimicrobianos basados en métodos usados en estudios similares en anfibios.

Se encontró que poseía actividad de amplio espectro tanto para bacterias Gram (+) como para bacterias Gram (-)

Se ha predicho que este péptido forma una estructura helical-anfipática similar a muchos otros péptidos antimicrobianos, los cuales ejercen su función formando hoyos en la membrana bacteriana (6).

B. Mixinidina

Es un péptido antimicrobiano presente en el mucus del mixino (*Myxine glutinosa* L). Este péptido presentó actividad con un número de bacterias Gram (+), Gram (-) y una cepa de levaduras. Estos ensayos llevados a cabo en paralelo con pleurocidin demostraron que la mixinidina es más potente que pleurocidin con Gram (-) (9).

C. Parasin I

Se aisló este péptido antimicrobiano del pez bagre (*Parasilurus asotus*). Este péptido es secretado por la capa epitelial mucosa cuando se presentan heridas epidérmicas.

Parasin I demostró fuerte actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de microorganismos, sin actividad hemolítica. La proyección del diagrama del eje de la lámina β mostró poseer una estructura anfipática. Los resultados indican que la parasin I podría ser producida de una histona H2A por una proteasa específica (10).

D. Chrysophysin

Es un péptido antimicrobiano proveniente del red sea bream (*Chrysophrys major*). Este se encuentra localizado en ciertas células epiteliales de superficie y en los gránulos eosinófilos en las lamelas o laminillas branquiales en las branquias de pez.

Este péptido demostró un amplio espectro para bacterias Gram (+) y Gram (-), incluyendo a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y patógenos de crustáceos y peces. Estos péptidos demostraron ser hemolíticos (11).

E. Moronecidin

Se aisló este péptido del striped bass (*Morone saxatilis*). Este péptido demostró un amplio espectro de acción antimicrobiana que se mantenía aún a altas

concentraciones de sales. Se confirmó una estructura α helicoidal. El gen de moronecidin consiste en tres intrones y 4 exones y su organización genética es similar a la pleurocidin (8).

F. Oncorhyncin III

Péptido aislado de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de secreciones mucosas del epitelio. Presentó amplio espectro de efecto antimicrobiano en bacterias Gram (+) y Gram (-). Los primeros 13 residuos de este péptido son idénticos a aquellos de la proteína cromosomal no-histona H6 de la trucha arcoiris. Se observó que este péptido no causaba lisis bacteriana (7).

1.4 Aplicaciones de los Péptidos Antimicrobianos en la Acuicultura

Los peces poseen péptidos antimicrobianos como parte de su sistema de defensa. Estos péptidos antimicrobianos se encuentran principalmente en el mucus, indicando que los patógenos se eliminan antes de que pasen la barrera epitelial. En condiciones de Acuicultura intensiva, los peces generalmente pierden escamas o tienen cicatrices, lo que permite a las bacterias pasar esta barrera fácilmente. (98). Además, las condiciones de cultivo introducen factores estresantes que hacen que el pez sea susceptible a la invasión de bacterias oportunistas patógenas.

A pesar del uso de antibióticos y vacunación, se han reportado un incremento en el número de brotes y el emerge de nuevos patógenos, como nuevas especies de vibrios, que anteriormente no se conocía que causaban infecciones. (99).

Debido al impacto para el sistema inmune de los peces, los niveles de péptidos antimicrobianos (AMP), pueden ser útiles para determinar, mantener o mejorar la salud de los peces en Acuicultura. (100). Los niveles de AMP pueden ser utilizados para el monitoreo de la salud de los peces en Acuicultura. además del potencial de uso de estos péptidos para mejorar los tratamientos tradicionales con antibióticos.

AMPs también pueden ser de gran interés incluso en biomedicina, como candidatos para ciertos tratamientos terapéuticos.

La principal ventaja de los péptidos antimicrobianos es que son una parte importante de la defensa innata es que estos son moléculas pequeñas que pueden ser resintetizadas en cuestión de horas, a diferencia de los componentes adaptativos de la respuesta inmune, que toman días y pueden ser eliminados o más intrusos al mismo tiempo son requerir reconocimientos específicos para cada invasor. Sin embargo en Acuicultura los peces no solo están en presencia de varios microorganismos a la vez sino que también al stress de sufrir heridas causadas por otros peces. (99) (101) (102) (103)(104)(105) (106)(107).

Actualmente las estrategias para controlar las enfermedades de los peces consisten en profilaxis, antibióticos, o tratamientos químicos, cuando es posible, la

erradicación del grupo de peces infectados. La aplicación de vacunas-basadas en estrategias inmunes es muy limitada. A pesar de que la mayoría de infecciones también pueden ser controladas por medidas de higiene, estas normas no son suficientes. El desarrollo de incrementar las defensas naturales parece ser el método mas efectivo para controlar las enfermedades de los peces.

En los mamíferos, AMPs han demostrado varios efectos biológicos (108), como la neutralización de endotoxinas, actividad inmunomoduladora y la inducción de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos). Por el momento, la incidencia de infecciones de bacterias resistentes a los antibióticos son de gran preocupación en la medicina y los AMPs podrían ayudar a contrarrestar este tema. Los AMPs pueden combatir a los patógenos y ejercer actividad sobre ellos de diferentes formas, debido a sus propiedades multifuncionales (108) y por lo tanto la investigación en este campo está aumentando en los últimos años.

1.5 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

El mecanismo preciso de acción de los péptidos aún no esta del todo explicado. Estos mecanismos han sido estudiados con mayor profundidad en el péptido antimicrobiano conocido como defensina (109). Sin embargo estudios demuestran que las membranas procarióticas son reconocidas por estos péptidos. Por lo tanto, varios modelos han sido propuestos para entender el mecanismo de acción

de estos péptidos. De acuerdo con uno de estos modelos, el mecanismo consta de los siguientes pasos:

1. Contacto electrostático entre la membrana, cargada negativamente, y el péptido, cargado positivamente.
2. Conformación de la estructura helicoidal y la inserción del péptido en la membrana.
3. Agregación de varias hélices en la membrana para formar un poro.

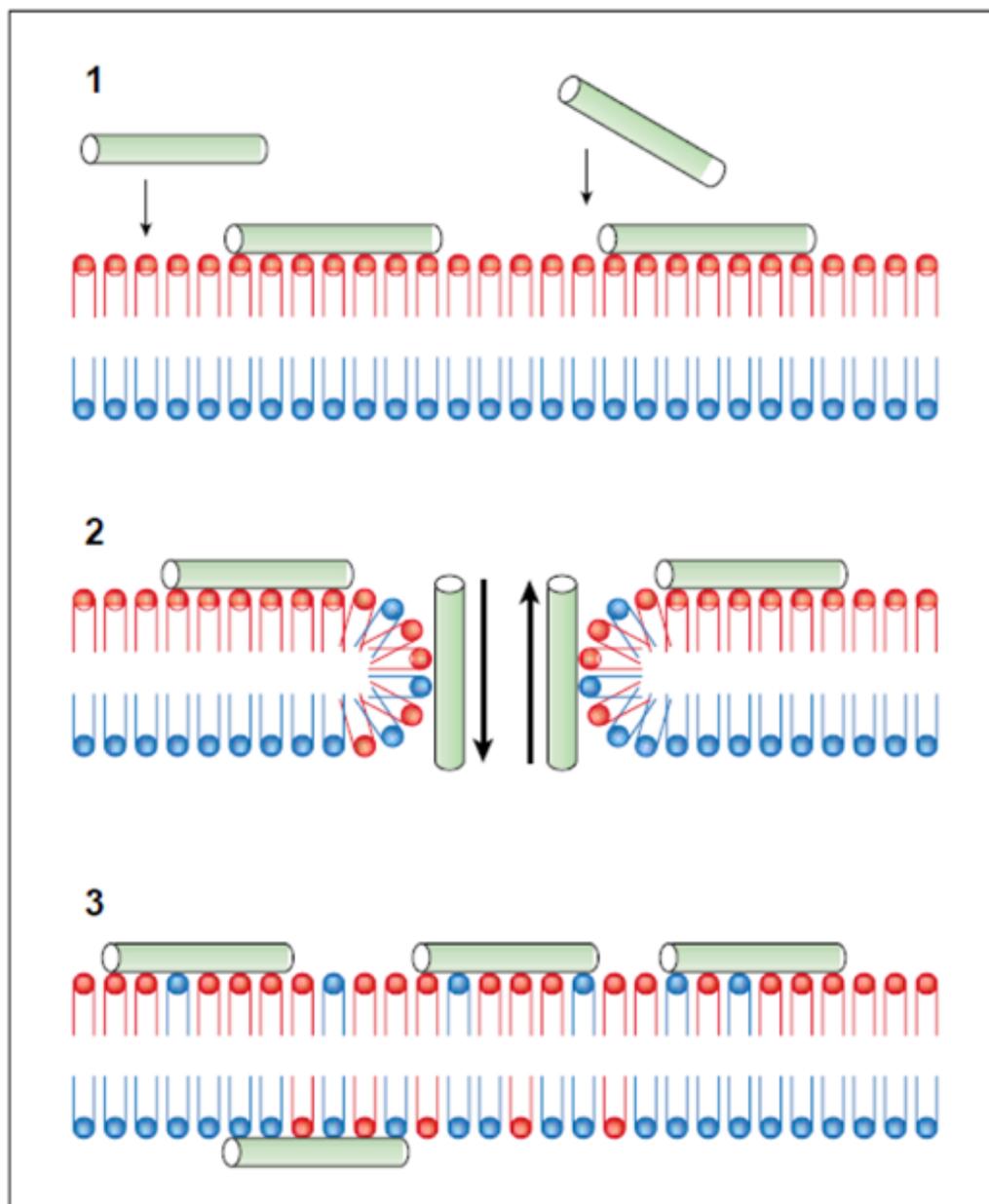


Gráfico 1 Esquema del mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos y la formación del poro

Los péptidos son representados por las figuras de color gris. Estos se adhieren a la membrana por atracción electrostática; cuando se hayan añadido suficientes péptidos, estos se insertan en la membrana y forman un micro poro; luego la membrana se restablece pero existe un intercambio de fosfolípidos entre la bicapa. (109). (Fuente: Tomado de Péptidos antibióticos eucarióticos, Rivas y Andreu, 2002).

Se ha reportado que una concentración micromolar de péptidos antimicrobianos es suficiente para formar una capa alrededor de la célula objetivo y provocar su lisis, y que 4 o mas péptidos son requeridos para la formación de poros de 5-40 de diámetro, suficiente para matar a la célula objetivo.

Se piensa que un organismo puede ser eliminado de diferentes maneras por diferentes péptidos, incluso si estos poseen la misma clase estructural, o incluso un péptido puede operar por diferentes mecanismos en diferentes organismos (110).

Los péptidos antimicrobianos son mas selectivos para las membranas de células procariotas. Esto se puede deber debido a que las membranas procariotas son mas aniónicas, y carecen de colesterol. Estudios han demostrado que la presencia de colesterol en membranas artificiales reduce significativamente la actividad lítica de los péptidos antimicrobianos. Esta investigación también demostró que además de la actividad antimicrobiana, los péptidos poseen actividad antiviral y antitumoral. (111).

Como los péptidos poseen diferentes mecanismos de acción que los antibióticos, estos pueden ser usados todavía activos en la misma bacteria que ha desarrollado resistencia a antibióticos comunes.

1.6 Inmunofisiología de peces

Los peces requieren buena comunicación entre su sistema inmune, nervioso y endocrino para lograr la homeóstasis en un ambiente altamente variable. Por ello,

estos sistemas, no solo responden a antígenos y citoquinas, pero también factores internos como hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores (112).

Los órganos del sistema inmune son inervados por las fibras nerviosas simpáticas y peptidérgicas, lo que les permite un efecto simpático rápido y directo en las células inmunes (113). Los receptores para neurohormonas y neurotransmisores han sido identificados en la superficie de leucocitos de peces (113, 114). Un gran número de citoquinas son conocidas por interactuar con el eje adrenal-pituitario-hipotalámico (HPA) en mamíferos, y las células que son parte integral del sistema nervioso también produce citoquinas, las cuales originalmente se creían que solo eran producidas por células del sistema inmune (114). Las citoquinas pro inflamatorias, IL-1, TNF- α e IL-6 son consideradas los efectores principales en esta comunicación entre el sistema inmune y el eje HPA en mamíferos (115).

