



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DIETARIA MICROALGAL (*Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium sp.*) SOBRE LA INMUNIDAD INESPECÍFICA Y LA MADUREZ ERITROCITARIA EN ALEVINES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO.

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias.

FELIPE ANTONIO SÁNCHEZ TORRES

Director de Tesis

JURIJ WACYK GONZÁLES

Profesores consejeros

GIORGIO CASTELLARO

HÉCTOR URIBE

SANTIAGO - CHILE

2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DIETARIA MICROALGAL (*Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium sp.*) SOBRE LA INMUNIDAD INESPECÍFICA Y LA MADUREZ ERITROCITARIA EN ALEVINES DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO.

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias.

FELIPE ANTONIO SÁNCHEZ TORRES

| | Calificaciones (Memoria de Título) | Calificaciones (Tesis de Grado) |
|--|---------------------------------------|------------------------------------|
| DIRECTOR DE TESIS/AFE | | |
| Jurij Wacyk Gonzáles Ingeniero Agrónomo, MSc, Ph D. | 7,0 | 7,0 |
| PROFESORES CONSEJEROS | | |
| Giorgio Castellaro Ingeniero Agrónomo, MSc. | 7,0 | 7,0 |
| Héctor Uribe Médico Veterinario, MSc, Ph D. | 6,6 | 6,6 |

Santiago - Chile

2022

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco en primer lugar al Dr Roberto Neira por permitir mi participación en el proyecto de investigación FONDEF IT 18I0067. Al Dr. Jurij Wacyk por su apoyo académico, orientación en el proceso de investigación, y su labor de profesor guía. Un especial agradecimiento a la Dra Ivonne Lozano por su gran apoyo en mi proceso de aprendizaje y su constante motivación hacia mi persona en el ámbito académico y profesional.

Agradezco también a mi familia por su inmenso cariño y por brindarme la oportunidad de tener una educación de calidad.

Proyecto FONDEF IT 18I0067: “Mejoramiento del proceso de esmoltificación en salmo salar mediante el uso de un aditivo dietario microalgal”

*Dedicado a María Elisa Ramírez Peña,
Antonio Hernán Torres Ramírez, y mi perrita
Llaima que en paz descansen*

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| HIPOTESIS | 5 |
| OBJETIVOS | 5 |
| Objetivo general | 5 |
| Objetivos específicos | 5 |
| MATERIALES Y MÉTODO | 6 |
| Ubicación del estudio | 6 |
| Material Biológico | 6 |
| Tratamiento y diseño experimental | 7 |
| Manejo del experimento | 7 |
| Evaluaciones | 8 |
| Calidad de smolt | 8 |
| Parámetros productivos | 8 |
| Obtención de tejidos y aislamiento celular | 9 |
| Aislamiento de ARN y síntesis de cDNA | 9 |
| Expresión génica | 10 |
| Recuento celular | 11 |
| Modelo de clasificación celular | 11 |
| Clasificación celular eritrocitaria | 13 |
| Análisis estadístico..... | 13 |
| RESULTADOS | 13 |
| Índice y calidad de esmoltificación | 13 |
| Parámetros productivos | 14 |
| Expresión génica inmunitaria | 15 |
| Recuento diferencial de células leucocitarias | 17 |
| Red neuronal con percepción en multicapa para la clasificación eritrocitaria.... | 18 |
| Recuento diferencial de eritrocitos según estado madurativo | 20 |

| | |
|---------------------------|----|
| DISCUSIÓN | 21 |
| CONCLUSIONES | 27 |
| BIBLIOGRAFÍA | 28 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Formulación de las dietas experimentales | 6 |
| Cuadro 2. Secuencia de primers para PCR en tiempo real | 10 |
| Cuadro 3. Caracterización cualitativa de madurez eritrocitaria | 12 |
| Cuadro 4. Parámetros productivos y consumo de alimento durante el desarrollo experimental. | 15 |
| Cuadro 5. Recuento celular diferencial de Salmón del Atlántico durante la esmoltificación y durante el desafío dietario microalgal con <i>Schizochytrium.sp</i> y <i>Nannochloropsis gaditana</i> | 17 |
| Cuadro 6. Resultados de clasificación eritrocitaria y capacidad predictiva de la red neuronal con percepción en multicapa | 18 |
| Cuadro 7. Continuación cuadro 6 | 19 |
| Cuadro 8. Análisis de la madurez eritrocitaria durante la esmoltificación y durante el desafío dietario microalgal con <i>Schizochytrium.sp</i> y <i>Nannochloropsis gaditana</i> | 21 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Imagen de frotis sanguíneo con células rojas nucleadas de Salmón de Atlántico en diferentes estados de desarrollo: Maduras (→), En maduración (→), Inmaduras (→)..... | 11 |
| Figura 2: Índice de esmoltificación de los peces experimentales en base a un score de esmoltificación | 14 |
| Figura 3: Niveles de expresión diferencial de Lisozima, Hecpidina, Complemento C3, y NK-Lysina en tejido leucocitario, eritrocitario y mucus de Salmón del Atlántico suplementados con <i>Schizochytrium.sp</i> y <i>Nannochloropsis gaditana</i> al 10% durante 30 días | 16 |
| Figura 3: Modelo de red neuronal con percepción en multicapa de una capa oculta con tres unidades, además de una capa de salida con 3 unidades que representan los niveles de madurez eritrocitario | 20 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo I: Deducción de puntos en base a los indicadores morfológicos y de comportamiento | 37 |
|---|----|

APENDICES

| | |
|---|----|
| Apéndice I: Valores morfométricos de eritrocitos para la conformación del modelo de clasificación celular | 38 |
| Apéndice II: Probabilidad de selección eritrocitaria | 39 |

RESUMEN

La transformación parr-smolt en salmónidos conlleva un periodo crítico que se caracteriza por la inmunosupresión sistémica en los peces, regulando a la baja una serie de componentes humorales y celulares de la respuesta inmune. Bajo ese contexto, las microalgas como ingrediente dietario en dietas funcionales son una alternativa por sus compuestos nutricionales y bioactivos que podrían fortalecer el estatus inmunitario. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de una dieta suplementada con *Schizochytrium sp* y *Nannochloropsis gaditana* sobre la expresión de genes asociados a la respuesta antibacteriana, además de evaluar el efecto de esta inclusión sobre la población leucocitaria y la madurez eritrocitaria en *Salmo salar*. Se alimentó a los peces durante 30 días con una mezcla microalgal (1:1) a un 10% de inclusión. Los niveles de transcripción se cuantificaron y analizaron mediante qRT-PCR desde aislados celulares y tejido mucus. Además, se realizó un recuento e identificación celular de leucocitos y una clasificación de madurez celular de eritrocitos. En el presente trabajo se reportó un incremento significativo de C3, NK-Lysina y Hepcidina en eritrocitos, además de C3 en tejido mucus en los peces alimentados con las dietas suplementadas. También, se observó un incremento en los monocitos y los eritrocitos inmaduros de este mismo grupo de peces. Los resultados de este estudio apuntan a la capacidad de la suplementación microalgal, de incrementar componentes humorales de la respuesta inmune en particular en el tejido eritrocitario, además de aumentar células fagocíticas y eritrocitos inmaduros en sangre.

Palabras clave: Ingredientes funcionales, *Nannochloropsis gaditana*, *Schizochytrium sp*, *Salmo salar*.

ABSTRACT

The parr-smolt transformation in salmonids entails a critical period characterized by systemic immunosuppression in fish, downregulating a series of humoral and cellular components of the immune response. In this context, microalgae as a dietary ingredient in functional diets are an alternative for their nutritional and bioactive compounds that could strengthen the immune status. The objective of this study was to evaluate the effect of a diet supplemented with *Schizochytrium sp* and *Nannochloropsis gaditana* on the expression of genes associated with the antibacterial response, in addition to evaluating the effect of this inclusion on the leukocyte population and erythrocyte maturity in *Salmo salar*. Fish were fed for 30 days with a microalgal mixture (1:1) at 10% inclusion. Transcription levels were quantified and analyzed by qRT-PCR from cell isolates and mucus tissue. In addition, cell count and identification of leukocytes and a classification of cellular maturity of erythrocytes were performed. In the present work, a significant increase of C3, NK-Lysine and Hepsidin in erythrocytes, in addition to C3 in mucus tissue, was reported in fish fed with supplemented diets. Also, an increase in monocytes and immature erythrocytes was observed in this same group of fish. The results of this study point to the ability of microalgal supplementation to increase humoral components of the immune response, particularly in erythrocyte tissue, in addition to increasing phagocytic cells and immature erythrocytes in the blood.

Keywords: Functional ingredient, *Nannochloropsis gaditana*, *Schizochytrium sp*, *Salmo salar*.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura, es la industria productora de alimentos con las mayores tasas de crecimiento a nivel mundial, estando este aumento sostenido en la productividad basado en la intensificación de sus prácticas, lo que impone enormes desafíos, especialmente en el control de enfermedades infecciosas asociadas al aumento de la susceptibilidad dentro de un sistema cada vez más exigente (Zeraatpisheh *et al.*, 2018). La producción de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), representa un área dentro de la acuicultura con enorme valor económico local y mundial (Iversen *et al.*, 2020). No obstante, las transformaciones fisiológicas asociadas a la preparación para el hábitat marino en los estados de desarrollo juveniles, denominada esmoltificación, representa un periodo crítico del ciclo productivo que se asocia a altas tasas de mortalidad (Johansson *et al.*, 2016; Hjeltne *et al.*, 2016). Los cambios inmunológicos descritos en la esmoltificación guardan relación con una competencia por recursos destinados a otros procesos metabólicos con alta demanda energética, entre ellos procesos de crecimiento, endocrinos y osmóticos (McCormick *et al.*, 2009; Bjornsson *et al.*, 2010; Morera *et al.*, 2021). Bajo ese contexto, las dietas funcionales que incorporan algas marinas en su formulación, entre ellas las microalgas, son una alternativa prometedora ya que una de las múltiples funciones que se le atribuye están asociadas a mejorar la respuesta inmune (Spolaore *et al.*, 2006; Guedes y Malcata, 2012). Esta capacidad, está asociada a la riqueza de un grupo de compuesto bioactivos, como los pigmentos naturales, biopéptidos, ácidos grasos poliinsaturados (PUFASs), polisacáridos, y vitaminas (Christaki., *et al* 2011; Munir *et al.*, 2013; Vaz *et al.*, 2016). Específicamente, se han caracterizado ciertas especies de microalgas con potencial como ingredientes funcionales acuícolas. Entre ellas, *Schizochytrium sp* que presenta un elevado contenido de DHA, ácido palmítico (PA), además de niveles de B-caroteno elevados (Vega *et al.*, 2018) siendo descrita como una alternativa para la alimentación de Salmón del Atlántico y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Miller *et al.*, 2007; Sarker *et al.*, 2020). Por otro lado, *Nannochloropsis gaditana* contiene altos niveles de EPA, polifenoles, carotenoides y vitaminas (Zanella *et al.*, 2020) y se han descrito sus capacidades antibacterianas para un amplio espectro de bacterias (Amal *et al.*, 2017).

La activación de la respuesta inmune, parte por la detección de agentes infecciosos mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Trichet, 2010; Secombes y Wang, 2012). Este reconocimiento, desencadena una respuesta inmunitaria general, que secreta y activa mecanismos de respuestas humorales, dentro de ellos, citoquinas, el sistema del complemento, la lisozima, péptidos antimicrobianos, entre otros (Abbas *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2017). En ese contexto, el tejido mucus es uno de los componentes más relevantes de la respuesta inmune inespecífica, siendo una barrera física y química rica en compuestos antimicrobianos (Tiralongo *et al.*, 2020). Se ha reportado, que la inclusión dietaria de algas marinas tiene la capacidad de aumentar la expresión de ciertos genes inmuno relevantes con capacidad antibacteriana (Cerezuela *et al.*, 2012; Kiron *et al.*, 2016; Lozano *et al.*, 2018; Vazizadeh *et al.*, 2020) además, de incrementar el número de células leucocitarias en sangre incluyendo neutrófilos y monocitos macrófagos (Wan *et al.*, 2016; Sotoudeh., *et al* 2017). Se

ha descrito también su capacidad de aumentar la respuesta de citoquinas, la actividad fagocítica, actividad de la lisozima y el complemento sérico, un gran grupo de interleucinas y péptidos antimicrobianos, además de receptores del tipo Toll (Nagappan *et al.*, 2021). La lisozima, es una enzima de origen leucocitario que tiene la capacidad de lisar las bacterias Gram positivas por medio de la ruptura de los enlaces β 1 \rightarrow 4, y las bacterias Gram negativas en un actuar coordinado con péptidos antimicrobianos y la actividad del complemento (Desriac *et al.*, 2013). El sistema del complemento se define como una cascada de reacciones enzimática que culmina con la lisis de paredes celulares de patógenos, y con la formación de subproductos como péptidos (Claire *et al.*, 2002). Dentro de este complejo enzimático, el factor C3 es una de las proteínas más abundante y que tiene un rol central en la secuencia y desencadenamiento de la actividad antimicrobiana (Boshra *et al.*, 2006, Sahoo *et al.*, 2021). Los péptidos antimicrobianos (AMPs), son una de las principales líneas de defensas que comprenden parte de la inmunidad innata y actúan con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, desde perturbar membranas celulares, hasta incidir a nivel de síntesis de material genético (Valero *et al.*, 2018). La Hepsidina es un AMPs que ha demostrado doble funcionalidad, en primer lugar, presenta capacidad antibacteriana endógena únicamente contra bacterias Gram negativas (Lauth *et al.*, 2005) y, por otro lado, está involucrada en la regulación de la homeostasis del hierro (Ashrafian *et al.*, 2003; Shi y Camus, 2006). Otro AMPs de importancia, es NK-Lysina la cual es producida por linfocitos T y células citotóxicas, la que tiene función antibacteriana tanto para bacterias Gram negativas como Gram positivas (Zhang *et al.*, 2014). Si bien, su mecanismo de acción está poco documentado para peces teleósteos, se cree que actúa perturbando las membranas lipídicas generando permeabilidad transitoria (Liepinsh *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2018).

