



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN TEJIDO ASOCIADO A MUCOSA DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y DORADA (*Sparus aurata*)

Trabajo de fin de grado

Ingeniería de Sistemas Biológicos

Autor: Lluç Soliva Dueso

Tutor: Felipe E. Reyes López

Eva Vallejos Vidal

30 / Septiembre / 2017

Resum

Els peixos en aqüicultura estan permanentment sota els efectes de diferents estímuls externs, alguns d'ells poden esdevenir agents d'estrès. Depenent de la seva magnitud i durada, poden donar lloc a una resposta fisiològica amb l'objectiu de mantenir la homeòstasis del organisme i així preservar l'estat del benestar. Tant mateix, la resposta a l'estrès pot provocar efectes col·laterals a altres tipus de mecanismes com la resposta immunològica. L'activació dels mecanismes fisiològics durant episodis d'estrès alliberen diferents hormones, essent el cortisol l'hormona més rellevant durant la resposta a l'estrès en teleostis. El cortisol no només és responsable de coordinar una sèrie de processos destinats a generar una resposta enfront a l'estímul extern, si no que també repercuteix a la modulació del sistema immunològic. En estudis previs s'ha reportat que el cortisol alliberat enfront a una resposta d'estrès agut (estímul de curta durada i alta intensitat) provoca un efecte immunoestimulant a nivell sistèmic. Actualment, un creixent interès s'ha centrat en la resposta a nivell local en teixit limfoide associat a mucosa (MALT) degut al seu rol immunològic fonamental com a primera línia de defensa enfront a un agent d'estrès i/o patògen. Tanmateix, a l'actualitat es desconeix l'efecte del cortisol en el teixit limfoide associat a mucosa (MALT). Per aquest motiu, l'objectiu principal d'aquest estudi va ser avaluar l'efecte del cortisol en els tres principals MALTs: pell (SALT), brànquies (GIALT) i intestí (GALT). Per això, els teixits van ser incubats *in vitro* amb una concentració fisiològica de cortisol simulant una situació de estrès agut (100 ng/100 mg de teixit). L'efecte del cortisol a nivell local, es va avaluar al cap de 2h, 4h, 24h de tractament mitjançant real-time PCR amb el propòsit de determinar la modulació de diferents gens relacionats amb la resposta pro-inflamatòria (interleucina 1 β i 6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) i ciclooxigenasa (COX2)), anti-inflamatòria (interleucina 10, factor de creixement transformant beta) i la expressió gènica de gens relacionats amb la resposta a l'estrès (receptors glucocorticoides (GR) i proteïna de xoc tèrmic 70kDA). Com a model d'estudi es va utilitzar la daurada (*Sparus aurata*) i la truita (*Oncorhynchus mykiss*) amb l'objectiu de determinar si la modulació de gens en resposta a la presència de cortisol és conservada entre espècies. Mentre que a la pell de daurada no es va observar cap modulació dels gens avaluats, a la truita sí que es va observar un augment de la expressió de TNF- α i GR a les 4 hores de tractament. A l'intestí, es va observar la modulació de IL-1 β i COX2 a les 24 hores d'incubació a la daurada, mentre que a la truita només es va registrar l'expressió de COX2. A les brànquies no es van observar diferències significatives a cap de les dues espècies. En conclusió, els nostres resultats indiquen que la incubació de cortisol als MALT produeixen un efecte estimulador, encara que reduït, a la modulació de gens associats a la resposta immunològica i d'estrès a nivell de teixit associat a mucosa a les dues espècies estudiades.

Paraules clau: Cortisol, teixits limfoides associats a mucosa (MALT), resposta pro-inflamatòria, resposta anti-inflamatòria, resposta al estrès, estrès agut, expressió gènica

Resumen

Los peces en acuicultura están permanentemente bajo los efectos de distintos estímulos externos, algunos de ellos pueden convertirse estresores. Dependiendo de su magnitud y duración, éstos pueden dar lugar a una respuesta fisiológica con el objetivo de mantener la homeostasis del organismo y así preservar el estado de bienestar. Sin embargo, la respuesta al estrés puede provocar efectos colaterales en otro tipo de mecanismos como la respuesta inmunológica. La activación de los mecanismos fisiológicos durante episodios de estrés liberan distintas hormonas, siendo el cortisol la hormona más relevante en la respuesta al estrés en teleósteos. El cortisol no sólo es responsable de coordinar una serie de procesos destinados a generar una respuesta frente al estímulo externo, sino que también repercute en la modulación del sistema inmunológico. En estudios previos se ha reportado que el cortisol liberado frente a una respuesta de estrés agudo (estímulo de corta duración y alta intensidad) provoca un efecto inmunoestimulante a nivel sistémico. Actualmente, un creciente interés se ha centrado en la respuesta a nivel local del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) debido a su rol inmunológico fundamental como primera línea de defensa frente a un agente estresor y/o patógeno. Sin embargo, en la actualidad se desconoce el efecto del cortisol en el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). Por tal motivo, el objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto del cortisol en los tres principales MALTs: piel (SALT), branquias (GIALT) e intestino (GALT). Para ello, los tejidos fueron incubados *in vitro* con una concentración fisiológica de cortisol simulando una situación de estrés agudo (100 ng/100 mg de tejido). El efecto del cortisol a nivel local, se evaluó al cabo de 2h, 4h, y 24h de tratamiento mediante real-time PCR con el propósito de determinar la modulación de distintos genes relacionados con la respuesta inmunológica pro-inflamatoria (interleucina 1 β (IL-1 β) y 6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y ciclooxigenasa (COX2)), anti-inflamatoria (interleucina 10, factor de crecimiento transformante beta) y la expresión génica de genes relacionados con la respuesta al estrés (receptor glucocorticoide (GR), proteína de choque térmico 70 kDA). Como modelo de estudio se utilizó la dorada (*Sparus aurata*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con el objetivo de determinar si la modulación de genes en respuesta a la presencia de cortisol es conservada entre especies. Mientras que en piel de dorada no se observó ninguna modulación en los genes evaluados, en trucha sí se observó un aumento de la expresión de TNF- α y GR a las 4 horas de tratamiento. En intestino, se observó la modulación de IL-1 β y COX2 a las 24 horas de incubación en dorada, pero que en trucha solo fue registrada la expresión de COX2. En branquias no se observó diferencias significativas en ambas especies. En conclusión, nuestros resultados indican que la incubación de cortisol en MALT produce un efecto estimulador, aunque reducido, de la modulación de genes asociados a la respuesta inmunológica y de estrés a nivel de tejido asociado a mucosas en ambas especies estudiadas.

Palabras clave: Cortisol, tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT), respuesta pro-inflamatoria, respuesta anti-inflamatoria, respuesta al estrés, estrés agudo



Abstract

Fish in aquaculture are permanently under the influence of various external stimuli, some of them can become stressors. Depending on their magnitude and duration, they may give rise to a physiological response with the aim of maintaining the body's homeostasis and thus preserving the welfare state. However, the response to stress can cause side effects in other types of mechanisms such as the immune response. The activation of physiological mechanisms during stress episodes releases different hormones, being cortisol the most relevant hormone in the response to stress in teleost. Cortisol is not only responsible to coordinate a series of processes aimed at generating a response to the external stimuli, but also influences the modulation of the immune system. In previous studies it has been reported that cortisol released against an acute stress response (short duration and high intensity stimuli) causes an immune-stimulating effect at systemic level. Currently, a growing interest has focused on the local response of mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) due to its fundamental immunological role as a first line of defence against a stressor and / or pathogen. Nevertheless, the effect of cortisol on mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) is currently unknown. For this reason, the aim of this study was to evaluate the effect of cortisol on the three main MALTs: skin (SALT), gills (GIALT) and intestine (GALT). For that reason, the tissues were incubated *in vitro* with a physiological concentration of cortisol simulating an acute stress situation (100 ng / 100 mg of tissue). The effect of cortisol at the local level was evaluated after 2h, 4h, and 24h of treatment by real-time PCR with the purpose of determining the modulation of different genes related to the pro-inflammatory immune response (interleukin 1 β (IL- 1 β) and 6, tumoral necrosis factor alpha (TNF- α) and cyclooxygenase (COX2), the anti-inflammatory immune response (interleukin 10, transforming growth factor beta) and gene expression related genes to stress response (glucocorticoid receptor (GR), 70 kDa heat shock protein). As a model of study, the sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were used to determine if the modulation of genes in response to the presence of cortisol is conserved between species. While, in sea bream skin no modulation was observed in the evaluated genes, an increase in the expression of TNF- α and GR was observed in trout at 4 hours of treatment. In the intestine, modulation of IL-1 β and COX2 was observed at 24 hours of incubation in sea bream, but in trout only COX2 expression was recorded. In gills, no significant differences were observed in both species. In conclusion, our results indicate that the incubation of cortisol in MALT produces a stimulatory, but reduced, effect of the modulation of genes associated with the immune response and stress at the level of mucosal associated tissue in both species studied.

Key words: Cortisol, mucosal-associated lymphoid tissue (MALT), pro-inflammatory response, anti-inflammatory response, stress response, acute stress

Sumario

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
SÍMBOLOS I ACRÓNIMOS	8
1. INTRODUCCIÓ	9
1.1. Acuicultura.....	9
1.2. Perspectiva general de la respuesta inmunológica en peces.....	10
1.3. Citoquinas.....	11
1.4. Respuesta inmune a nivel local en peces	14
1.5. Respuesta frente a un agente estresor y activación del eje HPI en teleósteos	15
1.6. Agentes o estímulos estresores	17
1.7. Efecto del estrés en el sistema inmune	18
1.8. Hipótesis y objetivos	20
2. METODOLOGÍA	21
2.1. Animales	21
2.2. Hormonas y agentes farmacológicos.....	21
2.3. Diseño experimental in vitro.....	21
2.4. Extracción del RNA y síntesis del cDNA.....	22
2.5. Análisis de la expresión génica.....	26
2.6. Análisis estadístico	27
3. RESULTADOS	29
4. DISCUSIONES	36
5. CONCLUSIÓN	41
BIBLIOGRAFÍA	42



Índice de figuras

- Figura 2-1 Representación de la cuantificación de la concentración de una muestra de RNA extraída utilizando el programa NanoDrpND-2000 spectrophotometer. Se indica el tipo de muestra (RNA), el factor de conversión de la absorbancia obtenida en concentración (40 ng/ μ l), la concentración (Conc.), absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280), y relaciones entre las absorbancias evaluadas (260/280; 260/230). _____ 23
- Figura 2-2 Medias de la concentración de RNA, ratios de contaminación proteica (260/280) y ratios de contaminación de solventes orgánicos (230/260). Columna izquierda: respuesta para piel, branquias e intestino en dorada; columna derecha: resultados para piel, branquias e intestino en trucha. En cada gráfica se representa (de izquierda a derecha) la media de la concentración de ácidos nucleicos (μ g/ μ l) (barras con patrón de rayas diagonales), media de los ratios 260/280 (barras con patrón cuadrículado), y la media de los ratios 260/230 (Barras con patrón de puntos). _____ 24
- Figura 2-3 Electroforesis de la integridad del RNA de 12 muestras escogidas aleatoriamente. Se presenta el estándar de peso molecular conocido (L) con las bandas de referencia de tamaño predefinido (25-4000 (nt)). El detalle del contenido de cada carril (1-12) se indica en la Tabla 2-1. Flecha azul (a la izquierda): pico 28S; Flecha roja (a la izquierda): pico 18S. _____ 25
- Figura 3-1 Expresión relativa normalizada (ERN) en piel de dorada de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). No hay diferencias significativas. _____ 30
- Figura 3-2 Expresión relativa normalizada (ERN) en piel de trucha arcoíris de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas:

tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol).
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. _____ 31

Figura 3-3 Expresión relativa normalizada (ERN) en branquias de dorada de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). No hay diferencias significativas. _____ 32

Figura 3-4 Expresión relativa normalizada (ERN) en branquias de trucha de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). No hay diferencias significativas. _____ 33

Figura 3-5 Expresión relativa normalizada (ERN) en intestino de dorada de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. _____ 34

Figura 3-6 Expresión relativa normalizada (ERN) en intestino de trucha arcoíris de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. _____ 35



Índice de tablas

Tabla 2-1 Valores de RIN de las muestras escogidas al azar y tejido al que pertenecen. _____ 25

Tabla 2-2 Primers utilizados para Real-time PCR para el análisis de expresión génica en dorada. 27

Tabla 2-3 Primers utilizados para Real-time PCR para el análisis de expresión génica en trucha arcoíris. _____ 28

Símbolos i acrónimos

- ATCH: Hormona adrenal corticoide.
- BCR: Receptores celulares B.
- CNS: Sistema nervioso central.
- COX2: Ciclooxygenasa o prostaglandina-endoperóxido sintasa-2.
- CRF o CRH: factor de liberación de corticoesteroides o hormona de liberación de corticoesteroides.
- CSF: Factores de estimulación de colonias.
- DC: Células dendríticas.
- EF1 α : Factor de elongación 1-alfa.
- GALT: Tejido linfoide asociado a intestino.
- GIALT: Tejido linfoide asociado a branquias.
- GR: Receptor glucocorticoide.
- GRE: Elementos de respuesta glucocorticoide.
- HPI: Hipotálamo-pituitaria-interrenal.
- HSP70: Proteína de choque térmico de 70 kDa.
- IEL: Linfocitos intraepiteliales.
- IL-1 β : Interleucina 1 β .
- IL-6: Interleucina 6.
- IL-10: Interleucina 10.
- INF: Interferones.
- LPL: Leucocitos lámina propia.
- MALT: Tejido linfoide asociado a las mucosas.
- MC2R: Receptor melancortin 2.
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- MR: Receptor mineralocorticoide.
- PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- POMC: Proteína precursora pro-opiomelanocortina.
- PRR: Receptores de reconocimiento de patrones.
- RIN: Numero de integración de RNA.
- RPL27: Proteína ribosomal L27.
- SALT: Tejido linfoide asociado a piel.
- TCR: Receptores celulares T.
- TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta.
- TLR: Receptores tipo Toll.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

1. Introducció

1.1. Acuicultura

La acuicultura es un conjunto de actividades, técnicas y conocimientos que abarca diversos sistemas de cultivo de especies acuáticas vegetales y cría de animales en zonas continentales, costeras y marítimas que utilizan y producen una amplia variedad de productos animales y vegetales. Tiene importantes efectos: (1) social, puesto que es uno de los sectores de producción de alimentos con un crecimiento más acelerado actualmente; (2) económico, puesto que hoy representa casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación, siendo además su producción de alimentos por hectárea muy superior a otras áreas productoras de alimentos como la agricultura o la ganadería; y (3) medioambiental, ya que contribuye a la reducción de la práctica de la pesca masiva, así como en otros ámbitos tales como la repoblación de especies autóctonas en peligro de extinción, o en la producción de algas para su utilización en la generación de biocombustible ([Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2004](#)).

