



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Jaime Figueroa V.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

CALICREÍNA GLANDULAR EN *Cyprinus carpió*, EFECTO DE 17 β -
ESTRADIOL EN LA ACLIMATIZACIÓN DEL PEZ Y PARTICIPACIÓN
EN EL SISTEMA INMUNE INNATO EN *Salmo salar*

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de ***Bioquímico***

DENISE ALICIA HAUSSMANN BIELEFELD

VALDIVIA - CHILE

2005

*“El arte de la ciencia:
Repasar el camino,
mirar lo que otros miraron
y ver lo que otros no vieron”*

*A Enrique Bielefeld B.
Mi abuelito, padre y amigo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime Figueroa por ser un excelente científico, amigo y compañero, gracias por sus enseñanzas, apoyo y todo su incondicional cariño. A Gudi por su apoyo y alegría. A Dr. Alejandro Claude por las correcciones realizadas a mi trabajo. Al Dr. Alejandro Yañez no solo por ser corrector de mi trabajo, sino también por ser una buena persona y científico. A la Dra. Gloria León por su amistad durante el transcurso de mi carrera, por su estimulación y ayuda constante.

A mis queridos amigos, Chani, Jessica, René, Yogui, Rodrigo, Iván y Gaspar, por esas tertulias interminables sobre la ciencia, donde tratamos de cambiar el mundo, mejor dicho de arreglarlo a nuestra manera.... Somos ocho personas que caminamos hacia distintos lugares, pero ahora no solo nos une la ciencia, sino también una gran amistad. Quiero agradecerle especialmente a René por todo su apoyo desde mi primer año en la Universidad.

A mis compañeros de laboratorio del LabBMP, a los que pertenecen y pertenecieron a este, con especial cariño a Alex un muy buen científico y amigo. También a mi querido Yoguito, mi "partner", que además de ser mi gran amigo fue una gran compañía en el laboratorio, peleas, risas, bailes, recuerdos inolvidables.

No quiero dejar de agradecer en forma especial a Biosonda, donde realicé mi práctica a cada una de las personas que ahí trabajan, en especial a la Dra. Maria Inés Becker y al Dr. Alfredo de loannes ambos excelentes personas, científicos y amigos, les agradezco por haberme recibido y por esas conversaciones interminables que me

dejaron no solo gratos recuerdos sino muchas enseñanzas. A Alejandro Munizaga por su ayuda en mi formación y por su amistad.

A Fernando Pérez por todo su cariño y apoyo durante gran parte de mi carrera.

A Cesar R., Natty, Giselle, Alejandra Fuentes, profe Mónica Brito, profesor Orlando Alarcón, Genaro, Dr. Carlos Figueroa y tantas personas, gracias a todos por que en algún momento me brindaron su ayuda y cariño.

A mi querida familia que siempre me ha apoyado en las decisiones que he tomado, en especial a Skania, que además de ser mi tía es la mejor amiga del mundo, a mi Onkel Claus, Carlita, mi prima y hermana que nunca tuve, a Claudito y Nacho. A mis tíos Isabel y Arturo. A mí querida Gladys. A mi Bueli por su apoyo, compañía y afecto. A mi abuelito Enrique, que le debo todo.

Esta tesis fue realizada gracias a apoyo del proyecto FONDECYT 1990710 y DID UACH-2002-17.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE CONTENIDO	i
INDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURIAS	ix
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCION	3
3. MATERIALES Y METODOS	15
3.1 MATERIALES	15
3.1.1 Reactivos	15
3.1.2 Soluciones	18
3.1.3 Instrumentos utilizados	19
3.1.4 Animales de experimentación	20
3.1.5 Anticuerpos	21
3.1.5.1 Anticuerpo anti-caliceína glandular (<i>C. carpio</i>)	21
3.1.5.2 Anticuerpo anti-caliceína glandular (<i>C. striata</i>)	21
3.1.5.3 Anticuerpo anti-caliceína humana	21
3.1.5.4 Anticuerpo anti-prolactina	21
3.1.5.5 Anticuerpo anti-prolactina, hecho en ratón	22
3.2 METODOS	22
3.2.1 Producción de anticuerpos policlonales anti-caliceína glandular (<i>C. carpio</i>)	22

3.2.2	Extracción de órganos	23
3.2.3	Tratamiento de carpas con 17 β -estradiol	23
3.2.4	Ensayos de desafíos contra patógenos	24
3.2.5	Cultivo de pituitarias	24
3.2.6	Obtención y enriquecimiento de leucocitos de salmón	24
3.2.7	Obtención de mucus de piel de salmón	25
3.2.8	Homogeneización de tejidos	25
3.2.9	Cuantificación de proteínas por turbidimetría	25
3.2.10	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	26
3.2.11	Purificación de calicreína glandular por electro-elusión	26
3.2.12	Electroforesis en geles de poliacrilamida	27
3.2.13	Electroforesis en Geles ácido-urea	28
3.2.14	Inmunohistoquímica	29
3.2.14.1	Fijación y montaje de tejidos	29
3.2.14.2	Inmunotinción	29
3.2.15	Inmunofluorescencia en cortes de hipófisis de carpa y salmón.	30
3.2.16	Exposición de antígenos en cortes de hipófisis para inmunohistoquímica	31
3.2.17	Cuantificación de inmunohistoquímica	31
3.2.18	Ensayos de inmunodot	32
3.2.19	Western Blot	32

4.	RESULTADOS	34
4. I	Calicreína glandular en <i>Cyprinus carpio</i> y su aclimatización	34
4.1	Inmundefección de calicreína de carpa	34
4.2	Purificación de calicreína muscular por electroelusión	34
4.3	Fraccionamiento de calicreína purificada en geles Ácido- Urea	36
4.4	Generación de anticuerpos policlonales anti-calicreína glandular de músculo de carpa.	36
4.5	Análisis de Western blot de CG en distintos órganos del pez <i>C. carpio</i> .	39
4.6	Análisis electroforético “pseudo” bidimensional de calicreína glandular	39
4.7	Inmunodetección de calicreína glandular en orina humana	43
4.8	Detección comparativa de Inmunohistoquímica de calicreína glandular	43
4.9	Inmunodetección de calicreína glandular en distintos órganos de carpa.	46
4.9.1	Inmunodetección de calicreína glandular en músculo	46
4.9.2	Inmunodetección de calicreína glandular en branquias	48
4.9.3	Inmunodetección de calicreína glandular en riñón de carpa	48
4.9.4	Inmunodetección de calicreína glandular en cortes de piel	48
4.9.5	Inmunodetección de calicreína glandular en cortes de	

hígado	52
4.10 Inmunohistoquímica comparativa de calicreína glandular en cortes de hipófisis	52
4.11 Inmunofluorescencia doble de prolactina y calicreína glandular en hipófisis de carpa por análisis confocal	55
4.12 Efecto de 17 β -estradiol en la expresión de calicreína glandular en distintos órganos de carpa	55
4.12.1 Inmunodetección de CG en músculo	58
4.12.2 Inmunodetección de CG en branquias	58
4.12.3 Inmunodetección de CG en riñón.	61
4.13 Inmunodetección de calicreína glandular en explantes de hipófisis	61
4. II Calicreína glandular involucrada en el sistema inmune de <i>Salmo salar</i>	64
4.14 Inmunofluorescencia doble de prolactina y calicreína glandular en hipófisis de salmones por análisis confocal	64
4.15 Inmunodetección de calicreína glandular en leucocitos de <i>S. salar</i>	67
4.16 Inmunodetección de calicreína en músculo de <i>Salmo salar</i>	67
4.17 Inmunodetección de calicreína glandular en hipófisis de <i>S. salar</i>	70
4.18 Inmunodetección de calicreína glandular en riñón de <i>S. salar</i>	70

4.18.1	Inmunodetección en cortes de riñón.	70
4.18.2	Análisis de Western blot de CG en riñón de salmones sanos y desafiados	73
4.19	Inmunodetección de calicreína glandular en branquias de <i>S. salar</i>	73
4.20	Inmunodetección de calicreína glandular en piel de <i>S. salar</i>	73
4.21	Inmunodetección de calicreína glandular en mucus de <i>S. salar</i>	77
4.21.1	Inmuno-dot para CG en mucus de salmón	77
4.21.2	Inmunodetección de calicreína glandular en mucus de salmón	77
5.	DISCUSION	81
6.	BIBLIOGRAFIA	93

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Electroforesis de proteínas de músculo de carpa en gel de poliacrilamida y Western blot con suero anti-callicreína del pez <i>C. striata</i> .	35
FIGURA 2 Electroforesis de callicreína muscular purificada por electroelusión y Western blot con suero anti-callicreína del pez <i>C. striata</i> .	37
FIGURA 3 Electroforesis de callicreína muscular purificada en geles Acido-Urea.	38
FIGURA 4 Electroforesis en gel de poliacrilamida de homogenizados de diversos órganos de carpa.	40
FIGURA 5 Análisis de Western blot del gel de la figura 4, con el anticuerpo anti-callicreína de <i>C. carpio</i> .	41
FIGURA 6 Análisis electroforético “pseudo” bidimensional de extracto proteico de músculo de carpa.	42
FIGURA 7 Inmunodetección de callicreína en orina humana.	44
FIGURA 8 Inmunodetección comparativa de callicreína en cortes de riñón de <i>C. carpio</i> .	45
FIGURA 9 Inmunodetección de callicreína en cortes de músculo de <i>C. carpio</i> .	47

FIGURA 10	Inmunodetección de calicreína en cortes de branquias de <i>C. carpio</i> .	49
FIGURA 11	Inmunodetección de calicreína en cortes de riñón de <i>C. carpio</i> .	50
FIGURA 12	Inmunodetección de calicreína en cortes de piel de <i>C. carpio</i> .	51
FIGURA 13	Inmunodetección de calicreína en cortes de hígado de <i>C. carpio</i> .	53
FIGURA 14	Comparación inmunohistoquímica de calicreína en hipófisis de <i>C. carpio</i> .	54
FIGURA 15	Inmunofluorescencia doble de calicreína y prolactina en hipófisis de <i>C. carpio</i> por microscopia confocal.	56
FIGURA 16	Inmunofluorescencia figura 15 con mayor aumento.	57
FIGURA 17	Efecto de 17 β -estradiol en la expresión de calicreína en músculo de <i>C. carpio</i> .	59
FIGURA 18	Efecto de 17 β -estradiol en la expresión de calicreína en branquias de <i>C. carpio</i> .	60
FIGURA 19	Efecto de 17 β -estradiol en la expresión de calicreína en riñón de <i>C. carpio</i> .	62
FIGURA 20	Inmunodetección de calicreína en explantes de hipófisis de <i>C. carpio</i> .	63
FIGURA 21	Inmunofluorescencia doble de calicreína y prolactina en hipófisis de <i>S. salar</i> por microscopia confocal.	65

FIGURA 22 Inmunofluorescencia figura 21 con mayor aumento.