Dentro de los componentes celulares de la respuesta inmune se ha estudiado el rol que juegan los eritrocitos en esta materia, y lo relevante del nivel de maduración de estos, estando involucrados en procesos de señalización celular, transcripción, síntesis proteica y secreción humoral (Sprague *et al.*, 2007; Morera y MacKenzi, 2011; Yamamoto *et al.*, 2017). Se ha reportado la expresión de NK-Lysina y Hepsidina, así como un conjunto de interleucinas y receptores del tipo Toll-Like en eritrocitos de peces teleósteos (Pereiro *et al.*, 2017; Puente-Marin *et al.*, 2019). Por consiguiente, existe evidencia para decir que los eritrocitos como células nucleadas tienen la capacidad de modular la expresión de diferentes conjuntos de genes relacionado con la homeostasis del sistema inmunológico, y jugar un rol complementario en la inmunidad de peces (Shen *et al.*, 2018). El proceso de maduración eritrocitario implica que existan poblaciones de eritrocitos circulantes en la sangre, formando una distribución y subpoblaciones con diferentes edades (Nikinmaa, 2019). El nivel de madurez celular está asociado a múltiples cambios entre ellos los referidos a la capacidad de transcripción génica, síntesis proteica, rigidez de membranas, concentración de hemoglobina, entre otros, (Lund *et al.*, 2000; Gotting y Nikinmaa, 2017). Se ha descrito un conjunto de factores que inciden en la madurez celular y la población circulante de eritrocitos, no obstante, no hay evidencia de la capacidad de los ingredientes funcionales y en particular de las algas marinas en afectar la distribución en la madurez celular de eritrocitos en sangre y como esta incidencia guarda relación con la expresión de genes inmune relevantes.

HIPÓTESIS

1. La dieta suplementada con *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium. sp* aumenta la expresión de genes asociados a la respuesta inmune en células sanguíneas y tejido mucus.
2. La dieta suplementada con *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium. sp* aumenta la proporción de los glóbulos blancos y eritrocitos inmaduros en la sangre periférica de Salmón del Atlántico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inclusión de *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium sp* en los niveles de expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta antibacteriana, en los componentes celulares de la respuesta inmune, y en los parámetros productivos de alevines de Salmón del Atlántico.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la inclusión de *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium sp* en los parámetros productivos de alevines de *Salmo salar*.
2. Evaluar mediante “Score” la calidad de Smolt de los peces pre y post desafío dietario.
3. Cuantificar mediante qRT-PCR los niveles de expresión de genes seleccionados que codifican las proteínas inmuno relevantes en eritrocitos, leucocitos, y tejido mucus.
4. Establecer un recuento leucocitario en sangre, y una determinación porcentual e identificación de los tipos celulares de la línea blanca durante la fase de esmoltificación y el desafío dietario microalgal.
5. Determinar la proporción de eritrocitos según el nivel de madurez durante la fase de esmoltificación y el desafío dietario microalgal.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del estudio

La fase experimental, se llevó a cabo en las dependencias de la unidad piscícola de investigación y desarrollo de la empresa AquaChile, ubicada en Hornopiren, X Región. Camino al Lago Cabrera S/N, Hualaihue, Provincia de Palena.

Material Biológico

Se utilizaron 560 alevines parr de Salmón del Atlántico con un peso inicial de $78,8 \pm 1,85\text{g}$ ($CV \leq 12\%$) en condiciones sanitarias óptimas, todos provenientes de la misma familia, pertenecientes al proyecto CAT-OTO-2021 de la empresa AquaChile.

Se seleccionaron dos especies de microalgas, *Schizochytrium sp* y *Nannochloropsis gaditana*, en base a las características nutricionales descritas en la literatura. *N. gaditana*, fue producida y cosechada con cepa obtenida del medio marino del norte de Chile, posteriormente centrifugada y secada por spray dryer (Proyecto FONDEF IT18I067). En el caso de *Schizochytrium. sp* se trabajó con un producto comercial manufacturado por Xi and Herbsnes China Co., Ltd. La dieta experimental, se elaboró en un formato extruido donde se suplementó con ambas microalgas (1:1) a una inclusión del 10% (Cuadro 1).

Cuadro 1: Formulación de las dietas experimentales.

| Ingredientes (% MS) | Dietas experimentales | |
|--|-----------------------|------------|
| | Control | Microalgal |
| Harina de pescado | 28 | 28 |
| Soya concentrada | 16,64 | 14,9 |
| Trigo entero | 14 | 0 |
| Harina panadera | 0 | 7 |
| Aceite de pescado | 19,7 | 18,37 |
| Gluten de maíz | 10 | 10 |
| Harina de vísceras de pollo | 10 | 10 |
| Fosfato monocálcico | 1 | 1 |
| Premix Vitamínal | 0,38 | 0,38 |
| L-Lisina | 0,27 | 0,27 |
| DL-Metionina | 0,08 | 0,08 |
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> ^a | 0 | 5 |
| <i>Schizochytrium. sp</i> ^b | 0 | 5 |

a Polvo de *Nannochloropsis gaditana* en base a materia seca.

b Polvo de *Schizochytrium. sp* en base a materia seca.

Tratamientos y diseño experimental

El presente estudio, constó de 2 tratamientos dietarios con 4 repeticiones cada uno, considerando un único factor, la inclusión de microalgas en la dieta en dos niveles, correspondientes a la dieta control y la dieta suplementada microalgal al 10%. El estudio, se realizó con un diseño experimental completamente al azar (DCA). La unidad experimental, fue el estanque en este caso con una capacidad de $1,2m^3$ y con 70 peces por estanque y, la unidad observacional de 6 peces por estanque seleccionados al azar para el análisis de expresión génica, y de 5 peces para los análisis celulares. Se procedió a un primer muestreo de los alevines en una condición parr, 4 semanas previo al inicio de la aclimatación, la cual contemplo los análisis de recuento y madurez celular. Posteriormente, se realizó un segundo muestreo al término del desafío dietario tanto para parámetros productivos, expresión génica inmunitaria y análisis celular, utilizando los mismos protocolos y criterios, tanto para los peces tratados como no tratados, con la finalidad de evaluar el efecto de la suplementación dietaria microalgal.

Manejo del experimento

Se realizó una distribución de los tratamientos completamente al azar en los 8 estanques experimentales. Se estableció un flujo continuo de agua de 7 L/min a una temperatura promedio de $10^{\circ}C \pm 0,35$ bajo un sistema de flujo abierto. Los peces fueron aclimatados durante las 2 semanas previas al inicio del ensayo, para posteriormente ser alimentados a saciedad durante 30 días con las dietas experimentales. Se entregó el pienso en 6 raciones diarias, cada pulso separado por 3 h, cuantificando el alimento consumido diariamente en cada estanque. Los peces se mantuvieron con un régimen de fotoperiodo de 24 h/ luz y, todos los días se verificó temperatura, oxígeno y sobrevivencia. Finalizados los 30 días de alimentación, los peces se mantuvieron en ayuno durante 24 h previo a la toma de muestras. El reconocimiento de la calidad de smolt, fue realizado mediante una pauta de determinación de calidad smolt elaborado por el equipo de investigación del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile bajo el marco del proyecto FONDEF IT18I0067 (Anexo1). Los peces fueron anestesiados con benzocaína por inmersión a 40mg/L de agua, posteriormente se extrajo tejido mucus según Alishasho *et al.* (2014). Inmediatamente después, se procedió a extraer tejido sanguíneo vía punción en la vena caudal según protocolo del mismo laboratorio. Finalmente, los peces fueron sacrificados según directiva 2010/63/EU.

Evaluaciones

Análisis calidad de Smolt

Para el análisis de calidad de smolt, se procedió a fotografiar 10 peces por estanque, previamente anestesiado, con cámara 5 MP con apertura f/2.0, flash LED de celular Motorola S6. Se utilizó una puntuación en base a indicadores morfométricos y de comportamiento de Salmón del Atlántico (Anexo1). Se analizó la coloración y manchas presentes en el cuerpo, coloración de aletas, presencia de escamas y mucosa, además de un factor de condición. La puntuación final que representó el nivel de esmoltificación (índice de calidad de smolt) es = $100 - \sum$ de deducción de puntos.

Calificación del índice de esmoltificación:

90-100p= smolt nivel I (Smolt)

60-89p= smolt nivel II (Pre smolt)

<60P= smolt nivel III (Parr)

Parámetros productivos

Al finalizar los 30 días de alimentación, todos los peces experimentales fueron pesados y medidos con una precisión de 0.01g y 0.1cm respectivamente. En el presente estudio, los indicadores de productividad: consumo aparente (C), ganancia de peso (GP), tasa específica de crecimiento (SGR), factor de condición alimenticio (FCR), y sobrevivencia (SR) fueron calculados según las siguientes ecuaciones:

$$C(g) = Po - (N * E) \quad (Ec. 1)$$

Donde Po representa el pienso ofertado (g), N: número de pellet no consumido, y E: peso promedio de un pellet.

$$GP(\%) = (PF - PI) * \frac{100}{PI} \quad (Ec. 2)$$

$$SGR \left(\frac{\%}{\text{día}} \right) = \frac{(\ln PF - \ln PI)}{T} * 100 \quad (Ec. 3)$$

$$FCR = C/GP$$

$$SR(\%) = \left(\frac{N^{\circ} \text{ peces al final del estudio}}{N^{\circ} \text{ inicial de peces}} * 100 \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde PF representa el promedio del peso corporal final (g), PI: promedio del peso corporal inicial (g), y T: Tiempo del ensayo en días.

Obtención de tejidos y aislamiento celular

Se procedió a la recolección de tejido mucus, mediante la extracción cutánea de la zona dorsal del cuerpo del pez con un Cells Scrapers (Dutscher, UK). El tejido removido, se transfirió a un criotubo de 2 mL con 0,5 mL de ARNlater para ser almacenado de forma inmediata a -80°C para evitar crecimiento bacteriana y degradación.

Se extrajo 0,5 mL de sangre por pez, para ser colectada en criotubos de 2 mL con medio estéril Hank's BBS a 4°C. Posteriormente, se procedió a un aislamiento celular descrito por Lozano *et al.* (2018), mediante centrifugado a 258 xg por 5 min con microcentrífuga (CAPP Rondo CR-68X). Posteriormente, se extrajo el plasma rico en linfocitos de la parte superficial (buffy-coat) siendo colectado en criotubos de 2 mL. Al aislado eritrocitario resultante en el fondo del criotubo se le añadió 0,8 mL de medio estéril Hank's BBs. Ambos aislados celulares fueron depositados en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta el análisis de expresión génica.

Mediante el mismo protocolo de extracción sanguínea se obtuvo 0,5 mL de sangre, desde los peces (n=5) destinados al análisis de recuento celular y madurez eritrocitaria, la cual se recibió en tubos de 2 mL con heparina de litio a 4°C para ser procesada de forma inmediata.

Aislamiento de ARN y síntesis de cDNA

Se procedió a realizar la extracción de ARN del tejido mucus, leucocitario y eritrocitario. Se añadió 750 µL de reactivo Trizol por muestra de tejido para luego ser centrifugado a 12.000 xg durante 10 min a 4 ° C. El sobrenadante resultante se incubo durante 5-10 minutos a temperatura ambiente para luego agregar 200 µL de cloroformo. La muestra se mezcló por inmersión durante 15s, se incubo 2-3 min a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se centrifugó a 12.000 xg por 15 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se agregó 1 µL de glucógeno y 500 µL de alcohol isopropílico. La muestra se incubo por 10 minutos a TA y se realizó un tercer ciclo de centrifugado durante 10 min a 12.000 rpm a 4 °C eliminando el sobrenadante. El pellet de ARN se lavó con etanol al 75% y se centrifugo a 7.500 xg por 5 min a 4°C. Se dejó secar a TA después de eliminar el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el RNA en agua libre de RNAasa y se incubo a baño maría a 55°C por 15 min. Se cuantificó por absorbancia a 260/280 nm (Biowave DNA, WPA) la cantidad y pureza de la extracción. Rangos de 1,8-2,1 de absorbancia se consideró ARN de alta calidad.