Actualmente España es el productor con mayor volumen de producción acuícola de la Unión Europea según los últimos datos del [Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente](#) (MAPAMA) del año 2015 ([Observatorio Español de Acuicultura, 2017](#)). En este ámbito, dos de las especies referentes en la acuicultura española son la dorada (*Sparus aurata*), que en los últimos años su producción nacional ha crecido hasta el punto de ser una de las especies más producidas de agua salada ([Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012](#)), y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) siendo su cultivo uno de los más antiguo (desde 1950) y de mayor producción de agua dulce ([Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017](#)). Según [APROMAR, 2016](#) la producción en 2014 de dorada mediante acuicultura existe en 20 países donde España ocupa el cuarto lugar con una producción de 16.231t (8.9% de la producción global), mientras que para trucha arcoíris el tamaño de producción fue de 15.111t en 2014. Por tanto, en el presente estudio se utilizó como espécimen ejemplar de agua marina la dorada y de agua dulce la trucha arcoíris por la relevancia que ambas especies representan en la acuicultura española.

1.2. Perspectiva general de la respuesta inmunológica en peces

La respuesta inmunológica de los peces se ha descrito generalmente basada en un modelo de fisiología comparada. Al igual que en los mamíferos, los peces también cuentan con un sistema de repuesta inmune innata y una adaptativa. La respuesta inmune innata corresponde a la primera línea de defensa del organismo frente a infecciones, e incluye barreras físicas y respuestas tanto de tipo humoral como celular. Por otra parte, la respuesta inmune adaptativa que es capaz de reconocer un antígeno específico y montar una respuesta inmune destinada a la erradicación de un patógeno en particular, es lo que se conoce como respuesta inmunológica secundaria.

El sistema inmune innato reconoce estructuras moleculares comunes entre los microorganismos patógenos (polisacáridos, lipopolisacáridos, DNA bacteriano, entre otros) que se conocen como patrón molecular asociado a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés). Los PAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés). Estos mecanismos de reconocimiento ayudan a la posterior eliminación de los patógenos (por fagocitosis, por ejemplo) o pueden activar la respuesta inmune adaptativa como vía de eliminación adicional. Las células de este sistema cuentan con una gran diversidad de funciones. Algunas tienen la función de fagocitar (trata de engullir i degradar las partículas patogénicas), otras producen y secretan citoquinas i quimioquinas las cuales ayudan a guiar la respuesta inmune en las zonas infectadas y que permiten a su vez una comunicación entre los diferentes componentes que integran la respuesta inmunológica.

El sistema inmune adaptativo se activa mediante el procesamiento de PAMPs por parte de las células presentadoras de antígenos, las cuales son responsables de procesar tal secuencia a efectos de producir secuencias polipeptídicas cortas que serán presentadas en la superficie extracelular por un receptor de transmembrana denominada como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC clase I, MHC clase II). Estas secuencias peptídicas cortas asociadas a patógenos son reconocidas mediante los receptores celulares B (BCR) y T (TCR). Aunque la activación de tal respuesta no es inmediata, ésta provoca como consecuencia la activación de una serie de mecanismos que generan un aumento en la velocidad y magnitud de la respuesta con cada exposición patogénica. Las células encargadas de esta respuesta son los linfocitos B (responsables de la respuesta específica humoral) y los linfocitos T (encargadas de la respuesta específica de tipo celular) (Reyes-Cerpa et al., 2012).



1.3. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas secretadas con funciones de crecimiento, diferenciación celular y activación que regulan la naturaleza de la respuesta inmunológica (Khansari, Parra, Reyes-López, & Tort, 2017). Las citoquinas son secretadas tanto a nivel de respuesta inmune innata como a nivel de respuesta adaptativa. En el caso de la respuesta inmune innata, los PRRs son capaces de reconocer PAMPs. Los PRRs se han descrito, principalmente, como receptores tipo Toll (TLR), los cuales, una vez se ha realizado el reconocimiento de PAMPs, son capaces de generar una cascada de activación de señales que conlleva a la activación de factores de transcripción y en consecuencia a la producción de citoquinas que serán las responsables de coordinar la activación de la respuesta inmune. Tal activación puede, por tanto, generar en consecuencia la activación de la respuesta específica (dependiendo de la naturaleza del patógeno) tanto a nivel humoral (producción de anticuerpos) como a nivel celular (células T, células T citotóxicas o Natural killers). Por tanto, las citoquinas pueden ser producidas por diferentes poblaciones celulares inmunológicas tales como macrófagos, linfocitos, granulocitos, DCs (células dendríticas), mastocitos, así como también por otros tipos celulares como las células epiteliales.

Las citoquinas se dividen en distintos grupos, estos son, interferones (INFs), interleucinas (ILs), factores de necrosis tumoral (TNFs), factores de estimulación de colonias (CSF) y quimioquinas. La combinación de tales citoquinas que son secretadas como respuesta a una estimulación inmune, induce a su vez la expresión de múltiples genes inmune relacionados a través de diferentes vías de señalización, los cuales contribuyen a la iniciación y diseminación de la respuesta inmune (Reyes-Cerpa et al., 2012). En efecto, las citoquinas son las responsables de dirigir las señales inflamatorias que regulan la capacidad de los fagocitos para destruir el patógeno invasor (Wang & Secombes, 2013). En este aspecto, una de las citoquinas más relevantes de la respuesta pro-inflamatorias es la interleucina-1 β (IL-1 β) siendo una de las primeras citoquinas pro-inflamatorias que se expresa como respuesta a un estrés en el organismo. La expresión de esta citoquina induce una cascada de reacciones y como resultado se produce una respuesta inflamatoria en el tejido donde se ha producido el reconocimiento del patógeno. Se produce principalmente en los monocitos sanguíneos y los macrófagos tisulares. Su papel principal es la modulación de la expresión de otras citoquinas y quimioquinas las cuales regulan la acción de genes inmunológicos, la activación de

linfocitos, la migración de leucocitos, la fagocitosis y las actividades bactericidas (Reyes-Cerpa et al., 2012; Wang & Secombes, 2013).

En respuesta a la secreción de IL-1 β una de las citoquinas que se expresa es IL-6 (interleucina 6). Esta interleucina se segrega durante la cascada de reacciones iniciada por IL-1 β que precede una infección bacteriana o una situación fisiológica que conlleve su síntesis. Se produce en distintos grupos de células de todo el organismo principalmente en los linfocitos T, macrófagos, fibroblastos, neuronas, células endoteliales y gliales. Aunque durante la inflamación la fuente principal de IL-6 son los monocitos y macrófagos de la zona. Tiene un efecto pleitrópico (actúa sobre muchos tipos de células diferentes) que abarca una gran variedad de procesos incluyendo la regulación de otras citoquinas pro- (IL-1 β , TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β), la regulación de diversos procesos inmunes y neuroendocrinos, el control de la producción de inmunoglobulinas, la diferenciación de linfocitos y monocitos, la secreción de quimioquinas y la migración de leucocitos a las zonas de inflamación. Además, modula la expresión de ella misma de manera que puede actuar como activador o supresor de la respuesta inflamatoria (Reyes-Cerpa et al., 2012).

Igual que IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) es una citoquina pleitrópica que puede actuar con distintos roles, aunque destaca principalmente su rol como citoquina pro-inflamatoria. Se produce en múltiples tipos de células, pero principalmente en las células responsables de la respuesta específica de tipo celular (Th1), respuesta específica de tipo humoral (Th2), y también la respuesta de linfocitos T reguladores responsables del control de tales respuestas (Th17). Su segregación afecta tanto en los procesos inmunológicos como fisiológicos y juega un papel crítico en estos procesos. Entre estos dos procesos TNF- α destaca por su papel incrementando la transcripción de citoquinas críticas en la activación de la respuesta inmune adaptativa (Th1, Th2), en diversas respuestas del huésped frente a un estrés (induciendo proliferación de células, diferenciación, necrosis, apoptosis e inducción de otras citoquinas), modula la supervivencia o apoptosis de las células induciendo la vía NF- κ B y activa varias respuestas antibacterianas (Reyes-Cerpa et al., 2012).

En la activación de la respuesta pro-inflamatoria resultan claves no sólo las citoquinas responsables de la activación de diferentes poblaciones celulares inmunológicas, sino también otras proteínas responsables de la regulación de tales respuestas. En este aspecto, COX2 (Ciclooxigenasa-2 o prostaglandina-endoperóxido sintasa-2) es una molécula efectora producida principalmente por los



macrófagos y monocitos, la cual está implicada en la inducción de un estado febril por medio de la producción de eicosanoides, entre otros PGD_2 y PGE_2 . Al mismo tiempo, es también responsable del control de daño a nivel tisular producto de la activación de tal respuesta (Boltaña, Reyes-Lopez, Morera, Goetz, & MacKenzie, 2011). Además, COX_2 también actúa como regulador de la respuesta inflamatoria a nivel del sistema nervioso central siguiendo una estrategia de regulación de retroalimentación negativa.

Además de COX_2 , otras citoquinas participan en el control de la respuesta pro-inflamatoria, conocidas como citoquinas anti-inflamatorias. Entre ellas destaca IL-10 (interleucina 10) la cual es secretada durante los procesos de prevención de patologías consecuencia de la inflamación. Es producida por gran parte de las poblaciones leucocitarias (principalmente monocitos y células T) y en los queratinocitos. IL-10 tiene un papel clave en la inhibición o supresión de la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Al mismo tiempo, puede tener un efecto de estimulación en poblaciones celulares inmunológicas (principalmente células B) con objeto de estimular una respuesta adaptativa de tipo humoral (Th2). Por tanto, IL-10 tiene efecto pleitrópico (Reyes-Cerpa et al., 2012).

Otra citoquina clave en la regulación de la respuesta pro-inflamatoria es el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$, por sus siglas en inglés). $TGF-\beta$ es una citoquina pleitrópica que actúa como molécula anti-inflamatoria e inmunosupresora. Aparece durante la regulación del desarrollo celular, proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de diferentes tipos de leucocitos (Natural killers, macrófagos, granulocitos, entre otros). Se producen principalmente en células T y afecta tanto a nivel autocrino como paracrino (células B). Aunque en la mayoría de sus funciones actúa como inmunosupresor mediante la inhibición de citoquinas (siendo una de las más relevantes $TNF-\alpha$) o en la regulación de la activación de células T, también se sabe que actúa como estimulador de la respuesta regulatoria (Th17) (Reyes-Cerpa et al., 2012).

1.4. Respuesta inmune a nivel local en peces

Tal como en los mamíferos existe una respuesta inmunológica tanto sistémica (torrente circulatorio y órganos inmunes secundarios como bazo, riñón anterior o cefálico, y timo) como a nivel local (tejidos linfoides asociados a mucosa, MALT por sus siglas en inglés), entre las cuales se incluye la piel, branquias e intestino. El tejido linfoide asociado a la piel (SALT, por sus siglas en inglés) es el tejido mucoso más extenso en los teleósteos. Al igual que en mamíferos, está formada por la epidermis y la dermis, pero a diferencia de ellos, la capa más superficial de la piel carece de queratina y presenta células secretoras de moco en la epidermis. Las propiedades antimicrobianas de este tejido son fruto de las lisozimas, componentes de complemento, lectinas, enzimas proteolíticas, e inmunoglobulinas (Ig) que recubren la microbiota de la piel.