En peces, la cabeza del riñón sirve tanto para ambos sistemas en un órgano, debido que se encuentra involucrado en la hematopoyesis, producción de anticuerpos, cortisol y producción de catecolaminas. Por ello, el término eje interrenal-pituitario-hipotalámico (HPI) es usado en peces reemplazando al eje HPA. El término “eje de estrés” ha sido usado en peces, debido a la clara interacción de los estímulos de estrés en función de las células en el interior del eje HPI (114).

1.6.1 Sensibilidad al estrés

Consideramos al estrés como una condición en donde la homeostasis de un animal es amenazada o molestada como resultado de una acción de estímulos intrínseca o extrínseca, comúnmente llamada “estresantes” (116). El proceso involucra un repertorio coordinado de respuesta fisiológicas y de comportamiento, a través de compensaciones y adaptaciones, permitiendo al animal soportar la amenaza. Sin embargo, en algunas situaciones, la respuesta al estrés podría perder su valor adaptativo, lo cuál resultaría en la inhibición del crecimiento, falla reproductiva e inmunosupresión (116, 114).

Los estresantes identificados en peces son numerosos e incluyen cambios extremos y súbitos en el ambiente fisiológico como temperatura, salinidad y turbidez; interacciones animales como predación, parasitismo, competencia por espacio, alimento y parejas sexuales; interferencia humana por prácticas de Acuicultura como manipuleo, densidad de siembra, transporte o anestesia; y polución de agua como pH bajo, amonio alto, metales pesados, polución orgánica (114, 117, 118).

El eje HPI es una característica clave en la respuesta de estrés del pez, debido a que conduce estímulos de estrés cognitivos desde el cerebro a la periferia, a través de una cascada de mensajeros bioquímicos que resultan en la secreción de

glucocorticosteroides como productos principales finales (118). El cortisol ha sido implicado en mediar los efectos inhibitorios de estresantes de la respuesta inmune.

1.6.2 Sensibilidad a la temperatura

Los peces siendo organismos ectotérmicos, que no pueden regular su temperatura corporal y por ello son susceptibles a la influencia de temperaturas ambientales. La temperatura puede ser considerado un estresor, sin embargo, también puede ser considerado separadamente debido a que los efectos observados difieren de otros estresores y existe una consecuencia metabólica directa que tiene efectos específicos en un individuo (119).

Generalmente se considera que temperaturas altas de alrededor de 5 – 10°C por arriba de la temperatura ambiente puede mejorar respuestas inmunes específicas, donde temperaturas bajas pueden suprimir respuestas inmunes específicas en peces (119).

Las funciones específicas de linfocitos podrían aclimatarse a bajas temperaturas ambientales por adaptaciones homeoviscosas, a pesar de que las células B son más eficientes en este proceso y por ello, menos susceptibles que las células T. Las adaptaciones a bajas temperaturas involucran la conversión de ácidos grasos saturados a más viscosos ácidos grasos insaturados para mantener fluidez de membrana y señalamiento transmembranal. Adicionalmente la supresión de células T

parece ocurrir en etapas tempranas de activación, y ha demostrado afectar células T inmaduras en lugar de células de memoria (118).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

2.1.1 Chame

Los peces chame fueron donados por una empresa que se dedica al engorde de estos peces. La finca de esta empresa, se encuentra ubicada en el cantón Rocafuerte, Provincia de Manabí. Los animales fueron transportados desde Rocafuerte hasta los tanques externos de la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos en gavetas de plástico sobre un colchón de papel periódico húmedo.

Los animales fueron mantenidos en los tanques externos en jaulas para facilitar el trabajo de mantenimiento de los mismos. Durante su permanencia en las jaulas en los tanques de la FIMCBOR los peces fueron alimentados *Ad-Libitum* utilizando una dieta comercial para tilapias.

En lo que concierne a la obtención del mucus de los peces, este fue obtenido utilizando la técnica del masaje, descrita en (7). El mucus obtenido fue depositado en tubos de 1.5 ml y posteriormente filtrado usando filtros de 0.2 μ M marca Millipore e inmediatamente utilizado en los ensayos antibacterianos.

2.1.2 Bacterias

Las diferentes cepas bacterianas que fueron utilizadas en el presente trabajo tanto para los ensayos de inhibición como turbidométricos fueron gentilmente cedidas por el Centro de Servicios para la Acuicultura (CSA). Las cepas donadas por el CSA fueron previamente identificadas como *Bacillus sp. 1*, *Bacillus sp. 2*, *Bacillus sp. 3*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus* y *Escherichia coli* D31.

2.2 Ensayos de actividad antibacteriana por halos de inhibición

La técnica para realizar los ensayos de actividad antibacteriana por halos de inhibición, utilizada en el presente estudio, fue realizada según lo descrito por Fernández, 2007 (Figura 2). Esta evaluación de actividad antibacteriana mediante halos de inhibición fue realizada como un paso previo utilizando como cepa de prueba la *E. coli* D 31 para verificar la presencia de actividad antibacteriana antes de realizar los ensayos turbidométricos.

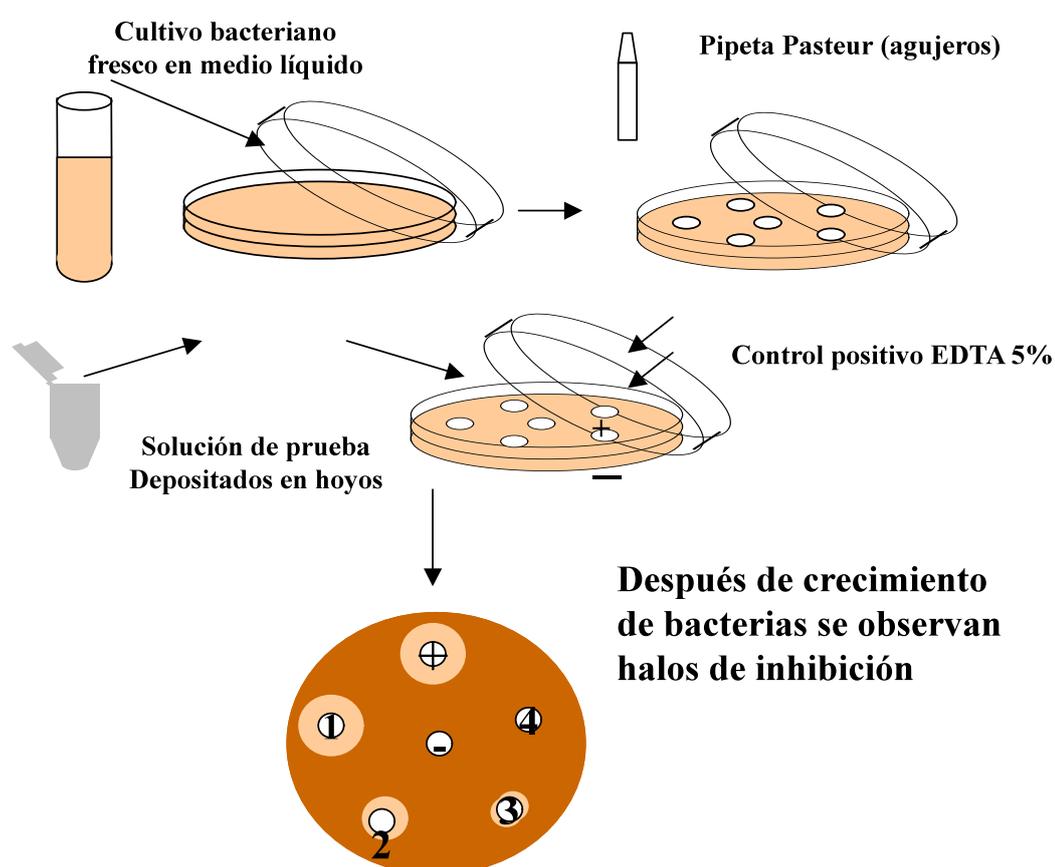


Figura 1 Diagrama de método de inhibición

Diagrama de método de halo de inhibición utilizado para la detección de actividades antibacterianas (Fuente: Tomado de Fernández, 2007). (Elaborado por los autores).

2.3 Ensayos turbidométricos

Los ensayos antibacterianos por halo de inhibición tal cual fueron presentados en este estudio son de naturaleza puramente cualitativa, hecho que no nos permite estimar de forma medible dichas actividades. Así, con el fin de obtener una estimación cuantitativa para evaluar las propiedades antibacterianas del mucus del chame fueron desarrollados análisis turbidométricos en el presente estudio.

El método utilizado para realizar los ensayos turbidométricos en esta tesis fue el descrito por Fernández en 2007(7) para muestras de lisados de células circulantes de concha prieta, el cual es un protocolo adaptado del ensayo optimizado por Tapia en 1997(120) para muestras de hemolinfa de camarón.

Las muestras de mucus de chame utilizadas para este trabajo fueron obtenidas como fue descrito en 2.1.1. Para la realización de los ensayos turbidométricos, muestras filtradas de mucus puro y diluido 1/10 en tampón Hepes (121) fueron usadas en dichos análisis.

La estimación de la actividad antibacteriana de las muestras analizadas con las diferentes cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fue realizada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia de muestra} - \text{Control de inhibición})}{\text{Control de crecimiento}} \times 100$$

2.4 Análisis estadísticos

El análisis estadístico del efecto inhibitorio del mucus del chame sobre las distintas cepas bacterianas fue realizado con el programa Statistica, con un Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía. Luego de la determinación de diferencias significativas por ANOVA con un $p > 0.05$, se realizó un análisis de comparación de medias mediante el método de Scheffé.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

Antes de realizar la estimación cuantitativa de los extractos de mucus de chame, análisis cualitativos fueron realizados, éstos análisis cualitativos fueron desarrollados mediante la técnica de los halos de inhibición. Los ensayos de actividad antibacteriana por halos inhibición utilizando mucus de chame y mucus de este pez diluido 1/10 fueron realizados utilizando la cepa *E. coli* D 31, como cepa de prueba de efecto antibacteriano. Los resultados de este estudio demostraron la presencia de halos de inhibición contra de la cepa estudio utilizando mucus de chame filtrado como muestra de análisis (Figura 2).

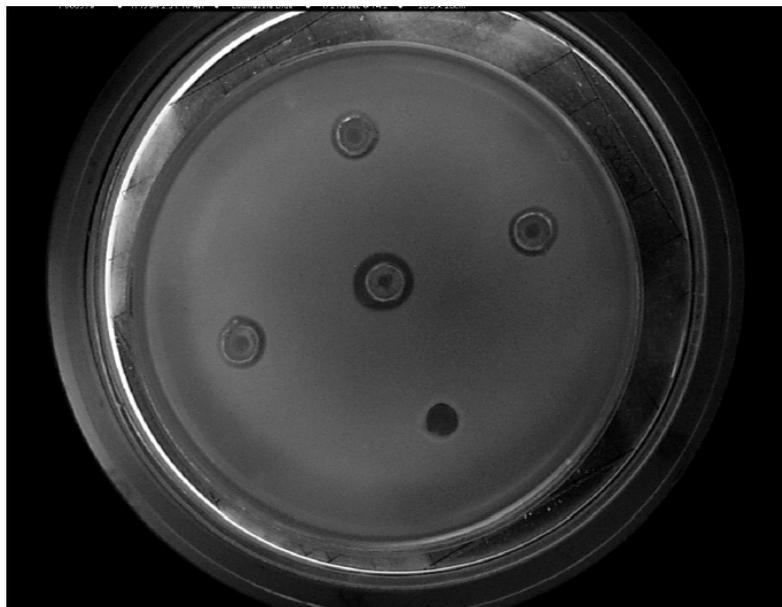


Figura 2 Fotografía Halo de Inhibición

Fotografía de una muestra de cultivo de bacterias con mucus de chame. Obsérvese los halos de inhibición formados. (Fuente: Elaborado por los autores).

Una vez determinada la presencia de cierta actividad antibacteriana en las muestras de mucus de chame se procedió a realizar los análisis turbidométricos. Para lograr este efecto se utilizó como cepas bacterianas de estudio, todas las cepas descritas en 2.1.2. En análisis realizados por Fernández (2007) (7), se estimó previamente mediante análisis turbidométricos con una longitud de onda de 650 nm el número UFC por ml correspondientes a una densidad óptica (medida de absorbancia) para cada una de las cepas que fueron utilizadas en este trabajo. Los valores obtenidos por Fernández (2007)(7) fueron utilizados como datos de referencia para el desarrollo del presente trabajo y son descritos en la tabla I.