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 2 µg de RNA total para cada reacción en un volumen final de 20 µL. La síntesis de cDNA se realizó con Transcriptasa reversa SuperscriptTMIII (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Expresión génica

Se seleccionaron 4 genes con importancia en la respuesta antibacteriana de Salmón del Atlántico (Lisozima, Hecpidina, NK-Lysina, C3) sumado a un Housekeeping (EF1 α) para evaluar el efecto inmunoestimulante del aditivo microalgal. En base a estos genes se diseñaron los cebadores utilizando la herramienta “pick primer” del Centro Nacional de Información Biotecnológica (ncbi.nlm.nih.gov).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), se realizó en un sistema de dos pasos utilizando la mezcla maestra de qPCR Máxima SYBR Green / ROX (2x; ThermoScientific, Santiago, Chile) y el sistema de PCR Eco Real-Time (Illumina, San Diego, CA, USA). Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en mezclas de reacción de 20 µL que contienen 10 µL de la mezcla maestra de qPCR 2x, cebador directo de 0,3 µL, cebador inverso de 0,3 µL, 8,4 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADNc modelo. Se procedió a un centrifugado antes de la amplificación en las siguientes condiciones: 10 min a 95 ° C (desnaturalización inicial) seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 ° C (desnaturalización) y 60 s a 60 ° C (recocido y prolongación).

La amplificación, se verificó mediante un análisis de curva de fusión para asegurar que un solo producto génico se haya amplificado. Los valores de CT proporcionados por la instrumentación de PCR en tiempo real se importaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel, y los cambios en la expresión génica se calcularon utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde $\Delta\Delta CT = (\text{gen diana CT} - \text{CT EF1}\alpha) \text{ muestra tratada} - (\text{CT target gene} - \text{CT EF1}\alpha) \text{ control no tratado}$ (Livak y Schmittgen 2001).

Cuadro 2: Secuencia de primers para PCR en tiempo real

| Gen | | Secuencia | No. de acceso | Amplificación (pb) |
|--------------|---------|---------------------------|----------------|--------------------|
| NK-lysina | Foward | TATGCACCACGCAACGCTAT | NM_001141110.1 | 102 |
| | Reverse | GGGTATGACGCAAAACGACT | | |
| Hecpidina | Foward | CTTTAGTGTTCAGTCGTCG | XM_014170058.1 | 111 |
| | Reverse | TCCCCAACTGGACTGTCAAA G | | |
| C3 | Foward | TGTTGTGTGGACGGGATGAG | XM_014186867.1 | 98 |
| | Reverse | AGGAAGGCTTGGATGCAGAC | | |
| Lisozima | Foward | CTACTGGTGTGACGACGGAC | XM_014145497.1 | 98 |
| | Reverse | AACTGACCGCCACTGTGATG | | |
| EF1 α | Foward | GTGGCAGTGTGATTTTCGTAGT | NM_001123629. | 83 |
| | Reverse | GCCAATGACCACGATGTTGA | | |

Fuente: Elaboración propia

Recuento celular

Se fijaron y tiñeron los frotis sanguíneos mediante método del portaobjeto con metanol al 95 % y tinción Giemsa en una dilución de 1:10 con agua tamponada como lo indica el proveedor (Diprolab, Chile). Luego de esto se procedió al recuento celular con objetivo 100x con microscopio óptico (LEICA ICC50W L) desde la porción de monocapa, contando 2000 células y dentro de ellas diferenciando la cantidad de leucocitos y trombocitos presentes, para posteriormente llevar a términos absolutos cada tipo celular (Correa *et al.*, 2017). Posteriormente, del mismo frotis sanguíneo se procedió con un recuento diferencial leucocitario, cuantificando en la monocapa sanguínea la cantidad de cada tipo leucocitario presente por cada 200 glóbulos blancos, llevando a términos porcentuales la cantidad de células identificadas.

Modelo de clasificación celular

Se procedió a utilizar una red neuronal con percepción en multicapa (MLP) según Spasic *et al.*, (2021) para determinar el estado madurativo de los eritrocitos de Salmón del Atlántico. Se seleccionaron 120 eritrocitos, 40 por cada nivel madurativo (maduro, en maduración e inmaduro), como se observa en la Figura 1, a partir de imágenes de alta resolución (1600 x 1200) obtenidas de campos aleatorios desde los frotis previamente fijados y teñidos. Las imágenes, fueron capturadas con cámara microscópica digital Leica ICC50W. Las 40 células en cada nivel de madurez eritrocitaria fueron seleccionadas y clasificadas según caracterización morfométrica descrita por Hardig (1977) (Cuadro 3), siendo estas células utilizadas para la construcción de la MLP.

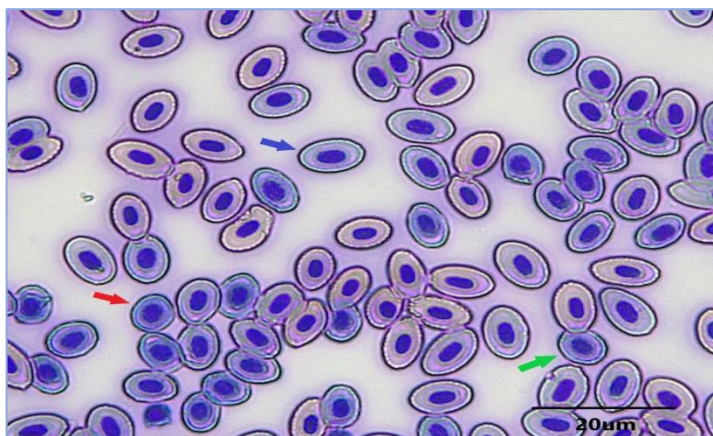


Figura 1: Imagen de frotis sanguíneo con células rojas nucleadas de Salmón de Atlántico en diferentes estados de desarrollo. Células identificadas: Maduras (→), En maduración (→), Inmaduras (→). Autoría propia.

De las células seleccionadas, se construyeron 8 variables predictoras: área celular (AC), largo celular (LC), perímetro celular (PC), factor de forma celular (SFC) (Ec.5), área nuclear (AN),

largo nuclear (LN), perímetro nuclear (PN), y factor de forma nuclear (SFN) (Ec.6). Las variables fueron cuantificadas de manera automática mediante la función elipse (Anexo 1) del Software de análisis de imágenes Digimizer versión 5.6.0. Estas variables, actuaron como las entradas del modelo asociadas al cambio que experimenta la célula cuando maduran. Por otro lado, las salidas del modelo de clasificación fueron los tres niveles de madurez eritrocitaria.

$$SFC = \frac{(4*\pi*AC)}{PC^2} \quad (\text{Ec.5})$$

$$SFN = \frac{(4*\pi*AN)}{PN^2} \quad (\text{Ec.6})$$

Se procedió al entrenamiento del MLP con software estadístico SPSS versión 28.0 utilizando un 70% de los datos obtenidos de las 120 células, donde m es la dimensión del vector de entrada y n es la dimensión del vector de salida (Ec.7), el 30% restante se utilizó para la prueba de la red neuronal. Finalizado el aprendizaje, se procedió a analizar el ajuste del modelo para posteriormente utilizarlo en la clasificación celular. Para la obtención de las variables predictoras más relevantes, se entrenó la red neuronal con todas las variables morfométricas que integran la entrada del modelo (8 Variables), y posteriormente se fue eliminando cada variable en función del efecto que generaba en la ejecución de la red y su capacidad de causar el mayor decremento en la predicción, como lo describe Masters (1993). Obteniendo de esta manera, las variables morfométricas predictoras y la red neuronal con percepción en multicapa que posteriormente será utilizada para la clasificación celular eritrocitaria.

$$f: R^m \rightarrow R^n \quad (\text{Ec.7})$$

Cuadro 3: Caracterización cualitativa de la madurez eritrocitaria.

| Caracterización | | | | |
|--------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|
| Edad eritrocitaria | Forma celular | Forma nuclear | Estructura nuclear | Tinción citoplasmática |
| Inmaduro | Circular | Circular | Laxo | Azul claro |
| En maduración | Ligeramente elíptico | Elíptico y Ligeramente elíptico | Semi laxo | Rojo – Rojo pálido |
| Maduro | elíptico | elíptico | Denso | Rojo |

Adaptado de Hardig (1977)

Clasificación celular eritrocitaria

Se procedió a contar 1000 eritrocitos desde las fotografías de la monocapa sanguínea (Anexo 2) obtenidas de los frotis sanguíneos, cuantificando en cada célula mediante programa Digimizer versión 5.6.0 las variables predictoras previamente definidas que constituirán el modelo. Posteriormente, se utilizó la red neuronal con percepción en multicapa validada previamente (Figura 7) con programa SPSS versión 28.0 y su función de asistencia en la puntuación, permitiendo correr el modelo con una base de datos nueva, respectiva a las células de los peces experimentales. De esta manera, se obtuvo la probabilidad de ocurrencia de que la célula en cuestión sea madura, y en base a aquella probabilidad se procede a clasificar los niveles madurativos y cuantificar la cantidad de células por edad eritrocitaria, tanto de peces parr como smolt tratados y control.

Análisis Estadístico

Se procedió a verificar los supuestos de normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Test de Levene's) para todos los datos obtenidos. Para determinar diferencias estadísticas entre el efecto de los tratamientos en los parámetros productivos, la expresión génica inmunitaria, además de las diferencias en los análisis celulares, los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA) o bien en caso de presentar heterocedasticidad se sometieron a una prueba T para muestras independientes sin asumir varianzas iguales. Se utilizó un nivel de significancia del 5% para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

RESULTADOS

Índice y calidad de smolt

El índice de calidad smolt, se representa en la Figura 2 mostrando en primer lugar que los valores de calidad de smolt obtenidos en base al análisis de imágenes en el tiempo T_0 fue de $59,5 \pm 3,28$ (EE), estableciendo una población inicial de peces experimentales parr (smolt nivel III). Finalizado el desafío dietario, los peces alimentados con la dieta control, obtuvieron un índice de $77,76 \pm 6,74$ indicativo de un smolt tipo II (pre-smolt), y por otro lado los peces suplementados con *Schizochytrium.sp* y *Nannochloropsis gaditana* demostró incrementar la puntuación de calidad smolt, resultando para los peces tratados en $83,25 \pm 5,94$, indicativo de un smolt tipo II, es decir, un individuo en calidad de pre smolt al igual que el tratamiento control. Es importante mencionar, que se mantuvo el coeficiente de

variación en valores prácticamente iguales en ambos tratamientos, este último como indicativo de la capacidad dietaria de homogeneizar la esmoltificación en la población.

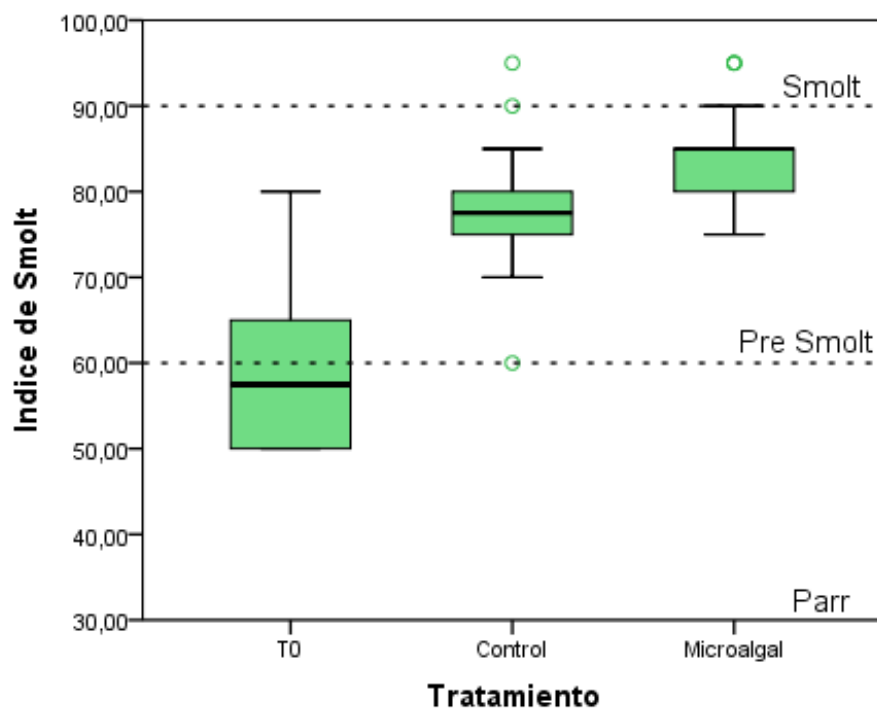


Figura 2: Índice de calidad smolt (Media \pm Error estándar) en la población inicial de peces 4 semanas previo al inicio de la aclimatación (T0), peces alimentados con la dieta control (Tratamiento control), y peces suplementados con *Schizochytrium.sp* y *Nannochloropsis gaditana* al 10% durante 30 días (Tratamiento microalgal). Cajas representan valores Inter cuartiles (IGR) entre el primer y tercer cuartil (percentil 25 y 75), y la línea horizontal representa la mediana.

Parámetros productivos

Durante el desarrollo experimental, se registró una mortalidad total de 7 peces, 5 referidos al tratamiento microalgal y 2 al tratamiento control, no obstante, el indicador porcentual de sobrevivencia no tuvo diferencias significativas entre las dietas. No se observaron signos de toxicidad o patologías en el desarrollo del ensayo. Además, ambas dietas fueron aceptadas sin problemas por los peces experimentales. Todos los parámetros productivos se mantuvieron sin diferencias significativas entre ambos tratamientos finalizado los 30 días de desafío dietario (Cuadro 4).