Las branquias (GIALT, por sus siglas en inglés) es el órgano de los teleósteos encargado del intercambio de oxígeno con el entorno. Además, al estar expuestas al medio externo acuático permanentemente, hace que sea un tejido diana del ataque por parte de una amplia gama de patógenos de diferente naturaleza. Por este motivo, en las branquias encontramos una acumulación de células inmunológicas, principalmente células T y algunas células B.

El intestino (GALT, por sus siglas en inglés) es una capa de moco que actúa como barrera, física y química con objeto de proteger el epitelio del intestino. Al mismo tiempo, este tejido mucoso es permeable para algunas macromoléculas específicas, jugando por tanto un rol en la homeostasis del tejido. El intestino de los teleósteos está formado por dos poblaciones de células inmunes: leucocitos lámina propia (LPLs) formada por las células inmunológicas como granulocitos, macrófagos, linfocitos, y células plasmáticas; y los linfocitos intraepiteliales (IELs) compuesta por células T y algunas células B localizadas en el epitelio. La acción y regulación de la respuesta inmune del intestino se debe a el convenio entre estas células inmune, las células epiteliales, las células caliciformes, y las células neuroendocrinas.

Por tanto, la respuesta local en peces cuenta con la respuesta inmunológica innata (anticuerpos IgM, lisozima, complemento) y adaptativa (humoral y celular). La diversidad de respuesta a nivel local adquiere relevancia desde el punto de vista que el tejido asociado a mucosa es la primera respuesta frente a un patógeno. Por otra parte, el tejido asociado a mucosa también juega un papel crucial en la percepción de un potencial agente estresor, lo que por tanto llevaría a una respuesta



inmediata a nivel local sin ninguna activación previa de los órganos centrales (respuesta sistemática) (Yada & Tort, 2016). Esta primera línea de defensa aparece particularmente cuando el agente o estímulo estresor se detecta en las superficies interactivas específicas de los peces. En nuestro estudio se analizaron los comportamientos de los MALT de piel, branquias e intestino. Por tanto, estas superficies mucosas actúan como barreras físicas y químicas para proteger al animal no sólo de potenciales patógenos, sino que además de los agentes estresores, actuando como señal de alarma destinada a la activación del sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés) vía eje hipotalámico-pituitaria-células interrenales (eje HPI). Esto se produce debido a que los cambios producidos en estos tejidos asociados a mucosa producen una alteración local en receptores específicos del tejido, lo que estimula la producción y consecuente liberación de sustancias mensajeras (péptidos, hormonas, citoquinas) que activarán la respuesta fisiológica general. Es decir, la respuesta local inducirá la respuesta neuroendocrina (sistemática) cuando las sustancias mensajeras lleguen al CNS y sean capaces de activar el eje HPI. Por tanto, tanto la respuesta local como sistémica serán regulados a través de una retroalimentación recíproca (Parra, Reyes-Lopez, & Tort, 2015).

1.5. Respuesta frente a un agente estresor y activación del eje HPI en teleósteos

El estrés, como termino general, fue definido por Hans Selye en 1953 como una situación donde una persona o animal está sujeto a un cambio que resulta en un daño real o simbólico para su integridad (Selye, 1953). La respuesta al estrés es la suma de las acciones de tres sistemas de regulación (neural, endocrino, e inmunológico). La respuesta neuroendocrina al estrés es llevada a cabo por el eje hipotálamo-hipofisiario-interrenal (HPI) el cual interactúa con el sistema inmunológico mediante la liberación de hormonas a nivel neural (hormonas de liberación de corticoesteroides (CRH); factores de liberación de corticoesteroides (CRF)) e interrenales (cortisol, el principal glucocorticoide en teleósteos).

El eje HPI se activa cuando el agente estresor es percibido por los sensores del sistema nervioso en el hipotálamo y consecuentemente estimula la liberación de CRF o CRH. La liberación de esta hormona peptídica se localiza principalmente en el área preóptica del hipotálamo. CRF viaja a la pituitaria anterior y estimula la secreción de la hormona adrenal corticoide (ATCH), que es el

producto resultante de la división de la proteína precursora pro-opiomelancortin (POMC). ACTH se une a los receptores melancortin 2 (MC2R) localizados en las células esteroideogénicas del tejido interrenal del riñón anterior. Esta unión desencadena una cascada de reacciones dentro de las células esteroideogénicas que induce la producción y liberación de cortisol. El cortisol viaja por el torrente sanguíneo a otros tejidos, entra dentro de las células a través de la membrana por difusión y se une a los receptores de glucocorticoides (GR) y los receptores mineralocorticoides (MR) que residen en el citoplasma. El GR es el principal receptor de la acción glucocorticoide en teleósteos y el nexo entre la respuesta al estrés e inmunológica. Existen diferentes isoformas de estos receptores dependiendo de la especie, en el caso de dorada hasta el momento solo se ha definido una isoforma llamada GR, mientras que para trucha arcoíris se ha encontrado al menos dos: GR isoforma 1 (GR1) y GR2. Estos receptores se encuentran en el citoplasma de una gran variedad de células en su forma libre (sin estar unido a un ligando glucocorticoide) formando un hetero complejo compuesto por un dímero de Hsp90, inmunofilina, p23, y una molécula de Hsp70 (chaperona molecular que cumple un rol clave en la regulación entre respuesta a estrés y respuesta inmune) (Faught, Aluru, & Vijayan, 2016; Stolte et al., 2009).

El complejo cortisol-GR sufre una translocación al núcleo uniéndose a los elementos de respuesta glucocorticoide (GREs) promoviendo la expresión de genes diana para estimular una respuesta molecular. Esta modificación en la transcripción de los genes debido al cortisol provoca un incremento de la actividad metabólica, suprimiendo el crecimiento celular y el sistema inmune. Esto es debido a que el GR es capaz de sufrir una translocación al núcleo donde activará la expresión de las citoquinas anti-inflamatoria, o bien, es capaz de mantenerse en el citoplasma suprimiendo la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias. Es por este motivo que la expresión de GR activados por el cortisol en los tejidos diana, está regulado por un mecanismo de retroalimentación negativo o inmunosupresión. La inducción de esta modificación protranscripcional hace que GR esté involucrado en un amplio espectro de funciones distintas, de las cuales hay que destacar su papel en el crecimiento, metabolismo, inmunología, estrés y acciones osmóticas y auto-regulatorias (Faught, Aluru, & Vijayan, 2016; Parra, Reyes-Lopez, & Tort, 2015; Yada & Tort, 2016).



1.6. Agentes o estímulos estresores

Los peces habitan intrínsecamente en un medioambiente con una elevada carga de agentes estresores. Esto debido a que el ambiente acuático posee propiedades físicas y coligativas que facilitan la exposición de los peces a xenobióticos, patógenos, y disruptores endocrinos que pueden aumentar su carga alostáticas y que por tanto pueden afectar negativamente la salud de los peces (Khansari, Balasch, Reyes-lópez, & Tort, 2017). Las sustancias o factores que inducen a un organismo una situación de estrés se le llama agente o estímulo estresor, los que tipológicamente se clasifican en:

- Sociales y simbólicos: Estos agentes han sido los menos estudiados hasta ahora en los teleósteos, aunque cada vez hay más evidencias de que el estrés social (dominancia, sobrepoblación, agresividad) puede ejercer cambios importantes y provocar una respuesta al estrés que genera en consecuencia una serie de modificaciones a nivel fisiológico, entre otros la respuesta inmunológica.
- Físicos (ambientales): Los cuales hacen referencia a los derivados de lesiones, manipulaciones, o transporte producto de las interacciones naturales o relacionadas con actividades de acuicultura o la pesca. Otros agentes estresores físicos son los relacionados con los parámetros de la calidad del agua y por lo tanto los relacionados con el ambiente, como temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto, compuestos nitrogenados, salinidad, presencia de compuestos químicos, contaminantes, así como también la presencia de patógenos.
- Agentes estresores agudos: Los agentes estresores agudos son los más comunes en la naturaleza y normalmente derivan de una situación de una alta tensión producida a corto plazo y con una alta intensidad (depredación, pelea), lo que genera que el organismo afectado lleve a cabo una reacción conocida como “fight-or-flight” destinada a preservar la integridad del individuo sometido a tal estímulo. En los episodios agudos los músculos y las respuestas cardiovasculares son los principales afectados, mientras que otros procesos fisiológicos como la respuesta inmune no se ve afectado de forma inmediata. Algunos mecanismos inmunológicos esenciales se mantienen activos como la fagocitosis, pero la mayoría no son activados por la rapidez del estímulo. Si la respuesta a este estrés agudo es

satisfactoria, el resultado puede ser una experiencia positiva para prevenir futuros episodios parecidos.

- **Agentes estresores crónicos:** Los agentes estresores crónicos actúan de forma persistente, aunque la intensidad resulta ser más débil. Los agentes estresores crónicos normalmente están menos presentes en la naturaleza, aunque se encuentran en muchas actividades antropogénicas como la contaminación o prácticas relacionadas con la industria acuícola. El estrés crónico normalmente implica la activación del metabolismo energético para soportar la demanda del agente estresor de manera de evitar una falta de recursos que provocaría una disminución en la eficiencia de la respuesta, lo que generaría en consecuencia a un menor nivel de respuesta de diversos mecanismos a nivel fisiológico. El resultado final de un estrés crónico para un organismo normalmente implica una reducción de crecimiento y actividad que hace al individuo más susceptible a los depredadores, esto es producto del gasto energético para luchar contra el agente estresor. Por otro parte, el organismo se ve expuesto a una mayor posibilidad de sufrir infecciones debido a un efecto de supresión de la respuesta inmunológica provocado por las hormonas liberadas en respuesta al estrés.

Estos estímulos estresores provocan una carga alostática e inducen una respuesta al estrés que genera un desequilibrio en el sistema de los peces. Fruto de este desequilibrio diferentes mecanismos del sistema neuro-endocrino e inmunológico se activarán para regular una respuesta general a la carga alostática con objeto de recuperar la homeostasis a nivel fisiológico ([Khansari, Balasch, Reyes-lópez, & Tort, 2017](#)).

1.7. Efecto del estrés en el sistema inmune

El efecto de un agente estresor puede desencadenar en el organismo una respuesta de activación y supresión de diversos procesos fisiológicos, lo que, usualmente, produce un efecto prejudicial en el organismo. Estos procesos dependen del tipo de agente estresor, tiempo de estrés y persistencia. En efecto, si el estrés es agudo y de corta duración, se desencadena una respuesta estimuladora y la respuesta inmunológica muestra una fase de activación promovida principalmente a nivel de



respuesta inmune innata (Tort, 2011). Esta fase de activación se relaciona con la producción de proteínas de fase aguda, citoquinas, hormonas y péptidos que actúan a corto plazo. Por el contrario, si el estresor es crónico la respuesta inmune muestra un efecto inmunosupresor y por tanto el huésped se ve expuesto a una infección por patógenos (Tort, 2011). Este efecto de supresión se asocia con la de glucocorticoides, principalmente cortisol. Por tanto, los efectos principales del cortisol a largo plazo sobre la respuesta inmunológica en los teleósteos se pueden clasificar en efectos de supresión y efectos permisivos. Los efectos de supresión suprimen los niveles de linfocitos circulantes y su proliferación, la producción de anticuerpos de los linfocitos B (células B), la capacidad citotóxica de las células natural killers y la fagocitosis y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en los macrófagos. Mientras que sus efectos permisivos aparecen en el incremento de los niveles de granulocitos circulantes y en la producción de citoquinas anti-inflamatorias en los macrófagos (Tort, 2011).

A nivel de respuesta sistémica el papel del cortisol ha sido ampliamente estudiado. En contraposición, existe escaso conocimiento del efecto que el estrés provoca a nivel local. En un estudio realizado en mamíferos, se observó que el estrés agudo provoca la movilización de leucocitos desde el torrente sanguíneo a la piel, provocando un aumento de la respuesta inmune en la piel (Dhabhar, 2000). En peces, el efecto del cortisol a nivel local (tejido asociado a mucosa) no ha sido explorado. Por tal razón, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del cortisol en los tejidos asociados a mucosa SALT, GIALT y GALT. Para ello, las muestras de MALT se incubaron *in vitro* con una concentración de cortisol (100 ng/100mg de tejido) con objeto de simular una condición de liberación de cortisol a nivel sistémico producto de la exposición a un agente estresor agudo. El efecto del cortisol en tejido asociado a mucosa se evaluó a nivel de expresión de genes asociados a respuesta pro- (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y anti-inflamatoria (IL-10, TGF- β) así como también genes en respuesta al estrés (GR, HSP70) mediante Real-time PCR. Además, y con objeto de evaluar la transversalidad del efecto en respuesta al cortisol, se utilizó dos especies modelo en acuicultura y distantes filogenéticamente, la dorada (especie de agua salada) y la trucha arcoíris (agua dulce).

1.8. Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

El cortisol en una concentración de 100 ng/100 mg de tejido promueve la modulación de genes asociados a respuesta inmunológica y de estrés en piel, branquias e intestino en teleósteos.

Objetivo general:

Determinar el efecto de cortisol en tejido asociado a mucosa simulando una condición de estrés agudo en dorada (*Sparus aurata*) y trucha arcoíris (*Onocorhynchus mykiss*).