Cepa	UFC/ml
<i>Bacillus sp-1</i>	1.88*10 ⁹
<i>Bacillus sp-2</i>	1.70*10 ⁸
<i>Bacillus sp-3</i>	9.20*10 ⁷
<i>Escherichia coli</i> D31	1.16*10 ⁹
<i>Vibrio anguillarum</i>	2.80*10 ⁹
<i>Vibrio harveyi</i>	1.92*10 ⁸
<i>Vibrio vulnificus</i>	7.20*10 ⁸
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.08*10 ⁹

Tabla I Número de células por ml por cepa

Valores determinados experimentalmente del número de células por ml de cada una de las diferentes cepas de estudio correspondientes a una densidad óptica de 1 obtenidas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm (Fuente: Tomado de Fernández, 2007).

Ensayo con *Bacillus sp*

Los ensayos turbidométricos para establecer el efecto del mucus de chame y mucus de chame diluido (1/10) sobre el *Bacillus sp* (1), demostraron un ligero efecto inhibitorio de estas muestra sobre el crecimiento de esta bacteria. En esta forma, estos microorganismos sometidos la presencia de mucus y mucus diluido (1/10) de chame presentaron al final de ensayo un crecimiento relacionado con una absorbancia de 0.312 ± 0.042 y 0.345 ± 0.002 respectivamente. Los resultados obtenidos por las bacterias de la cepa *Bacillus sp* (1) que no estuvieron en contacto con la muestra (control de crecimiento) presentaron un crecimiento con un valor de absorbancia de 0.379 ± 0.050 (Gráfico 1). Así, no se puede establecer diferencias significativas ($p >$

0.05) en las absorbancias del crecimiento de *Bacillus sp* (1) tratados previamente con mucus y mucus diluido (1/10) de chame con respecto al control de crecimiento bacteriano de este *Bacillus*. Por el contrario, se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control negativo (crecimiento de bacterias de la cepa *Bacillus sp* (1) previamente tratadas con EDTA al 1 %) en relación a las absorbancias obtenidas en los otros tres tratamientos. Basado en los valores de absorbancia determinados para cada una de las muestras utilizadas en estos ensayos se establecieron los porcentajes de inhibición del mucus y mucus diluido (1/10) de chame contra la cepa *Bacillus sp* (1). Así, se calculó porcentajes de inhibición de 17,194 % para el mucus de chame y 7.823 % de inhibición para el mucus diluido 1/10 de chame (Gráfico 2).

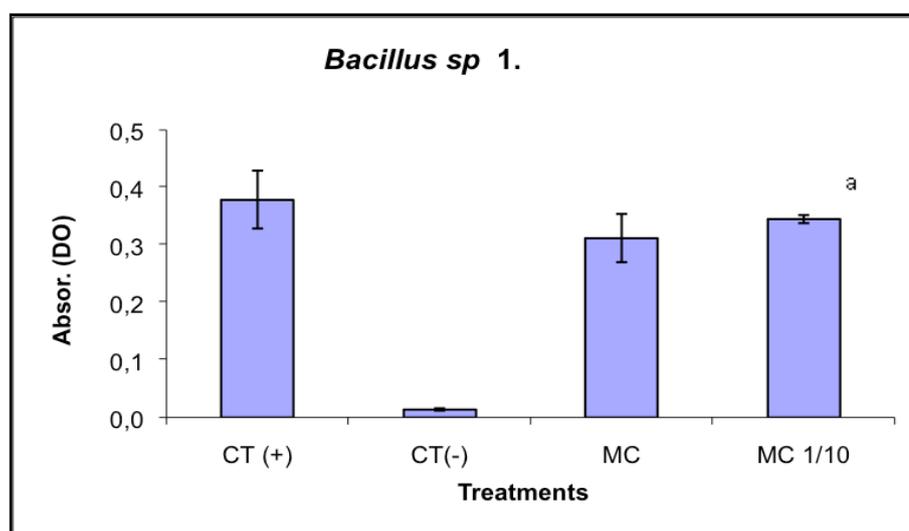


Gráfico 2 Tasa de crecimiento del *Bacillus sp* 1

Grafico indicando la tasa de crecimiento del *Bacillus sp* 1 frente a los controles y el tratamiento. CT (+) es el control de la bacteria sin tratamiento alguno. CT (-) es el control con EDTA 1%. MC es el tratamiento con mucus de chame filtrado y MC 1/10 es el tratamiento con mucus de chame diluido. El crecimiento se estima midiendo la

absorbancia a $640\mu\text{m}$. (Esta misma descripción de los tratamientos sirve para los gráficos siguientes). (Fuente: Elaborado por los autores).

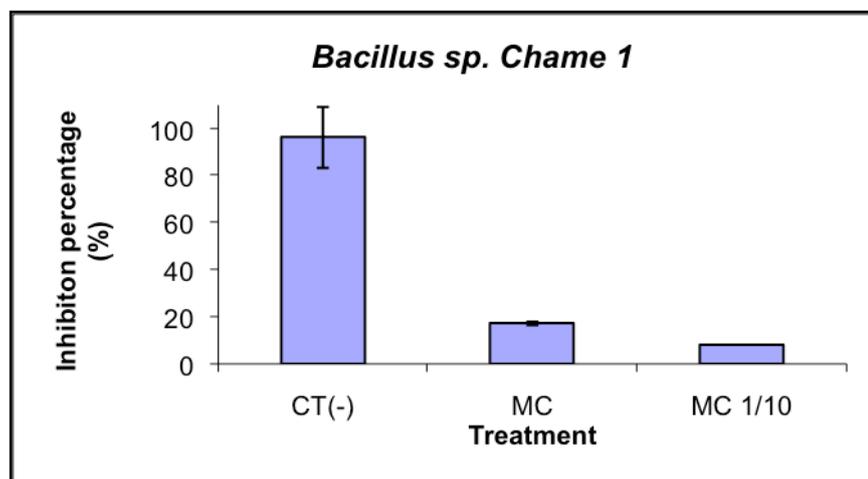


Gráfico 3 Porcentaje de Inhibición del mucus frente al *Bacillus sp. 1*

Gráfico indicando el porcentaje de inhibición del mucus de chame frente al *Bacillus sp. 1*. Se calculó el porcentaje midiendo el nivel de absorbancia del CT (-) con los del tratamientos MC y MC 1/10. (Esta misma descripción de los tratamientos sirve para los gráficos siguientes). (Elaborado por los autores).

Los ensayos turbidométricos efectuados con *Bacillus sp (2)*, produjeron un valor de absorbancia medio para el crecimiento bacteriano después del contacto con mucus de chame de 0.503 ± 0.028 . Del mismo modo, los ensayos realizados con este bacillus en presencia de mucus de chame diluido 1/10 generaron un crecimiento con una absorbancia media de 0.869 ± 0.245 para la misma cepa. Las bacterias de la cepa *Bacillus sp. 2* que no fueron tratadas mucus de chame (control de crecimiento de la cepa), produjeron un valor medio de densidad óptica de 0.958 ± 0.193 (Gráfico 3).

Así, se establecieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancias obtenidas luego de crecimiento entre el control de crecimiento y las absorbancias del

crecimiento de *Bacillus sp* (2) tratadas mucus de chame. Sin embargo, no se pudo establecer diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las absorbancias del control de crecimiento y las absorbancias obtenidas en el crecimiento de bacterias sometidas a mucus de chame diluido 1/10. Además, también se establecieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las densidades ópticas del crecimiento de *Bacillus sp* (2) tratados con mucus y mucus de chame diluido con respecto al control negativo con EDTA. De esta forma, los resultados obtenidos, nos permiten determinar un valor medio de porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de la cepa *Bacillus sp* (2) en presencia de mucus de chame de 46 %. Mientras, los valores obtenidos de porcentaje de inhibición provocado por el mucus de chame diluido exhibieron un porcentaje de inhibición medio de 10 % sobre bacterias de la cepa *Bacillus sp* (2). Los porcentajes de inhibición obtenido por el mucus y mucus de chame diluido son presentados en el gráfico 4.

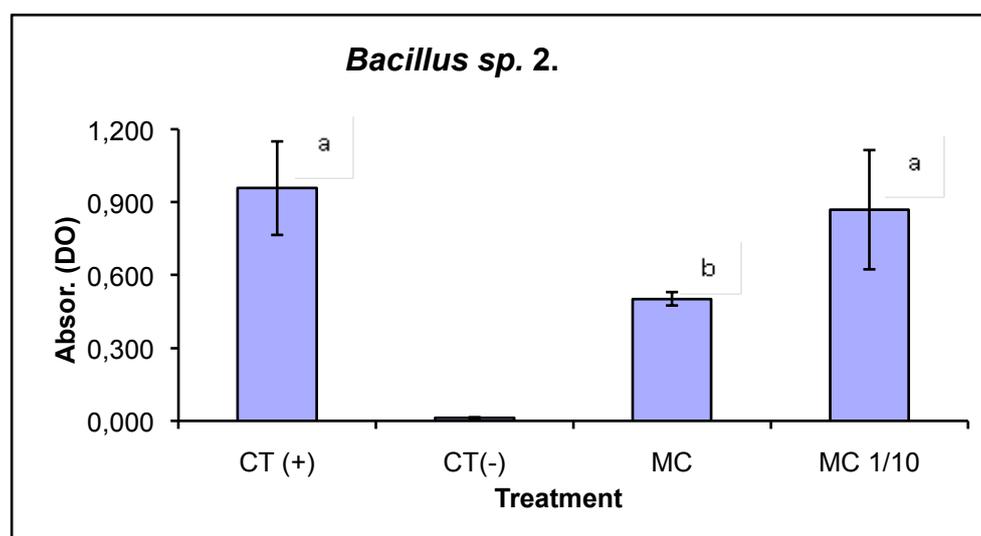


Gráfico 4 Crecimiento medido por absorbancia del *Bacillus sp* 2
(Fuente: Elaborado por los autores)

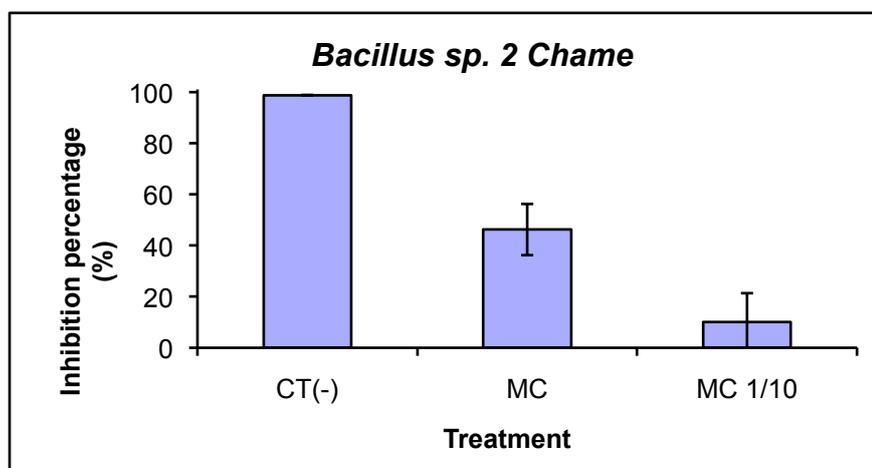


Gráfico 5 Porcentaje de inhibición del *Bacillus sp. 2*

(Fuente: Elaborado por los autores)

En lo que concierne al *Bacillus sp. (3)*, el valor medio de absorbancia del crecimiento de bacterias tratadas con mucus de chame fue de 0.277 ± 0.15 . El valor medio de crecimiento de bacterias de la cepa *Bacillus sp. (3)* sometidas al tratamiento con mucus de chame diluido fue de 0.272 ± 0.012 . El crecimiento de bacterias de esta cepa, que no fueron sometidas a tratamiento alguno, presentó un valor medio de densidad óptica de 0.272 ± 0.015 . Los resultados de este ensayo utilizando la cepa bacteriana *Bacillus sp. (3)* son exhibidos en el gráfico 5. Los resultados de estos análisis no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control de crecimiento bacteriano de *Bacillus sp. (3)* y la absorbancia del crecimiento del mucus y mucus de chame diluido sobre bacterias de esta cepa. Sin embargo, con respecto a *Bacillus sp. (3)* se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control negativo con EDTA con respecto tanto a las absorbancias del control de crecimiento como la absorbancia de las bacterias tratadas mucus y mucus

de chame diluido 1/10. Las densidades ópticas obtenidas en estos ensayos turbidométricos generaron porcentajes inhibición de crecimiento de la cepa *Bacillus sp* (3) de -2.466% y -0.342% tanto para el mucus y el mucus diluido de chame respectivamente (Gráfico 6)