66

FIGURA 23	Inmunodetección de calicreína en leucocitos de <i>S. salar</i> .	68
FIGURA 24	Inmunodetección de calicreína en músculo de <i>S. salar</i> .	69
FIGURA 25	Inmunodetección de calicreína en hipófisis de <i>S. salar</i> .	71
FIGURA 26	Inmunodetección de calicreína en riñón de <i>S. salar</i> .	72
FIGURA 27	Análisis de Western blot para calicreína en extracto de proteínas riñón de <i>S. salar</i> .	74
FIGURA 28	Inmunodetección de calicreína en branquias de <i>S. salar</i> .	75
FIGURA 29	Inmunodetección de calicreína en piel de <i>S. salar</i> .	76
FIGURA 30	Inmuno-dot para calicreína en mucus de <i>S. salar</i> .	78
FIGURA 31	Inmunodetección de calicreína en mucus de <i>S. salar</i> .	79

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	albúmina de suero bovino.
CG	calicreína glandular.
DAB	diaminobencidina.
EDTA	ácido etilendiamino tetracético.
EGTA	ácido etilenglicol-bis (β -aminoetileter)-N, N, N', N'- tetraacético.
IgG	inmunoglobulina G.
IgM	inmunoglobulina M.
IHQ	inmunohistoquímica.
MW	microonda.
PAP	complejo peroxidasa-antiperoxidasa.
PBS	tampón fosfato salino.
PI	<i>pars intermedia.</i>
PMSF	fosfometilsulfonilfosfato.
PPD	<i>proximal pars distalis.</i>
PRL	prolactina.
TBS	tampón tris salino.
TCA	ácido tricloroacético.
Temed	N,N,N',N'-tetrametilendiamina.
TNT	tampón tris cloruro de sodio-tween 20.
Tris	tris (hidroximetil) aminometano.
RPD	<i>rostral pars distalis.</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio.

1. RESUMEN

Calicreína glandular o tisular (CG) pertenece a la familia de las serinas proteasas, con una alta especificidad de sustrato, teniendo principalmente su sitio de corte en residuos de arginina y lisina. En la hipófisis, calicreína sólo está presente en las células lactotropas productoras de prolactina y se cree que procesa a prolactina. La presencia de calicreína en peces no ha sido estudiada en detalle. En este trabajo se purificó CG y se generó un anticuerpo policlonal anti-calicreína del pez *Cyprinus carpio*. Con esta herramienta se evaluó la presencia de calicreína en diversos tejidos del pez, tanto en peces tratados con estrógenos y peces control, evidenciándose cambios en la intensidad de inmunorreacción. La relevancia de los estrógenos es que son productos de degradación de compuestos contaminantes en el agua. Teniendo presente estos antecedentes, los peces y particularmente la variación de CG podrían servir como biomarcador de contaminación del agua.

Por otro lado se evaluó la presencia de CG en tejido de salmones, teniendo en cuenta que los peces poseen un sistema inmune innato altamente desarrollado donde diversas enzimas como lisozima y otras proteasas juegan un rol determinante. Por ello se realizaron experimentos en *Salmo salar* tanto en peces sanos y desafiados frente a un patógeno bacteriano *Piscirickettsia salmonis*, analizando la presencia de CG en órganos, leucocitos y mucus. Una importante contribución de este trabajo fue el hallazgo de una clara diferencia de intensidad de inmunorreacción de calicreína entre peces sanos y desafiados al patógeno, cuya función específica en el sistema inmune innato se pretende dilucidar a futuro.

SUMMARY

Glandular or tissue Kallikrein (GK) belongs to the family of serine proteases, with a high substrate specificity, cutting between arginine and lysine residues. In the hypophysis, Kallikrein is only present in the lactotroph cells that produce prolactin and are involved in the processing of prolactin. The presence of kallikrein in fish has not been studied. In this work Kallikrein was purified from the fish *Cyprinus carpio* and a polyclonal antibody anti-carp kallikrein was generated. This tool was used to evaluate the presence of kallikrein in diverse carp organs. Significant changes of the intensity of the immunoreaction was detected in carp injected with estrogen compared to control fish. The physiological relevance of the estrogenic effect on expression of kallikrein is important in the context of estrogenic potential of contaminating substances in water. Therefore, the expression pattern of kallikrein in fish could serve as biomarker for water contamination.

On the other hand, the presence of GK was evaluated in salmon's organs, a fish that exhibits a highly developed innate immune system where proteases play important roles. For that reason experiments were performed in *Salmo salar*, healthy and challenged with a bacterial pathogen, *Piscirickettsia salmonis*, analyzing the presence of GK in different organs, leukocytes and mucus. A clear difference of intensity of immunoreaction of kallikrein between healthy and challenged fish to the pathogen was observed. These findings constitute a very important contribution to reveal the role of kallikrein in the innate immune system of fish.

2. INTRODUCCION

Desde el siglo pasado los investigadores han estudiado los mecanismos por los cuales los seres vivos logran adaptarse al medio ambiente, involucrando en el estudio de esta propiedad lo que se ha denominado procesos de aclimatización, que conllevan una serie de modificaciones en el medio interno del ser vivo.

Fisiológicamente, la adaptación de los organismos vivos frente a uno o más parámetros ambientales posibilita la clasificación de éstos en dos grupos bien definidos: reguladores y conformistas (Prosser *et al*, 1986). Los reguladores, vertebrados superiores, son capaces de mantener un estado interno constante frente a las variaciones del medio ambiente en base a complejos mecanismos regulatorios y un alto gasto de energía. Por otro lado, los conformistas, vertebrados inferiores y mayoritariamente invertebrados son aquellos en los cuales su medio interno varía a la par de las fluctuaciones ambientales. Entre los ectotermos euroicos están los euritermales, es decir, organismos que al adaptarse a una temperatura externa que caracteriza a cada estación, han desarrollado una serie de respuestas compensatorias a nivel fisiológico y bioquímico dotando al organismo de una adecuada flexibilidad para sobrevivir a los cambios del medio ambiente (Hochachka y Somero, 1973; Hazel y Prosser, 1974).

Los organismos ectodermos como el pez *Cyprinus carpio*, que están sometidos a fluctuaciones cíclicas del ambiente, deben adaptarse a los cambios que este conlleva. Entre las variantes más estudiadas y que cambian más dramáticamente, se encuentra el foto periodo y la temperatura; la respuesta a los cambios estacionales de estas

variables (foto periodo y temperatura) es lo que se conoce como aclimatización. La aclimatización se refiere a las adaptaciones que acontecen en respuesta a una o más variables controladas en el laboratorio (Hazel y Prosser, 1974). En el proceso de aclimatización, como respuesta compensatoria frente al estrés o a los cambios de su medio ambiente, se produce variación de genes a nivel transcripcional y traduccional en varios tejidos (Krauskopf *et al.*, 1988; Figueroa *et al.* 1994, 1997, 2005; Goldspink, 1995; Kausel *et al.*, 1998, 1999; Vera *et al.*, 2000).

Previamente se ha demostrado, que como respuesta adaptativa de este pez, prolactina es una de las hormonas que está más fuertemente regulada en su expresión, (PRL) Figueroa *et al.* (1994). Prolactina es una hormona de 23 - 24 kDa de peso molecular. Prolactina es sintetizada como una prehormona de 229 aminoácidos. El péptido señal de 30 aminoácidos es removido del extremo amino terminal, por corte proteolítico, produciéndose un péptido de 199 aminoácidos. Esta forma de la hormona es la que se encuentra mayoritariamente en pituitaria de muchas especies. En mamíferos esta hormona no solo existe en la forma de 23 kDa, sino que también se encuentran modificaciones de diversos tamaño. Como es el caso de PRL de 21 kDa, alternativa que involucra una delección aminoacídica durante el proceso de empalme. La isoforma de 25 kDa, alternativa que involucra sustitución aminoacídica durante el proceso de empalme. También existen formas truncas de PRL, que da como resultado fragmentos de distintos tamaños 22, 21, 16, 8, 2, y 1 kDa. Existe también una PRL glicosilada y dímeros de PRL entre otras formas (Sinha 1992). En teleósteos esta hormona contiene de 10 a 12 residuos aminoacídicos menos en el extremo amino terminal que en mamíferos, y no presenta el puente disulfuro del extremo amino

terminal. Prolactina se localiza en teleósteos en las células acidófilas de la rostral pars distalis (RPD) y pertenecería, junto a hormona de crecimiento y la hormona lactógeno placentaria, a una familia de péptidos relacionados en estructura y función (Kawauchi *et al.*, 1990). Por ello se ha postulado que estos genes habrían evolucionado de un gen ancestral común (Bewley y Li, 1971; Niall *et al.*, 1971).

Dentro de las funciones de PRL, se ha demostrado que afecta el flujo de iones sodio en agallas, riñón, vejiga urinaria y posiblemente piel, controlando de esta forma también el flujo de agua en estos órganos (Ensor y Ball, 1972). Existe suficiente información para reconocer que esta hormona es de vital importancia en peces eurihalinos en agua dulce. Respecto a la secreción de esta hormona desde las células lactotropas, se postula que se encuentra bajo control interno de dos orígenes: uno neuronal (básicamente hipotalámico) y otro sensible a alteraciones osmóticas en la sangre (Ensor y Ball, 1972; McKeown y Peter, 1975; Ball *et al.*, 1981). Sin embargo, hasta ahora no está del todo claro, cual es el inductor de la expresión y liberación de ésta.

En teleósteos como el pez *Cyprinus carpio*, Molina (1993) demostró que prolactina varia su expresión durante aclimatización. Posteriormente, Figueroa, *et al.* (1994; 1997) demostraron que principalmente el fotoperíodo y la temperatura son claves en determinar los cambios de expresión de PRL. Es por ello, que se ha postulado que el eje hipotálamo-hipofisiario es clave en el proceso de aclimatización modulando la respuesta adaptativa del pez como un todo por la expresión de esta hormona.

En este contexto, como se mencionó anteriormente, prolactina es sintetizada como una pre-hormona, por lo cual debería existir un procesamiento que permita la

obtención de un producto final procesado (Cooke *et al.*, 1980; Powers y Hatala, 1990). La secuencia aminoacídica de PRL posee un par de residuos Arg-Arg como típica señal de corte, secuencia también presente en PRL de carpa, en similar posición (Yasuda *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1991). La enzima involucrada en este proceso, en vertebrados superiores es calicreína glandular (Powers and Nasjletti, 1983).