Cuadro 4: Efecto del suplemento dietario microalgal sobre los parámetros productivo de alevines de Salmón del Atlántico.

| Parámetros | Tratamientos | |
|----------------------|------------------------|------------------------|
| | Control | Microalgal |
| Consumo (g) | 29,28 ± 2,36 a | 28,90 ± 1,73 a |
| Peso inicial (g) | 78,00 ± 1,72 a | 79,80 ± 1,68 a |
| Peso final (g) | 110,50 ± 3,67 a | 112,25 ± 3,53 a |
| Ganancia de peso (%) | 42,60 ± 4,10 a | 41,22 ± 2,12 a |
| K | 1,25 ± 0,04 a | 1,28 ± 0,02 a |
| SGR | 1,20 ± 0,13 a | 1,18 ± 0,05 a |
| FCR | 0.90 ± 0.08 a | 0.89 ± 0.04 a |
| Sobrevivencia (%) | 99,29 ± 1,43 a | 98,21 ± 1,37 a |

Valores representan promedios ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en las filas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$).

Expresión génica inmunitaria

Posterior a los 30 días de desafío dietario, la expresión génica inmunitaria mostró que los genes candidatos a la respuesta antibacteriana se expresaron en todos los tejidos evaluados, presentando errores estándar amplios, particularmente en los aislados celulares.

En primer lugar, los niveles de NK-Lysina en eritrocitos (Figura 3.A) fueron significativamente más altos en los peces suplementados con *Schizochytrium.Sp* y *Nannochloropsis gaditana* ($P \leq 0,05$). De igual manera, se encontró un incremento significativo en la expresión del complemento C3 y Hepsidina en aislados eritrocitarios de peces tratados (Figura 3B y 3C). Respecto a la Lisozima, no se visualizaron cambios en la expresión génica de los peces suplementados en ninguno de los tres tejidos inmunocompetentes (Figura 3.D).

En ninguno de los genes candidatos a la respuesta antibacteriana de leucocitos se encontró un cambio significativo frente a la inclusión de *Schizochytrium.sp* y *Nannochloropsis gaditana*.

Respecto al tejido mucus, en el presente estudio se visualizó un aumento significativo de la expresión de Complemento C3 en los peces tratados con el suplemento microalgal (Figura 3.B), de forma contraria NK-Lysina, Hepsidina y Lisozima no sufrieron variaciones estadísticamente significativas respecto a los peces alimentados con la dieta control (Figura 3).

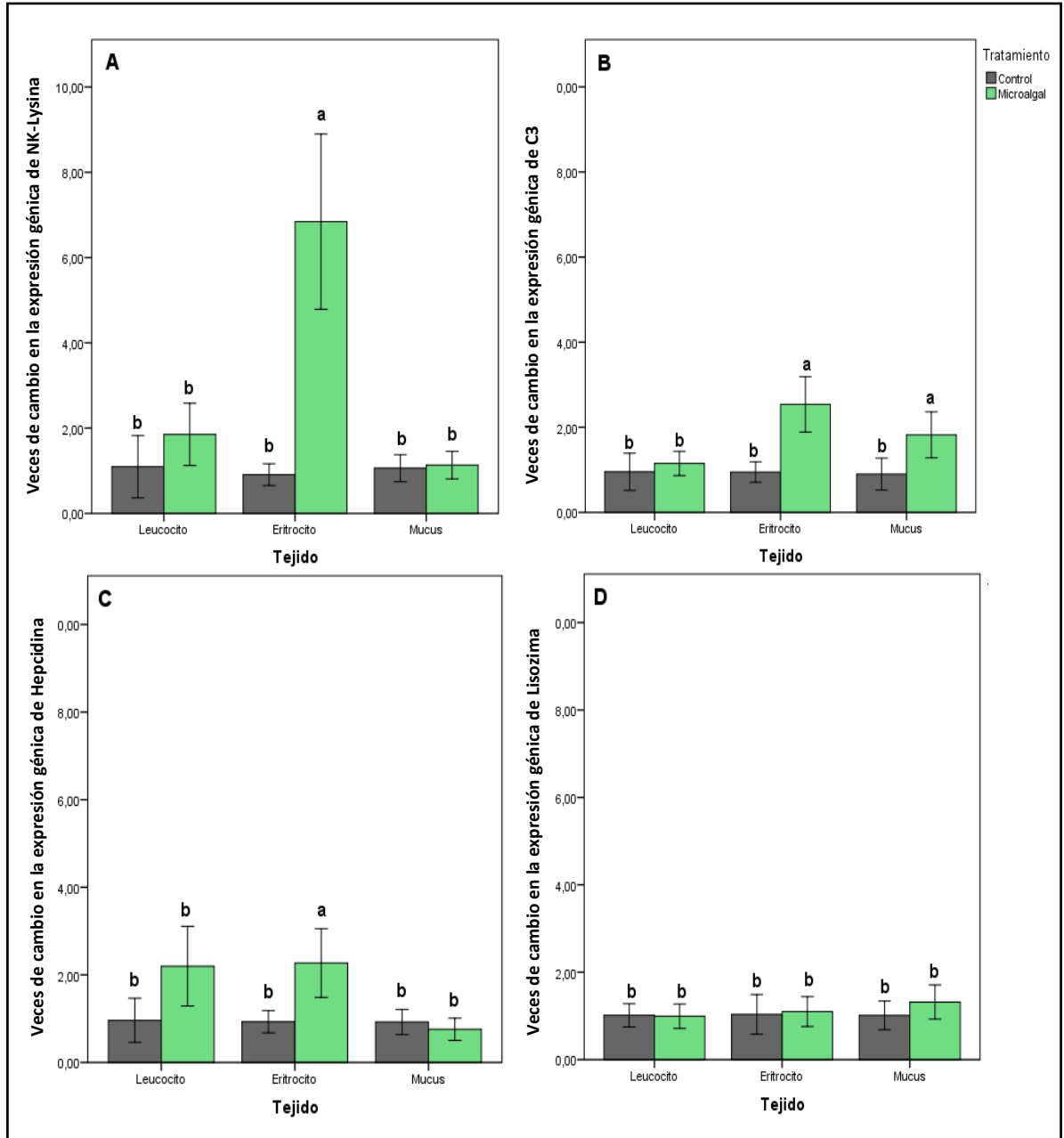


Figura 3: Efecto de la inclusión dietaria de *Schizochytrium.Sp* y *Nannochloropsis gaditana* sobre los niveles de expresión diferencial de Lisozima, Heparidina, Complemento C3, y NK-Lysina en tejido leucocitario, eritrocitario y mucus (n= 20). Las barras representan el promedio de cada tratamiento \pm error estándar. Letras distintas en las barras asociadas a un tejido específico representan diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

Recuento diferencial y absoluto de células leucocitarias

En primer lugar, se visualizó una disminución significativa (46%) en la cantidad de leucocitos por cada 2000 células, en los peces alimentados con la dieta control (Pre smolt) respecto a los alevines To (Parr) al inicio del experimento. Respecto al recuento diferencial, al finalizar el periodo experimental, este no se vio alterado, es decir, la proporción de los tipos leucocitarios se mantuvo constante en los peces pre smolt alimentados con a la dieta control respecto a los alevines en estado parr (Cuadro 6).

Por otro lado, la suplementación dietaria microalgal durante 30 días, no genero diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de leucocitos por cada 2000 células respecto a los peces tratados con la dieta control. No obstante, la cantidad porcentual de Monocitos precursores de macrófagos si se vio incrementada de forma significativa ($P \leq 0,05$). Durante el recuento celular no se observaron basófilos ni tampoco eosinófilos en los individuos muestreados, tanto para la evaluación de los estados de esmoltificación, como para el desafío dietario microalgal.

Cuadro 5: Recuento celular diferencial y absoluto de Salmón del Atlántico durante la esmoltificación y durante el desafío dietario microalgal con *Schizochytrium.sp* y *Nannochloropsis gaditana*.

| Recuento diferencial | Esmoltificación | | Desafío dietario | |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | To (Parr) | Control (Pre Smolt) | Control | Microalgal |
| Linfocito (%) | 86,56±4,99 a | 84,60±3,71 a | 84,60±3,71 A | 84,20±3,74 A |
| Monocito (%) | 1,87±1,50 a | 2,45±1,87 a | 2,45±1,87 B | 2,95±1,10 A |
| Neutrófilo (%) | 11,56±4,88 a | 13,55±3,34 a | 13,55±3,34 A | 12,85±4,14 A |
| Recuento absoluto | To (Parr) | Control (Pre Smolt) | Control | Microalgal |
| Leucocitos /2000celulas | 15,87 ± 6,60 a | 8,60 ± 3,25 b | 8,60± 3,25 A | 9,30±3,58 A |
| Trombocitos/ 2000 células | 46,75 ± 7,10 a | 51,95 ± 8,34 a | 51,95 ± 8,34 A | 43,75 ± 9,27 A |

Valores representan promedios ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en las filas indican diferencias estadísticamente significativas en el análisis de esmoltificación entre peces en el tiempo T0 y los peces alimentados con la dieta control al final del experimento ($P \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas en las filas indican diferencias estadísticamente significativas en el desafío dietario entre los peces alimentados con la dieta control y los peces suplementados con microalgas ($P \leq 0,05$).

Red neuronal con percepción en multicapa para la clasificación de madurez eritrocitaria

El número de capas ocultas de las redes neuronales fue igual a 1 y su función de activación de capa oculta fue tangente hiperbólica. La variable dependiente, fue la etapa de desarrollo mental con tres unidades en la capa de salida identificadas como el nivel de madurez asociada a una función softmax (Figura 7).

Las redes neuronales evaluadas con 8, 6 y 4 variables predictoras obtuvieron en la prueba (30 % de los datos) un 0% de pronósticos incorrectos, no obstante, a nivel de entrenamiento de la red neuronal la predicción realizada con 8 variables morfométricas presento 2 casos de pronóstico incorrecto en células inmaduras, a diferencia del modelo con 6 y 4 variables que solo presento 1 caso, lo que hace mantener un error de entropía cruzada de 4,55 en el entrenamiento.

Respecto al modelo conformado con las variables: Largo celular (LC), Factor de Forma Celular (SFC), Largo Nuclear (LN) y Factor de Forma Nuclear (SFN), obtuvo 1 caso de clasificación incorrecta en el entrenamiento y ningún error en la fase de prueba, presentando así el menor valor de error de entropía cruzada del 2,48 para el entrenamiento y de 0,21 para la prueba.

La red neuronal conformada con 2 variables, referidos tanto al Factor de Forma Nuclear como Celular, presento los valores más bajos de ajuste en la prueba con un porcentaje de pronósticos incorrectos de 6,5% asociado a un error de entropía cruzada de 7,2.

Cuadro 6: Clasificación eritrocitaria mediante Red Neuronal con percepción en multicapa con 8 variables en la capa de entrada.

| Muestra | Observado | Clasificación | | | Porcentaje correcto |
|---------------|---------------|---------------|------------------|--------------|---------------------|
| | | Pronosticado | | | |
| | | Madura | En maduración | Inmadur a | |
| 8V | | | | | |
| Entrenamiento | Madura | 30 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 33 | 0 | 100,0% |
| | Inmadura | 0 | 2 | 25 | 92,6% |
| | % Global | 33,3% | 38,9% | 27,8% | 97,8% |
| Prueba | Madura | 10 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 7 | 0 | 100,0% |
| | Inmadura | 0 | 0 | 13 | 100,0% |
| | % Global | 33,3% | 23,3% | 43,3% | 100,0% |

Continúa

Cuadro 7: Continuación cuadro 6.

| | | 6V | | | |
|---------------|---------------|-------|-------|-------|--------|
| Entrenamiento | Madura | 28 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 31 | 0 | 100,0% |
| | Inmadura | 0 | 1 | 25 | 96,2% |
| | % Global | 32,9% | 37,6% | 29,4% | 98,8% |
| Prueba | Madura | 12 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 9 | 0 | 100,0% |
| | Inmadura | 0 | 0 | 14 | 100,0% |
| | % Global | 34,3% | 25,7% | 40,0% | 100,0% |
| | | 4V | | | |
| Entrenamiento | Madura | 29 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 24 | 0 | 100,0% |
| | Inmadura | 0 | 1 | 22 | 95,7% |
| | % Global | 38,2% | 32,9% | 28,9% | 98,7% |
| Prueba | Madura | 11 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 16 | 0 | 100,0% |
| | Inmadura | 0 | 0 | 17 | 100,0% |
| | % Global | 25,0% | 36,4% | 38,6% | 100,0% |
| | | 2V | | | |
| Entrenamiento | Madura | 27 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 30 | 0 | 100,0% |
| | Inmadura | 0 | 0 | 32 | 100,0% |
| | % Global | 30,3% | 33,7% | 36,0% | 100,0% |
| Prueba | Madura | 13 | 0 | 0 | 100,0% |
| | En maduración | 0 | 9 | 1 | 90,0% |
| | Inmadura | 0 | 1 | 7 | 87,5% |
| | % Global | 41,9% | 32,3% | 25,8% | 93,5% |

8V: Area C, Perimetro C, Largo C, Factor de Forma C, Area N, Perimetro N, Largo N, Factor de Forma N.

6V: Largo C, Factor de Forma C, Area N, Perimetro N, Largo N, Factor de Forma N.