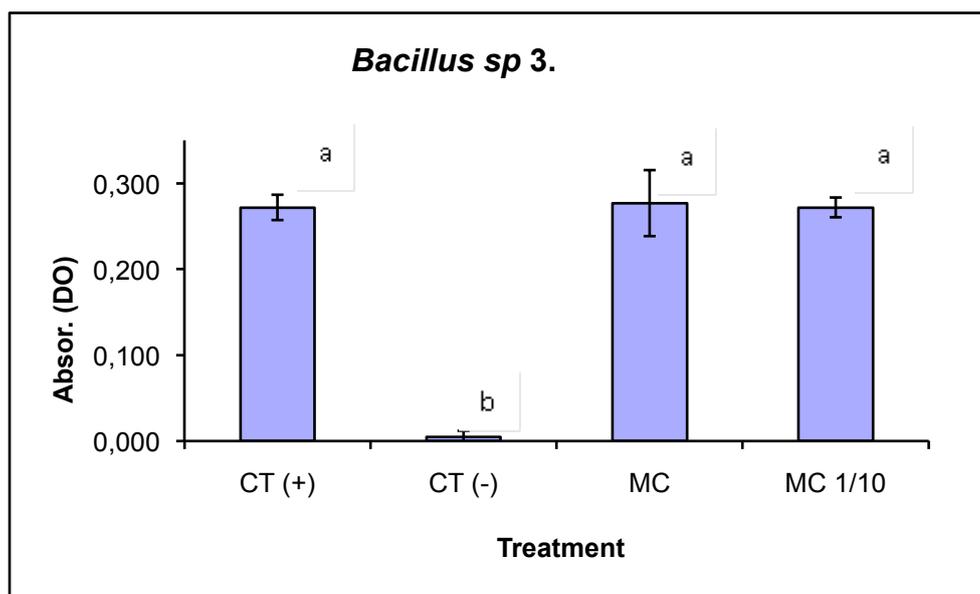


Gráfico 6 Tasa de crecimiento medido por absorbancia del *Bacillus sp* 3

Determinación del crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría obtenida a 650 nm del crecimiento de tres cepas de bacilos. 1) Absorbancia del crecimiento de *Bacillus sp.* 1 con diferentes tratamientos. 2) Absorbancia del crecimiento bacteriano de la cepa identificada como *Bacillus sp.* 2 utilizando diferentes sustancias de prueba. 3) Absorbancia del crecimiento bacteriano de *Bacillus sp* 3 luego de la exposición a diferentes sustancias. CT(+), Absorbancia del crecimiento de los diferentes bacilos sin tratamiento alguno. CT(-), representa la Absorbancia del crecimiento bacteriano de cada una de las cepas de bacilos expuestas a EDTA 1%. MC, Representa la Absorbancia del crecimiento de diferentes bacilos luego de estar en contacto con mucus de chame. MC 1/10, representa la Absorbancia del crecimiento de las diferentes cepas bacterianas respectivamente confrontadas con mucus de chame diluido 1/10. (Fuente: Elaborado por los autores).

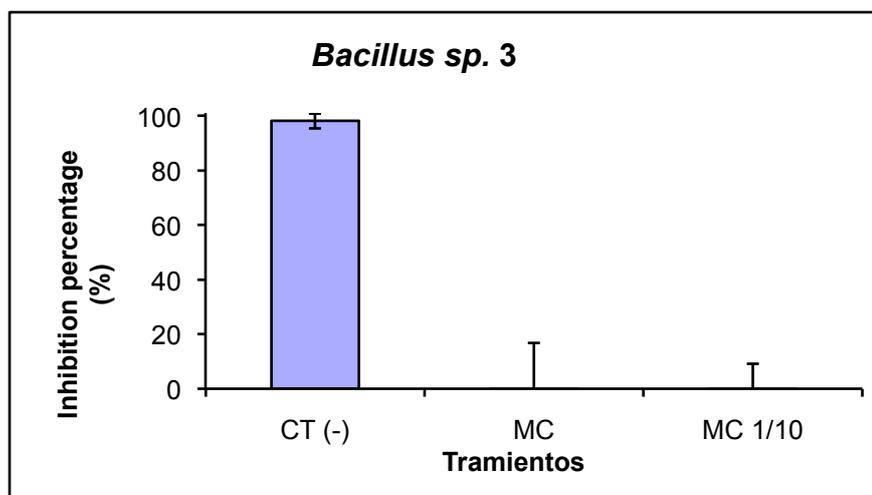


Gráfico 7 Porcentaje de Inhibición del *Bacillus sp3*

Porcentaje de inhibición del mucus del chame contra tres diferentes tipos de bacilos. 1) Porcentaje de inhibición determinado contra la cepa identificada como *Bacillus sp. 1*. 2) Porcentaje de inhibición determinado contra la cepa identificada como *Bacillus sp. 2*. 3) Porcentaje de inhibición determinado contra la cepa identificada como *Bacillus sp. 3*. CT(-), representa el porcentaje de inhibición cada una de las cepas bacterianas expuestas a EDTA 1%. MC, Describe el porcentaje de inhibición del crecimiento las cepas bacterianas luego de estar en contacto con mucus de chame. MC 1/10, representa el porcentaje de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas bacterianas respectivamente confrontadas con mucus de chame diluido 1/10. (Fuente: Elaborado por los autores).

ENSAYOS TURBIDOMÉTRICOS - TASA DE CRECIMIENTO			
ESPECIES DE BACTERIAS			
MUESTRA	<i>Bacillus sp. 1</i>	<i>Bacillus sp. 2</i>	<i>Bacillus sp. 3</i>
<i>Control de crecimiento (-)</i>	0.379 ± 0.050	0.958 ± 0.193	0.272 ± 0.015
<i>MC*</i>	0.312 ± 0.042	0.503 ± 0.028	0.277 ± 0.15
<i>MC* (1/10)</i>	0.345 ± 0.002	0.869 ± 0.245	0.272 ± 0.012
<i>DS* (p > 0.05)</i>	No	Si, para MC	No

Medición del crecimiento de las bacterias por absorbancia a 650 nm

*Mucus Chame

*Diferencia significativa con respecto al control y el tratamiento con mucus de chame.

Tabla II Resumen de la tasa de crecimiento de las diferentes especies de *Bacillus sp*

Se muestra el control de crecimiento negativo, el tratamiento con mucus de chame (MC) y mucus de chame diluido a 1/10 (MC 1/10). Además se indica la diferencia significativa entre las muestras tomadas. (Fuente: Elaborado por los autores).

ENSAYOS TURBIDOMÉTRICOS - PORCENTAJE DE INHIBICIÓN			
ESPECIES DE BACTERIAS			
MUESTRA	<i>Bacillus sp. 1</i>	<i>Bacillus sp. 2</i>	<i>Bacillus sp. 3</i>
MC	17,19%	46%	-2.466 %
MC (1/10)	7,823%	10%	-0.342 %

Porcentaje estimado comparando la absorbancia del control con EDTA 1% y las muestras.

Tabla III Resumen de los porcentajes de inhibición de los tratamientos

Resumen de los porcentajes de inhibición de los tratamientos hacia las diferentes especies de *Bacillus sp.* (Fuente: Elaborado por los autores).

Ensayos con Vibrios

Los ensayos turbidométricos usando la cepa identificada como *V. alginolyticus* tratadas con mucus de chame luego del periodo de incubación presentaron una absorbancia de 0.290 ± 0.008 . Del mismo modo, bacterias de *V. alginolyticus* sometidas a la presencia de mucus de chame diluido (1/10) luego de la incubación generaron una densidad óptica de 0.277 ± 0.055 (Gráfico 7). Además, las bacterias de *V. alginolyticus* que no estuvieron en contacto con sobrenadante alguno, exhibieron una absorbancia de 0.255 ± 0.013 . Los análisis estadísticos no demostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la absorbancia del control de crecimiento de *V. alginolyticus* y la absorbancia del mucus y mucus chame diluido 1/10. Así, los resultados obtenidos con la cepa identificada como *V. alginolyticus*, determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control negativo (EDTA 1%) y las absorbancias de los crecimientos de los otros tratamientos (mucus de chame, mucus de chame diluido 1/10 y control de crecimiento). Los valores obtenidos durante este ensayo muestran un porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa *V. alginolyticus* por el mucus de chame de -13.87%, mientras

el porcentaje de inhibición obtenido con mucus de chame diluido 1/10 fue de -8.277 % (Gráfico 8).

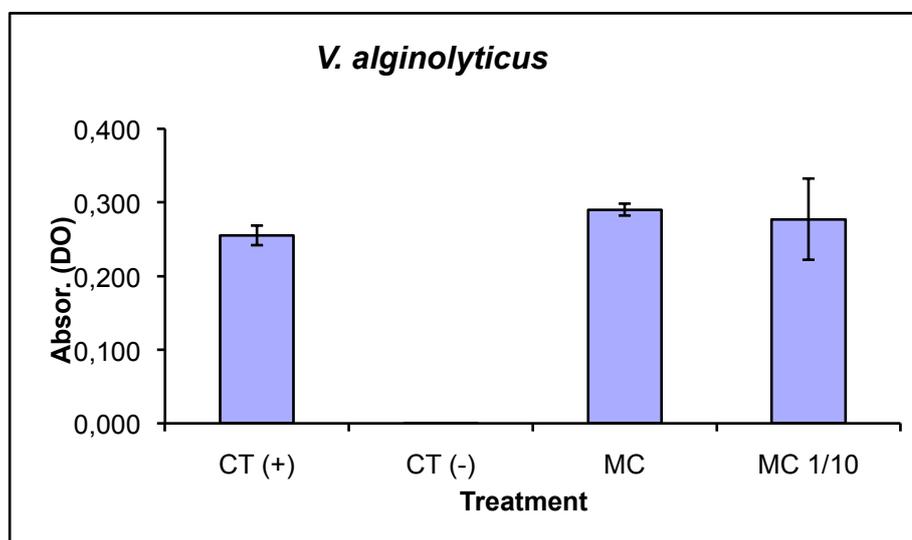


Gráfico 8 Determinación de la absorbancia del vibrio *V.alginolyticus*

Determinación de la absorbancia a $640\mu\text{m}$ del vibrio *V. alginolyticus* con los diferentes tratamientos. Donde CT (+) es el control de las cepas sin tratamiento alguno. CT (-) es el control con EDTA al 1%. MC es el tratamiento con mucus chame y MC1/10 es el tratamiento con mucus diluido a 1/10. No se observan diferencias significativas. (Fuente: Elaborado por los autores).

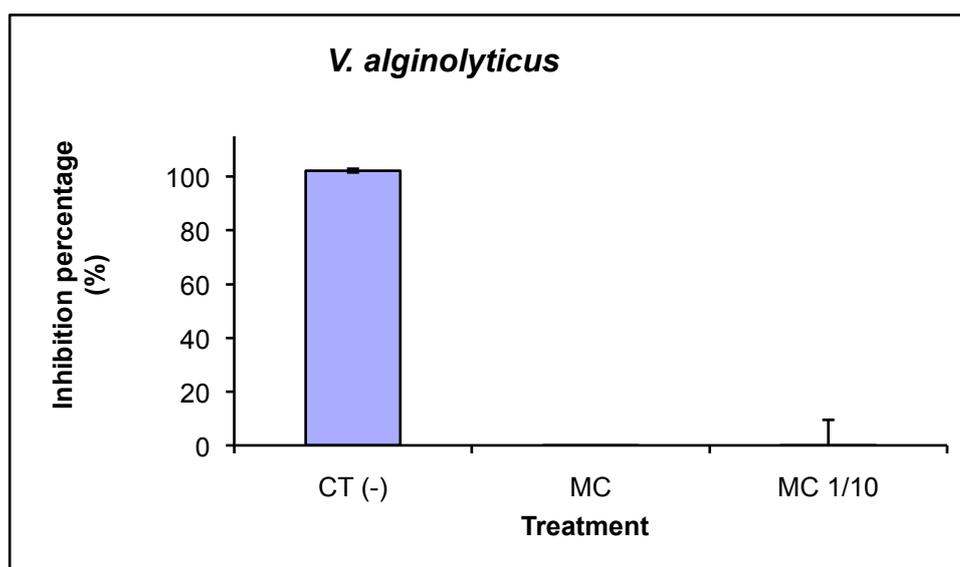


Gráfico 9 Porcentaje de inhibición del mucus hacia el *V.alginolyticus*
(Fuente: Elaborado por los autores)

En el caso de la cepa identificada como *V. harveyi*, se logró establecer que bacterias de esta cepa que fueron sometidas al contacto de 1 hora en presencia de sobrenadantes de mucus de chame generaron una absorbancia de 0.021 ± 0.031 , luego de 16 horas de incubación. Así también, en el mismo ensayo las bacterias de esta cepa en contacto con los mucus de chame presentaron una absorbancia de 0.022 ± 0.019 . En lo que concierne al control de crecimiento, bacterias de la cepa *V. harveyi* sin ningún contacto con mucus de chame y mucus de chame diluido presentaron un crecimiento relacionado con una densidad óptica de 0.182 ± 0.012 (Gráfico 9). Así, se determinó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia obtenida del control de crecimiento y la absorbancia del crecimiento de los otros tres tratamientos (EDTA 1%, mucus de chame y mucus de chame diluido 1/10). A partir de los valores previamente obtenidos se produjeron los porcentajes de inhibición de mucus de chame sobre la cepa de *V. harveyi* de 88.246 %. Mientras el mucus de chame diluido 1/10 generó un porcentaje de inhibición del 88.211 % (Gráfico 10).