Por su parte las calicreínas son serina proteasas que se caracterizan por su capacidad para generar, con una alta especificidad, péptidos bioactivos desde precursores inactivos, denominados cininógenos (glicoproteína plasmática inactiva), generando cininas (potente péptido vasodilatador), teniendo como principal señal de corte los residuos Arg y Lys (Schachter, 1980). Calicreína glandular es un miembro típico de la familia de las serina proteasas que procesan péptidos (MacDonald *et al.*, 1988; Clements, 1989). Otros miembros de la familia incluye la subunidad γ del factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*, NGF) y el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF); los cuales han sido relacionados al procesamiento del factor de crecimiento (Server y Shooter, 1977; Isackson *et al.*, 1987).

Estas enzimas están divididas en dos grupos: calicreína plasmática y calicreína glandular. Estas dos categorías difieren en su peso molecular, especificidad de sustrato, características inmunológicas, estructura génica y el tipo de cinina liberada luego de la proteólisis (Diamandis *et al.*, 2000).

La calicreína plasmática o *Factor Fletcher* (KLKB1) es codificado en humano, por un gen localizado en el cromosoma 4q35 (Diamandis *et al.*, 2000). El gen se compone de 15 exones y se expresa en hígado codificando una proteína de alto peso molecular (cininógeno) producido también en el hígado, a partir de la cual se libera el péptido

bioactivo, bradicidina. La calicreína plasmática es producida exclusivamente en células hepáticas, y es secretada al plasma donde ejerce su acción.

Calicreína glandular (CG) actúa tanto a nivel tisular como plasmático, pero la diferencia principal entre ambas es el tipo de cininas que producen y el efecto fisiológico provocado por estas.

En cuanto a su distribución en diferentes órganos, la glándula submandibular y páncreas exocrino, expresan un alto nivel de CG, la que se secreta en el espacio no vascular, el cual es carente de cininógenos, lo que sugeriría otro sustrato. De hecho CG corta algunos precursores *in vitro*, como los esperados de un proceso enzimático (Ole-MoiYoi *et al.*, 1979; Mindroui *et al.*, 1991). Las propiedades antes mencionadas acerca de calicreína glandular, sugieren que ésta puede funcionar procesando prehormonas, por lo tanto, se podría rastrear calicreína glandular en distintos órganos, por ejemplo específicamente en este caso en pituitaria se podía utilizar un marcador o sonda para el procesamiento común de las proteasas.

En mamíferos se documenta la presencia de CG en distintos tejidos (Clements, 1989; Bhoola *et al.*, 1992). La amplia distribución de CG sugiere abundantes funciones fisiológicas en los distintos sitios. Además precursores pro-calicreína glandular son más abundantes en otros tejidos, como por ejemplo en músculo esquelético de rata (Shimojo *et al.*, 1987), riñón (Figuroa C.D. *et al.*, 1988) y glándula pituitaria (Chao *et al.*, 1987; Mena *et al.*, 1992).

Dentro de las funciones más conocidas de esta proteasa se encuentra la regulación del flujo sanguíneo local por la generación de cininas e interacción con los

receptores de cininas, de esta forma media una gran variedad de respuestas en la célula huésped (Bhoola *et al.*, 1992).

Dentro de las CG la más estudiada es la calicreína renal; a la cual se le asocia la regulación del flujo sanguíneo local, balance hidroelectrolítico y la patogénesis de desórdenes renales derivadas de hipertensión arterial y otras enfermedades (Marin-Grez, 1982; Margolius, 1984; Fuller y Funder, 1986; Scicli y Carretero, 1986; Sharma, 1988). Se identificó CG en páncreas y glándula salival, apareciendo localizadas en los gránulos de zimógenos en las células acinares en humanos, ratas y en otros animales (Simson *et al.*, 1979; Shachter, 1980; Overlack, 1983) y en las células β de los islotes pancreáticos (Ole-Moiyoi *et al.*, 1979; Pinkus *et al.*, 1983). Donde podría estar involucrada en el transporte de iones de Na^+ y Cl^- , procesador de precursores proteicos y regulación del flujo sanguíneo local. La presencia de CG en músculo esquelético ha sido bien demostrada en rata (Shimojo *et al.*, 1987), donde los niveles de CG aumentan después del ejercicio intenso (Wicklmayr *et al.*, 1983; Wicklmayr *et al.* 1988); dentro de las funciones en el músculo esquelético se encuentra el aumento del flujo sanguíneo local durante el ejercicio (Wicklmayr *et al.*, 1983; Wicklmayr *et al.* 1988). En el músculo liso vascular las cininas estimulan la vasodilatación y aumentan la permeabilidad capilar, reduciendo la presión sanguínea (Rigoli *et al.*, 1980). También se identificó CG en el tracto gastrointestinal de distintos animales; la función de ésta en el tracto gastrointestinal particularmente en colon, duodeno y estómago; puede involucrar el transporte de iones de Cl^- (Cuthbert *et al.*, 1986; Cuthbert *et al.*, 1987; Bhoola *et al.*, 1989), regulación del flujo sanguíneo local (Overlack, 1983) y procesamiento de mucoproteínas (Schachter, 1983). Se identificó también en cerebro de rata, cerdo y

pituitaria anterior de rata (Power y Nasjletti, 1982; Powers, 1986; Vio *et al.*, 1990), en la mucosa nasal (Baumgarten *et al.*, 1989) y en glándulas de la traquea (Bhoola *et al.*, 1989).

La mayor parte de los estudios de CG se han realizado en mamíferos, mayoritariamente en ratón, sin embargo, se ha estudiado también en vertebrados inferiores como *Centropristis striata*, *Centropristis philadelphica*, *Acipenser oxyrhynchus* (peces), *Rhizoprionodon terraenovae* (tiburón del atlántico), *Alligator mississippiensis* (caimán) y *Scalopus aquaticus* (mole). En estos se identificó CG en distintos órganos (Richards *et al.*, 1997b) mediante técnicas de inmunodetección con un anticuerpo anti-caliceína glandular del pez *Centropristis striata*, (Richards *et al.*, 1997a) de esta forma se postula que esta proteasa tiene múltiples funciones en los distintos órganos y además se mantiene en la escala evolutiva lo que sugiere un alto grado de conservación estructural o la presencia de los mismos epítopes de estructura similar (Richards *et al.*, 1997b).

Está descrito hace varios años que caliceína glandular y prolactina son coordinadamente expresados y reguladas en células lactótropas de pituitaria de rata (Jones *et al.*, 1990) En este tipo celular, caliceína glandular es inducida por estrógenos y co-regulada con prolactina, lo cual ha sugerido que puede estar involucrada en el procesamiento de prolactina (Clements *et al.*, 1986; Hatala y Powers 1987). Cabe destacar que prolactina es sintetizada como prohormona, con lo que requiere sólo el procesamiento del péptido señal para generar la hormona lactogénica (Hatala and Powers, 1987).

Se ha demostrado que CG en adenohipófisis de rata es inducida por estrógenos e inhibida por dopamina al igual que PRL (Hatala y Powers, 1988). Calicreína también ha sido localizada en el lóbulo intermedio de pituitarias de rata, ligada a las células productoras de GH (Chao y Chao, 1988), postulándose un rol en el procesamiento a formas activas de esta hormona (Isackson *et al.*, 1987). Además se ha postulado que esta serina proteasa estaría involucrada en el procesamiento *in vivo* de PRL, desde un precursor inactivo a una forma activa, o bien calicreína podría estar degradando la hormona producida en exceso (Bhoola *et al.*, 1992).

En mamíferos se ha mostrado que tanto *in vivo* como *in vitro* los estrógenos tienen un rol claro en estimular las células lactotropas (Giguere *et al.*, 1982; Barry y Grau, 1986; Montagne *et al.*, 1995). Lo que nos indicaría que factores extrahipotalámicos también juegan un rol importante en el control de la secreción de PRL. Se ha mencionado que, la expresión del gen de calicreína glandular en pituitaria anterior, está bajo control estrogénico e inhibido por dopamina al igual que PRL (Hatala y Powers, 1988); el rol local de CG en pituitaria es el procesamiento de precursores; control del flujo sanguíneo local y otros efectos parecen estar modulados por estrógeno *in vivo* (Clements *et al.*, 1986).

En peces, la presencia de CG es prácticamente desconocida y aún más si su acción está estacionalmente regulada. Por ello, como objetivo principal es establecer su presencia en diversos órganos en los que ha sido previamente descrita.

El pez teleósteo *Cyprinus carpio* (carpa) presenta cambios dramáticos en los niveles de prolactina presente en pituitaria como respuesta a los cambios medio ambientales naturales tales como fotoperíodo y temperatura, medida tanto a nivel de los

transcritos presentes en la glándula pituitaria por hibridación *in situ*, como a nivel proteico por inmunohistoquímica (Figuroa *et al.*, 1994). Entre ambas variantes medioambientales, se ha demostrado que el fotoperíodo constituye el modulador particularmente más relevante en la cascada adaptativa que desemboca en la activación de la transcripción de prolactina (Figuroa *et al.*, 1997), hormona de crecimiento (Figuroa *et al.*, 1999) y aparentemente calicreína glandular (Kausel *et al.*, 2000).

En carpa, calicreína glandular en la glándula pituitaria constituiría una putativa proteasa involucrada en el procesamiento de prolactina (Figuroa *et al.*, 2002). En estudios previos empleando anticuerpos anti-CG de *Centropomus striata* se detectaron proteínas de 39 kDa en músculo, 52 kDa en agalla, 52 kDa en riñón y dos proteínas en pituitaria de 46 y 72 kDa (Figuroa *et al.*, 2002). La inmunorreactividad de calicreína glandular observada en tejido intermusculares, células epiteliales de agalla, región apical de las células tubulares de riñón y células lactótropas de la glándula pituitaria, sugerirían un rol osmorregulatorio para esta enzima (Figuroa *et al.*, 2002). Esta expresión de calicreína glandular detectada en varios tipos de tejidos del pez *Cyprinus carpio*, podría indicar la existencia de varios genes de CG, los cuales tendrían una expresión tejido específica. Todo estos resultados obtenidos con un anticuerpo heterólogo.

De acuerdo a todos los antecedentes anteriormente descritos se postula como hipótesis que: ***Calicreína Glandular está presente en diversos tejidos de la carpa y su expresión génica es diferencialmente regulada por estrógenos.***

Por ello uno de los objetivos fundamentales del trabajo es purificar CG y con ella producir anticuerpos policlonales homólogos. Con esta nueva herramienta se postula estudiar la presencia de esta proteasa en distintos órganos de carpa por ensayos de inmunohistoquímica. Además, con los antecedentes ya nombrados de la regulación de esta serina proteasa por estrógenos, se someterá a los peces a una estimulación estrogénica ya descrita por Hernández *et al.* (1992) y luego se evaluará la presencia de esta proteasa en los diversos órganos por análisis de inmunohistoquímica con el anticuerpo homólogo generado.