4V: Largo C, Factor de Forma C, Largo N, Factor de Forma N

2V: Factor de Forma C, Factor de Forma N

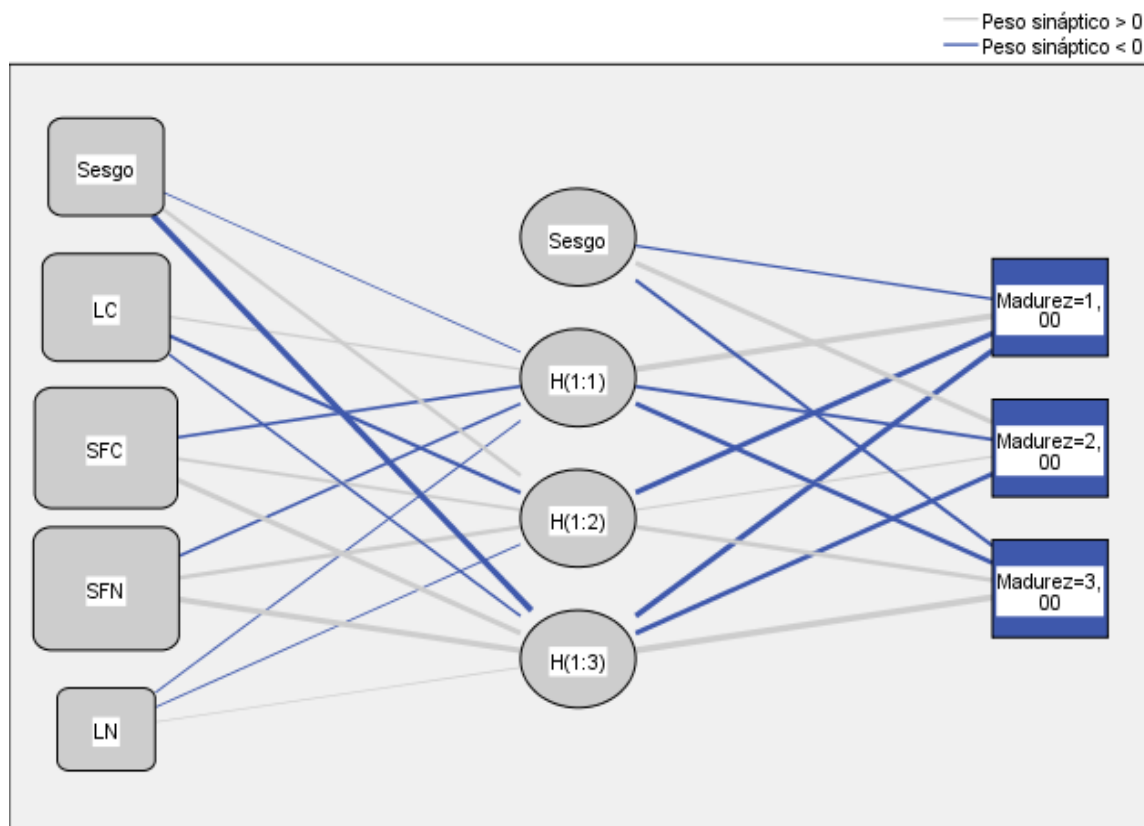


Figura 4: Modelo de red neuronal con percepción en multicapa (MLP) definido para la clasificación celular, que presenta una capa de entrada con 4 variables morfológicas, una capa oculta con tres unidades, al igual que una capa de salida con los niveles de madurez eritrocitario. Auditoría propia.

Recuento diferencial de eritrocitos según estado madurativo

Posterior a la utilización de la red neuronal con percepción en multicapa, se obtuvieron los valores de eritrocitos maduros, en maduración e inmaduros por cada mil células rojas analizadas (Cuadro 7). Los valores de madurez durante la esmoltificación no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tres niveles. No obstante, la inclusión dietaria de *Schizochytrium.sp* y *Nannochloropsis gaditana* a un 10% por 30 días demuestran un aumento significativo de los glóbulos rojos inmaduros. De forma contraria, la distribución madurativa por cada 1000 eritrocitos se mantiene sin diferencias significativas en los tipos celulares maduros y en maduración en respuesta a la inclusión microalgal.

Cuadro 8: Análisis de la madurez eritrocitaria durante la esmoltificación y durante el desafío dietario microalgal con *Schizochytrium.sp* y *Nannochloropsis gaditana*

| | Esmoltificación | | Desafío dietario | |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | To (Parr) | Control (Pre-Smolt) | Control | Microalgal |
| RBC Maduros / 1000 RBC | 903,0 ± 8,94 a | 919,5 ± 7,45 a | 919,5 ± 7,45 A | 901,77 ± 4,85 A |
| RBC En maduración /1000 RBC | 86,67 ± 7,62 a | 73,34 ± 6,73 a | 73,34 ± 6,73 A | 82,23 ± 4,47 A |
| RBC Inmaduros /1000 RBC | 9,22 ± 5,99 a | 7,17 ± 1,25 a | 7,17 ± 1,25 B | 16,92 ± 1,65 A |

Valores representan promedios ± desviación estándar. RBC: Glóbulos rojos. Letras minúsculas distintas en las filas indican diferencias estadísticamente significativas en el análisis de esmoltificación entre peces en el tiempo T0 y los peces alimentados con la dieta control al final del experimento ($P \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas en las filas indican diferencias estadísticamente significativas en el desafío dietario entre los peces alimentados con la dieta control y los peces suplementados con microalgas ($P \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se demostró que la inclusión dietaria de *Schizochytrium.sp* y *Nannochloropsis gaditana*, no genera efectos adversos en alevines de Salmón del Atlántico suplementados a un 10% durante 30 días. El consumo, como primer indicador de importancia a analizar en una dieta con inclusión de ingrediente vegetales, no mostro diferencias respecto al tratamiento control, del mismo modo, se comportó la conversión alimenticia (FCR) y la tasa de crecimiento (SGR). Resultados similares, fueron obtenidos en *Salmo salar* alimentado con *P. tricornutum* a un 3% y 6 % de inclusión (Sorensen *et al.*, 2016), *Nanofrustulum* y *Teraselmis* (5 y 10%) (Kiron *et al.*, 2012), y *Nannochloropsis oceánica* (10%) (Serensen *et al.*, 2017; Gong *et al.*, 2020). No obstante, se ha reportado como las microalgas pueden mejorar el FCR y aumentar la ganancia de peso (GP) (Alishahi *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2021), además, de una mejora en las tasas de crecimiento (Zhao *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2021) y el consumo (Dallaire *et al.*, 2007). Esta capacidad, está asociado a la gran cantidad de nutrientes como las vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales y ácidos grasos que están involucrados en procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento (Nakagawa y Montgomery, 2007; Dineshbabu *et al.*, 2019).

El uso de microalgas marinas como ingredientes para salmónidos, se ha descrito en general con inclusiones no superior al 10%, de tal manera de evitar efectos negativos sobre el crecimiento, la deposición de lípidos corporales y el contenido energético del pez (Kousoulaki *et al.*, 2015). Se han reportado factores que limitan la inclusión de algas marinas en la dieta de peces, entre ellos los polisacáridos complejos de las paredes celulares, la concentración de metales pesados, presencia de lectinas e inhibidores de amilasa y tripsina

(García *et al.*, 2001; Madeira *et al.*, 2017). No obstante, se han documentado inclusiones de hasta el 20% con *Nannochloropsis oceanica* y *Phaeodactylum tricornutum* con respuesta positiva en Salmón del Atlántico (Serensen *et al.*, 2016; Serensen *et al.*, 2017) y cerca de un 12,5 % con *Scenedesmus sp.* y *Chlamydomonas sp.* en Trucha arcoíris (Dallaire *et al.*, 2007). La evidencia empírica, muestra una gran variabilidad en la respuesta a la inclusión de algas marinas, muy dependiente de cada especie y sus respuestas fisiológicas específicas, los niveles de inclusión y remplazo, la interacción con otros nutrientes, y el tiempo de desafío dietario (Thepot *et al.*, 2021). En esta línea, desde un enfoque del organismo del pez, factores de la fisiología digestiva y el metabolismo nutricional propios de cada especie son los que responden frente a un tipo de microalga específica (Rust, 2003; Zhang *et al.*, 2020). Esto, sumado a la naturaleza y perfil nutricional propio de la microalga en cuestión, mirando con particularidad elementos como: la digestibilidad, proporción de polisacáridos no almidonados, contenido proteico y lipídico, perfil lipídico y aminoacídico, entre otros, determinan la respuesta a nivel nutricional, fisiológico e inmunológicos (Hemaiswarya *et al.*, 2011; Nagappan *et al.*, 2021).

Durante la transformación parr-smolt, se han caracterizado los cambios inmunológicos asociados a este proceso fisiológico, los cuales van en la línea de los resultados obtenidos en el presente estudio. Se reportó, una disminución significativa de leucocitos totales en alevines de *Salmo salar* pre esmoltificados. No obstante, la metodología utilizada en esta investigación para el recuento celular es un punto de discusión, ya que el análisis se realiza en base a la identificación continua de 2000 células, a diferencia de los recuentos manuales en Cámara de Neubauer. La dificultad del recuento manual recae en la necesidad de realizar el análisis dentro de las primeras horas desde la extracción sanguínea (Hubec y Smith, 2010), por consiguiente, bajo el contexto experimental de una zona extrema del sur de Chile, es una restricción que obligó al proyecto investigativo a utilizar la metodología descrita por Correa *et al.* (2017). Esta metodología, ha sido descrita como un buen biomarcador para determinar el cambio continuo de leucocitos en sangre, mediante el uso y recuento diferencial en frotis sanguíneo. Los resultados obtenidos en este análisis fueron similares a los descritos por Muona *et al.* (1992) evidenciando una disminución del total de glóbulos blancos y linfocitos circulantes en Salmón del Atlántico y Trucha Arcoíris. Así mismo, Maule *et al.* (1987), McLeay (1975) y Pettersen *et al.* (2003) demuestran la reducción de células inmunocompetentes, siendo una de las posibles respuestas el efecto del cortisol inducido en la esmoltificación, el cual es causante de la lisis celular y por consiguiente de la reducción de leucocitos en sangre.

Respecto al análisis diferencial leucocitario, se observó un aumento significativo del porcentaje de monocitos totales. Esto, posiblemente demuestra un incremento en la capacidad de destrucción de patógenos de los peces suplementados con *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp.* (Grayfer *et al.*, 2018). Hassaan *et al.* (2021), encontró de la misma manera un incremento porcentual de monocitos en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementada con extractos de B-caroteno y Phycocianina provenientes de *spirulina platensis*, al igual que Cerezuela *et al.* (2012) demostró un aumento de la capacidad fagocítica mediante citometría de flujo en *Sparus aurata* alimentada con *Phaeodactylum*

tricornutum y *tetraselmis chuii*. Otras investigaciones, obtienen resultados similares ya sea mediante recuento en frotis sanguíneo o mediante citometría de flujo, asociando tal respuesta a la riqueza mayoritariamente de pigmentos y polisacáridos que estimulan el sistema inmunológico inespecífico (Salinas *et al.*, 2005; Aly *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Gen *et al.*, 2011), y en particular el rol que juega los pigmentos carotenoides, los cuales está involucrado directamente sobre la proliferación y estimulación de la fagocitosis (Chew y Soon, 2004).

La inmunosupresión sistémica que se presenta en la esmoltificación ha demostrado una serie de genes inmunorelevantes regulados a la baja (Johansson *et al.*, 2016), entregando argumentos necesarios para la búsqueda de inmunopotenciadores. Bajo ese escenario, la dieta probada en el presente estudio incremento significativamente la expresión de NK-Lysina, Hecpidina y el Complemento C3 en eritrocitos de Salmón del Atlántico. Estos resultados apuntan hacia la capacidad de *Nannochloropsis gaditana* en conjunto con *Schizochytrium.sp* de incrementar los componentes humorales de la respuesta antibacteriana.

NK-Lysina, es un péptido antimicrobiano que ha sido caracterizado con expresión génica constitutiva en la gran mayoría de los tejidos de peces, y está involucrado en la respuesta inmune temprana frente a las infecciones bacterianas (Cai *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018). NK-Lysina, no tan solo actúa perturbando las membranas celulares de bacterias, si no también ejerce actividad antimicrobiana intracelular, interactuando con ácidos nucleicos y otros factores dianas provocando la muerte bacteriana (Brogden, 2005; Hale y Hancock, 2007; Desriac *et al.*, 2013). Este AMPs, fue descrito por primera vez en tejido mucus de Salmón del Atlántico por Valero *et al.* (2019), y siendo el presente estudio el primero en evaluar su expresión en eritrocitos de *Salmo salar* suplementados con microalgas marinas. Los hallazgos reportados por esta investigación muestran una regulación al alza de NK-Lysina posiblemente asociado a la riqueza de compuestos bioactivos de las microalgas como ácidos grasos, carotenoides y compuestos fenólicos (Maadane *et al.*, 2017). Particularmente, la riqueza de *Nannochloropsis gaditana* de ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido oleico y ácido eicopentanoico, se correlaciona con la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano (Surendhiran *et al.*, 2014). Además, los ácidos grasos omega 3 presentes en las microalgas se incorporan a los fosfolípidos de las membranas celulares en desmedro de los ácidos grasos omega 6, para posteriormente ser metabolizados modulando funciones celulares entre ellas la proliferación celular, fagocitosis, producción de citocinas y quimiocinas, y la polarización de macrófagos activados (Saray *et al.*, 2019) que posiblemente guardan relación con una mayor síntesis de péptidos antimicrobianos. No obstante, falta evidencia para responder a como estos compuestos bioactivos actúan en las células rojas aumentando la expresión de genes inmunocompetentes y en particular de AMPs.