Objetivos metodológicos de laboratorio:

1. Incubación de SALT, GIALT y GALT (trucha y dorada) en presencia de cortisol.
2. Extracción de RNA total y evaluación de su concentración e integridad (control de calidad).
3. Análisis de expresión de genes asociados a respuesta pro- (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y anti-inflamatoria (IL-10, TGF- β), y respuesta a estrés (GR, HSP70) mediante Real-time PCR.

Objetivo adicional:

4. Determinar si el cortisol produce el mismo efecto a nivel local en dos especies de teleósteos.



2. Metodología

2.1. Animales

Las doradas se obtuvieron desde la piscifactoría AQUICULTURA ELS ALFACS, S.L. (Tarragona) con un peso medio de 65 g. Las truchas arcoíris se obtuvieron de una piscifactoría local (TROUTFACTORY, Barcelona) con un peso medio de 130 g. Los peces fueron transferidos al estabulario de peces de la Univeristat Autònoma de Barcelona (AQUAB) para ser aclimatados (3 semanas en condiciones controladas de NO₂, NO₃, NH₃/NH₄, oxígeno, pH, y temperatura) a las condiciones de laboratorio. Todos los procesos experimentales aplicados a los peces fueron realizados de acuerdo a la Guía de Principios para investigación biomédica en animales (EU2010/63).

2.2. Hormonas y agentes farmacológicos

El cortisol (Hydrocortisone; Sigma cat #H2882-1G) fue disuelto en alcohol absoluto de acuerdo con las intrusiones del fabricante (50 mg/ml).

2.3. Diseño experimental *in vitro*

El diseño experimental se basó en [Khansari, Parra, Reyes-López, & Tort, 2017](#) con algunas modificaciones. Truchas arcoíris (n=6) y doradas (n=6) sanas y sin rasgos fenotípicos aparentes de enfermedad fueron incluidas en el estudio. Los peces fueron cogidos desde sus respectivos tanques e inmediatamente eutanasiados mediante sobredosis de MS-222 (Sigma). Se extrajeron las muestras de tejidos asociados a mucosa tales como la piel (SALT), branquias (GIALT) e intestino (GALT) e inmediatamente introducidos en una placa de cultivo de 24 pocillos (Jet Biofil) en presencia de medio DMEM-high glucose (Sigma) (1ml) y mantenidos en hielo. El tejido fue lavado dos veces con medio DMEM-high glucose. Posteriormente, los tejidos fueron incubados en presencia de cortisol (100 ng/100 mg de tejido) (grupo experimental **cortisol**) durante 2h, 4h o 24h para cada especie (18°C para la dorada, 16°C para la trucha arcoíris y 5% CO₂). Las muestras de tejido asociado a mucosa tratado con cortisol se denominó grupo cortisol. Como control negativo, muestras de tejido asociado a mucosa sin tratamiento (grupo control). Finalizados los tiempos de incubación, las muestras fueron inmediatamente congeladas a -80 hasta su posterior análisis.

2.4. Extracción del RNA y síntesis del cDNA

El RNA total fue extraído a partir de la totalidad de los tejidos muestreados (piel, branquias e intestino) tanto de los grupos control y cortisol utilizando TRI reagent (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El pellet de RNA fue disuelto en agua milliQ autoclavada e inmediatamente guardado a -80°C . La concentración de RNA, así como la detección de una potencial contaminación proteica (ratio 280/260) o bien contaminación por solventes orgánicos (ratio 260/230) fue cuantificada utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific). La representación de la obtención de tales valores es representada en la [Figura 2-1](#). La media de las concentraciones de RNA y los ratios de contaminación fueron aceptables en las muestras de todos los tejidos procesados y especies (media de la concentración $1800\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$; ratio 280/260 > 1.80; 260/230 > 1.80) ([Figura 2-2](#)). Además, se evaluó la integridad del RNA total de las muestras extraídas con el equipo Agilens 2100 bioanalyzer, el cual entrega el nivel de integridad de las muestras de RNA total extraídas basándose en la intensidad de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S. Para hacer el análisis de integridad se escogieron 12 muestras al azar de las dos especies y distintas muestras de tejidos extraídas. En las 12 muestras se observó un nivel de integridad satisfactorio con un valor de RIN > 5.5 en todas las muestras ([Tabla 2-1](#)) notando la presencia de las bandas correspondientes al 28S y 18S en todas las muestras evaluadas (28S bandas cerca de 4000 nt y 18S bandas cerca de 2000 nt) ([Figura 2-3](#)). A partir de los resultados de cuantificación y la integridad de RNA obtenidos, se confirmó la utilización de estas muestras para realizar la síntesis de cDNA y su posterior análisis de perfil de expresión génica. El RNA se utilizó como molde para la síntesis de DNA complementario (cDNA), utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

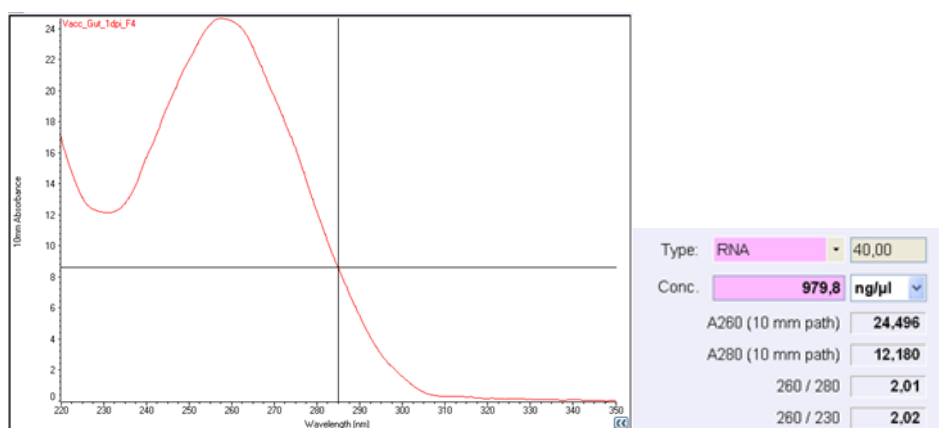


Figura 2-1 Representación de la cuantificación de la concentración de una muestra de RNA extraída utilizando el programa NanoDrpND-2000 spectrophotometer. Se indica el tipo de muestra (RNA), el factor de conversión de la absorbancia obtenida en concentración (40 ng/µl), la concentración (Conc.), absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280), y relaciones entre las absorbancias evaluadas (260/280; 260/230).

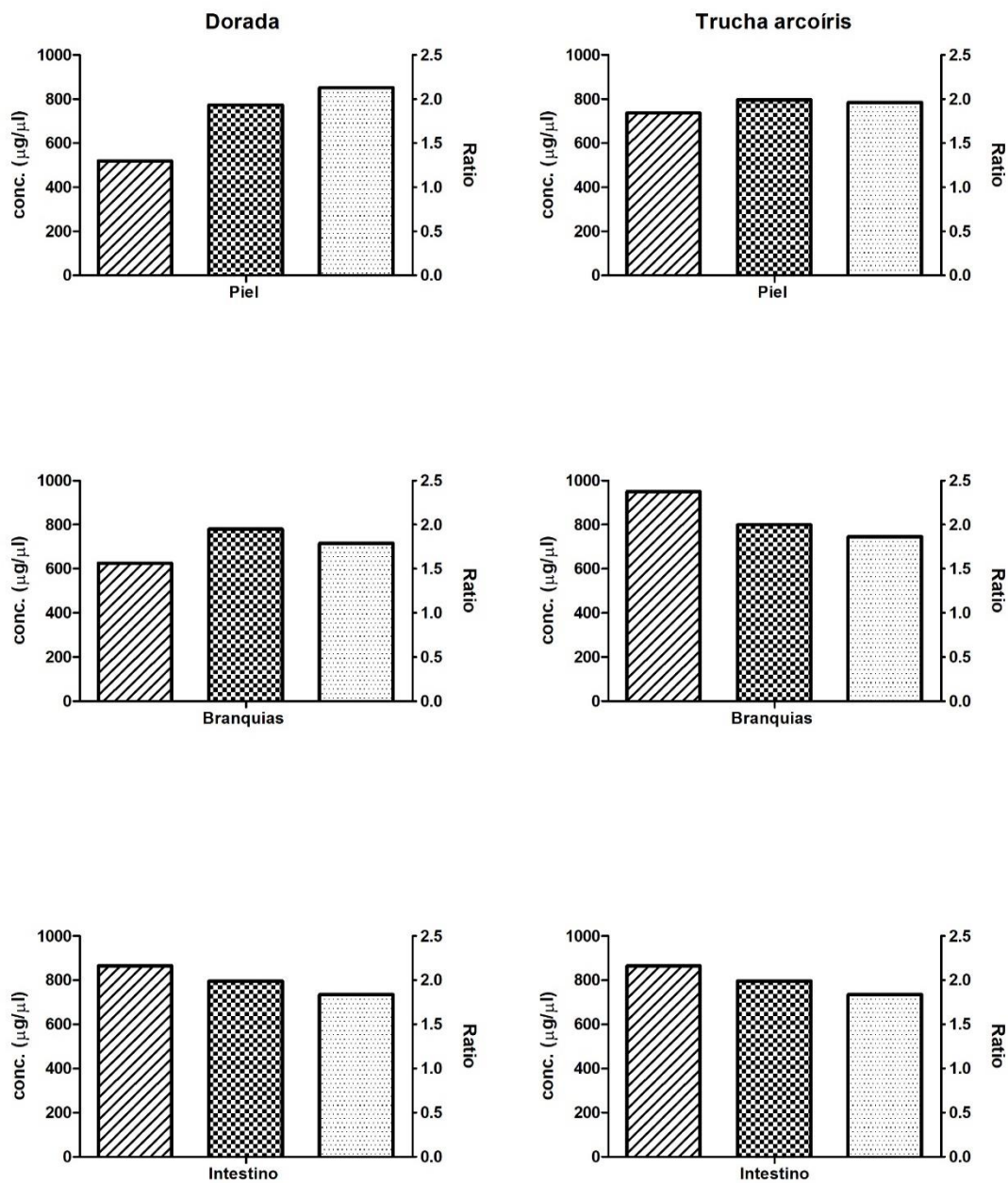


Figura 2-2 Medias de la concentración de RNA, ratios de contaminación proteica (260/280) y ratios de contaminación de solventes orgánicos (230/260). Columna izquierda: respuesta para piel, branquias e intestino en dorada; columna derecha: resultados para piel, branquias e intestino en trucha. En cada gráfica se representa (de izquierda a derecha) la media de la concentración de ácidos nucleicos ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (barras con patrón de rayas diagonales), media de los ratios 260/280 (barras con patrón cuadrículado), y la media de los ratios 260/230 (Barras con patrón de puntos).

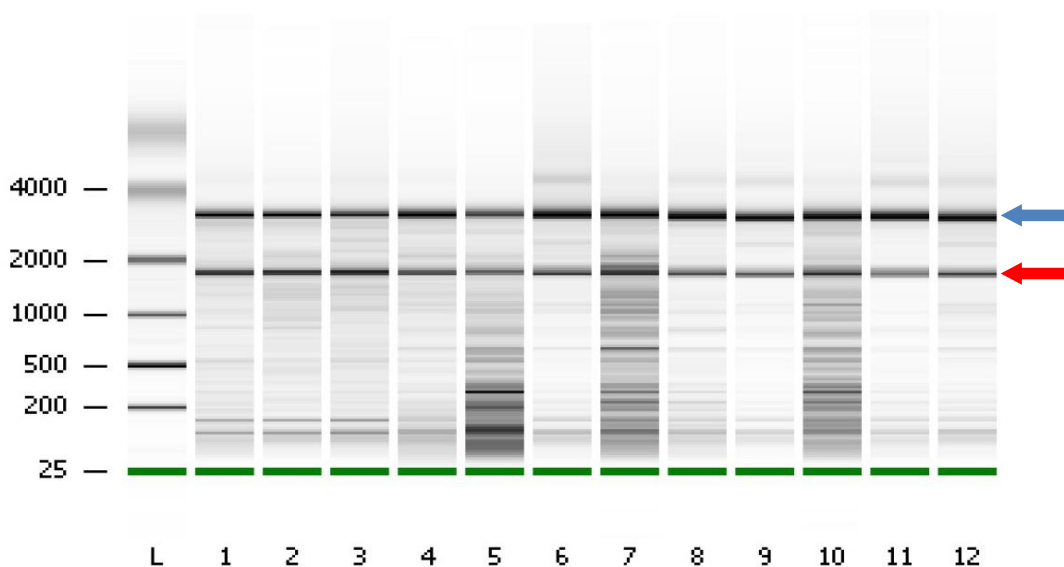


Figura 2-3 Electroforesis de la integridad del RNA de 12 muestras escogidas aleatoriamente. Se presenta el estándar de peso molecular conocido (L) con las bandas de referencia de tamaño predefinido (25-4000 (nt)). El detalle del contenido de cada carril (1-12) se indica en la [Tabla 2-1](#). Flecha azul (a la izquierda): pico 28S; Flecha roja (a la izquierda): pico 18S.

Tabla 2-1 Valores de RIN de las muestras escogidas al azar y tejido al que pertenecen.