Por otro lado, recordando que calicreína es una serina-proteasa, que posee actividad tipo tripsina, capaz de generar péptidos bioactivos desde precursores inactivos (cininógenos), se evaluará la presencia de esta en distintos órganos del pez *Salmo salar*. Teniendo en cuenta los antecedentes de la presencia de proteasas que contiene actividad tipo tripsina en mucus y piel de muchos peces (Ellis, 1999, Ylönen *et al.*, 1999). Se sabe que estas enzimas poseen un rol fundamental en la defensa de los peces frente a patógenos bacterianos a los que son expuestos.

Al respecto es necesario hacer algunas consideraciones acerca del sistema inmune de peces, el cual posee amplias diferencias con mamíferos, ya que la respuesta secundaria es relativamente menor y las IgGs no están presentes. Los teleósteos sólo poseen IgM, e IgD ha sido recientemente descrita (Wilson *et al.*, 1997). Sin embargo las diferentes formas de IgM y su observada flexibilidad estructural, pueden compensar la ausencia de IgG (Watts *et al.*, 2001). Los peces también poseen un sistema inmune innato altamente desarrollado y quizás de mayor relevancia, donde diversas macromoléculas, tales como lisozima, proteasas tipo-tripsina, C3, α 2 macroglobulina y

proteína-C reactiva, juegan roles claves, aumentando el reconocimiento inmune. La lisozima que en peces posee una fuerte actividad contra bacterias Gram-negativas (la mayoría de los patógenos que atacan a los peces). En suero de salmón del Atlántico, la lisozima se incrementa en respuesta a infecciones con *Aeromonas salmonicida*, por largo periodo y mucho antes que la respuesta inmune específica se haya desarrollado (Magnadóttir *et al.*, 1995). Como ya se nombró, el mucus y la piel de diversos peces contiene actividad tipo tripsina (Braun *et al.*, 1990; Ellis, 1999), incluso el mucus de rainbow trout es capaz de lisar células de *V. anguillarum* (Hjelmeland *et al.*, 1983). En peces también se ha descrito actividad fagocítica y células citotóxicas que son análogas en función a “natural killer cells” de mamíferos (Secombes *et al.*, 1996). Mediadores de inflamación también han sido descritos y los mejores caracterizados son las citoquinas, particularmente Interleukina-1, Interleukina-6 y factor- α de necrosis tumoral, todas orientadas a aumentar la producción de proteínas séricas, para minimizar el daño o actuar directamente sobre el patógeno (Watts *et al.*, 2001). En cuanto a la respuesta humoral, en relación a memoria, resulta muy modesta en peces, y la heterogeneidad de anticuerpos es también baja (Watts *et al.*, 2001). Por todo lo ya antes mencionado, las proteasas son indispensables dentro del sistema inmune de los peces.

Como ya se mencionó prolactina y calicreína están íntimamente ligadas, siendo posiblemente co-secretadas. Calicreína podría estar involucrada en el procesamiento de prolactina para su activación. Por su parte está descrito que prolactina presenta un efecto estimulante sobre el sistema inmune, específicamente sobre la actividad de células fagocíticas (Sakai *et al.*, 1996) y una activa participación en la mantención de los niveles de inmunoglobulinas circulantes en peces (Yada *et al.*, 1999).

De acuerdo a lo analizado en relación a los sistemas defensivos en peces se plantea la siguiente hipótesis: ***Calicreína Glandular como proteasa está presente en diversos tejidos de salmón participando en el sistema defensivo innato ante al ataque de patógenos bacterianos.***

Con estos antecedentes, disponiendo del anticuerpo anti-calicreína glandular del pez *Cyprinus carpio* se quiere ver la presencia de esta proteasa en diversos órganos de *Salmo salar*, tanto de peces sanos como de peces que fueron enfrentados a un patógeno bacteriano (desafiados), en este caso se utilizó *Piscirickettsia salmonis*. Poniendo hincapié en la piel, barrera directa de los peces frente a los patógenos y también en el mucus de estos. Con esto se quiere tener una visión general de la distribución de calicreína en los tejidos y evaluar si ocurre alguna fluctuación de esta en los dos estadios del pez, sano y desafiado.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

- Aceite de inmersión: Zeiss.
- Ácido acético: Arquimed.
- Ácido clorhídrico: Merk.
- Ácido fosfórico: Merk.
- Ácido pícrico: Merk
- Acrilamida: Merk.
- Albúmina de suero bovino: Merk.
- Anticuerpo anti IgG conejo: Dako.
- Anticuerpo anti IgG conejo, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488: Molecular probes.
- Anticuerpo anti IgG conejo conjugado a peroxidasa: Dako.
- Anticuerpo anti IgG ratón, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 568: Molecular probes.
- Azur C: Sigma
- Azul de bromofenol: Sigma.
- Azul de Coomasie R-250: Sigma.
- Bálsamo de Canadá: Merk.
- Bisacrilamida: Biorad.
- BZ-20: Veterquímica.
- β -Mercaptoetanol: Merk
- Citrato de sodio: Winkler.
- Cloruro de sodio: Winkler.

- Cloruro de potasio: Merk.
- Coadjudante de Freund completo: Sigma
- Coadjudante de Freund incompleto: Sigma.
- Complejo PAP: Dako.
- DAB: Sigma.
- EDTA: Merk.
- EGTA: Merk
- Eosina: Merk.
- Estradiol: Sigma
- Etanol: Arquimed
- Fluorescent mounting medium: Dako.
- Formalina: Merk
- Formol: Merk
- Fosfato diácido: Merk.
- Fosfato disódico: Merk.
- Glicerol: Merk.
- Glicina: Winkler.
- Glucosa: Sigma.
- Hematoxilina: Merk.
- Heparina: Lab Biosano.
- Hidróxido de sodio: Arquimed.
- Histosec: Merk.
- Histostain-DS KIT: Zymed laboratories.

- Isobutanol: Merk.
- Isopropanol: Merk.
- Leche descremada: Colun
- L-glutamina: Sigma.
- Medio L199: Sigma.
- Marcador de peso molecular rango amplio: Winkler y Biorad.
- Marcador de peso molecular rango amplio, preteñido: Winkler y Biorad.
- Mezcla penicilina-anfotericina B: Sigma
- Metanol: Merk.
- Perhidrol: Merk.
- Persulfato de amonio: Arquimed.
- PMSF: Sigma.
- Riboflavina: Merk.
- SDS: Merk.
- Suero de caballo: Sigma.
- Tampón Hepes: Sigma.
- TCA: Merk.
- Temed: Gibco BRL (Invitrogen).
- Tris base: Promega.
- Triton x-100: Sigma.
- Tween-20: Sigma.
- Urea: Sigma.
- Xilol: Arquimed.

3.1.2 Soluciones

-Bouin Acuoso: 75 ml ácido pícrico saturado en agua, 25 ml formamida 40%, 5ml ácido acético glacial.

-Medio base: medio de cultivo L199 (contiene Earle's SALT y NaHCO_3), L-glutamina 0.1 g/l, tampón Hepes 25 μM , mezcla penicilina y anfotericina B, pH 7.0 a 7.2.

-Medio completo: medio base enriquecido con un 5% de suero de caballo.

-Medio Hanks modificado: NaCl 145 mM, K_2HPO_4 8,9 mM, Glucosa 11 mM.

-PBS: NaCl 136.89 mM, KCl 2.68 mM, Na_2HPO_4 10.14 mM, KH_2PO_4 1.76 mM, pH 7.4.

-Reactivo de Bradford: Azul de Coomasie G 0.01 %, etanol 4.75 %, ácido fosfórico 8.5 %.

-Solución de bloqueo (Inmunohistoquímica): Albúmina de suero bovino 1%, Triton X-100 0.3%, Leche descremada 5% en PBS.

-Solución de bloqueo (Western blot): Albúmina de suero bovino 1%, Tween-20 0.3%, Leche descremada 5% en PBS.

-Solución de desteñido para geles de poliacrilamida: Metanol 30%, Ácido Acético 7%.

-Solución de diálisis: Tris-HCl 10mM, pH 7.5.

-Solución de fijado para geles de poliacrilamida: Metanol 50%, Ácido acético 12%.

-Solución de teñido para geles de poliacrilamida: Azul de Coomasie R-250 0.3%, Metanol 50%, Ácido Acético 10%.

-Solución de revelado: DAB 0.2% (p/v) y H_2O_2 0.007% (v/v) en PBS.

- TBS**: Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0,1 M, pH 7.4.
- Tampón citrato**: Ácido cítrico 10 mM, pH 6.0.
- Tampón de corrida (4X) para electroforesis**: Tris-HCl 0.1 M, Glicina 0.78 M, SDS 0.4%, pH 8.3.
- Tampón de corrida gel ácido-urea**: Ácido Acético 0,9 N.
- Tampón de elusión**: Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1 %.
- Tampón de homogenización**: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, 5mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM PMSF.
- Tampón de muestra (5X)**: Tris-HCl 0.3125 M, pH 6.8, SDS 10%, Sacarosa 50%, Azul de bromofenol 0.010%.
- Tampón de Transferencia**: Tris 25 m, Glicina 193 mM, Metanol 20%.
- Tampón espaciador**: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.4 % SDS.
- Tampón separador**: Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.4 % SDS.
- TNT**: Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M, Tween-20 0.05%.

3.1.3 Instrumentos utilizados

- Balanza, Kern.**
- Baño termorregulable, Kioto (modelo YCW-O3S).**
- Cámara de electroforesis Protean II xi cell, Biorad.**
- Cámara de electroforesis Mini Protean II Alignment Card, Biorad.**
- Cámara de transferencia, de fabricación local.**
- Cámara Electro-eluter modelo 422, Biorad.**

- Centrífuga para tubos Falcon, Wifung.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1203.
- Lupa estereoscópica, Leitz Wetzlar.
- Microcentrífuga, Hettich.
- Microondas, Samsung.
- Micropipetas, Wilson y Eppendorf.
- Microscopio óptico de epifluorescencia, Zeiss (Axioscop-Z).
- Microscopio confocal, Zeiss (Axiovert 100 M).
- Sonicador, Cole Palmer.

3.1.4 Animales de experimentación

Las carpas de 0,8 – 2,0 kg fueron capturadas en el río Cayumapu (Valdivia), siendo trasladadas a una jaula de 3 m de ancho x 4 m de largo y 2 m de profundidad, ubicada en el río Cau-Cau (Valdivia). La temperatura del agua varió entre 8–10°C en la estación fría (invierno) y 18-20°C en la estación cálida (verano). Las carpas se alimentaron con partículas en suspensión del mismo río. Los animales fueron mantenidos en estas condiciones un mínimo de dos semanas antes de ser sacrificados para los experimentos.