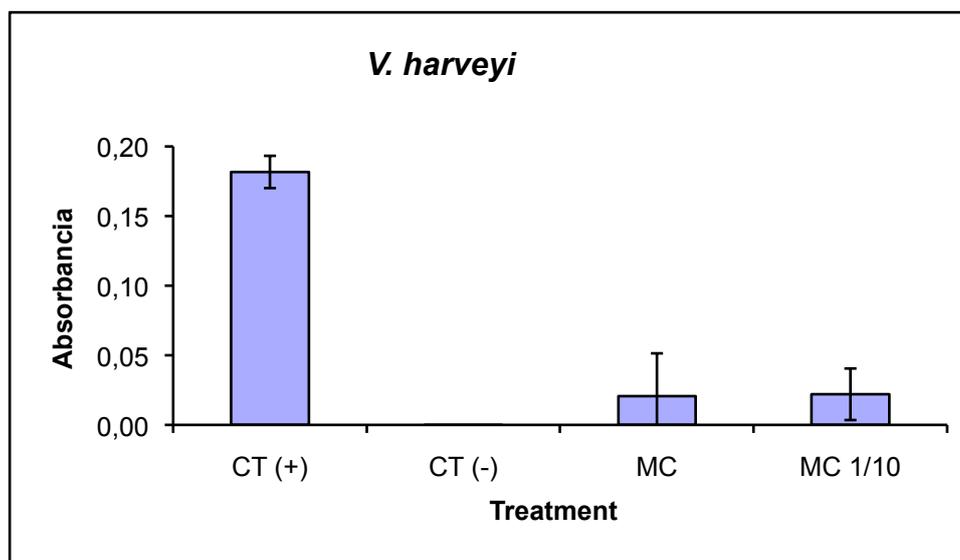


Gráfico 10 Determinación de la absorbancia del vibrio *V.harveyi*

Determinación de la absorbancia a 640 μ m del vibrio *V. harveyi* con los diferentes tratamientos. (Elaborado por los autores)

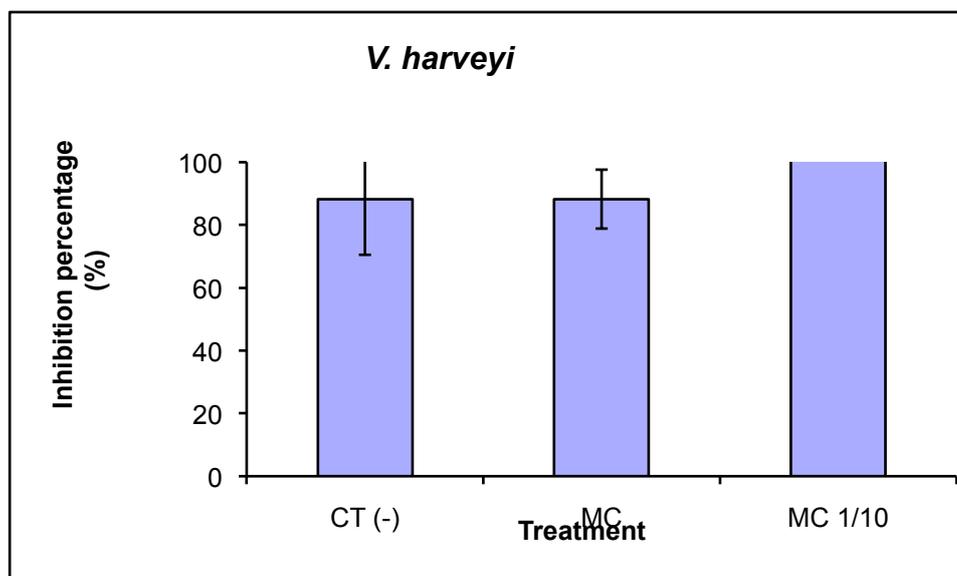


Gráfico 11 Porcentaje de inhibición de los tratamientos frente al *V.harveyi*

(Fuente: Elaborado por los autores)

En el caso de *V. vulnificus*, el crecimiento de bacterias de esta cepa tratadas con muestras mucus de chame presentó una densidad óptica de 0.011 ± 0.020 , luego del periodo de incubación. Además, las bacterias de la cepa de *V. vulnificus* que estuvieron en contacto con mucus de chame diluido 1/10 luego de la incubación produjeron una absorbancia de 0.065 ± 0.013 . Sin embargo, bacterias de la cepa de *V. vulnificus* que no fueron sometidas a tratamiento alguno, presentaron una densidad óptica de 0.182 ± 0.006 (Gráfico 11). En esta forma, se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control de crecimiento y la absorbancia de las células bacterianas de *V. vulnificus* tratadas con mucus de chame ($p > 0.05$). También se determinaron diferencias significativas entre las absorbancias de los tratamientos con mucus de chame y mucus de chame diluido 1/10 ($p > 0.05$). Del mismo modo, si se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del crecimiento de esta cepa tratada con EDTA con respecto a la absorbancia del control de crecimiento y la absorbancia de bacterias sometidas al tratamiento con mucus de chame diluido 1/10. Sin embargo, no se establecieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del tratamiento del control negativo (EDTA 1%) y la absorbancia de bacterias de la cepa *V. vulnificus* tratadas con mucus de chame. Así, se pudo determinar el porcentaje de inhibición generado por el mucus de chame sobre el crecimiento bacteriano de la cepa identificada como *V. vulnificus* (- 94.149 %). Mientras, el mucus de chame diluido 1/10 mostró un porcentaje de inhibición del crecimiento de *V. vulnificus* de 64.635% (Gráfico 12).

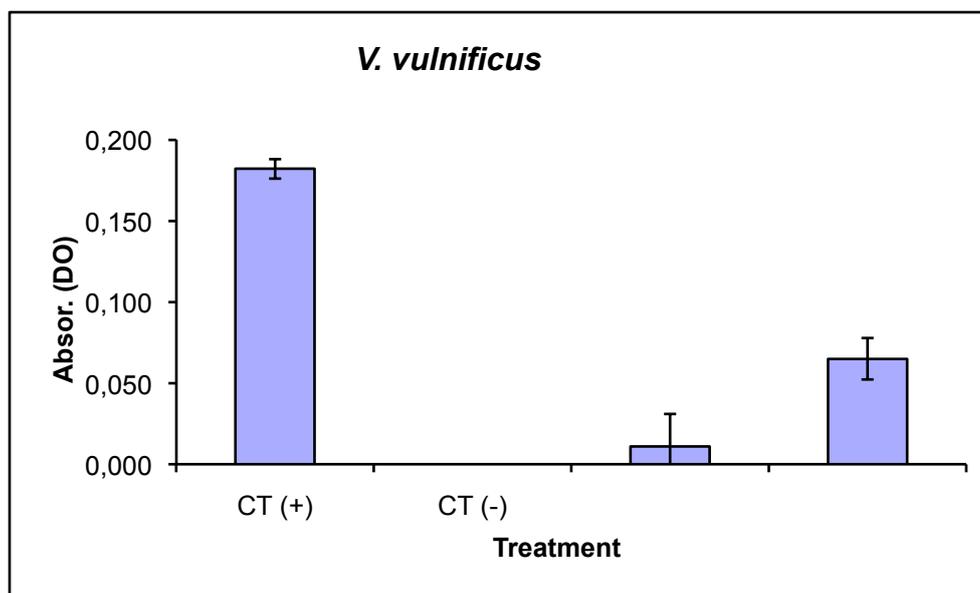


Gráfico 12 Determinación de la absorbancia del vibrio *V.vulnificus*

Determinación de la absorbancia a 640 μ m del vibrio *V. vulnificus* con los diferentes tratamientos. (Fuente: Elaborado por los autores).

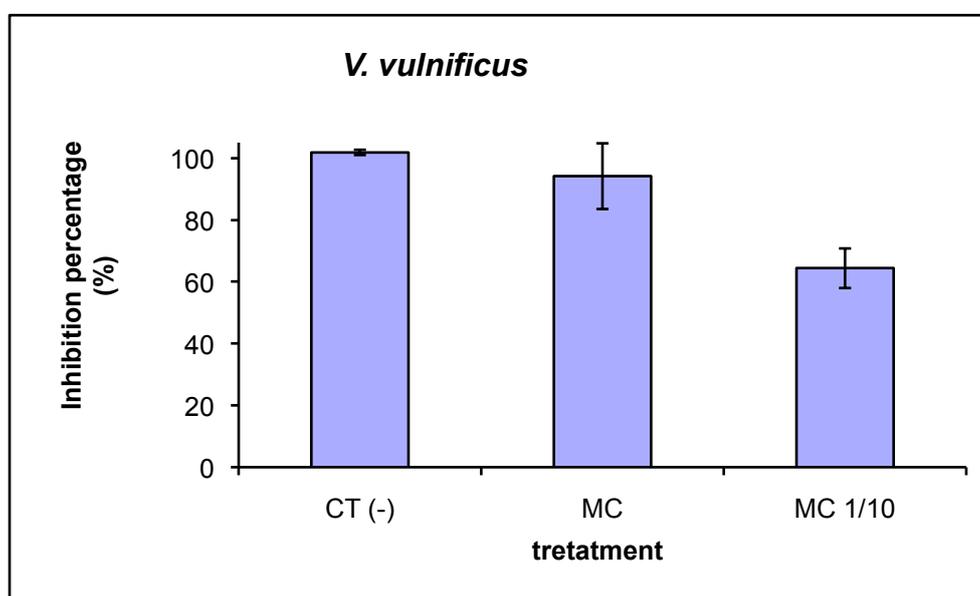


Gráfico 13 Porcentaje de inhibición *V.vulnificus*

Porcentaje de inhibición de los tratamientos de mucus de chame frente al *V. vulnificus*. (Elaborado por los autores).

En lo que concierne al efecto sobre el crecimiento de *V. anguillarum* del mucus de chame se determinó, luego de 16 horas de incubación, una absorbancia de 0.007 ± 0.007 . En la misma forma, el crecimiento de bacterias de la cepa de *V. anguillarum* tratados con mucus de chame diluido 1/10 generaron una densidad óptica de 0.055 ± 0.012 . El control de crecimiento bacteriano de esta cepa presentó un valor de absorbancia de 0.048 ± 0.004 (Gráfico 13). En esta forma, se determinaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia del control de crecimiento y las absorbancias de los tratamientos con mucus de chame y el control negativo (EDTA 1%). También se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la absorbancia determinada para el mucus de chame diluido y las absorbancias obtenidas en tratamiento con EDTA al 1%. Sin embargo, no se establecieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las absorbancias del control negativo (EDTA 1%) y las absorbancias registradas para el tratamiento con mucus de chame. En base a los resultados previamente descritos, se pudo establecer que el tratamiento con mucus de chame produjo un porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacterias de la cepa *V. anguillarum* del 83.740 %. De la misma manera, el mucus de chame diluido 1/10 mostró un porcentaje de inhibición del 45 % sobre la cepa *V. anguillarum* (Gráfico14).