Otro péptido poco estudiado, en cuanto al efecto de las algas marinas en peces teleósteos es la Hecpidina (Skov *et al.*, 2012). En el presente estudio, se demostró un incremento significativo de este AMP en glóbulos rojos frente a la inclusión (10%) de *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp*. De igual manera, se ha reportado una regulación al alza de la Hecpidina en el bazo de Trucha Arcoíris frente a la suplementación dietaria de *Tribonema ultriculosum* (50 y 100 g/Kg) (Chen *et al.*, 2021), además, de un incremento en el riñón, bazo,

e hígado mediante el desafío dietario en *Lobos roita* con FRSE (Extracto rico en fucoidan de *Sargassum wightii*) a un 2% de inclusión (Gora *et al.*, 2018). No obstante, falta evidencia que revele los mecanismos de regulación de la Hepcidina en función a la inclusión de ingredientes funcionales. Hasta la fecha, existen reportes de la sensibilidad al cambio frente a desafíos con lipopolisacáridos y patógenos bacterianos (Hirono *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Ahmed y Manal, 2021). Se describe que la regulación de la expresión de Hepcidina está dada principalmente por la disponibilidad de hierro, las tasas de eritropoyesis, y la presencia de infección e inflamación (Darshan *et al.*, 2009). Posiblemente, el incremento de Hepcidina este asociado al aumento de hierro en la dieta por el aporte realizada de las microalgas marinas y la necesidad de regular la homeostasis del hierro (Beckman *et al.*, 2010). Otra posible explicación del incremento de AMPs y el complemento C3 en eritrocitos, está relacionada, con los contenidos de EPA y DHA que caracterizan ambas microalgas, e influyen en la composición lipídica celular tanto de la línea blanco como roja. Tal modificación, tiene efectos a nivel de activación de factores de transcripción modificando la expresión génica (Calder, 2007). En esta misma línea, los carotenoides influyen en la fluidez de las membranas lipídicas celulares y la brecha de unión comunicacional entre ellas (Chew y Park, 2004). Si bien, se ha documentado el efecto de los ácidos grasos esenciales en células de la línea blanca, faltan estudios para dilucidar el efecto que genera la alteración en la composición y fluidez de las membranas lipídicas sobre la respuesta transcripcional en eritrocitos nucleados de vertebrados inferiores.

Respecto al aumento en la expresión de la proteína central de la actividad del complemento C3, se han reportado resultados similares frente a la inclusión dietaria de algas marinas en peces teleósteos. Chen *et al.* (2010) visualizó un incremento de C3 en Carpa Gibel suplementado con *Oedocladium sp.* y *Tribonema sp.*, de igual manera se incrementó C3 en Trucha Arcoíris con *Dunaliella salina* (Emadi *et al.*, 2010). Es importante mencionar, que el comportamiento de la cascada del complemento no está bien estudiado para peces teleósteos (Claire, 2002; Boshra, 2006), la gran mayoría de los reportes evalúa la actividad del complemento hemolítico a nivel enzimático, no pudiendo dilucidar cuales son las proteínas, rutas y mecanismos de acción que responden frente a la inmunonutrición con algas marinas. Uno de los posibles mecanismos de la síntesis de componentes del complemento, guarda relación con la riqueza de B-caroteno de algunas microalgas, estando involucrado en la activación de receptores de retinoides. Además, los elementos de respuesta del ácido retinoico están presentes en las regiones promotoras del gen del factor del complemento H, y el ácido retinoico aumenta los niveles de ARNm del gen H. Esto indica, que la activación de los receptores de retinoides y la unión de ácido retinoico en la región promotora del gen diana es un posible mecanismo a través del cual los carotenoides o sus metabolitos pueden afectar la síntesis de los componentes del complemento (Emadi *et al.*, 2010).

La dieta suplementada con *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp* no mostró diferencias significativas respecto a la expresión de lisozima en ninguno de los tres tejidos evaluados (Figura 3.D). Resultados similares fueron obtenidos por Carballo *et al.* (2019) mediante el uso de *Phaeodactylum tricornutum* en *Solea senegalensis*. Así mismo, la lisozima en tejido mucus evaluada posterior a un 9% de inclusión con *Sargassum ilicifolium*

en Lubina no tubo diferencias estadísticamente significativas (Zeynali *et al.*, 2020). Existe una enorme evidencia de que la lisozima es el gen inmunorelevante mayormente evaluado en estudios de inclusión dietaría de algas marinas, y además es regulado al alza en múltiples especies y desafíos dietarios: *Solea senegalensis* con *Ulva ohnoi* (5%) (Fumanal *et al.*, 2020); Trucha arcoíris con *Gracilariopsis persica* (5%), *Sargassum boveanum* (10%) e *Hypnea flagelliformis* (10%) (Vazirzadeh *et al.*, 2020); Salmón del Atlántico con crio concentrado de *Pyropia columbia* y *Gracilaria chilensis* (1%) (Lozano *et al.*, 2018). Esto sugiere, que la diferencia encontrada en la expresión o actividad de la lisozima de distintos estudios podría guardar relación con la condición experimental establecida, las especies de peces y su estatus de salud, además de las algas marinas utilizados y el tejido evaluado (Thepot *et al.*, 2020).

El tejido mucus, es descrito como la primera línea de defensa y fuente potencial de componentes humorales antimicrobianos claves en la respuesta inmune inespecífica, siendo una fuente de lisozima, complemento, lectinas, AMPs y enzimas proteolíticas (Reverter *et al.*, 2018; Tiralongo *et al.*, 2020). El incremento del Complemento C3 en peces suplementados con *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp.*, avanza en la línea de como los compuestos fitoestimulantes de las algas marinas pueden activar el sistema inmunitario de la mucosa (Hoseinifar *et al.*, 2016). Entre ellos, se ha reportado un incremento en la actividad de lisozima en Dorada suplementada con *Ulva Ohnoi* (Martinez *et al.*, 2021), Esturión de Persia con *Gracilaria persica* (Adel *et al.*, 2021), Lubina con *Sargassum ilicifolium* (Zeynali *et al.*, 2020), Trucha arcoíris con *Dunaliella salina* (Alishahi *et al.*, 2015) y un incremento de la vía alternativa del complemento (ACH50) de Dorada| suplementada con *Phaeodactylum tricornutum* (Reis *et al.*, 2021). Se cree que los polisacáridos de la pared celular de microalgas tienen la capacidad de inducir activación de macrófagos en tejidos mucus (Cunha y Grenha, 2016), que posiblemente tenga relación con el incremento de la proteína central de la cascada del complemento y su estimulación temprana (Lubbers *et al.*, 2017). En esta línea, se ha demostrado en mamíferos como la biosíntesis de C3 se incrementa fuertemente con la estimulación de macrófagos (Mogilenko *et al.*, 2012) asociado a la capacidad de atraer por quimiotaxis células fagocíticas y posteriormente actuar por medio de la opsonización de la superficie de patógenos mediante el etiquetado con C3b (Bohlson *et al.*, 2014).

En este estudio, se determinó la importancia de los eritrocitos en secretar componentes humorales relacionados con la respuesta antibacteriana. Si bien, existe bastante evidencia del rol que cumplen los glóbulos rojos en complementar la respuesta inmune (Shen *et al.*, 2018; Puente-Marin *et al.*, 2019), no se ha estudiado la sensibilidad en la expresión de genes inmunorelevantes frente a la inclusión dietaría microalgal. De esta manera, se demostró que el tejido eritrocitario es capaz de incrementar y sobre expresar péptidos antimicrobianos como Nk-Lisina y Hepcidina, además de la proteína C3 de la actividad del complemento. Además, se determinó por primera vez como por medio de la inmunonutrición, utilizando microalgas marinas, se puede modificar la distribución de la madurez celular eritrocitaria. En esa misma línea, el modelo de clasificación eritrocitario determinó que las variables: Largo celular (LC), Factor de Forma Celular (SFC), Largo Nuclear (LN) y Factor de Forma Nuclear (SFN) fueron las que permitieron maximizar el porcentaje correcto de predicción, presentar

el menor error de entropía cruzada tanto para el entrenamiento como para la prueba, y además cumplir con el principio de parsimonia asociado a un modelo simple y no sobre parametrizado. En este contexto, se generó un modelo de clasificación celular para Salmón del Atlántico al igual que el descrito por Spasic *et al.* (2020) para *Condrostoma nasus* y *vimba vimba*, resultando en una herramienta válida y capaz de predecir el nivel de madurez eritrocitaria.

El aumento significativo de células inmaduras en alevines suplementados con *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp* a un 10%, develan de manera indirecta una mayor tasa de eritropoyesis (Beckman, 2010), lo cual posiblemente responda a la disponibilidad de hierro y vitaminas del tipo B presentes en la dieta suplementada, las cuales son necesarias para las células precursoras eritroides (Singh, 2018). Es bastante lógica la correlación con una mayor expresión de C3, Nk-lisina y Hepsidina, en los peces suplementados, lo cual es consistente con la mayor cantidad de material genético presente en eritrocitos jóvenes (Lund *et al.*, 2000; Koldkjaer *et al.*, 2004) y, por consiguiente, con la mayor capacidad de secretar componentes humorales inespecíficos relacionados con la respuesta antibacteriana (Gotting y Nikinmaa, 2017).

Los análisis y resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la necesidad de seguir estudiando los eritrocitos como un componente celular más de la respuesta inmune, y como la variación en la madurez celular eritrocitaria incide en la secreción de componentes humorales. Por otro lado, se requieren mayores avances en buscar inmunoestimulantes de origen natural, en el proceso de esmoltificación y como mediante estos se pueden generar smolt con un mejor estatus inmunitario, que respondan de forma más resiliente a un entorno marino.

CONCLUSIONES

- 1- La inclusión dietaria de *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp* a un 10% durante 30 días no tiene efectos adversos a nivel de crecimiento y parámetros productivos en la fase de pre-esmoltificación de Salmón del Atlántico.
- 2- *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp* estimulan mayores niveles de transcripción de C3 en tejido mucus y eritrocitos, además de aumentar la secreción de péptidos antimicrobianos, Hepcidina y NK-Lysina, en glóbulos rojos de Salmón del Atlántico, generando un estatus inmunitario posiblemente estimulado.
- 3- El suplemento dietario microalgal es capaz de incrementar monocitos/macrófagos en sangre periférica, sugiriendo una mayor proliferación de células fagocíticas y capacidad de destrucción de patógenos.
- 4- De acuerdo con el análisis de maduración eritrocitario, la suplementación dietaria con *Nannochloropsis gaditana* y *Schizochytrium.sp* modifica las clases eritrocitarias en Salmón del Atlántico, incrementando la cantidad de glóbulos rojos inmaduros en sangre, lo que posiblemente se correlaciona con una mayor síntesis humoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., A.H. Licht man, and S. Pillai. 2012. Cellular and Molecular Immunology, Seventh edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA
- Adel, M., A. Omid, M. Dawood, B. Karimí, S. Hosseini, P. Seyed. 2020. Dietary *Gracilaria persica* mediated the growth performance, fillet colouration, and immune response of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Aquaculture. 530: 104-130.
- Ahmed, M., and I. Manal. 2021. El-Barbary Comparative hepcidin gene expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) tissues during the therapy of bacterial infections. The Egyptian Journal of Aquatic Research 47(4): 409-415.
- Alishahi, M., M. Karamifar, M. Mesbah. 2015. Effects of astaxanthin and *Dunaliella salina* on skin carotenoids, growth performance and immune response of *Astronotus ocellatus*. Aquaculture International 24 (1):65-77.
- Alishahi, M., M. Karamifar, M. Mesbah, and M. Zarei. 2014. Hemato-immunological responses of *Heros severus* fed diets supplemented with different levels of *Dunaliella salina*., 40(1): 57-65.
- Aly, S., A. Abdel-Galil, G. Abdel-Aziz, M. Mohamed. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol 25:12-36.
- Amal, M., N. Merghoub, N. Mernissi, A. Tarik, S. Amzazi, I. Wahby, B. Youssef. 2017. Antimicrobial activity of marine microalgae isolated from Moroccan coastlines. Journal of microbiology, biotechnology, and food sciences 6: 1257-1260.
- Ashrafian, H. 2003. Hepcidin: the missing link between hemochromatosis and infections. Infect Immun 71: 693–700.
- Beckman, B. 2010. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference Erythropoiesis 7(2): 1–4.
- Bjornsson, B., S. Stefansson, and S. McCormick. 2011. Environmental endocrinology of salmon smoltification, Gen. Comp. Endocrinol 170: 290-298.
- Bohlon, S., S. O’Conner, H. Hulsebus, M. Ho, D. Fraser. 2014. Complement, C1q, and C1q Related Molecules Regulate Macrophage Polarization. Frontiers in Immunology 5: 402-418.
- Boshra, H., J. Li, and J.O. Sunyer. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish 20(2): 0-262.