Los salmones tanto *Salmo salar* como *Salmon coho* se obtuvieron directamente de Novartis, piscicultura ubicada en Puerto Varas, donde los peces estaban a una temperatura óptima de 15°C para su crecimiento en estanques oxigenados y alimentados con “pellet” que contienen los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de los peces. Los animales fueron mantenidos en estas condiciones hasta ser

sacrificados en el mismo laboratorio de la piscicultura, donde se anestesiaron con BZ-20 y se sacrificaron por decapitación, se procesaron las muestras y se guardaron a 4°C para ser trasladadas a Valdivia.

3.1.5 Anticuerpos

3.1.5.1 Anticuerpo anti-callicreína glandular (*Cyprinus carpio*).

Se produjeron anticuerpos policlonales como se detalla en más adelante en el punto 3.2.1.

3.1.5.2 Anticuerpo anti-callicreína glandular (*Centropristia striata*).

Los anticuerpos anti-callicreína glandular fueron donados por el Dr. Gary Richards, (USA) producidos por inyección intramuscular y subcutánea del antígeno muscular de procallicreína del pez *Centropristis striata* en conejo (Richards *et al.*, 1997a).

3.1.5.3 Anticuerpo anti-callicreína humana.

Donado por el Dr. Carlos Figueroa del Instituto de Patología de la Universidad Austral de Chile, producido en conejo, con los protocolos clásicos (Vio CP *et al.*, 1988.)

3.1.5.4 Anticuerpo anti-PRL.

Es un suero anti PRLs recombinante de tilapia (tiPRL-I y tiPRL-II) (Swennen *et al.*, 1991), donado por la Dra. F. Rentier-Delrue (Bélgica).

3.1.5.5 Anticuerpo anti-PRL, hecho en ratón.

Este fue fabricado en el Laboratorio de acuerdo a procedimientos ya descritos. (Figueroa *et al*, 1994).

3.2 METODOS

3.2.1 Producción de anticuerpos policlonales anti-caliceína glandular (*Cyprinus carpio*).

Se generaron anticuerpos policlonales contra caliceína glandular de *Cyprinus carpio*, utilizándose conejos, los que fueron inmunizados por vía subcutánea en el lomo. Se realizó sangrías periódicas para evaluar el título de los anticuerpos séricos mediante “immunodot”. El proceso tardó 3 meses.

La primera inyección consistió de 0,5 mg de antígeno puro disuelto en 0,5 ml de solución salina y emulsionada con 0,5 ml de complejo coadyudante completo de Freund's. Las tres inyecciones suplementarias se efectuaron después de tres semanas, luego de la primera inmunización con intervalos de tres semanas entre cada una de ellas. Todas se realizaron con 0,5 mg de antígeno disuelto en 0,5 ml de solución salina y emulsionada con 0,5 ml de coadyudante incompleto de Freund's. Antes de comenzar la inmunización se obtuvo suero para el control preinmune y entre cada período de inyección se realizó sangrías para obtener suero inmune a modo de control.

Al finalizar el período de inmunización se colectó la sangre de ambos conejos en tubos Falcon y se dejó toda la noche a 37°C para que coagule, luego se desprendió el

coagulo y el suero obtenido se centrifugo por 5 min a 3000 rpm. Obteniéndose así un suero libre de células, este fue alicuotado y almacenado a -20°C.

3.2.2 Extracción de órganos.

Las carpas y salmones fueron sacrificadas por decapitación y se les separó la parte superior de la cabeza. Luego se extrajo la parte adiposa que rodea el cerebro hasta dejarlo expuesto. Se cortaron los nervios motores para luego levantar la masa cerebral dejando a la vista la hipófisis que se ubica por debajo, empotrada en una cavidad y recubierta por una membrana, la que se removió. Las glándulas se extrajeron evitando causar daño del tejido. Para los demás órganos se realizó un corte abdominal longitudinal, donde se extrajo cada uno de los diversos órganos. Para luego ser procesados para su inclusión o para extracción de proteínas totales.

3.2.3 Tratamiento de carpas con 17β-estradiol.

Las carpas aclimatizadas a invierno, fueron tratadas con 17β-estradiol de acuerdo al protocolo descrito por Hernández *et al*, (1992) inyectándolas en la cavidad celómica con dosis de 0,5 mg/kg de peso a intervalos de 24 h por un periodo de 5 días. La hormona fue disuelta de la siguiente forma: 17β-estradiol resuspendido en 100 µl de etanol y luego se adicionaron 900 µl de aceite vegetal. Al quinto día fueron sacrificadas y se les extrajo la hipófisis y tejidos de distintos órganos.

3.2.4 Ensayos de desafíos contra patógenos.

Se desafiaron salmones de 10-25 gramos contra la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, en dos estanques con 25 peces cada uno. La duración del desafío fue de 35 días, a una temperatura del agua correspondiente a 12°C. Las muestras extraídas fueron de los peces sobrevivientes a este desafío.

3.2.5 Cultivo de pituitarias.

Para el cultivo de explantes de pituitaria de carpa se siguió una modificación del método originalmente descrito por Janssen and Grigg (1994). Para ello, básicamente los explantes de hipófisis se cultivaron en una placa de cultivo de 24 pocillos de los cuales se usaron 6 pocillos, cada pocillo contenía aproximadamente 6 explantes, de diferentes carpas, inmersas en 1 ml de medio de cultivo (700 µl de medio base y 300 µl de medio completo). Luego se trasladaron a la sala de cultivo donde permanecieron en una estufa a 23°C, en atmósfera normal, por 8-14 días.

A las 24 h y a los 7 días se realizó cambio de medio para evitar contaminación. Luego de transcurrido el tiempo de cultivo los explantes fueron procesados para inmunohistoquímica y Western blot de forma descrita más adelante.

3.2.6 Obtención y enriquecimiento de leucocitos de salmón.

Se realizó una punción cardiaca con jeringas heparinizadas para obtener sangre de cada uno de los peces, se hizo un pool de sangre de individuos controles y desafiados.

A partir de esta sangre, se tomaron 500 μ l que fueron mezclados con 1 ml de medio Hanks modificado, se depositó dentro de una botella plástica y se dejó por 24 horas en cámara húmeda. Después de transcurrido este tiempo se vació la botella y se procedió a lavarla con 200 μ l del medio Hanks modificado. Las muestras enriquecidas en leucocitos se usaron para confeccionar frotis para inmunohistoquímica.

3.2.7 Obtención de mucus de piel de salmón.

Los peces anestesiados se sacaron del agua y se estilaron, se verifico que no tuvieran heridas en su piel y luego de esto se obtuvo el mucus con ayuda de una espátula, depositándolo directamente en un tubo independiente por individuo.

3.2.8 Homogeneización de tejidos.

Aproximadamente 250 mg de los tejidos de carpas aclimatizadas a verano e invierno, como los tejidos de los salmones, fueron sonicados en tubos Eppendorf con 1 ml de tampón de homogenización. Posteriormente, fueron centrifugados a 12.000 rpm, en microcentrífuga durante 3 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se guardó a -20°C para los ensayos de Western-blot.

3.2.9 Cuantificación de proteínas por turbidimetría.

Se utilizó el método de Luck (1958), en el cual a 2 μ l de cada muestra y en duplicado, se agregaron 148 μ l de agua destilada y 500 μ l de TCA 30% (v/v). Se dejó durante 10 min a temperatura ambiente y luego se midió DO a 400 nm. En paralelo se

realizó una curva de calibración utilizando BSA a distintas concentraciones en agua destilada, junto con un blanco que solo contiene agua destilada más TCA 30 %(v/v).

3.2.10 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Basado en el método de Bradford (Brandford *et al*, 1976), se fabricó una curva de calibración entre 5 a 30 µg de proteínas por ml de reactivo, utilizando BSA en agua destilada como estándar. La lectura se realizó después de 10 min. en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras se tomaron alícuotas de cada una, en dilución determinada y se le agregó el reactivo; Esperando el tiempo correspondiente la absorbancia fue leída a la misma longitud de onda y su valor fue interpolado en la curva de calibración.

Todas las lecturas se realizaron contra su respectivo blanco, en este caso se utilizó agua destilada, (que también se usó para las diluciones de las muestras), con el reactivo de Bradford.

3.2.11 Purificación de calicreína glandular por electro-elución.

Para ello se realizaron una serie de geles en condiciones denaturantes, de un tamaño de, 95 x 100 x 0.75 mm donde sólo se cargó las proteínas totales de músculo junto con un estándar de peso molecular preteñido. Luego de ser fijado y teñido, como ya se conocía la ubicación de la banda, se procedió a cortarla del gel con ayuda de un bisturí.

Todos estos fragmentos del gel se sometieron a una electro-elución, utilizando una cámara de electro-elución (Elutor) siguiendo el protocolo del fabricante (Biorad). Se tomó el fragmento del gel, se colocó en el tubo de electro-elución sobre una membrana que dejaba pasar proteínas inferiores de 3,5 D y una frita porosa, todo esto inmerso en tampón de elución, este sistema se montó y se dejó 5 horas a 10 mA, 50 Volt.

Luego se extrajo la proteína que esta entre la membrana y la frita porosa. Esta fue sometida a diálisis en un "cassete" con un poro de exclusión de 10.000 Da contra PBS, a 4°C por toda la noche. Después de su purificación se almacenó a -20°C.

3.2.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se prepararon los geles con el sistema de tampón discontinuo en condiciones denaturantes descrito originalmente por Laemmli (1970). Las dimensiones de los geles fueron 95 x 100 x 0.75 mm y 16 x 20 x 0.5 cm organizados entre dos placas de vidrio y espaciadores de teflón. El gel separador se preparó con acrilamida-bisacrilamida 30% (p/v) 0,8% (p/v) respectivamente, a una concentración final de 12% (p/v), tamponado con Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 y SDS 0,4%. El gel espaciador, en cambio se preparó a una concentración final de 3,4% (p/v) tamponado con Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 y SDS 0,4%. Ambos fueron polimerizados con persulfato de amonio 0,05% (p/v) y TEMED 0,15% (p/v) de concentración final. Las muestras con tampón de muestra y con un 1.5% (v/v) de β -mercaptoetanol fueron denaturadas calentándolas por 20 min. en agua a 50° C, para luego ser cargadas cuidadosamente en los surcos del gel.