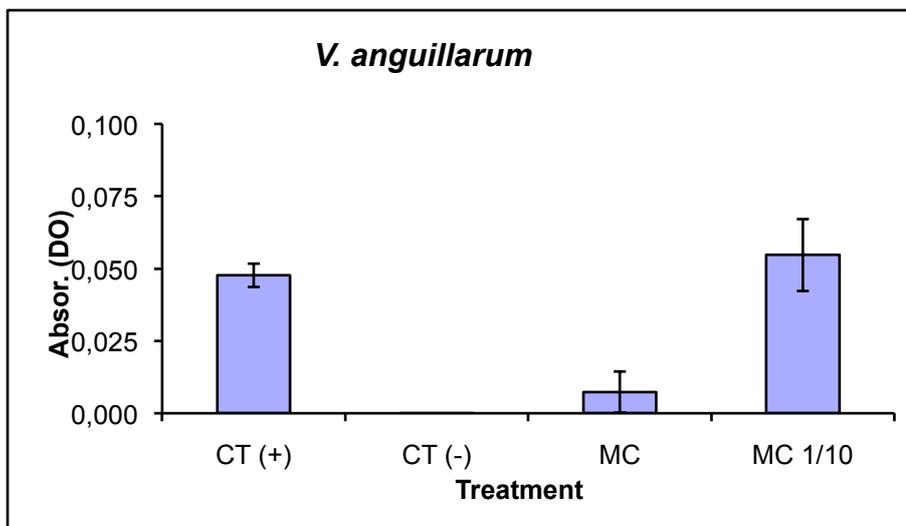


Gráfico 14 Determinación de la absorbancia del vibrio *V.anguillarum*

Determinación de la absorbancia a 640 μ m del vibrio *V. anguillarum* con los diferentes tratamientos. (Fuente: Elaborado por los autores).

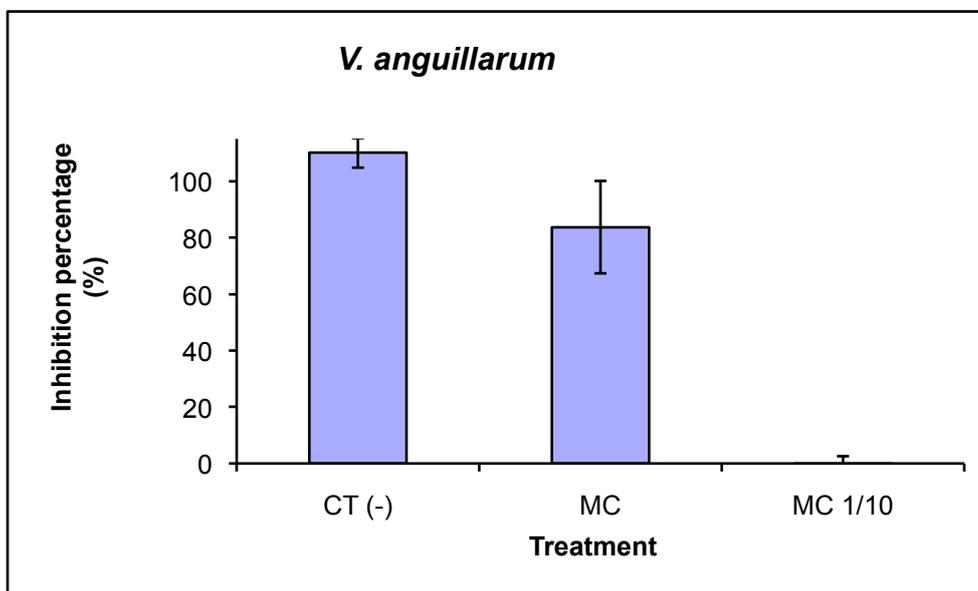


Gráfico 15 Porcentaje de inhibición de los tratamientos frente al *V.anguillarum*

Porcentaje de inhibición de los tratamientos de mucus de chame frente al *V. anguillarum*. (Fuente: Elaborado por los autores).

ENSAYOS TURBIDOMÉTRICOS - TASA DE CRECIMIENTO				
ESPECIES DE BACTERIAS				
MUESTRA	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. anguillarum</i>
Control de crecimiento (-)	0.255 ± 0.013	0.182 ± 0.012	0.182 ± 0.006	0.048 ± 0.004
MC	0.290 ± 0.008	0.021 ± 0.031	0.011 ± 0.020	0.007 ± 0.007
MC (1/10)	0.277 ± 0.055	0.022 ± 0.019	0.065 ± 0.013	0.055 ± 0.012
DS ($p > 0.05$)	Si	Si	Si	Si, para MC

Medición del crecimiento de las bacterias por absorbancia a 650 nm

Diferencia significativa con respecto al control y el tratamiento con mucus de chame.

Tabla IV Resumen de la tasa de crecimiento de las diferentes especies de vibrios: *V.alginolyticus*, *V. harveyi*, *V.vulnificus*, *V.anguillarum*

Se muestra el control de crecimiento negativo, el tratamiento con mucus de chame (MC) y mucus de chame diluido a 1/10 (MC 1/10). Además se indica la diferencia significativa entre las muestras tomadas. (Fuente: Elaborado por los autores).

ENSAYOS TURBIDOMÉTRICOS - PORCENTAJE DE INHIBICIÓN				
ESPECIES DE BACTERIAS				
MUESTRA	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. anguillarum</i>
MC	-13,87%	88,246%	94,149%	83.740 %.
MC (1/10)	-8,277%	88,211%	64,635%	45%

Porcentaje estimado comparando la absorbancia del control con EDTA 1% y las muestras.

Tabla V Resumen de los porcentajes de inhibición de los tratamientos hacia las diferentes hacia las especies de Vibrio

(Fuente: Elaborado por los autores)

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

A fin de establecer las condiciones ideales para la realización de los ensayos antibacterianos se estableció por espectrofotometría el número de células de acuerdo a la densidad óptica para las diferentes cepas utilizadas en este estudio. Los resultados de la cepa control de este ensayo utilizando *E. coli* D31 presentan un valor 1.16×10^9 el cual se aproxima al valor teórico esperado de 1.2×10^9 (120) lo cual valida los resultados obtenidos con las diferentes cepas usadas en este ensayo.

Los resultados obtenidos en los ensayos turbidométricos de actividad antibacteriana contra las cepas Gram (+) presentan un ligero efecto inhibitorio del mucus de chame sobre estas cepas. Sin embargo, no se podría determinar si existe un verdadero efecto inhibitorio sobre las cepas *Bacillus* sp 1 y *Bacillus* sp 3 con los bajos porcentajes de inhibición demostrados (17% y 10% respectivamente) no presentan valores

significativamente diferentes a los valores del control de crecimiento. Esto podría encontrarse relacionado con la sensibilidad de la técnica, que probablemente no permitiría detectar una baja actividad antibacteriana o a la ausencia de efecto inhibitorio del mucus de chame sobre esas cepas. Por el contrario, el efecto inhibitorio demostrado sobre la cepa Gram (+) *Bacillus sp* (2) por el mucus de chame de 46%, cuyos valores son significativamente distintos del control de crecimiento demuestran la existencia de una verdadera inhibición. Así, podemos inferir que el mucus de chame tiene efecto inhibitorio sobre algunas cepas de bacterias Gram (+) de tipo *Bacillus*.

En lo que concierne a las cepas Gram (-) de vibrios utilizados en los ensayos turbidométricos podemos claramente determinar un fuerte efecto inhibitorio del mucus del chame sobre el crecimiento de *V. harveyi* y *V. vulnificus* cercano al 100% de inhibición. Esta actividad observada fue importante sobre estas cepas incluso cuando se utilizó el mucus de chame diluido 1/10 para los ensayos. Además, también se detectó una actividad antibacteriana importante sobre *V. anguillarum* 83%, aunque este efecto se pierde cuando el mucus es diluido 1/ 10. Finalmente nunca se detectó actividad antibacteriana del mucus de chame sobre la cepa de *V. alginolyticus*.

La presencia de actividades antibacterianas del mucus del pez chame sobre diferentes bacterias de tipo Gram (+) y Gram (-), implica que el efecto inhibitorio es de amplio espectro. En estos instantes, es muy difícil determinar el origen de esta actividad

antibacteriana encontrada en las secreciones dérmicas de pez chame. Esta podría tener diferentes orígenes, uno de ellos puede estar vinculado con la presencia de péptidos antibacterianos que pueden estar presentes en las secreciones dérmicas como ha sido demostrada la presencia en otros peces tanto de agua dulce o marina. Sin embargo, no podemos descartar que dicha actividad se deba a la presencia de algún tipo de enzima u otro componente de diferente naturaleza química que sea responsable dicha actividad. Desde otro punto de vista, debemos también analizar que la acción antibacteriana puesta en evidencia en el mucus de chame no solo tenga su origen en un solo compuesto y sea el producto de un sinergismo entre diferentes componentes.

Desde el punto de vista fisiológico, el presente trabajo da indicios sobre la resistencia de este pez para desarrollarse en lugares inhóspitos, así la secreción de determinados componentes en el mucus del chame puede conferirle algún tipo de inmunidad innata. Esta inmunidad, por lo demostrado en este trabajo funcionaría en forma selectiva, basados en el hecho, que algunas cepas no fueron inhibidas bajo exposición con mucus de chame. Este particular, nos indica algún tipo de adaptación fisiológica a determinados ambientes para conferir cierta resistencia a estos animales, hecho que le permite defenderse en forma selectiva contra cierto tipo de cepas bacterianas. Así, podríamos mantener la hipótesis, que cualquiera sea el origen de la actividad antibacteriana puesta en evidencia, sería el resultado evolutivo de este pez a los ambientes en los cuales ellos habitan.

El presente trabajo es a nuestro conocimiento el primer intento de establecer la presencia de actividad antibacteriana en un pez del litoral ecuatoriano. A su vez, presenta la originalidad de la especie, que por sus condiciones de vida en un hábitat extremo representa un buen candidato para la búsqueda de moléculas con propiedades antibacterianas y probablemente originales a nivel de estructura.

RECOMENDACIONES

- 1 Se recomienda dar continuidad a este trabajo, con el fin de caracterizar y determinar el origen de esta proteína antibacteriana.
- 2 Referente a la actividad antibacteriana del chame, se logró determinar la capacidad de inhibición que posee el mucus. Sin embargo, no se determinó si esta actividad antibacteriana posee características bactericidas. Por ello, es recomendable que se realicen experimentos posteriores para lograr esclarecer si esta actividad antibacteriana posee características bactericidas.
- 3 Un punto fuerte de este estudio es que logramos determinar el amplio espectro de acción del mucus del chame. Por ello, se debe determinar si este amplio espectro se debe a una adaptación propia de la especie a su medio.

Desarrollar trabajos en paralelo, para buscar posibles actividades de interés para la industria farmacéutica (virus, parásitos, hongos, células tumorales).

- 4 También, conociendo cómo se producen estos compuestos se podría estudiar la posibilidad de utilizar marcadores genéticos que permitan determinar animales que posean propiedades superiores en lo que respecta a las características inmunes innatas que incluyen estos péptidos, no solo en el chame, sino también en otras especies.

- 5 Además se recomienda, generar bancos de cDNA diferenciales con el fin de determinar probables moléculas ya descubiertas asociadas con la inhibición del crecimiento bacteriano.

- 6 El presente trabajo es el inicio de una investigación que debe conllevar a análisis cromatográficos que permitan aislar, purificar y estudiar en forma separada los componentes del mucus del pez chame, a fin de determinar si algunos de estos componentes poseen actividad antibacteriana.

- 7 Este trabajo aporta con conocimiento nuevo para una especie que posee gran potencial y que es de gran valor económico. Se recomienda que se continúe con este tipo de trabajos con otras especies y así explotar todo el potencial de la fauna ecuatoriana.

CONCLUSIONES

- 1 El presente trabajo, trata la primera aproximación de una especie que aunque comercial, no se la había considerado como especie de interés bioquímico, y sus propiedades antibacterianas; lo cuál abre una posibilidad de un estudio posterior.
A pesar de la falta de información disponible, se han llegado a identificar diversas claves, las cuales se presentan a continuación:
- 2 El presente estudio demuestra la presencia de actividad antibacteriana en el mucus del chame (*Dormitator latifrons*) contra distintas cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-). Sin embargo, su efecto es más efectivo contra las bacterias Gram (-).
- 3 El efecto inhibitorio del mucus del chame fue observado en las cepas *Bacillus* sp2, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* y *Vibrio harveyi*. Siento este efecto más observado en Gram (-).