Carril	Muestra	RIN
1	Gills	6.9
2	Gut	6.4
3	Gut	6.5
4	Gills	7.0
5	Gills	5.7
6	Gut	8.2
7	Gut	5.6
8	Skin	8.0
9	Gut	8.7
10	Gut	5.7
11	Skin	9.0
12	Skin	7.9

2.5. Análisis de la expresión génica

El efecto del cortisol en tejido asociado a mucosa fue evaluado por real-time PCR para determinar el patrón de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y respuesta a estrés tanto en dorada como en trucha. Todas las reacciones real-time PCR se llevaron a cabo con iTaq universal sybr Green supermix (Bio-Rad Laboratories). Se analizó la expresión génica de los genes inmunes asociados a respuesta pro-inflamatoria (IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2), respuesta anti-inflamatoria (IL-10, TGF- β) y respuesta a estrés (GR, HSP70) tanto en dorada como en trucha arcoíris. Como genes de referencia, se evaluó dos genes candidatos por especie; en la dorada se analizó los genes 18S y RPL27, mientras que en trucha arcoíris se analizó el patrón de expresión de β actina y EF1 α). Para el análisis del patrón de expresión de estos genes, se seleccionó los genes de referencia RPL27 (dorada) y EF1 α (trucha arcoíris) dada su menor variabilidad considerando el total de muestras incluidas en el estudio. Se utilizaron primers específicos para dorada (Tabla 2-2) y trucha arcoíris (Tabla 2-3). Todos los primers utilizados tenían una concentración de 500 nM en todas las reacciones llevadas a cabo en este estudio. Se evaluó la eficiencia de tales primers a partir de la cual se seleccionó la dilución de cDNA óptima por tejido y especie. Para tal efecto, se preparó siete diluciones seriadas (1:2.5, 1:6, 1:15, 1:39, 1:97, 1:244, 1:610). Las reacciones se realizaron por triplicado introduciendo 8 μ l de sybr mix y 2 μ l de una de las diluciones seriadas de cDNA a evaluar. Las condiciones termales para la real-time PCR fueron de 3 minutos a 95 $^{\circ}$ C de pre-incubación seguido de 40 ciclos a 95 $^{\circ}$ C durante 30 segundos y 60 $^{\circ}$ C durante 30 segundos. Para evaluar las diluciones seriadas se utilizaron placas CFX96 Touch real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). A partir de las eficiencias obtenidas, se evaluaron y se determinaron las diluciones más adecuadas para cada tejido (dorada: piel dilución 1:15; branquias e intestino dilución 1:20; trucha arcoíris: piel, branquias e intestino dilución 1:15. Finalmente, una vez elegidas las diluciones, se evaluó la expresión génica por duplicado de los genes de interés en placas CFX384 Touch real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). El análisis de expresión génica se realizó en duplicado para la totalidad de las muestras incluidas en el estudio introduciendo 8 μ l de sybr mix y 2 μ l de cDNA (volumen final 10 μ l) en placas CFX384 Touch real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). Los datos crudos obtenidos en todas las real-time PCR realizadas fueron extraídos utilizando el software Bio-Rad CFX Manager.



La cuantificación de la expresión de los genes analizados en este estudio se realizó acorde al método Pfaffl corregido con eficiencia de cada primer (Pfaffl, 2001). Los valores para cada condición experimental se expresaron como expresiones relativas normalizadas, calculados en relación a los valores del grupo control y normalizados respecto a los genes de referencia (RPL27 para dorada y EF1 α para trucha arcoíris).

2.6. Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos control y los tratados con cortisol en todos los tejidos de cada especie fueron analizados con el análisis de variancia de dos factores (two-way ANOVA). El análisis de los resultados y la representación gráfica de los resultados fue llevado a cabo utilizando el programa estadístico GraphPad Prims 5. La diferencia en la expresión de los genes se consideró significativa cuando el p-valor <0.05 entre los tejidos control y cortisol.

Tabla 2-2 Primers utilizados para Real-time PCR para el análisis de expresión génica en dorada.

Genes	Número de acceso GenBank	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pares de bases)	Eficiencia
18s	AY587263.1	FW:ACCAGACAAATCGCTCCACC RV:AGGAATTGACGGAAGGGCAC	172	2,01
RPL27	AY188520	FW: AAGAGGAACACAACACTCACTGCCCCAC RV: GCTTGCCTTTGCCAGAACTTTGTAG	160	1,99
IL-1 β	AJ277166.2	FW:TCAGCACCGCAGAAGAAAAC RV:TAACACTCTCCACCTCCAC	115	2,01
IL-6	EU244588.1	FW:ATCCCCTCACTTCCAGCAGA RV:GCTCTTCGGCTCCTCTTCT	129	1,93
TNF- α	AJ413189.2	FW:TCGTTCAGAGTCTCCTGCAG RV:AAGAATTCTTAAAGTGCAAAACACACAAA	320	1,81
COX2	AM296029.1	FW: TACTGGAAGCCGAGCACGTT RV: TGAAAGGATGCCACGGGAC	116	1,96
IL-10	JX976621.1	FW:GAGCGTGGAGGAATCTTTCAA RV:GATCTGCTGGATGGACTGC	154	1,96
TGF- β	AF424703.1	FW:AGACCTTCAGAAGCTGGCTC RV:ACTGCTTTGTCTCCCTACC	145	1,99
GR	DQ486890.1	FW:ACTGAGGAGGGAGGTCTATT RV:GGACTCTGGGACTTCTAACA	195	1,99
HSP70	EU805481.1	FW: CATCATCAACGAGCCAAGTGC RV: TGTCGAAATCTTCCCCACCA	191	1,97

Tabla 2-3 Primers utilizados para Real-time PCR para el análisis de expresión génica en trucha arcoíris.

Genes	Número de acceso GenBank	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pares de bases)	Eficiencia
β Actine	NM_001124235.1	FW: GGACTTTGAGCAGGAGATGG RV: ATGATGGAGTTGTAGGTGGTCT	186	1,95
EF	NM_001124339.1	FW: ATGCCCCAAGTTCCTGAAG RV: AACAGCAACAGTCTGCCTCA	140	1,95
IL-1 β	NM_001124347.2	FW: TGAGAACAAGTCTGGGTCC RV: GGCTACAGGTCTGGCTTCAG	148	2,02
IL-6	NM_001124657.1	FW: GAGTTTCAGAAGCCGTGGA RV: AGCTGGTACACTTGCAGACC	149	2,02
TNF- α	NM_001124357.1	FW: CACACTGGGCTCTTCTTCGT RV: CAAACCTGACCTTACCCCGCT	155	1,98
COX2	NM_001124348.1	FW: AGCACTTCACCCACCAGTTC RV: GGTAGACCTCGCCGTTCAAA	180	2,02
IL-10	NM_001245099.1	FW: CCGCCATGAACAACAGAACA RV: TCCTGCATTGGACGATCTCT	105	1,98
TGF- β	NM_001281366.1	FW: GCCAAGGAGGTCCACAAGTT RV: GTGGTTTTGATGAGCAGGCG	146	2,06
GR(isoforma 1)	NM_001124730.1	FW: TTCCTTTCCTCCTGTGAGT RV: ATCCTCCTCCGTCTTGATGA	171	1,95
HSP70	AB176854	FW: CGGGAGTTGTAGCGATGAGA RV: CTTCCTAAATAGCACTGAGCCATAA	140	2,01

3. Resultados

Para evaluar el efecto del cortisol en tejido asociado a mucosa (SALT, GIALT y GALT) y las posibles diferencias de tal efecto entre dos especies de teleósteos (dorada y trucha arcoíris), se analizó el patrón de expresión de genes relacionados con el sistema inmune incluyendo la respuesta pro-inflamatoria (IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2), anti-inflamatoria (IL-10, TGF- β), y los relacionados con la respuesta frente a un agente estresor (GR o GR (isoforma 1), HSP70) mediante Real-time PCR. Para los resultados de expresión en piel (SALT) de dorada no se observó diferencias significativas en ninguno de los tiempos (2h, 4h y 24h) y genes evaluados entre el grupo control y las muestras tratadas con cortisol (**Figura 3-1**). En cambio, en el caso de la piel de trucha arcoíris, se observó la sobreexpresión tanto de TNF- α como de GR (isoforma 1) a las 4 h de tratamiento con cortisol (**Figura 3-2**). No se observó diferencias significativas en el resto de los genes y tiempos evaluados. Estos resultados sugieren que el tejido de piel incubada con cortisol provoca la modulación diferencial de genes puntuales relacionados con la respuesta pro-inflamatoria y estrés en trucha arcoíris, pero no en dorada.

Referente a las branquias (GIALT), la expresión génica entre los grupos control y cortisol no presentaron diferencias significativas tanto en dorada (**Figura 3-4**) como en trucha arcoíris (**Figura 3-5**) para los tiempos y genes evaluados. Estos resultados sugieren que la incubación con cortisol no genera cambios en la modulación de genes relacionados con respuesta pro- y anti-inflamatoria así como la respuesta a estrés en ambas especies analizadas.

Finalmente, los resultados en intestino (GALT) indicaron una sobreexpresión en dorada de genes implicados en respuesta pro-inflamatoria IL-1 β y COX2 a las 24 h de tratamiento con cortisol (**Figura 3-5**). A su vez, la sobreexpresión de COX2 en trucha arcoíris a las 24h de tratamiento con cortisol también fue observada (**Figura 3-6**). No se apreció diferencias significativas en el resto de genes y tiempos evaluados en ambas especies. De esta manera, la incubación de cortisol en intestino produce un aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta pro-inflamatoria en ambas especies.

En suma, los resultados sugieren que la incubación con cortisol no genera cambios relevantes en la modulación de genes relacionados con la respuesta pro- y anti-inflamatoria, y respuesta a estrés en tejidos asociados a mucosa (MALT) en ambas especies analizadas.

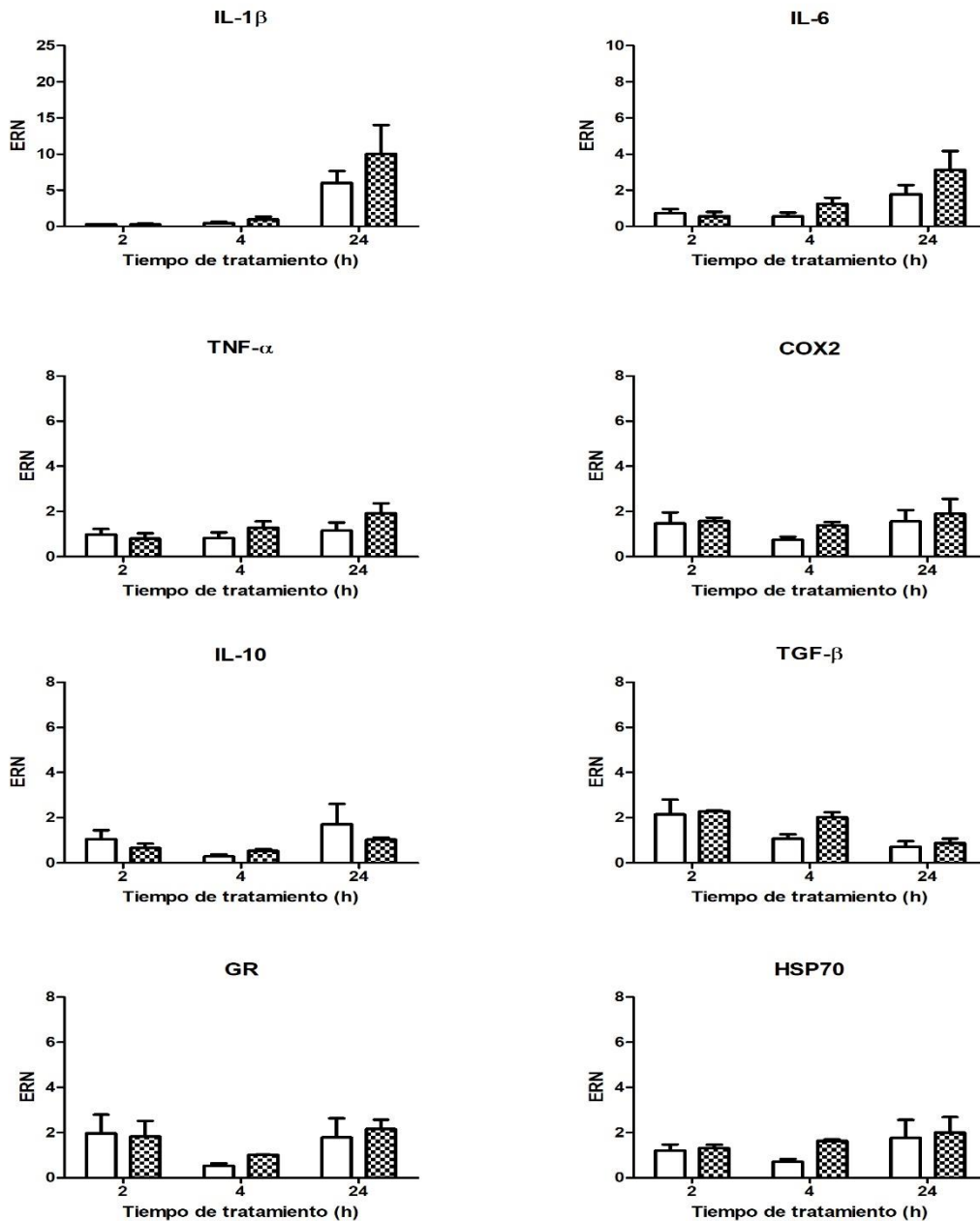


Figura 3-1 Expresión relativa normalizada (ERN) en piel de dorada de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). No hay diferencias significativas.