El sistema ya montado e inmerso en tampón de corrida, se aplicó aproximadamente una corriente de 10 mA hasta que el indicador del frente iónico llegó

al borde inferior del gel. Finalizada la electroforesis, el gel se fijó durante 1 h, luego se tiñó en solución de tinte por 12 h. Finalmente el gel se destiñó mediante repetidos lavados con una solución de desteñido hasta que el gel quedara completamente claro y sólo se apreciaran las bandas teñidas. Todas estas etapas se llevaron a cabo con agitación suave y constante en una plataforma rotatoria.

3.2.13 Electroforesis en Geles ácido-urea

Los geles se hicieron en placas de 15 x 15 x 0.15 cm al 10 y 12 % de concentración final de acrilamida. El gel separador se preparó con un 12.5% de un ácido acético 43.2% que contenía 4% de Temed. Más un 12.5% de Riboflavina 5mg/100ml. Con distintas concentraciones del stock de acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8%, para obtener el porcentaje requerido del gel. También se varió la concentración de urea que requiere el gel, desde 2.5 M a 6 M.

El gel espaciador es al 6 % del stock acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8%. Con un 20% de ácido acético 43.2% que contenía 4% de Temed, más un 20% de Riboflavina 5mg/100ml, y los gramos necesarios de urea para obtener una concentración final de 6 M.

Tanto el gel separador como el espaciador se dejaron gelificar frente a una lámpara de tubos fluorescentes durante aproximadamente 45 minutos.

Las muestras, de calicreína pura y extracto de proteínas de homogenizado de músculo de carpa, se prepararon en 10 M urea y 1.8 N ácido acético. Como indicador se usó Azur C 0.001 % disuelto en una solución de corrida (0.9 N ác. acético). Las corridas electroforéticas se hicieron entre 10-15 mA a temperatura ambiente. La fijación

y tinción se realizó en 0.2% de azul de Coomassie Brilliant R, 40% metanol y 10% ácido acético por aproximadamente una hora. La decoloración se llevo a cabo en una solución de 30% metanol y 10% ác. acético.

3.2.14 Inmunohistoquímica

3.2.14.1 Fijación y montaje de tejidos

Las hipófisis y los tejidos de los diferentes órganos (normales y tratados con 17β -estradiol) de carpas y salmónes fueron fijados en Formol salino 4% y Bouin acuoso por 48 h a temperatura ambiente. En seguida fueron deshidratados mediante una gradiente ascendente de etanol (50%, 70%, 80%, 90% y 100% (v/v)) seguido de alcohol-xilol (1:1), xilol-Histosec a 60°C, luego Histosec I y II por 30 min cada uno en estufa a 60°C siendo incluidas en el mismo medio. Finalmente los tejidos fijados se seccionaron con un micrótopo, obteniéndose cortes seriados de 5 μ m de grosor, los que se montaron en porta objetos de vidrio gelatinizados.

3.2.14.2 Inmunotinción

Los cortes incluidos en parafina se desparafinaron e hidrataron por inmersión en una batería de xiloles y una serie decreciente de etanoles y se trataron con una mezcla de metanol 70% (v/v) perhidrol 3% (v/v) durante 10 min para inactivar las peroxidas endógenas; seguidamente se lavaron los cortes 3 veces durante 5 min con PBS.

Primero los cortes se cubrieron con una solución de bloqueo (se probaron de dos tipos y no hubo diferencia alguna) por 30 min, luego de lo cual se lavó 3 veces durante

5 min en tampón TNT o “*washing buffer*”. Después se incubó con el primer anticuerpo anti-caliceína, anti-prolactina, etc. en solución de bloqueo durante 18 h; se lavó 3 veces durante 5 min en TNT; se incubó con el segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo, hecho en cabra, sin marcar durante (1:100) un mínimo de 30 minutos, se lavó 3 veces durante 5 min en tampón TNT. Se continuo con la incubación con un tercer anticuerpo anti-inmunoglobulina de cabra marcado con peroxidasa diluido (1:100) en solución de bloqueo durante 30 min; se lavó 3 veces durante 5 min en TNT. Para revelar se adicionó la solución de revelado por 15 min en oscuridad, agregando 15 μ l más de perhidrol a los 5 minutos de comenzado. Finalmente los cortes de tejido se deshidrataron, se sumergieron en xilol y se montaron con bálsamo de Canadá.

3.2.15 Inmunofluorescencia en cortes de hipófisis de carpa y salmón.

La metodología usada, es prácticamente la misma que se utiliza para inmunohistoquímica. Los cortes desparafinados se sometieron a un tratamiento para exponer epítopes, detallado en el punto siguiente. El bloqueo se realizó con el mismo tampón de bloqueo utilizado en las inmunos anteriores, durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron toda la noche en una cámara húmeda con los primeros anticuerpos anti-prolactina (1:250) hecho en ratón y anti-caliceína (1:500) diluidos en tampón de bloqueo. Después de 3 lavados con TNT, cada uno de 5 minutos, se incubo por 2 horas a temperatura ambiente con los segundos anticuerpos, anti-conejo acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 y anti-ratón acoplado a fluoróforo Alexa Fluor 568 ambos diluidos 1:200. Luego se lavó 3 veces con TNT y se monto con un medio especial para fluorescencia fabricado por DAKO.

3.2.16 Exposición de antígenos en cortes de hipófisis para inmunohistoquímica.

Para ello los cortes después de ser desparafinados e hidratados se sometieron a un tratamiento de horno microonda (MW) inmersos en tampón Citrato 20 mM, se hierven dentro del “*coplin*” a temperatura media en el MW, se dejó 3 minutos más en temperatura de descongelado. Luego se enfrió con el tampón por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó una vez en TBS por 5 minutos. Después de este tratamiento se siguió con la remoción de los peróxidos y se continúa la inmunohistoquímica de forma ya descrita.

3.2.17 Cuantificación de inmunohistoquímica.

En las reacciones de inmunohistoquímica se realizó un análisis semicuantitativo en los distintos tejidos de carpas, en las distintas condiciones de aclimatización y tratadas con 17β -estradiol. La cuantificación de las secciones de los diversos órganos y tejidos, fueron realizadas utilizando un sistema de imagen de digitalización automática por medio del programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics, USA), por el cual se determinó la densidad óptica integrada "*density optical integrated*" (IOD) sobre el área reactiva (reacciones positivas) a bajo aumento, para poder realizar la cuantificación en un área mayor de los cortes, de manera de hacerlos más representativos. En el análisis estadístico de los valores el t-test. $P < 0,05$ lo que es estadísticamente significativo. Donde $n=7$ y de cada una de las carpas se estudiaron distintas secciones de los diversos órganos, por lo tanto se analizó una mayor cantidad de muestras.

3.2.18 Ensayos de inmunodot.

Cada una de las muestras de mucus se aplicaron en cada casillero en forma de *spot*, se secó la nitrocelulosa y luego se incubó por 30 minutos con tampón de bloqueo y se incubó seis horas con el anticuerpo anti-CG de *Cyprinus carpio*, diluido en tampón de bloqueo. Se lavó tres veces por 5 minutos con TNT. Luego se incubó con el segundo anticuerpo marcado (1:1000) por 30 minutos, y se lavó de igual manera con TNT.

Se reveló la reacción con solución de revelado durante 15 minutos, y se detuvo con agua destilada.

3.2.19 Western Blot.

Primero se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de los homogenizados de los órganos de carpa y salmón, cargando distintas concentraciones de proteínas por carril, detalladas en cada experimento. Luego de realizada la corrida electroforética, los geles fueron electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia, se transfirió como mínimo 6 horas a 70 mA.

Se tomó la membrana ya transferida y se procedió a bloquear los sitios libres con solución de bloqueo. Luego se incubó con el primer anticuerpo dependiendo del experimento, a la dilución indicada en cada figura, con una incubación mínima de 4 horas, luego se realizan 3 lavados con TNT, cada uno de 5 minutos con agitación suave. Se incubó con el segundo anticuerpo marcado con peroxidasa anti-IgG de conejo, dilución 1:1000, por 1 hora. Luego se realizan 3 lavados con TNT, cada uno de 5 minutos con agitación suave.

Para el revelado la membrana, se incubó con solución de revelado por 15 minutos, agregando a los 5 minutos de reacción 15 μ l más de perhidrol, la reacción se detuvo sumergiendo la membrana en agua.

4. RESULTADOS

4. I Calicreína glandular en *Cyprinus carpio* y su aclimatización.

4.1 Inmundefección de calicreína de carpa.

Por los antecedentes previos, se sabía que calicreína glandular es abundante en extractos proteico de músculo de carpa y que no está presente en el hígado de esta (Figuroa et al, 2002). Como se muestra en la figura 1, (A) se puede apreciar el perfil electroforético de las proteínas de los extractos de músculo e hígado de carpa, en el cual se evidencian bandas de distintos tamaños teñidas con azul de Coomassie. En B se aprecia en músculo una intensa banda inmunorreactiva de 39 kDa obtenida con el anticuerpo anti-calicreína glandular del pez *Centropristis striata*. En hígado no se aprecian bandas inmunoteñidas.

4.2 Purificación de calicreína muscular por electroelución.

Con las datos ya obtenidos y teniendo claro la ubicación de la banda correspondiente a calicreína glandular en extractos proteicos de músculo de carpa, en geles denaturantes teñidos con azul de Coomassie, se realizó una serie de estos geles de poliacrilamida grandes bajo las mismas condiciones, detallados en materiales y métodos 3.2.12. Se fraccionaron extractos proteicos de músculo de carpa y luego se tiñeron los geles con azul de Coomassie. Como se tenía claridad respecto a la ubicación de la banda correspondiente a calicreína glandular, con ayuda de un bisturí y un

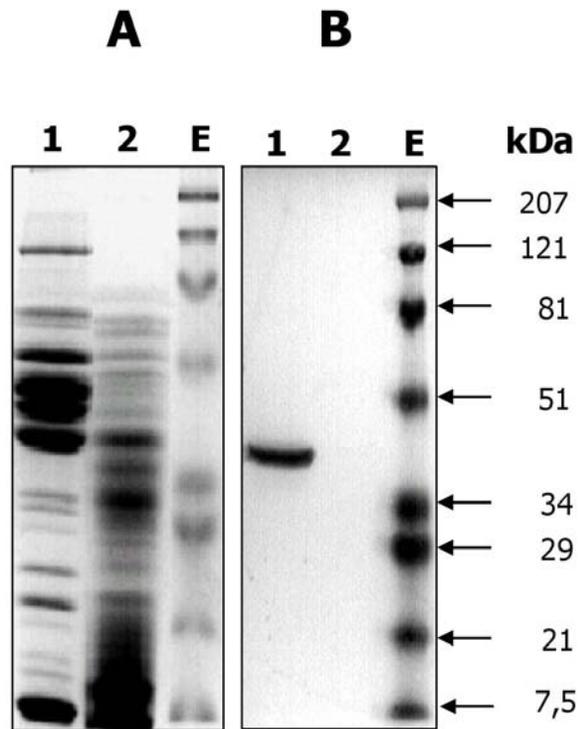


Figura 1: Calicreina glandular en músculo de carpa.