- 4 El efecto inhibitorio presente en las cepas *Bacillus sp1*, *Bacillus sp3* y *V. Alginolyticus*, fue tenue y casi no pudo ser observado, lo que sienta bases para pensar que el objetivo primario del mucus en esta especie, es la de servir como primera defensa contra bacterias Gram (-).

El origen de la actividad antibacteriana demostrada en este estudio, en el mucus del chame, se encuentra circunscrito a algún factor o factores del sistema inmune innato y que probablemente son localizados en el tejido epitelial del chame.

- 5 El presente estudio abre nuevas posibilidades y sienta las bases para el desarrollo de este tópico, tanto para definir el origen de esta actividad antibacteriana como para determinar su rol en la respuesta inmune innata del pez chame.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz, N. Campos, M. y Castelo, R. (1985) El Chame. Una nueva fuente de alimentación e ingresos. Proyecto Chame. Fundación Ciencia. Quito.
2. Lagler, K.F., J.E. Bardach and R.R. Miller. 1977. Ichthyology. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 506.
3. Subramanian S, Ross NW, MacKinnon SL. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008 May;150(1):85-92.
4. Kuppalakshmi C, Prakash M, Gunasekaran G, Manimegalai G, Sarojini S. Antibacterial properties of fish mucus from *Channa punctatus* and *Cirrhinus mrigala*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2008 May-Jun;12(3):149-53.
5. Kitami Y, Tsukamoto C, Zhang G, Nagai H, Ishida M, Ishizaki S, Shimakura K, Shiomi K, Nagashima Y. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. *FEBS J.* 2007 Jan;274(1):125-36.

6. Alexander M. Cole, Peddrick Weis, and Gill Diamond (1997) Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2pp 12008–12013
7. Jorge M. O. FERNANDES, Nathalie SAINT, Graham D. KEMP and Valerie J. SMITH (2003) Oncorhyncin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemistry Journal*. 373, 621–628
8. Xavier Lauth, Hiroko Shike, Jane C. Burns, Mark E. Westerman, Vaughn E. Ostland, James M. Carlberg, Jon C. Van Olst, Victor Nizet, Steven W. Taylor, Chisato Shimizu, and Philippe Bulet (2002) Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass. *The Journal Of Biological Chemistry*. 15pp 5030–5039
9. Sangeetha Subramanian & Neil W. Ross & Shawna L. MacKinnon (2009): Myxinidin, A Novel Antimicrobial Peptide from the Epidermal Mucus of Hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine Biotechnology* 11:748–757
10. In Yup Park, Chan Bae Parka, Mi Sun Kimb, Sun Chang Kim (1998) Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters* 437 258-262
11. Noriaki Iijima, Norio Tanimoto, Yohko Emoto¹ Yohko Morita, Kazumasa Uematsu, Tomoya Murakami and Toshihiro Nakai (2003) Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial

- peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur. J. Biochem.* 270, 675–686
12. Campos, Margarita. (1986) Informe Final del Proyecto El Chame. Quito.
 13. Razquin BE, Castillo A, Lopez-Fierro P, Alvarez F, Zapata A, Villena A (1990): Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Richardson: an immunological and enzyme-histochemical study. *Journal of Fish Biology* 36, 159–173.
 14. Mulero V, Meseguer J (1998): Functional characterisation of a macrophage activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 8, 143–156.
 15. Mulero I, Garcia Ayala A, Meseguer J, Mulero V (2007): Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A mini review. *Aquaculture* 268, 244–250.
 16. Willett C, Cortes, A Zuasti A, Zapata A. (1999): Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Developmental Dynamics* 214, 323–336.
 17. Magnadottir B (2006): Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20, 137–151.
 18. Magnadottir B (2010): Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology* 12, 361–379.
 19. Magnadottir B, Jonsdottir H, Helgason S, Bjornsson B, Jorgensen TO, Pilstrom L (1999): Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus*

- morhua L.). II. The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B, 181–188.
20. Magnadottir B, Jonsdottir H, Helgason S, Bjornsson B, Jorgensen TO, Pilstrom L (2001): Immuneparameters of immunised cod (*Gadus morhua* L). *Fish and Shellfish Immunology* 10, 75–89.
21. Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA (2005): Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 429–439.
22. Chantanachookhin C, Seikai T, Tanaka M (1991): Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture* 99, 143–155.
23. Dalmo RA, Bogwald J (2008): β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 384–396.
24. Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-De Frias C, Cortes A (2006): Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 126–136.
25. Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin Y (2004): Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 9–28.
26. Ellis AE (2001): Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827–839.

27. Davis JM, Clay H, Lewis JL, Ghori N, Herbomel P, Ramakrishnan L (2002): Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity* 17, 693–702.
28. Bowden TJ (2008): Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 373–383.
29. Trede NS, Zapata A, Zon LI (2001): Fishing for lymphoid genes. *Trends in Immunology* 22, 302–307.
30. Castillo A, Sanchez C, Dominguez J, Kaattari SL, Villena AJ (1993): Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology* 17, 419–424.
31. Sanchez C, Babin M, Tomillo J, Ubeira FM, Dominguez J (1993): Quantification of low levels of rainbow trout immunoglobulin by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 36, 65–74.
32. Press CM, Dannevig BH, Landsverk T (1994): Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 4, 79–93.
33. Ferguson HW (1989): *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost.* Iowa state University Press. Ames. Iowa, USA. 5–103.

34. Acton RT, Weinheimer PF, Hall SJ, Niedermeier W, Shelton E, Bennett JC (1971): Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 107–111.
35. Wilson MR, Warr GW (1992): Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Disease* 2, 201–221.
36. Elcombe BM, Chang RJ, Taves CJ, Winkelhake JL (1985): Evolution of antibody structure and effector functions: comparative hemolytic activities of monomeric and tetrameric IgM from rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 80, 697–706.
37. Uchida D, Hirose H, Chang PK, Aranishi F, Hirayabu E, Mano N, Mitsuya T, Prayitno SB, Natori M (2000): Characterization of Japanese eel immunoglobulin M and its level in serum. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 127, 525–532.
38. Vilain C, Wetzel MC, Du Pasquier L, Charlemagne J (1984): Structural and functional analysis of spontaneous antinitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Developmental and Comparative Immunology* 8, 611–622.
39. Scapigliati G, Chausson F, Cooper EL, Scalia D, Mazzini M (1997): Qualitative and quantitative analysis of serum immunoglobulins of four Antarctic fish species. *Polar Biology* 18, 209–213.

40. Olesen NJ, Jorgensen PEV (1986): Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions. *Disease of Aquatic Organism* 1, 183–189.
41. Hatten F, Fredriksen A, Hordvik I, Endresen C (2001): Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish and Shellfish Immunology* 11, 257–268.
42. Rombout JH, Huttenhuis HBT, Picchiatti S, Scapigliati S (2005): Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 441–455.
43. Lumsden JS, Ostland VE, Byrne PJ, Ferguson HW (1993): Detection of a distinct gill surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Disease of Aquatic Organism* 16, 21–27.
44. Jenkins JA, Ourth DD (1993): Opsonic effect of the alternative complement pathway on channel catfish peripheral blood phagocytes. *Veterinary Immunology Immunopathology* 39, 447–459.
45. Jenkins PG, Wrathmell AB, Harris JE, Pulsford AL (1994): Systemic and mucosal immune response to enterically delivered antigen in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology* 4, 255–271.

46. Jones DR, Hannan CM, Russel-Jones GJ, Raison RL (1999): Selective B cell non-responsiveness in the gut of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 172, 29–39.
47. Arkoosh MR, Kaattari SL (1991): Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental and Comparative Immunology* 15, 279–293.
48. Whittington RJ, Munday BL, Akhlaghi M, Reddacliff GL, Carson J (1994): Humoral and peritoneal cell responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to ovalbumin, *Vibrio anguillarum* and Freund's complete adjuvant following intraperitoneal and bath immunisation. *Fish and Shellfish Immunology* 4, 475–488.
49. Kaattari SL (1992): Fish B lymphocytes: Defining their form and function. In: Faisal M, Hetrick FM (eds.): *Annual Review of Fish Diseases*. Vol. 2. Pergamon, Tarrytown, NY, USA. 161–180.
50. Morrison RN, Nowak B (2002): The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11, 46–54.
51. Fischer U, Utke K, Somamoto T, Kollner B, Ototake M, Nakanishi T (2006): Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 209–226.
52. Dijkstra JM, Kollner B, Aoyagi K, Sawamoto Y, Kuroda A, Ototake M (2003): The rainbow trout classical MHC class I molecule Onmy-UBA) 501 is

- expressed in similar cell types as mammalian classical MHC class I molecules. *Fish and Shellfish Immunology* 14, 1–23
53. Tatner MF, Manning MJ (1983): The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Developmental and Comparative Immunology* 7, 69–75.
54. Whyte SK (2007): The innate immune response of finfish e A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 1127–1151.
55. Subramaniam S, Stansberg C, Olsen L, Zou J, Secombes CJ, Cunningham C (2002): Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 415–431.
56. Subramaniam S, Mackinnon SL, Ross NW (2007): A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 148, 256–263.
57. Subramaniam S, Ross NW, Mackinnon SL (2008): Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 150, 85–92.
58. Shephard KL (1994): Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology Fisheries* 4, 401–429.
59. Ingram GA (1980): Substances involved in the natural resistance of fish to infection a review. *Journal of Fish Biology* 16, 23–60.

60. Aranishi F, Nakane M (1997): Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry* 16, 471–478.
61. Boshra H, Li J, Sunyer JO (2006): Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 239–262.
62. Saurabh S, Sahoo PK (2008): Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39, 223–239.
63. Hibiya T (ed.) (1994): *An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. 5–125.
64. Sveinbjornsson B, Olsen R, Paulsen S (1996): Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Disease* 19, 349–355.
65. Evans D, Jaso-Friedmann L (1992): Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Disease* 2, 109.
66. Hasegawa S, Nakayasu C, Yoshitomi T, Nakanishi T, Okamoto N (1998): Specific cell-mediated cytotoxicity against an allogeneic target cell line in isogeneic ginbuna crucian carp. *Fish and Shellfish Immunology* 8, 303–313.
67. Shen L, Stuge TB, Zhou H, Khayat M, Barker KS, Quiniou SM, Wilson M, Bengten E, Chinchar VG, Clem LW, Miller NW (2002): Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 141–149.
68. Hinuma S, Abo T, Kumagai K, Hata M (1980): The potent activity of fresh water fish kidney cells in cell-killing. I. Characterization and species

- distribution of cytotoxicity. *Developmental and Comparative Immunology* 4, 653–666.
69. McKinney EC, Achmale MC (1994): Damselfish with neurofibromatosis exhibit cytotoxicity in toward tumor targets. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 305–313.
70. Faisal M, Ahmed G, Peters II, Cooper EL (1989): Natural cytotoxicity of tilapia leukocytes. *Disease of Aquatic Organisms* 7, 17–22.
71. Lange S, Magnadottir B (2003): Spontaneous haemolytic activity of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) serum. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular Biology* 136, 99–106.
72. Blazer VS (1991): Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *Journal of Aquatic Animal Health* 3, 77–86.
73. Secombes CJ (2008): Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish and Shellfish Immunology* 25, 409–416.
74. Secombes CJ, Fletcher TC (1992): The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease* 2, 53–71.
75. Holland MC, Lambris JD (2002): The complement system of teleosts. *Fish and Shellfish Immunology* 12, 399–420.
76. Sakai M, Taniguchi K, Mamoto K, Ogawa H, Tabata M (2001): Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Disease* 24, 433–438.