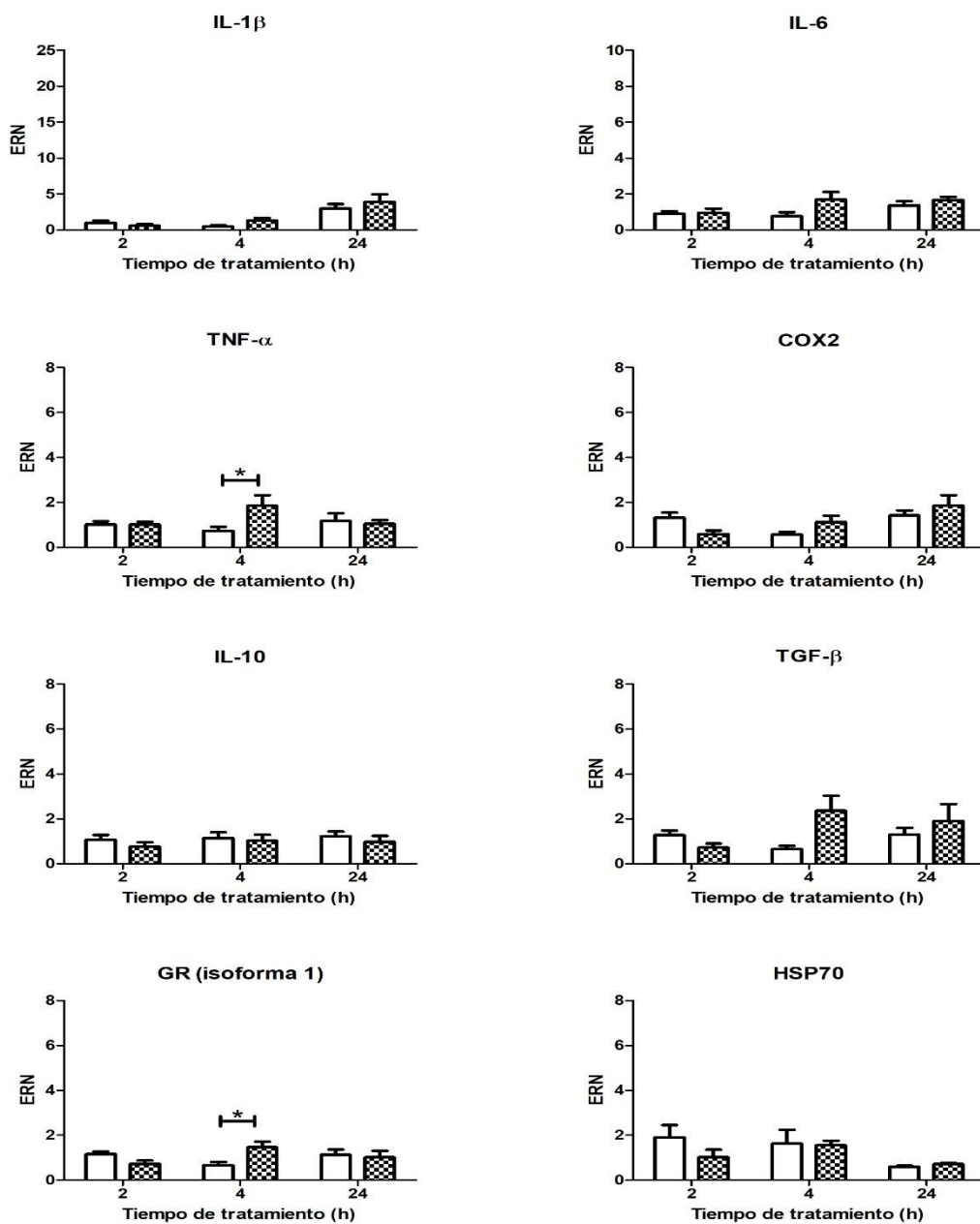


Figura 3-2 Expresión relativa normalizada (ERN) en piel de trucha arcoíris de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

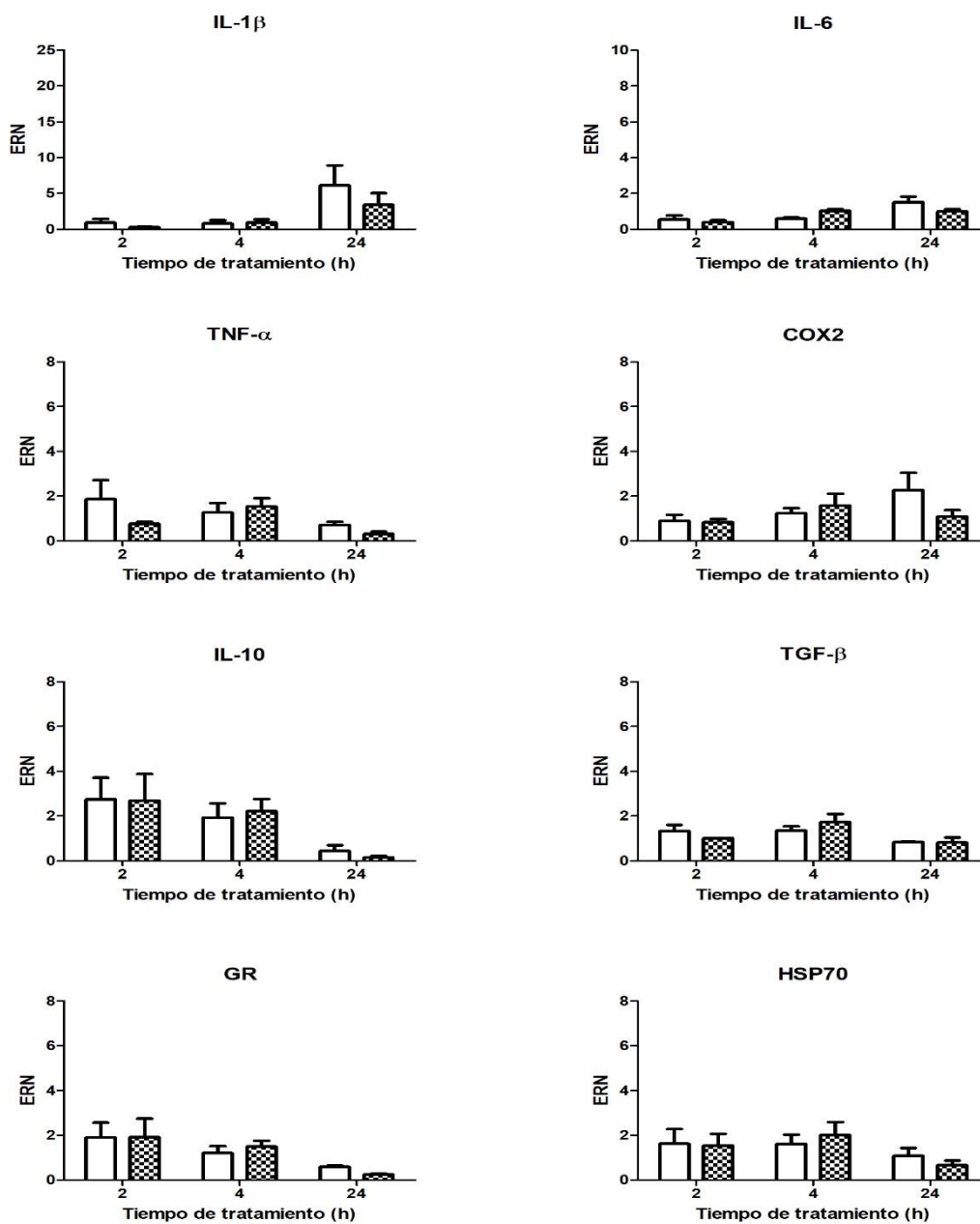


Figura 3-3 Expresión relativa normalizada (ERN) en branquias de dorada de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). No hay diferencias significativas.

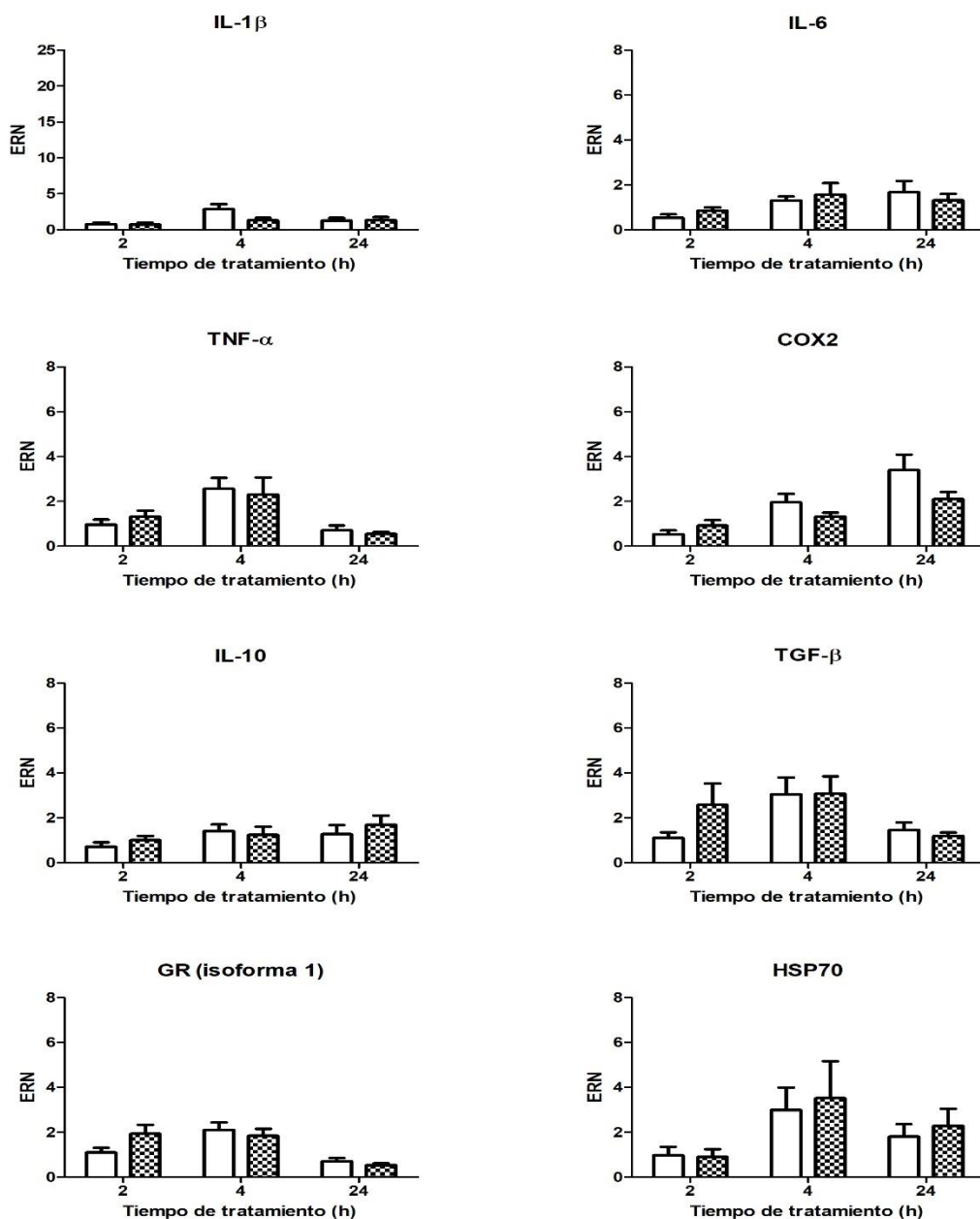


Figura 3-4 Expresión relativa normalizada (ERN) en branquias de trucha de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). No hay diferencias significativas.