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, teñido con azul de Comassie. Carril E: estándar preteñido de amplio rango de peso molecular. Carril 1: extracto de músculo y 2: extracto de hígado (40 μ g proteínas totales).

B) Western blot del gel mostrado en A con suero anti-calicreína del pez *Centropristis striata* (dilución 1:100), con segundo anticuerpo marcado con peroxidasa (Figuroa *et al.*, 2002).

transiluminador se procedió a cortarla. Así se obtuvo una serie de trozos de gel que contenían esta proteasa. La proteína contenida en el gel se electroeluyó de este, como se señaló en materiales y métodos 3.2.11. Luego, se dializó toda la noche, a 4°C, contra un tampón fosfato pH 7,4 (PBS) para eliminar el SDS y el colorante. Y luego se procedió a evaluar su purificación. Como se muestra en la figura 2, en A la proteína electroeluída fraccionada en un gel al 12% y teñida con azul de Coomassie, denota la presencia de sólo una banda de 39 kDa y en B se aprecia la misma banda inmunorreactiva obtenida con el anticuerpo anti-calicleína glandular del pez *Centropristis striata*. De esta forma se comprobó en una primera etapa la obtención de CG purificada a partir de músculo de carpa.

4.3 Fraccionamiento de calicleína purificada en geles Ácido- Urea.

Para corroborar la purificación de calicleína, se realizó otro tipo de fraccionamiento proteico, en geles ácido-urea, donde en este tipo de geles las proteínas migran principalmente por su carga eléctrica. La figura 3 muestra la estandarización de los geles ácido-urea en distintas condiciones. Para obtener una banda nítida y definida. Esto se logró a una concentración de 6M urea y 12% de poliacrilamida en ausencia del detergente Triton-X100, donde se aprecia una única banda, que corresponde a calicleína purificada.

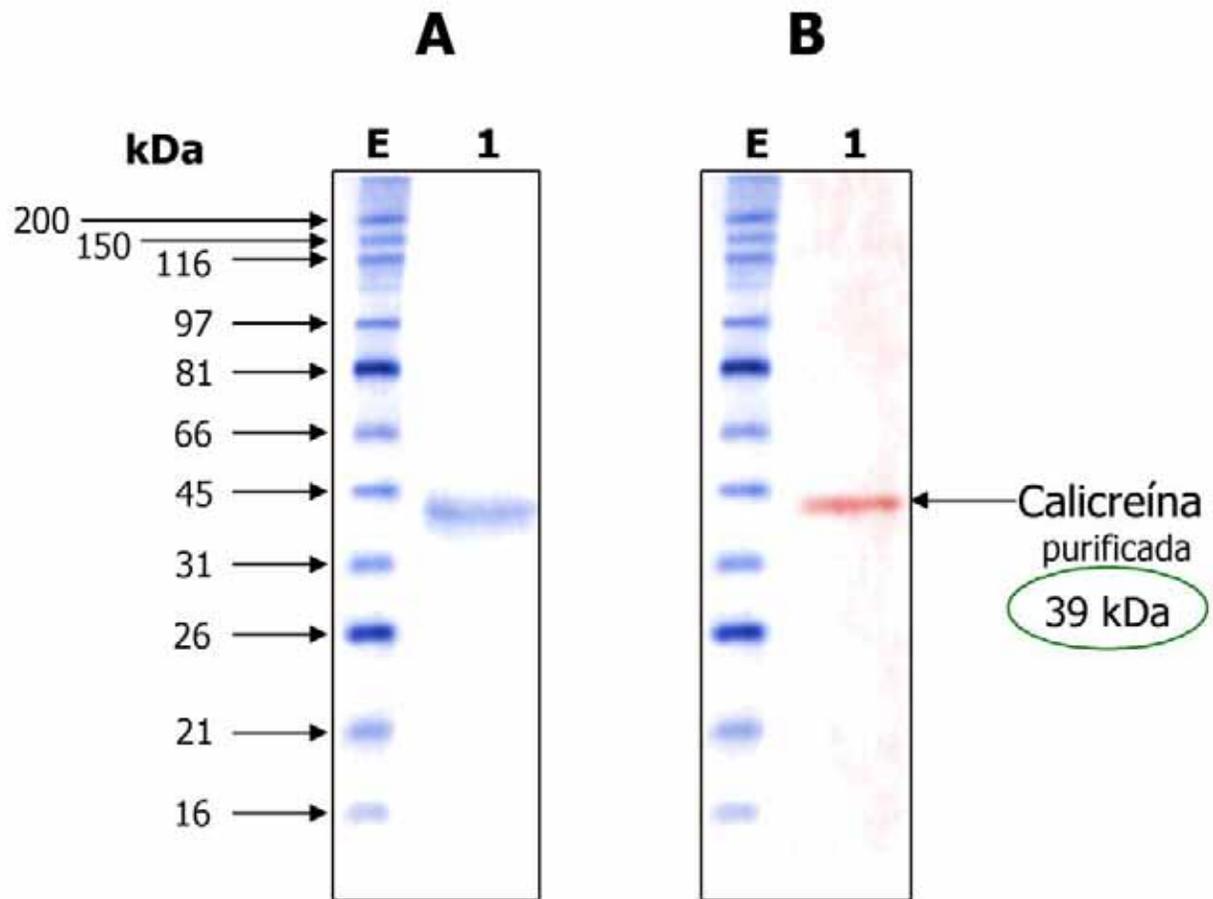


Figura 2: Calicreína muscular purificada por electroelusión.

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, teñido con azul de Comassie. Carril E: estándar preteñido de amplio rango de peso molecular. Carril 1: calicreína purificada por electroelusión (10 μg proteínas totales).

B) Western blot del gel mostrado en A con suero anti-calicreína del pez *Centropomus striatus*. (dilución 1:100) y segundo anticuerpo marcado con peroxidasa.

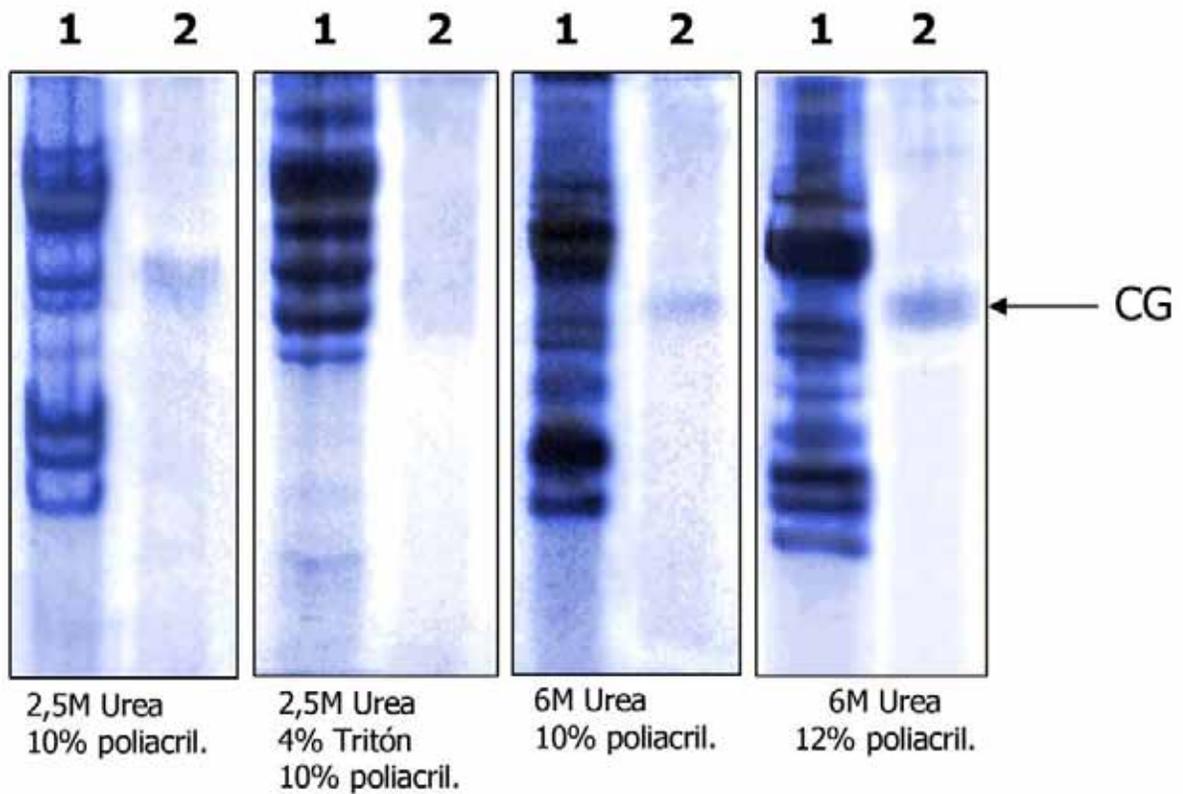


Figura 3: Electroforesis de calicreína muscular purificada en geles Acido-Urea.

Carriles 1: proteínas totales de homogenizado de músculo de carpa (50 µg/carril). Carriles 2: calicreína purificada por electroelución. (20 µg/carril). Las condiciones de electroforesis en cada caso, están señaladas bajo cada imagen.

4.4 Generación de anticuerpos policlonales anti-callicreína glandular de músculo de carpa.

Teniendo la proteína purificada y almacenada a 4°C, se procedió a la producción de anticuerpos policlonales en conejo, como se detalló en materiales y métodos 3.2.1.

4.5 Análisis de Western blot de CG en distintos órganos del pez *Cyprinus carpio*.

Con el anticuerpo homólogo recién generado, se quiso evaluar la presencia de CG en distintos órganos de carpa. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes. En la figura 4 se pueden apreciar los perfiles electroforéticos de las proteínas de los sobrenadantes de los homogenizados de distintos tejidos de carpa, evidenciándose una serie de bandas de distintos tamaños teñidas con azul de Coomassie, junto al estándar de peso molecular (carril E). En la figura 5, se observan una serie de Western blot con distintas diluciones del anticuerpo anti-CG de *Cyprinus carpio*. El orden de las muestras de estas membranas corresponden al mismo de las cargadas en el gel de la figura 4. En estos inmunoblots se aprecian intensas bandas inmunorreactivas de 39 kDa en todos los órganos, y con mayor intensidad en el carril de músculo (carril 1). Además, se aprecia otra banda inmunorreactiva de 79 kDa exclusivamente en hipófisis que podría corresponder a una forma inactiva de la proteasa, es decir, de una forma precursora o de un dímero, (existen datos experimentales no mostrados que así lo indican) entre otras posibilidades (carril 3). Con este ensayo se concluyó que la dilución óptima de trabajo para ensayos de Western blot es de alrededor de 1:1000 (figura 5B).