77. Matsushita M, Endo Y, Nonaka M, Fujita T (1998): Complement- related serine proteases in tunicates and vertebrates. *Current Opinion in Immunology* 10, 29–35.
78. Yano T, Matsuyama H, Mangindaan REP (1991): Polysaccharide induced protection of carp *Cyprinus carpio* against bacterial infection. *Journal of Fish Disease* 14, 577–582.
79. Matsuyama H, Yano T, Yamakawa T, Nakao M (1992): Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish and Shellfish Immunology* 2, 69–78.
80. Lammens M, Decostere A, Haaesebrouck F (2000): Effects of *Flavobacterium psychrophilum* strains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. *Disease of Aquatic Organisms* 41, 173–179.
81. Lorenzen N, LaPatra SE (1999): Immunity to rhabdovirus in rainbow trout: the antibody response. *Fish and Shellfish Immunology* 9, 345–360.
82. Yin Z, Lam TL, Sin YM (1997): Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 7, 93–104.
83. Robertsen B (2006): The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 172–191.
84. De Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BRG (2001): Functional classification of interferon-stimulated

- genes identified using microarrays. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 912–920.
85. Kileng O, Brundtland MI, Robertsen B (2007): Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 378–389.
86. Dinarello CA (1997): Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Review* 8, 253–265.
87. Mathew JA, Guo YX, Goh KP, Chan J, Verburg van Kemenade BM, Kwang J (2002): Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1 β and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish and Shellfish Immunology* 13, 85–95.
88. Sangrador-Vegas A, Martin SA, O’Dea PG, Smith TJ (2000): Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *European Journal of Biochemistry* 267, 7031–703.
89. Armstrong PB, Quigley JP (1999): α -2-Macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 375–390.
90. Grinde B, Lie O, Poppe T, Salte R (1988): Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture* 68, 299–304.

91. Bayne CJ, Gerwick L (2001): The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 725–743.
92. Hoover GJ, El-Mowafi A, Simko E, Kocal TE, Ferguson HW, Hayes MA (1998): Plasma proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) isolated by binding to lipopolysaccharide from *Aeromonas salmonicida*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120, 559–569.
93. Cook MT, Hayball PJ, Nowak BF, Hayball JD (2005): The opsonising activity of a pentraxin-like protein isolated from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 703–712.
94. De Haas CJ, van Leeuwen EMM, van Bommel T, Verhoef J, van Kessel KPM, van Strijp JAG (2000): Serum amyloid P component bound to Gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infection and Immunity* 68, 1753–1759
95. Nauta AJ, Daha M, van Kooten C, Roos A (2003): Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends in Immunology* 24, 148–154.
96. Szalai AJ, Norcum MT, Bly JE, Clem LW (1992): Isolation of an acute-phase and phosphorylcholine-reactive pentraxin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 102, 535–543.
97. Suzumoto BK, Schreck CB, McIntyre JD (1997): Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their

- hematological responses to bacterial kidney disease. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 1–8.
98. Zou J, Mercier C, Koussounadis A, Secombes C (2007) Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Mol Immunol* 44: 638-647.
99. Salerno G, Parrinello N, Roch P, Cammarata M (2007) cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, Part B* 146: 521-529.
100. Noga EJ, Silphaduang U, Park NG, Seo JK, Stephenson J, et al. (2009) Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides. *Comp Biochem Physiol, Part B* 152: 299-305.
101. Du Pasquier L (2001) The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 1-15.
102. Chang CI, Pleguezuelos O, Zhang YA, Zou J, Secombes CJ (2005) Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect Immun* 73: 5053-5064.
103. Silphaduang U, Noga EJ (2001) Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414: 268-269.
104. Bao B, Peatman E, Li P, He C, Liu Z (2005) Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific up-regulation after bacterial infection. *Dev Comp Immunol* 29: 939-950.

105. Pan CY, Chen JY, Cheng YSE, Chen CY, Ni IH, et al. (2007) Gene expresión and localization of the epinecidin-1 antimicrobial peptide in the grouper (*Epinephelus coiodes*), and its role in protecting fish against pathogenic infection. *DNA Cell Biol* 26: 403-413.
106. Ravichandran S, Kumaravel K, Rameshkumar G, AjithKumar TT (2010) Antimicrobial peptides from the marine fishes. *Res J Immunol* 3: 146-156.
107. Chia TJ, Wu YC, Chen JY, Chi SC (2010) Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish Shellfish Immunol* 28: 434-439.
108. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135: 1-11
109. Luis Rivas y David Andreu (2002) Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿una nueva alternativa en clínica? *Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Madrid.* 21(7):358-65
110. Merryfield, R.B., Merrifield, E.L., Juvvadi, P., Andreu, D. And Boman, H.G. (1994). Design and synthesis of antimicrobial peptides. *Antimicrobial peptides.* Wiley Press, Chichester (Ciba Foundation Symposium 186), pp 5-26.

111. Hultmark, D., Engstrom, A., Anderson, K., Steiner, H., Bennich, H. and Boman, H.G. (1983) Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO* 2:571-576.
112. Plytycz, B. and R. Seljelid. 1995. Fish immunophysiology. *FINews* 2: 4-5.
113. Flory, G.M. and C.J. Bayne. 1991. The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic responses of leucocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology* 15: 135-142.
114. Weyts, F.A.A., N. Cohen, G. Flik, and B.M.L. Verburg-Van Kemenade. 1999. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 1-20.
115. Engelsma, M.Y., M.O. Huising, W.B. van Muiswinkel, G. Flik, J. Kwang, H.F.J. Savelkoul, and B.M.L. Verburg-van Kemenade. 2002. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 87: 467-479.
116. Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response of fish. *Physiological Reviews* 77: 591-626.
117. Barton, B.A. and G.K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the stress response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 3-26.

118. Bly, J.E. and L.W. Clem. 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish & Shellfish Immunology* 2: 159-171
119. Bly, J.E., S.M. Quiniou, and L.W. Clem. 1997. Environmental effects on fish immune mechanisms. *Developments in Biological Standardization* 90: 33-43.
120. Tapia F., (1997) Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de grado para la obtención del título de Acuicultor.
121. Lijima N., Tanimoto N., Emoto Y., Morita Y., Uematsu K., Murakami T., Nakai T., (2003) Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream *Chrysophryx major*. *European Journal of Biochemistry*. 270: 675-68.

ANEXOS

ANEXO A

Análisis estadísticos

Análisis estadísticos de ensayos de actividad antibacteriana contra *Bacillus sp 1* de mucus de pez chame.

Summary Table of Means (new.sta)					
N=12 (No missing data in dep. var. list)					
	<i>Bacillus sp 1</i>	<i>Bacillus sp 1</i>	<i>Bacillus sp 1</i>	<i>Bacillus sp 1</i>	<i>Bacillus sp 1</i>
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,364	3,000	1,091	0,045	0,002
17092g	0,501	3,000	1,502	0,077	0,006
785g	0,481	3,000	1,443	0,088	0,008
EDTA	0,012	3,000	0,035	0,008	0,000
All Grps	0,339	12,000	4,071	0,212	0,045
Scheffe Test; Variable: <i>Bacillus sp 1</i> (new.sta)					
Marked differences are significant at p < .05000					
	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.36367	M=.50067	M=.48100	M=.01167	
CT (+)		0,144	0,233	0,001	
17092g	0,144		0,984	0,000	
785g	0,233	0,984		0,000	
EDTA	0,001	0,000	0,000		

Análisis estadísticos de ensayos de actividad antibacteriana contra *Bacillus sp 2* de mucus de pez chame.

Summary Table of Means (new.sta)					
N=12 (No missing data in dep. var. list)					
	<i>Bacillus sp. 2</i>	<i>Bacillus sp. 2</i>	<i>Bacillus sp. 2</i>	<i>Bacillus sp. 2</i>	<i>Bacillus sp. 2</i>
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,970	3,000	2,910	0,091	0,008
17092g	0,478	3,000	1,434	0,017	0,000
785g	0,628	3,000	1,884	0,059	0,003
EDTA	0,040	3,000	0,120	0,052	0,003
All Grps	0,529	12,000	6,348	0,353	0,124
Scheffe Test; Variable: <i>Bacillus sp. 2</i> (new.sta)					
Marked differences are significant at $p < .05000$					
	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.97000	M=.47800	M=.62800	M=.04000	
CT (+)		0,0000743	0,0009727	0,0000006	
17092g	0,0000743		0,0908966	0,0001730	
785g	0,0009727	0,0908966		0,0000197	
EDTA	0,0000006	0,0001730	0,0000197		

Análisis estadísticos de ensayos de actividad antibacteriana contra *Bacillus sp 3* de mucus de pez chame.

Summary Table of Means (new.sta)					
N=12 (No missing data in dep. var. list)					
	<i>Bacillus sp. 3</i>	<i>Bacillus sp. 3</i>	<i>Bacillus sp. 3</i>	<i>Bacillus sp. 3</i>	<i>Bacillus sp. 3</i>
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,254	3,000	0,762	0,116	0,014
17092g	0,413	3,000	1,239	0,122	0,015
785g	0,457	3,000	1,371	0,025	0,001
EDTA	0,000	3,000	0,001	0,001	0,000
All Grps	0,281	12,000	3,373	0,200	0,040
Scheffe Test; Variable: <i>Bacillus sp. 3</i> (new.sta)					
Marked differences are significant at $p < .05000$					
	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.25400	M=.41300	M=.45700	M=.00033	
CT (+)		0,2364906	0,1062699	0,0411598	
17092g	0,2364906		0,9376301	0,0026923	
785g	0,1062699	0,9376301		0,0013934	
EDTA	0,0411598	0,0026923	0,0013934		

Análisis estadísticos de ensayos de actividad antibacteriana contra *V. alginolyticus* de mucus de pez chame.

Summary Table of Means (new.sta)					
N=12 (No missing data in dep. var. list)					
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,628	3,000	1,883	0,016	0,000
17092g	0,594	3,000	1,781	0,081	0,007
785g	0,615	3,000	1,846	0,026	0,001
EDTA	0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps	0,459	12,000	5,510	0,280	0,078
Scheffe Test; Variable: <i>V. alginolyticus</i> (new.sta)					
Marked differences are significant at p < .05000					
	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.62767	M=.59367	M=.61533	M=0.0000	
CT (+)		0,8185360	0,9882490	0,0000009	
17092g	0,8185360		0,9423932	0,0000014	
785g	0,9882490	0,9423932		0,0000011	
EDTA	0,0000009	0,0000014	0,0000011		

Análisis estadísticos de ensayos de actividad antibacteriana contra *V. harveyi* de mucus de pez chame.

Summary Table of Means (new.sta)					
N=12 (No missing data in dep. var. list)					
	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,243	3,000	0,729	0,010	0,000
17092g	0,011	3,000	0,032	0,009	0,000
785g	0,001	3,000	0,004	0,001	0,000
EDTA	0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps	0,064	12,000	0,765	0,108	0,012
Scheffe Test; Variable: <i>V. harveyi</i> (new.sta)					
Marked differences are significant at p < .05000					
	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.24300	M=.01067	M=.00133	M=0.0000	
CT (+)		0,000	0,000	0,000	
17092g	0,000		0,444	0,341	
785g	0,000	0,444		0,996	
EDTA	0,000	0,341	0,996		

Análisis estadísticos de ensayos de actividad antibacteriana contra *V. vulnificus* de mucus de pez chame.

Summary Table of Means (new.sta)					
N=12 (No missing data in dep. var. list)					
	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
CT (+)	0,267	3,000	0,802	0,023	0,001
17092g	0,261	3,000	0,783	0,051	0,003
785g	0,288	3,000	0,865	0,023	0,001
EDTA	0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps	0,204	12,000	2,450	0,126	0,016
Scheffe Test; Variable: <i>V. vulnificus</i> (new.sta)					
Marked differences are significant at p < .05000					
	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.26733	M=.26100	M=.28833	M=0.0000	
CT (+)		0,995	0,864	0,000	
17092g	0,995		0,749	0,000	
785g	0,864	0,749		0,000	
EDTA	0,000	0,000	0,000		

Análisis estadísticos de ensayos de actividad antibacteriana contra *V. anguillarum* de mucus de pez chame.

Summary Table of Means (new.sta)					
N=12 (No missing data in dep. var. list)					
	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>
	Mean	N	Sum	Std.Dv.	Variance
G_1:1	0,177	3,000	0,530	0,018	0,000
G_2:2	0,096	3,000	0,288	0,002	0,000
G_3:3	0,122	3,000	0,365	0,009	0,000
G_4:4	0,000	3,000	0,000	0,000	0,000
All Grps	0,099	12,000	1,183	0,067	0,005
Scheffe Test; Variable: <i>V. anguillarum</i> (new.sta)					
Marked differences are significant at p < .05000					
	{1}	{2}	{3}	{4}	
	M=.17667	M=.09600	M=.12167	M=0.0000	
G_1:1 {1}		0,000	0,001	0,000	
G_2:2 {2}	0,000		0,084	0,000	
G_3:3 {3}	0,001	0,084		0,000	
G_4:4 {4}	0,000	0,000	0,000		