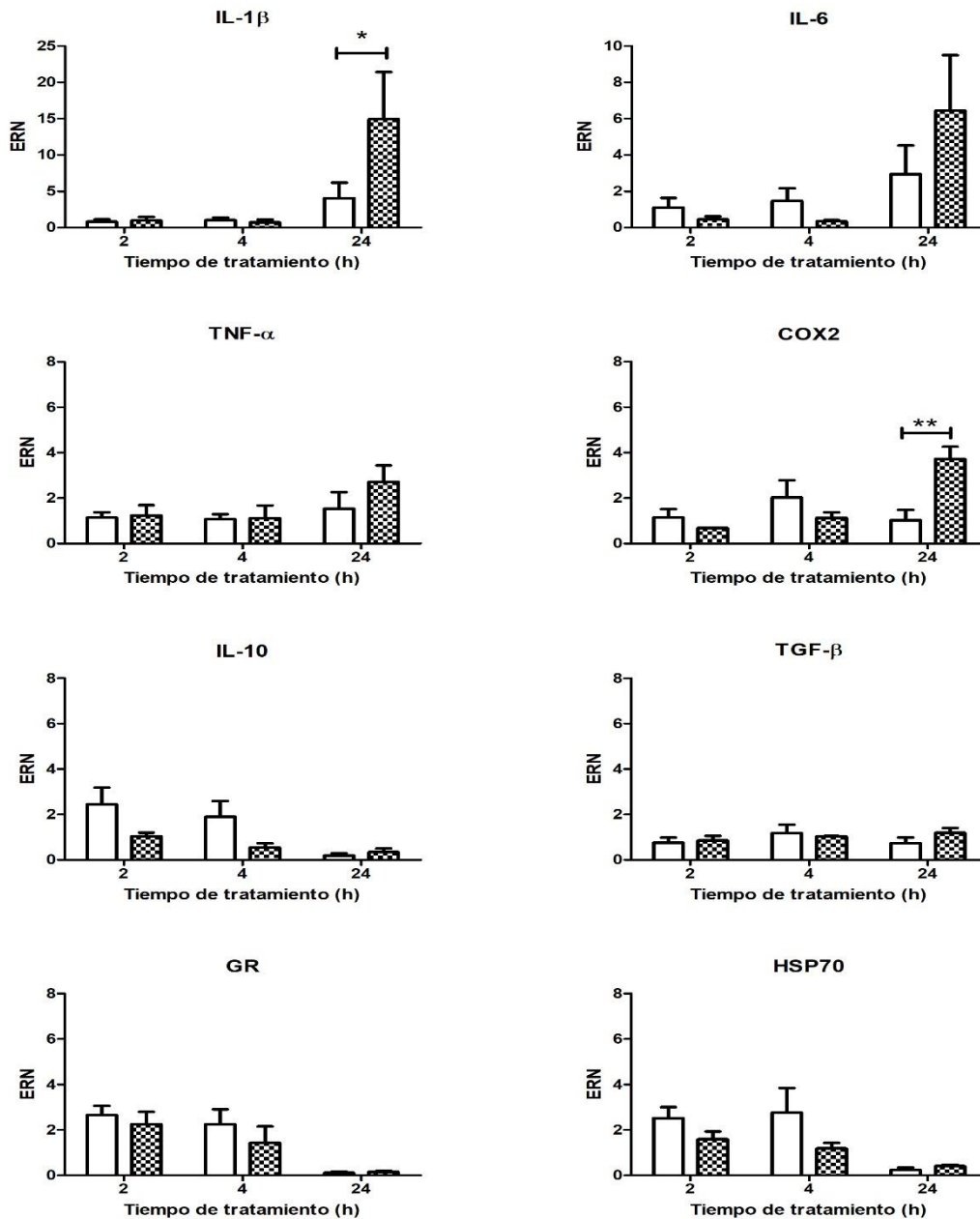


Figura 3-5 Expresión relativa normalizada (ERN) en intestino de dorada de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

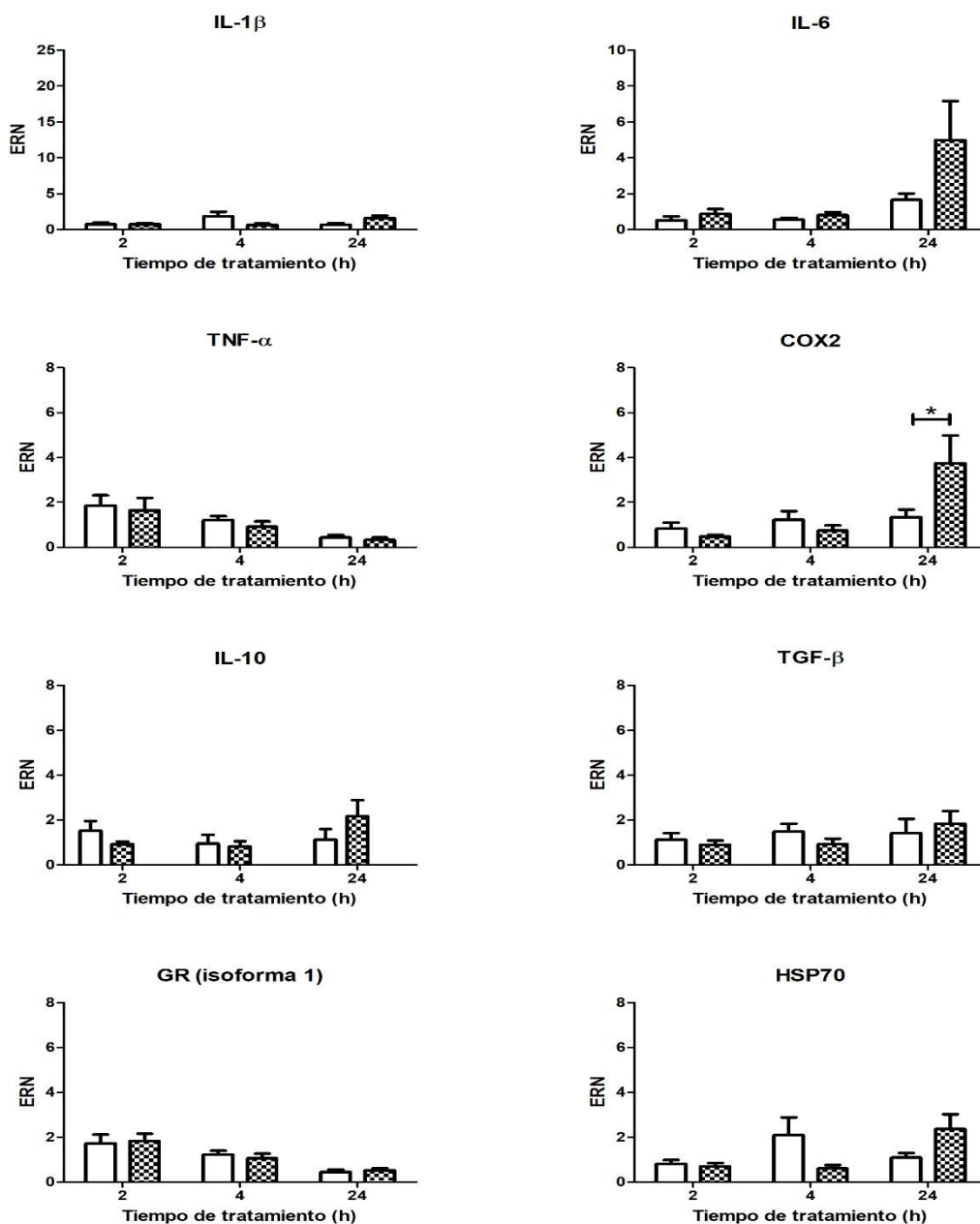


Figura 3-6 Expresión relativa normalizada (ERN) en intestino de trucha arcoíris de los genes IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 (pro-inflamatorios); IL-10, TGF- β (anti-inflamatorios) y GR, HSP70 (respuesta a estrés). Las muestras de tejido fueron incubadas durante 2h, 4h o 24h en presencia de cortisol. Se representa el promedio \pm error estándar de 6 peces por condición y tiempo. Barras blancas: tejido sin tratamiento (control); barras con patrón negro: tejido tratado con cortisol (cortisol). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. Discusiones

En este estudio se analizó el efecto del cortisol en los tejido asociado a mucosa (SALT, GIALT y GALT) sobre la modulación de genes relacionados con la respuesta pro-inflamatoria (IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2), anti-inflamatoria (IL-10, TGF- β) y con el estrés (GR, HSP70). Mientras que en la dorada sólo se observó la modulación de genes relacionados con la respuesta pro-inflamatoria en intestino, el mismo efecto se observó en trucha junto con la modulación de genes pro-inflamatorios y de respuesta al estrés en piel. Esto sugiere que el cortisol produce un efecto estimulador, aunque reducido, a nivel local.

En la literatura, existe una amplia variedad de artículos relacionados con el estrés en teleósteos (Dhabhar, 2002; Tort, 2011; Yada & Tort, 2016). Sin embargo, su integración resulta compleja por las diferencias metodológicas (*in vitro/in vivo*) entre ellos, especies utilizadas (basados en estudios especie específicos), tejido diana de estudio, condición experimental, utilización de un agente estresor agudo o crónico, y evaluación del efecto del estrés a nivel inmunológico (local o sistemático). Por este motivo, es crucial y relevante estudiar la respuesta frente a un mismo agente estresor en las mismas condiciones en dos especies de teleósteos muy lejanos filogenéticamente (dorada y trucha arcoíris) y pertenecientes a medioambientes tan diversos como los de agua dulce y salada. Esto nos ayudará a comprender si la respuesta local frente al cortisol, una de las principales hormonas que gestionan la respuesta a un estrés de peces, se conserva en teleósteos o es más bien especie específico. En la mayoría de los artículos publicados se evalúa la respuesta sistémica frente a la presencia de un agente estresor (Khansari, Balasch, Reyes-lópez, & Tort, 2017; Khansari, Parra, Reyes-López, & Tort, 2017; Tort, 2011), pero en los últimos años una creciente atención se ha puesto sobre la respuesta local a nivel de mucosa en peces. En efecto, se ha propuesto que el efecto del estrés a nivel fisiológico podría no tener el mismo patrón respecto a la respuesta producida a nivel de mucosas en teleósteos (Tort, 2011) provocado principalmente por el cortisol secretado. La mayoría de estudios indican un efecto inmunosupresor producida por la acción del cortisol; sin embargo, otros artículos recientes sugieren que puede tener un papel como activador o estimulador de algunos genes relacionados con la respuesta inmune. Finalmente, otro aspecto innovador de este estudio es el enfoque del efecto del cortisol a nivel tisular (*in vitro*), la concentración de cortisol se estableció en 100 ng/100 mg de tejido simulando la concentración de

cortisol en sangre de individuos sometidos a la influencia de un agente estresor agudo (1 hora post estrés).

La respuesta pro-inflamatoria juega un rol clave frente a la activación de la respuesta inmunológica. Unas de las citoquinas más influyentes durante esta respuesta, en teleósteos, son IL-1 β , IL-6, TNF- α y COX2. Debido a las limitaciones metodológicas existentes en la evaluación del estado de salud en peces (falta de anticuerpos disponibles para la identificación de poblaciones celulares, limitado conocimiento del espectro de proteínas secretadas frente un determinado estímulo, entre otras) la evaluación a nivel de expresión génica es un buen indicador de su activación. IL-1 β es una citoquina responsable de promover la respuesta pro-inflamatoria induciendo o suprimiendo la activación de otras citoquinas. Nuestros resultados mostraron una sobreexpresión de IL-1 β en intestino de dorada a las 24h de tratamiento con cortisol respecto al control. La expresión de IL-1 β ha sido pobremente descrita a nivel de mucosas frente a la acción de un agente estresor agudo. A nivel sistémico, se ha observado que IL-1 β puede no sólo aumentar su expresión en peces expuestos a un agente agudo, sino que además su expresión puede tener un rol bidireccional en la regulación de la comunicación entre el eje HPI y el sistema inmune en peces (Metz et al., 2006). Esto sugiere que en dorada el cortisol tiene un papel de activador en este tejido mucoso pero que también su expresión puede tener un rol en la comunicación entre el eje HPI y la respuesta inmune a nivel de mucosa.

Además, en intestino de dorada también se observó la sobreexpresión de COX2 a las 24h del tejido tratado con cortisol. En un estudio previo realizado en intestino medio de salmón del Atlántico (*Salmo salar L.*) un aumento en la expresión de COX2 se observó en peces sometidos a un estrés agudo (Olsen, Svardal, Eide, & Wargelius, 2012). Teniendo en consideración que IL-1 β es una citoquina promotora de la respuesta pro-inflamatoria, en nuestro estudio la sobreexpresión de COX2 junto a la de IL-1 β sugiere que IL-1 β podría ser la responsable de la inducción de la expresión de COX2 en intestino de dorada.

En nuestro estudio, la sobreexpresión de COX2 también se observó en intestino de trucha arcoíris a las 24 horas de incubación con cortisol. En un estudio *in vivo* realizado en truchas sometidas a un estrés agudo se observó una sobreexpresión de COX2 a nivel sistémico (hígado) en los peces estresados (Wiseman et al., 2007). No obstante ello, la expresión de COX2 se vio aumentada incluso 24 horas después de la aplicación del agente estresor (Wiseman et al., 2007), lo que sugiere que la

respuesta local podría ser diferente a la respuesta frente a estrés a nivel sistémico en peces. Por otra parte, la expresión de IL-1 β no sufrió cambios entre los grupos control y tratado con cortisol en los tiempos evaluados en este estudio. Esto sugiere que la expresión de IL-1 β en trucha podría llevarse a cabo antes de las 24 horas de incubación con cortisol.