- Brogden, K. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol* 3: 238–250.
- Cai, S.R., J. Wang, K.Y. Wang, D.F. Chen, X.W. Dong, T. Liu. 2016. Expression, purification, and antibacterial activity of NK-lysin mature peptides from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Appl. Sci.* 6 :240-255.
- Carballo, C., P. Pinto, A. Mateus, C. Berbel, C. Guerreiro, J. Martinez-Blanch, F. Codoñer, L. Mantecon, D. Power, and M. Manchado. (2019). Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology* 92: 31-39.
- Cerezuela, R., F. Guardiola, J. Meseguer, and M. Esteban. 2012. Enrichment of Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) diet with microalga: effects on the immune system. *Fish Physiology Biochemistry* 38(6): 1729-1739.
- Chen, W., Y. Wang, G. Han, X. Zhu, S. Xie, D. Han, Q. Hu. 2019. Two filamentous microalgae as feed ingredients improved flesh quality and enhanced antioxidant capacity and immunity of the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture Nutrition* 25(5): 1-11.
- Chen, W., L. Luo, D. Han., F. Long, G. Chi, and G. Hu. 2021. Effect of dietary supplementation with filamentous microalga *Tribonema ultriculosum* on growth performance, fillet quality and immunity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition* 27(4): 122-135.
- Chew, B. P., and Park, J. S. 2004. Carotenoid action on the immune response. *Journal of Nutrition* 134: 257-261.
- Christaki, E., P. Florou-Paneri, and E. Bonos. 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *Int J Food Sci Nutr* 62(8):9-21
- Claire, M.H., H. Holland, J.D. Lambris. 2002. The complement system in teleosts., 12(5), 0-420.
- Correa, S., D. Aparecida, D. Abessa, D. de Souza. 2016. Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. *Toxicological & Environmental Chemistry* 4:112-129.
- Cunha, L and A. Grenha. 2016. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Marine Drugs* 14(3), 42-83.
- Dallaire, V., P. Lessard, G. Vandenberg, and J. Noüe. 2007. Effect of algal incorporation on growth, survival, and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresour. Technol* 98: 1433-1439.
- Darshan, D., and GJ. Anderson. 2009. Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* 22(1):77–87.

- Desriac, F., C. Jégou., B. Brillet., P. Chevalier., Y. Fleury. 2013. Utilization of Fish Waste. P. 176-259, Chapter: Chapter 5. *In: Antimicrobial Peptides from Fish*. Publisher: CRC Press . Ed:12, Elsevier Saunders, Philadelphia, USA
- Emadi, H., P. Amaninejad, M. Emtiazjoo, and H. Hosseinzadeh. 2010. Effects of *dunaliella* microalgae (*Dunaliellasalina*) on different levels of complement C 3, C 4 and antioxidant capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Advances in Environmental Biology* 4: 456-463.
- Fumanal, F., E. Daniel, Z. Di Zeo, V. Anguís, C. Fernández-Díaz, J. Alarcón, R. Piñera, N. Albaladejo-Riad, A. Esteban, A. Miguel, M. Moríñigo, C. Balebona. 2020. Inclusion of dietary *Ulva ohnoi* 5% modulates *Solea senegalensis* immune response during *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. *Fish and shellfish immunology* 100: 186-197.
- Garcia, M., and M. Hayes. 2016. Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food. *Food Rev* 32: 15-45.
- Geng, X., X. Dong, B. Tan, G. Yang, S. Chi, H. Liu. 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity, and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunol* 31(3): 400-406.
- Gnanasekaran, D., G. Goswami, R. Kumar, A. Sinha, D. Ankan. 2019. Microalgae–nutritious, sustainable aqua- and animal feed source. *Journal of Functional Foods* 62: 103-128.
- Gong, Y., S. Sorensen, D. Dahle, N. Nadanasabesan, J. Días, L. Valente, M. Sorensen, and V. Kiron. 2020. Approaches to improve utilization of *Nannochloropsis oceanica* in plant-based feeds for Atlantic salmon. *Aquaculture* 522 (30): 735-756.
- Gora, A, N. Sahu, S. Sahoo. 2018. Effect of dietary *Sargassum wightii* and its fucoidan-rich extract on growth, immunity, disease resistance and antimicrobial peptide gene expression in *Labeo rohita*. *Int Aquat Res* 10 :115–131.
- Götting, M., and M. Nikinmaa, 2017. Transcriptomic Analysis of Young and Old Erythrocytes of Fish. *Frontiers in Physiology* 8: 1046-1057.
- Grayfer, L., B. Kerimoglu, A. Yaparla, J. Hodgkinson, W. Jordan, J. Xie, M. Belosevic. 2018. Mechanisms of Fish Macrophage Antimicrobial Immunity. *Frontiers in Immunology* 9: 44-55.
- Guedes, A., and F. Malcata. 2012. Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. *Aquaculture* 3(2):320-333.
- Hale, J., and R. Hancock. 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria, *Expert Rev. AntiInfect. Ther* 5: 951–959.
- Hassaan, M., E. Mohammady, M. Soady, S. Sabae, A. Mahmoud, E. El-Haroun. 2020. Comparative study on the effect of dietary β -carotene and phycocyanin extracted from

- Spirulina platensis* on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 108: 63-72.
- Hemaiswarya, S., R. Raja, R. Kumar, G. Venkatesan, C. Anbazhagan. 2011. Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(8): 1737-1746.
- Hirono, I. J., Hwang, Y. Ono, T. Kurobe, T. Ohira, R. Nozaki, T. Aoki. 2005. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *FEBS J* 272:5257–5264.
- Hjeltnes, H., C. Walde, and B. Jensen. 2015. Fish Health Report, Veterinarinstituttet.
- Hoseinifar, S.H., F. Zoheiri, C. Lazado. 2016. Dietary phytoimmunostimulant Persian hogweed (*Heracleum persicum*) has more remarkable impacts on skin mucus than on serum in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol* 59: 77–82.
- Hrubec, T, and S. Smith. 2010. Hematology of Fishes. p. 994-1003. In: Weiss, D.; Wardrop, immune-relevant gene encoding the Mx antiviral protein in salmon (*Salmo salar*) white blood cells. *Journal of Applied Phycology* 31: 1415-1424. K. Schalm's Veterinary Hematology. 6ta ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA
- Huang, Y., Q. Zheng, J. Niu, J. Tang, B. Wang, E. Abarike, J. Jian. 2018. NK-lysin from *Oreochromis niloticus* improves antimicrobial defense against bacterial pathogens. *Fish & Shellfish Immunology* 72: 259–265.
- Iversen, A., F. Asche., O. Hermansen, R. Nystøyl. 2020. Production cost and competitiveness in major salmon farming countries 2003-2018. *Aquaculture* 522: 735-789.
- Jan Härdig, 1978. Maturation of circulating red blood cells in young baltic salmon (*Salmo salar* L.) 102(3), 290–300.
- Johansson, L., G. Timmerhaus, A. Sergey, S. Jorgensen, and K. Aleksei. 2016. Smoltification and seawater transfer of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is associated with systemic repression of the immune transcriptome. *Fish & Shellfish Immunology* 58 :33-41.
- Kiron, V., M. Sorensen, M. Huntley, G. Vasanth., Y. Gon; D. Dahle, A. Palihawadana. 2016. Defatted Biomass of the Microalga, *Desmodesmus* sp., Can Replace Fishmeal in the Feeds for Atlantic salmon. *Frontiers in Marine Science* 3(67): 22-35.
- Kiron, V., W. Phromkunthong, M. Huntley, I. Archibald, G. Scheemaker. 2012. Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition* 18(5): 521-531.
- Koldkjaer, P., T. Pottinger, S. Perry, A. Cossins. 2004. Seasonality of the red blood cell stress response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol* 207: 357–367.

- Kousoulaki, K., T. Ostbye, A. Krasnov, J. Torgersen, T. Morkore, and J. Sweetman. 2015. Metabolism, health and fillet nutritional quality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing n-3 rich microalgae. *Journal of nutritional science* 4: 24-57.
- Kumar, R., S. Mukherjee, R. Ranjan, and S. Nayak. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol* 24:168-72.
- Lauth, X., J. Babon, J. Stannard, S. Singh, V. Nizet, and J. Carlberg. 2005. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *J Biol Chem* 280: 9272–82.
- Liao, Z., Q. Wan, H. Su, C. Wu, and J. Su. 2017. Pattern recognition receptors in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: I. Organization and expression analysis of TLRs and RLRs. *Developmental & Comparative Immunology* 76: 93-107.
- Liepinsh, E., M. Andersson, J. M. Ruyschaert, and G. Otting. 1997. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat. Struct. Biol* 4:793–795.
- Livak, K., and T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods* 24(4):402-408.
- Lozano, I., J. Wacyk, C. Perez, J. Carrasco, and M. Martin. 2018. Diets enriched in red seaweed (*Pyropia columbina* and *Gracilaria chilensis*) cryo concentrates modulate the immune-relevant gene encoding the Mx antiviral protein in salmon (*Salmo salar*) white blood cells. *Journal of Applied Phycology* 31: 1415-1424.
- Lubbers, R., M. van Essen, K. van Kooten, L. Trouw. 2017. Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical & Experimental Immunology* 188(2): 183–194.
- Lund, S., M. Phillips, C. Moyes, B. Tufts. 2000. The effects of cell aging on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J. Exp. Biol* 203, 2219–2228.
- Maadane, A., N. Merghoub, N. Mernissi, T. Ainane, S. Amzazi, I. Wahby, and Y. Bakri. 2017. Antimicrobial activity of marine microalgae isolated from moroccan coastlines. *Journal of microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 6: 1257-1260.
- Madeira, M., C. Cardoso, P. Lopez, D. Coelho, C. Alfonso, M. Bandarra, and J. Prates. 2017. Microalgae as feed ingredient for livestock production and meat Quality: a review. *Livest* 205: 111-121.
- Martínez, F., P. Martos-Sitcha, J. A. Reyna, J. M., and F. Moyano. 2021. Evaluation of the Inclusion of the Green Seaweed *Ulva ohnoi* as an Ingredient in Feeds for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animals* 11(6), 1684-1697.
- Masters, T. 1993. Practical neural networks recipes in C++. Academic Press. London Sydney.

- Maule, A., G. Schreck, and S. Kaattari. 1987. Changes in the immune system of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-to-smolt transformation and after implantation of cortisol. *J. Fish. A&at. S&* 44: 161-166.
- McCormick, S. 2009. Evolution of the hormonal control of animal performance: insights from the seaward migration of salmon, *Integr. Comp. Biol* 49: 408-422.
- McLeay, D. 1975. Variations in the pituitary-renal axis and the abundance of circulating blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during stream residence. *CY J.Zool* 53: 1882-1891.
- Miller, M., P. Nichols, C. Carter. 2007. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium sp* L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar L*) diets. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 148 (2): 382-92.
- Mogilenko, D., V. Kudriavtsev, A. Trulioff, V. Shavva, E. Dizhe, B. Missyul, A. Zhakhov, A. Ischenko. 2012. Modified low density lipoprotein stimulates complement C3 expression and secretion via liver X receptor and Toll-like receptor 4 activation in human macrophages. *The Journal of biological chemistry* 287:59-68.
- Morera, D., and S. MacKenzie. 2011. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? *Veterinary Research* 42(1): 89-97.
- Morera, F., M. Castro-Guarda, D. Nualart, G. Espinosa, J. Muñoz, and L. Vargas-Chacoff. 2021. The biological basis of smoltification in Atlantic salmon. *Austral journal of veterinary sciences* 53: 73-82.
- Munir, N., N. Sharif, S. Naz, and F. Manzoor. 2013. Algae: A potent antioxidant source. *Sky Journal of Microbiology Research* 1: 22-31.
- Muona, M., and A. Soivio. 1992. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and sea trout (*Salmo trutta L.*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 106(1), 75–87.
- Nagappan S, P. Das, M. AbdulQuadir, M. Thaher, S. Khan, C. Mahata, H. Al-Jabri, AK. Vatland, G. Kumar. 2021. Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *J Biotechnol* 20:1-20.
- Nakagawa, H. and M. Linn. 2007. Algae. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish.* 2: 133-167.
- Nikinmaa, M. 2019. Environmental regulation of the function of circulating erythrocytes via changes in age distribution in teleost fish: Possible mechanisms and significance. *Marine genomic* 49: 1230-1238.
- Pereiro, P., A. Romero, P. Díaz-Rosales, A. Estepa, A. Figueras, and B. Novoa. 2017. Nucleated Teleost Erythrocytes Play an Nk-Lysin- and Autophagy-Dependent Role in Antiviral Immunity. *Frontiers in Immunology* 8: 1458-1467.