En nuestro estudio, la incubación de cortisol en piel de trucha produjo un aumento en la expresión de TNF- α luego de 4 horas de incubación. El aumento en la expresión de TNF- α en trucha arcoíris sometidas a estrés agudo ya ha sido reportado, aunque a nivel sistémico (Wiseman et al., 2007). Sin embargo, la expresión en piel de trucha de otros genes relacionados con respuesta pro-inflamatoria (IL-1 β , IL-6, COX2) no fue registrada. No obstante lo anterior, una tendencia (aunque no significativa) fue observada tanto en IL-1 β como en COX2 luego de 4 horas de incubación con cortisol. Tanto TNF- α como IL-1 β son citoquinas que regulan (aunque por vías distintas) la expresión de COX2 (García-Bonilla, Benakis, Moore, Iadecola, & Anrather, 2014; Kuldo et al., 2005). La tendencia a la sobreexpresión observada tanto en IL-1 β como en COX2 luego de 4 horas de incubación con cortisol, plantea que una sobreexpresión de IL-1 β podría llevarse a cabo previo a las 4 horas de incubación con cortisol, mientras que la activación de COX2 por la vía de TNF- α podría ser posterior a las 4 horas de incubación.

En resumen, el cortisol (100ng/100 ml de tejido) promueve la expresión de genes asociados a la respuesta pro-inflamatoria tanto en dorada (intestino) como en trucha (intestino y piel) aunque la cinética de expresión entre ambas especies parece ser diferente.

La respuesta pro-inflamatoria es crucial para la protección del organismo, pero al mismo tiempo puede causar daño tisular si no es contrarrestada a tiempo. Uno de los principales responsables del control de la respuesta pro-inflamatoria corresponde a las citoquinas anti-inflamatorias. Estos dos mecanismos de regulación de la respuesta inmune están íntimamente controlados por distintos mecanismos donde intervienen citoquinas. Los genes de expresión de citoquinas anti-inflamatorias evaluadas en este estudio fueron IL-10 y TGF- β , cuyo rol como citoquinas anti-inflamatorias ha sido reportado anteriormente (Reyes-López et al., 2015). En nuestro estudio, la modulación de ambas citoquinas anti-inflamatorias no fue registrada. Algunos reportes previos corroboran que la regulación de estas citoquinas se mantiene inalterada durante el efecto del cortisol por estrés agudo en cultivos primario de riñón anterior en dorada y trucha arcoíris (Khansari, Parra, Reyes-



López, & Tort, 2017) y en macrófagos RTS-11 de trucha arcoíris (Castro, Zou, Secombes, & Martin, 2011).

En nuestro estudio, la no modulación de ambas citoquinas anti-inflamatorias podría deberse a que la expresión de estas se lleve a cabo en tiempos distintos de incubación a los analizados. La tendencia (aunque no significativa) en el aumento de la expresión de IL-10 (intestino de trucha) como TGF- β (intestino de dorada y trucha; piel de dorada y trucha) sugieren tal posibilidad. Otra alternativa es que, dado que la intensidad de la respuesta pro-inflamatoria no es exacerbada, otros mecanismos inherentes al tejido asociado a mucosa podrían estar involucrados en el control de tal respuesta.

Finalmente, se evaluaron la expresión de GR y Hsp70. GR es el principal receptor de los glucocorticoides (cortisol) en teleósteos y se expresa en todos los tejidos. Mientras que Hsp70 tiene un papel fundamental como chaperona molecular (estabiliza el plegamiento de las proteínas) en diferentes procesos y estructuras, por lo que su expresión génica aparece en casi todos los tipos de poblaciones celulares. Ambos tienen un papel crucial como nexo entre la respuesta neuroendocrina e inmunológica frente un agente estresor, ya que son uno de los principales responsables del balance entre las respuestas pro- y anti-inflamatorias (Stolte et al., 2009). En nuestro estudio, la expresión de GR no se vio modulada en branquias, intestino y piel de dorada en los tiempos evaluados. En literatura, existe una gran cantidad de reportes previos donde GR no es afectado por el cortisol durante un estrés agudo tanto a nivel local (Teles, Tridico, Callol, Fierro-Castro, & Tort, 2013) como a nivel de respuesta sistémica (Kiilerich et al., 2017; Stolte et al., 2008). Sin embargo, un aumento en la expresión de GR (isoforma 1) fue registrada en piel de trucha arcoíris luego de 4 horas de incubación con cortisol. En otros estudios, el aumento en la expresión de GR se ha observado sólo a nivel de respuesta sistémica tanto en carpa (Stolte et al., 2008) como lubina (Vazzana et al., 2010). Esto sugiere que la expresión de GR frente a la presencia de cortisol podría ser tejido dependiente. Sin embargo, más estudios se hacen necesarios para evaluar si ésta u otras alternativas (como la expresión de GR en tiempos distintos al evaluado en este estudio) son las responsables del patrón de expresión de GR obtenido en tejido asociado a mucosa incubado con cortisol.

Por otra parte, resulta llamativo en piel de trucha la también sobreexpresión de TNF- α al cabo de 4 horas de incubación con cortisol. En nuestro estudio, la piel de trucha fue el único tejido asociado a mucosa en donde se observó una sobreexpresión significativa de GR junto a la sobreexpresión de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α (una de las citoquinas involucradas en la inducción de la respuesta inflamatoria). Este resultado corrobora el papel de GR como activador del sistema inmune frente a un agente estresor (Stolte et al., 2009).

En lo que respecta a Hsp70, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tejidos, especies y tiempos evaluados. En estudios previos, otros autores también describieron que el cortisol no afectaba la expresión génica de Hsp70, tanto en *in vivo* (Mazur, 1996; Vijayan, Pereira, Forsyth, Kennedy, & Iwama, 1997) como en *in vitro* (Celi, Vazzana, Sanfratello, & Parrinello, 2012; Philip, Daniel Kim, & Vijayan, 2012). En efecto, se ha propuesto a nivel de respuesta sistémica que el cortisol no afecta las acciones de Hsp70 (Basu, Nakano, Grau, & Iwama, 2001). En un estudio previo se ha observado que la incubación de leucocitos con cortisol no afecta la expresión de HSP70 y GR (Stolte et al., 2009). En conjunto, estos antecedentes junto a los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la no modulación de GR y Hsp70 en la mayoría de los tejidos y especies estudiadas podría relacionarse con la mayoritaria no modulación de genes asociados a respuesta inmune en tejido asociado a mucosa estimuladas con cortisol, confirmando la influencia de GR y Hsp70 en la modulación de las respuestas pro- y anti-inflamatorias.



5. Conclusión

En conclusión, nuestros resultados indican que el cortisol, a concentraciones (100 ng/100 mg de tejido) y tiempos (2h, 4h, 24h) simulando un estrés agudo (100 ng/100 mg de tejido), produce un efecto estimulador, aunque reducido, en la modulación de genes asociados a la respuesta inmunológica y de estrés a nivel de tejido asociado a mucosas en ambas especies estudiadas. Además, en general la expresión de los marcadores evaluados en este estudio parece ser especie, tejido y cinética dependiente. Lo que indica, que aunque este efecto estimulador del cortisol se conservaría entre especies, no afectaría los mismos genes o bien aparecería en tiempos distintos dependiendo de las especies y los tejidos expuestos.

Bibliografía

- APROMAR. (2016). La acuicultura en España, 89.
- Basu, N., Nakano, T., Grau, E. G., & Iwama, G. K. (2001). The Effects of Cortisol on Heat Shock Protein 70 Levels in Two Fish Species. *General and Comparative Endocrinology*, 124(1), 97–105. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7688>
- Boltaña, S., Reyes-Lopez, F., Morera, D., Goetz, F., & MacKenzie, S. A. (2011). Divergent responses to peptidoglycans derived from different *E. coli* serotypes influence inflammatory outcome in trout, *Oncorhynchus mykiss*, macrophages. *BMC Genomics*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-34>
- Castro, R., Zou, J., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M. (2011). Cortisol modulates the induction of inflammatory gene expression in a rainbow trout macrophage cell line. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.010>
- Celi, M., Vazzana, M., Sanfratello, M. A., & Parrinello, N. (2012). Elevated cortisol modulates hsp70 and hsp90 gene expression and protein in sea bass head kidney and isolated leukocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 175(3), 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.037>
- Dhabhar, F. S. (2000). Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Skin Immunity: The Role of Stress Hormones and Leukocyte Trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917(1), 876–893. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05454.x>
- Dhabhar, F. S. (2002). Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(6), 785–798. [https://doi.org/10.1016/S0889-1591\(02\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00036-3)
- Faught, E., Aluru, N., & Vijayan, M. M. (2016). The molecular stress response. In *Biology of Stress in Fish* (First edit, Vol. 35, pp. 113–166). Elsevier Inc.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). Programa de información de especies acuáticas *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), 9(10), 11–15.



- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012). *Species Fact Sheets Sparus aurata (Linnaeus, 1758)*. Retrieved from <http://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/34216>
- Garcia-Bonilla, L., Benakis, C., Moore, J., Iadecola, C., & Anrather, J. (2014). Immune mechanisms in cerebral ischemic tolerance. *Frontiers in Neuroscience*, (8 MAR). <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00044>
- Khansari, A. R., Balasch, J. C., Reyes-López, F. E., & Tort, L. (2017). Stressing the Inflammatory Network : Immuno-endocrine Responses to Allostatic Load in Fish, (July), 1–14.
- Khansari, A. R., Parra, D., Reyes-López, F. E., & Tort, L. (2017). Cytokine modulation by stress hormones and antagonist specific hormonal inhibition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) head kidney primary cell culture. *General and Comparative Endocrinology*, 250, 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.06.005>
- Kiilerich, P., Servili, A., Péron, S., Valotaire, C., Goardon, L., Leguen, I., & Prunet, P. (2017). Regulation of the corticosteroid signalling system in rainbow trout HPI axis during confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.08.013>
- Kuldo, J. M., Westra, J., Ásgeirsdóttir, S. A., Kok, R. J., Oosterhuis, K., Rots, M. G., ... Molema, G. (2005). Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α and IL-1-induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 289(5), C1229–C1239. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00620.2004>.
- Mazur, C. F. (1996). The heat shock protein response and physiological stress in aquatic organisms. Retrieved from <https://circle.ubc.ca/handle/2429/6116>
- Metz, J. R., Huising, M. O., Leon, K., Verburg-van Kemenade, B. M. L., & Flik, G. (2006). Central and peripheral interleukin-1 β and interleukin-1 receptor I expression and their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Endocrinology*, 191(1), 25–35. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06640>
- Olsen, R. E., Svoldal, A., Eide, T., & Wargelius, A. (2012). Stress and expression of cyclooxygenases (cox1, cox2a, cox2b) and intestinal eicosanoids, in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish*

Physiology and Biochemistry, 38(4), 951–962. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9581-1>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2004). Visión general del sector acuícola nacional España, 1–16.

Parra, D., Reyes-Lopez, F. E., & Tort, L. (2015). Mucosal immunity and B cells in teleosts: Effect of vaccination and stress. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00354>

Philip, A. M., Daniel Kim, S., & Vijayan, M. M. (2012). Cortisol modulates the expression of cytokines and suppressors of cytokine signaling (SOCS) in rainbow trout hepatocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 38(2), 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.07.005>

Reyes-Cerpa, S., Maisey, K., Reyes-Lopez, F., Toro-Ascuy, D., Mara, A., & Imarai, M. (2012). Fish Cytokines and Immune Response. *New Advances and Contributions to Fish Biology*, 3–58. <https://doi.org/10.5772/53504>

Reyes-López, F. E., Romeo, J. S., Vallejos-Vidal, E., Reyes-Cerpa, S., Sandino, A. M., Tort, L., ... Imarai, M. (2015). Differential immune gene expression profiles in susceptible and resistant full-sibling families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Developmental and Comparative Immunology*, 53(1), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.06.017>

Selye, H. (1953). The present state of stress conception. *Munch Med. Wochenschr*, 95(15), 426–433.

Stolte, E. H., Chadzinska, M., Przybylska, D., Flik, G., Savelkoul, H. F. J., & Verburg-van Kemenade, B. M. L. (2009). The immune response differentially regulates Hsp70 and glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 27(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.003>

Stolte, E. H., Nabuurs, S. B., Bury, N. R., Sturm, A., Flik, G., Savelkoul, H. F. J., & Lidy Verburg-van Kemenade, B. M. (2008). Stress and innate immunity in carp: Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. *Molecular Immunology*, 46(1), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.022>



- Teles, M., Tridico, R., Callol, A., Fierro-Castro, C., & Tort, L. (2013). Differential expression of the corticosteroid receptors GR1, GR2 and MR in rainbow trout organs with slow release cortisol implants. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 164(3), 506–511. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.018>
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Vazzana, M., Vizzini, A., Sanfratello, M. A., Celi, M., Salerno, G., & Parrinello, N. (2010). Differential expression of two glucocorticoid receptors in seabass (teleost fish) head kidney after exogeneous cortisol inoculation. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 157(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.05.003>
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Forsyth, R. B., Kennedy, C. J., & Iwama, G. K. (1997). Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β -naphthoflavone. *Life Sciences*, 61(2), 117–127. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)00366-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)00366-4)
- Wang, T., & Secombes, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1703–1718. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.030>
- Wiseman, S., Osachoff, H., Bassett, E., Malhotra, J., Bruno, J., VanAggelen, G., ... Vijayan, M. M. (2007). Gene expression pattern in the liver during recovery from an acute stressor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 2(3), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2007.04.005>
- Yada, T., & Tort, L. (2016). Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions. In *Biology of Stress in Fish* (First edit, Vol. 35, pp. 365–403). Elsevier Inc.