- Pettersen, E., M. Ulvene, G. Melingen, and H. Wergeland. 2003. Peripheral blood and head kidney leucocyte populations during out-of-season (0+) parr-smolt transformation and seawater transfer of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Fish & Shellfish Immunology* 15(5):373–385.
- Philip, C. 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids 77(5-6): 0–335.
- Puente-Marin, S., R. Thwaite, L. Mercado, J. Coll, N. Roher, and M. Ortega-Villaizan. 2019. Fish Red Blood Cells Modulate Immune Genes in Response to Bacterial Inclusion Bodies Made of TNF α and a G-VHSV Fragment. *Frontiers in Immunology* 10: 1055-1069.
- Reis, B., L. Ramos-Pinto, J. Martos-Sitcha, M. Machado, R. Azeredo, S. Fernández-Boo, J. Pérez-Sánchez. 2021. Health status in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles fed diets devoid of fishmeal and supplemented with *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology* 33(2), 979–996.
- Reverter, M., N. Tapissier-Bontemps, D. Lecchini, B. Banaigs, P. Sasal. 2018. Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. *Fishes* 3(4), 41–60.
- Rust, MB. 2003. *Fish Nutrition, Nutritional Physiology* (3), 367–452.
- Sahoo, B., H. Banu, P. Abhinav, and T. Gayatri. 2021. Antimicrobial Immune Response Immune system of fish: An evolutionary perspective. Ed. Ortega. M. V. Chico. Pp.100.
- Salinas, I., A. Cuesta, M. Esteban, J. Meseguer. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology* 19(1):67-77.
- Saray, G., S. Svahn, and M. Johansson. 2019. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20(20): 50.58.
- Sarker, P., A. Kapuscinski, G. Vandenberg, E. Proulx, and A. Sitek. 2020. Towards Sustainable and Ocean-Friendly Aquafeeds: Evaluating a Fish-Free feed for Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Using Three Marine Microalgae Species. *Elem. Sci. Anth* 8: 5-15.
- Secombes, C., and Wang, T. 2012. The innate and adaptive immune system of fish. P.4-68. In: Austin, B. (ed.) *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and control*.
- Shen, Y., D. Wang, J. Zhao, and X. Chen. 2018. Fish red blood cells express immune genes and responses. *Aquaculture and Fisheries* 3(1): 14–21.
- Shi, J., and A.C. Camus. 2006. Hecidins in Amphibians and Fishes: Antimicrobial Peptides or Ironregulatory Hormones? *Dev. Comp. Immunol* 30(9): 746–755.
- Singh, K. 2018. *Textbook of Nephro-Endocrinology Erythropoiesis* 5: 207–215.
- Skov, J., P. Kania, L. Holten-Andersen, B. Fouz, and K. Buchmann. 2012. immunomodulatory effects of dietary b-1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol* 33:111–120.

- Sorensen, M., G. Berge, R. Inge, and R. Benete. 2016. Microalga *Phaeodactylum tricorutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) - effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture* 460: 116-123.
- Sorensen, M., Y. Gong, F. Bjarnason, G. Vasanth, D. Dahle, M. Huntley, and V. Kiron. 2017. *Nannochloropsis oceania*-derived defatted meal as an alternative to fishmeal in Atlantic salmon feeds. *PLOS ONE* 12(7): 1799-1808.
- Sotoudeh, E., and M. Jafari. 2017. Effects of dietary supplementation with red seaweed, *Gracilaria pygmaea*, on growth, carcass composition and hematology of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture International* 25: 1857-1867.
- Spasic, S., S. Subotic, J. Vicinjac, M. Lenhardt. 2020. Application of Different Classification Methods to Determine the Developmental Stage of Fish Erythrocytes of the Common Nase (*Chondrostoma nasus*) and Vimba Bream (*Vimba vimba*). *Pattern Recognition and Image Analysis* 30(1), 43-51.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert. 2006. "Review: commercial applications of microalgae," *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87- 96.
- Sprague, R., A. Stephenson, and M. Ellsworth. 2007. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. *Trends Endocrinol Metab* 18: 350-355.
- Surendhiran, D., M. Vijay, A. Sirajunnisa, T. Subramaniyan, A. Shanthalin. 2014. A green synthesis of antimicrobial compounds from marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Journal of coastal life medicine* 2(11): 859-863.
- Tiralongo, F., G. Messina, B. Lombardo, L. Longhitano, G. Li Volti, D. Tibullo. 2020. Skin Mucus of Marine Fish as a Source for the Development of Antimicrobial Agents. *Frontiers in Marine Science* 7(2): 541-553.
- Trichet, V. 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41: 356-372.
- Valero, Y., J. Cortés, and L. Mercado. 2019. NK-lysin from skin-secreted mucus of Atlantic salmon and its potential role in bacteriostatic. *Fish & Shellfish Immunology* 87:41-49.
- Valero, Y., M. Saraiva-Fraga, B. Costas, F. Guardiola. 2018. Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Reviews in Aquaculture* 12(1): 224-253.
- Vaz, B., J. Moreira, M. Morais, J. Costa. 2016. Microalga as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science* 7: 73-77.
- Vazirzadeh, A., A. Marhamati, R. Rabiee, and C. Faggio. 2020. Immunomodulation, antioxidant enhancement and immune genes up-regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on seaweeds included diets. *Fish & Shellfish Immunology* 106: 852-858.
- Vega, A., S. Mendoza, B. Hernández, C. Angulo. 2018. Prospects on the Use of *Schizochytrium sp.* to Develop Oral Vaccines. *Frontiers in Microbiology* 9:25-32.

- Wan, A., A. Soler-Vila, D. O’Keeffe, P. Casburn, R. Fitzgerald, and M. Johnson. 2016. The inclusion of *Palmaria palmata* macroalgae in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets: effects on growth, haematology, immunity, and liver function. *Journal of Applied Phycology* 28(5):3091–3100.
- Wang, J., J. Cai, L. Cai, H. Qu, M. Yang, M. Zhang. 2009. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides* 30:638–646.
- Wang, G.L., M.C. Wang, Y.L. Liu, Q. Zhang, C.F. Li, P.T. Liu. 2018. Identification, expression analysis, and antibacterial activity of NK-lysin from common carp *Cyprinus carpio*, *Fish Shellfish Immunol* 73:11–21.
- Wei, M., C. Parrish, N. Guerra, R. Armenta, and S. Colombo. 2021. Extracted microbial oil from a novel *Schizochytrium sp.* (T18) as a sustainable high DHA source for Atlantic salmon feed: Impacts on growth and tissue lipids. *Aquaculture* 534: 736-749.
- Yamamoto, M., T. Clark, S. Gee, J. Kang, A. Schweitzer, A. Wickrema, and J. Conboy. 2009. Alternative pre-mRNA splicing switches modulate gene expression in late erythropoiesis. *Blood* 113: 3363-3370.
- Zanella, L. and F. Vianello. 2020. Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition, *Journal of Functional Foods* 68: 1756-464
- Zeraatpisheh, F., F. Firouzbakhsh, and J. Khalili. 2018. Effects of the macroalga *Sargassum angustifolium* hot water extract on hematological parameters and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Applied Phycology* 30(3): 2029-2037.
- Zeynali, M., B. Nafisi, V. Morshedi, A. Ghasemi, M. Torfi. 2020. Replacement of dietary fishmeal with *Sargassum ilicifolium* meal on growth, innate immunity and immune gene mRNA transcript abundance in *Lates calcarifer* juveniles. *Aquaculture Nutrition* 7: 87-99.
- Zhang, M., M. Li, and L. Sun. 2014. NKLP27: A Teleost NK-Lysin Peptide that Modulates Immune Response, Induces Degradation of Bacterial DNA, and Inhibits Bacterial and Viral Infection. *PLoS ONE* 9(9): 106-123.
- Zhao, W., F. Hao-Hang, G. Bao-Yan, D. Chen-Min, L. Zhen-Zhou, Z. Cheng-Wu, and N. Jin. 2020. Dietary *Tribonema sp.* supplementation increased growth performance, antioxidant capacity, immunity and improved hepatic health in golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Aquaculture* 529: 735-744.

ANEXO

Anexo I.

Deducción de puntos en base a los indicadores morfológicos y de comportamiento

| | | Alevín parr | Smolt |
|---------------------------------|--|---|---|
| 1.Morfológicos y comportamiento | Nado | Nado contra la corriente, territorial, prefiere zona más baja de la columna de agua (Handeland et al. 1996) Máxima deducción -20 p | Nado en el sentido de la corriente, nado en cardumen a favor de la corriente (Handeland et al. 1996) Mayor presencia en la superficie (Garay 2015) Cumple |
| | Coloración | Coloración verdosa amarillenta, presentan manchas oscurecidas verticales en los costados (manchas parr), (Handeland et al. 1996) -20 p | Color azul/negro en el dorso, tonalidad plateada en los costados y vientre blanco (Folmar and Dickhoff 1980) Reflexión de la luz sobre las guaninas en piel, aumento de catabolismo proteico inducido por la hormona tiroidea (TSH) Medición de guanina y piel en suero (Haner et al. 1995) Cumple |
| | Aletas | Aleta pectoral y aleta caudal son anaranjadas o amarillentas (Orrego 2015) -20 p | Aletas pectorales y caudales claras en la base y bordes más oscuros (migración de melanóforos, que contienen gránulos de melanina (Mizuno et al. 2004) Cumple |
| | Escamas y mucosa | Parr sano: escamas firmes y abundante mucosa (Orrego 2015) -20 P | Fácil pérdida de escamas (Garay 2015), pérdida de mucosa (Orrego 2015) Cumple |
| | Factor de condición $K = (\text{peso g} / \text{longitud cm})^3 * 100$ (McCormick et al. 1999) | Cuerpo redondeado y acortado $K = 1.2$ a 1.3 (Orrego 2015) -20P | Aumento de tasa de crecimiento, pez delgado y alargado, se acelera su factor de condición $K = 0.9$ a 1.0 (Orrego 2015) Cumple |

APÉNDICES

Apéndice I

Cuadro 1: Valores morfométricos de eritrocitos para la conformación del modelo de clasificación celular.

| | | N | Media | Desv. estándar | Error típico | Límite inferior | Límite superior | mínimo | Máximo |
|-----|---------------|-----|-------|----------------|--------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| AC | Madura | 40 | 58,61 | 6,12 | 0,97 | 56,66 | 60,57 | 47,76 | 70,51 |
| | En maduración | 40 | 49,40 | 3,65 | 0,58 | 48,23 | 50,56 | 40,09 | 57,79 |
| | Inmadura | 40 | 49,70 | 5,74 | 0,91 | 47,86 | 51,53 | 40,04 | 62,46 |
| | Total | 120 | 52,57 | 6,77 | 0,62 | 51,35 | 53,79 | 40,04 | 70,51 |
| PC | Madura | 40 | 28,58 | 1,45 | 0,23 | 28,12 | 29,05 | 26,05 | 31,42 |
| | En maduración | 40 | 25,19 | 0,92 | 0,14 | 24,90 | 25,48 | 22,87 | 27,17 |
| | Inmadura | 40 | 25,00 | 1,44 | 0,23 | 24,54 | 25,46 | 22,43 | 28,11 |
| | Total | 120 | 26,26 | 2,09 | 0,19 | 25,88 | 26,64 | 22,43 | 31,42 |
| LC | Madura | 40 | 11,24 | 0,76 | 0,12 | 11,00 | 11,48 | 10,00 | 13,18 |
| | En maduración | 40 | 8,94 | 0,42 | 0,07 | 8,81 | 9,07 | 8,03 | 9,65 |
| | Inmadura | 40 | 8,32 | 0,55 | 0,09 | 8,14 | 8,49 | 7,24 | 9,70 |
| | Total | 120 | 9,50 | 1,39 | 0,13 | 9,25 | 9,75 | 7,24 | 13,18 |
| SFC | Madura | 40 | 0,90 | 0,04 | 0,01 | 0,89 | 0,91 | 0,78 | 0,97 |
| | En maduración | 40 | 0,98 | 0,01 | 0,00 | 0,97 | 0,98 | 0,95 | 1,00 |
| | Inmadura | 40 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,99 | 1,00 | 0,98 | 1,00 |
| | Total | 120 | 0,96 | 0,05 | 0,00 | 0,95 | 0,97 | 0,78 | 1,00 |
| SN | Madura | 40 | 10,94 | 1,36 | 0,22 | 10,50 | 11,37 | 8,57 | 14,28 |
| | En maduración | 40 | 13,71 | 1,21 | 0,19 | 13,32 | 14,09 | 10,07 | 16,15 |
| | Inmadura | 40 | 15,43 | 2,16 | 0,34 | 14,74 | 16,11 | 12,18 | 21,13 |
| | Total | 120 | 13,36 | 2,46 | 0,22 | 12,91 | 13,80 | 8,57 | 21,13 |
| PN | Madura | 40 | 12,44 | 0,69 | 0,11 | 12,21 | 12,66 | 11,38 | 14,17 |
| | En maduración | 40 | 13,26 | 0,60 | 0,09 | 13,07 | 13,46 | 11,36 | 14,54 |
| | Inmadura | 40 | 13,92 | 0,95 | 0,15 | 13,62 | 14,22 | 12,39 | 16,33 |
| | Total | 120 | 13,21 | 0,97 | 0,09 | 13,03 | 13,38 | 11,36 | 16,33 |
| LN | Madura | 40 | 4,96 | 0,30 | 0,05 | 4,86 | 5,05 | 4,43 | 5,67 |
| | En maduración | 40 | 4,71 | 0,26 | 0,04 | 4,63 | 4,79 | 4,01 | 5,36 |
| | Inmadura | 40 | 4,63 | 0,30 | 0,05 | 4,53 | 4,73 | 3,97 | 5,47 |
| | Total | 120 | 4,77 | 0,32 | 0,03 | 4,71 | 4,82 | 3,97 | 5,67 |
| SFN | Madura | 40 | 0,89 | 0,04 | 0,01 | 0,87 | 0,90 | 0,78 | 0,95 |
| | En maduración | 40 | 0,98 | 0,01 | 0,00 | 0,97 | 0,98 | 0,94 | 0,99 |
| | Inmadura | 40 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,99 | 1,00 | 0,98 | 1,00 |
| | Total | 120 | 0,95 | 0,05 | 0,00 | 0,94 | 0,96 | 0,78 | 1,00 |

Apéndice II

Figura 1: Probabilidad de selección eritrocitaria.