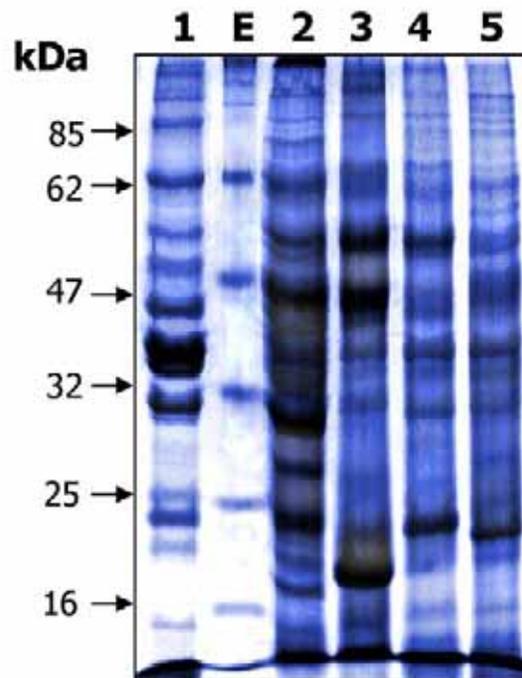


Figura 4: Electroforesis de homogenizados de diversos órganos de carpa.

Se separó en PAGE al 12% en condiciones denaturantes, 50 μ g de proteínas totales de diferentes órganos de carpa. El gel fue revelado por tinción con azul de comassie. Carril 1: músculo, E: estándar de peso molecular preteñido, 2: hígado, 3: hipófisis, 4: branquias y 5: riñón.

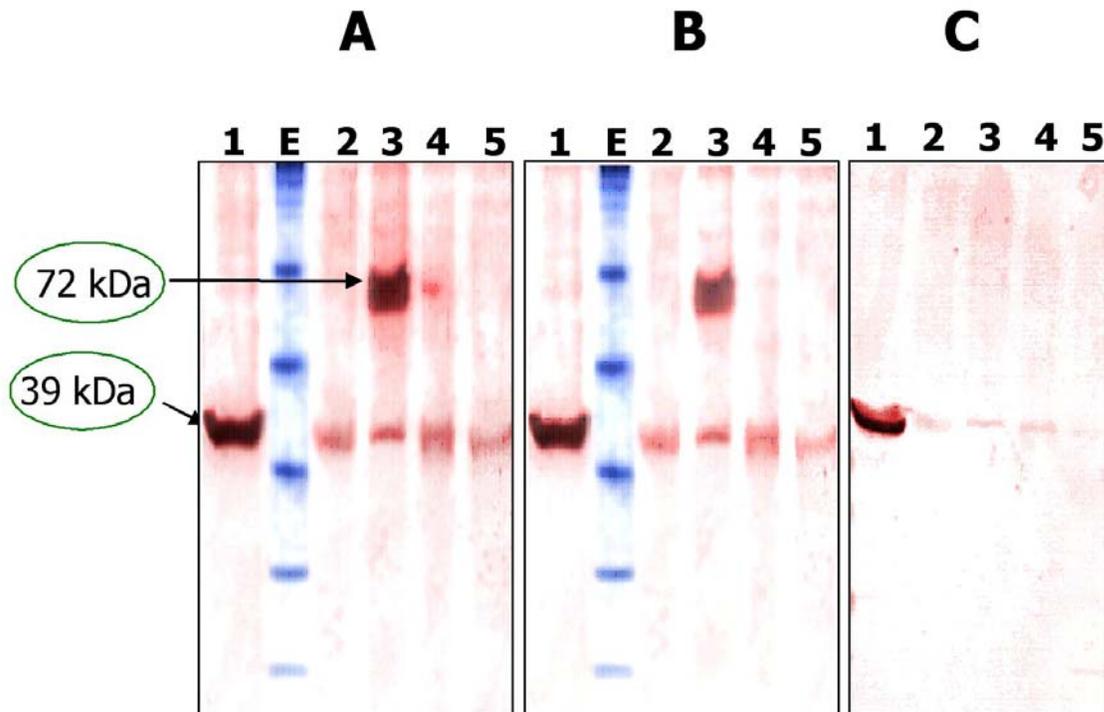


Figura 5: Análisis de Western blot del gel mostrado en la figura 4. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo anti-caliceína glandular de *Cyprinus carpio*, en diferentes diluciones. **A)** 1:500, **B)** 1:1000, **C)** 1:5000. Carril 1: músculo, E: estándar de peso molecular preteñido, 2: hígado, 3: hipófisis, 4: branquias y 5: riñón.

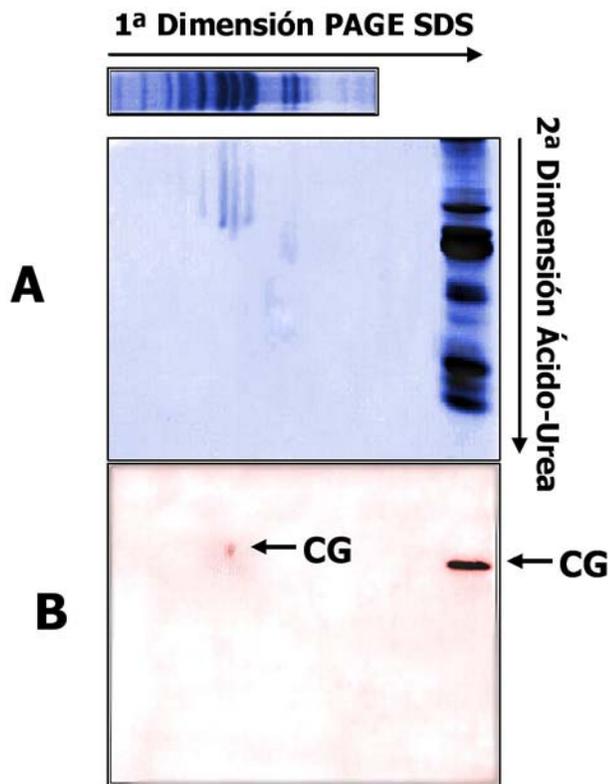


Figura 6: Análisis electroforético bidimensional de proteínas de extracto de músculo.

A) Primera dimensión, PAGE en condiciones denaturantes y segunda dimensión en geles ácido-urea (poliacrilamida al 12% y Urea 6M), teñido con azur C. **B)** Western blot del gel mostrado en A, con el antisuero anti-CG de carpa (dilución 1:2500).

4.6 Análisis electroforético “pseudo” bidimensional de calicreína glandular.

Con el fin de evaluar que el anticuerpo anti-CG de carpa reconoce una sola proteína, se realizó un análisis “pseudo” bidimensional. Como se muestra en la figura 6; se trató de unificar dos técnicas de fraccionamiento proteico en geles de poliacrilamida, en distintas condiciones. Se fraccionó un extracto proteico de músculo de carpa en gel PAGE-SDS, que corresponde a la primera dimensión. Luego este carril completo se colocó sobre un gel ácido-urea, bajo condiciones ya estandarizadas (figura 3). En A se muestra el gel teñido con azul C, donde se evidencia la presencia de distintas bandas y “spots” teñidos. Las proteínas de este gel se transfirieron y la membrana se incubó con el anticuerpo homólogo de CG, como se muestra en B. En ella se observa una única banda, junto con un solo “spot” a una altura similar, reconociendo el anticuerpo a una sola proteína, que corresponde a calicreína muscular.

4.7 Inmunodetección de calicreína glandular en orina humana.

Otro control utilizado para corroborar que el anticuerpo anti-CG muscular de carpa, reconoce la misma proteína que otros anticuerpos anti-calicreína glandular, se fraccionaron proteínas concentradas de orina humana en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturantes, luego estos se transfirieron y las membranas se incubaron con distintos anticuerpos anti-CG, como se muestra en la figura 7. Se puede apreciar en A, que tanto el anticuerpo anti-CG humana, como los anti-CG de peces reconocen la misma forma de la proteína de 85 kDa, que corresponde a una forma altamente glicosilada de la proteína original de aproximadamente 39 kDa.

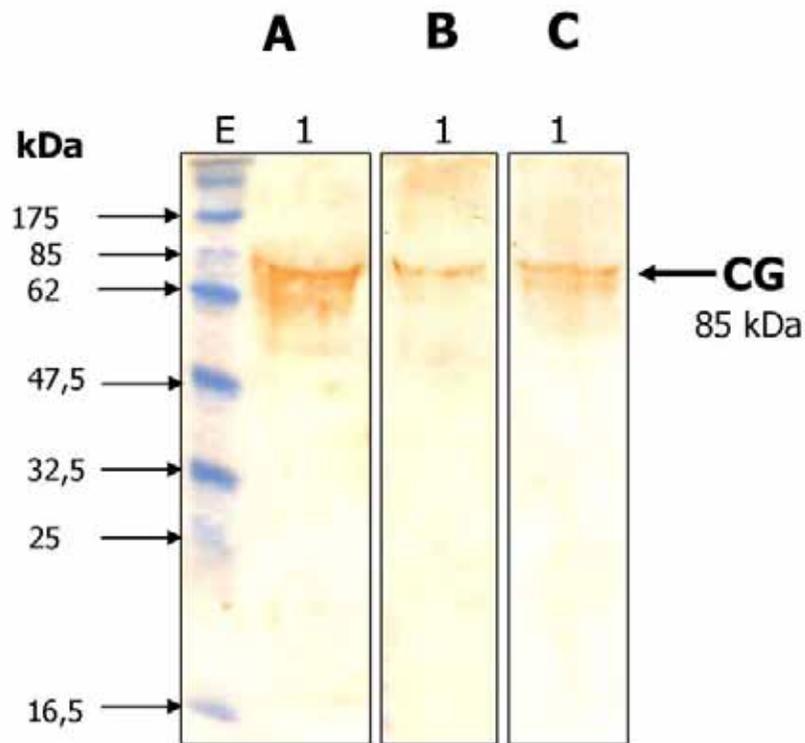


Figura 7: Inmunodetección de calcitreína glandular en orina humana.

A) Inmunodetección con anticuerpo anti-calcitreína humana. **B)** Inmunodetección con anticuerpo anti-calcitreína del pez *Centropomus striata*. **C)** Inmunodetección con anticuerpo anti-calcitreína del pez *Cyprinus carpio*. Carril E: estándar preteñido de peso molecular, y carril 1: proteínas de orina humana (25 µg).

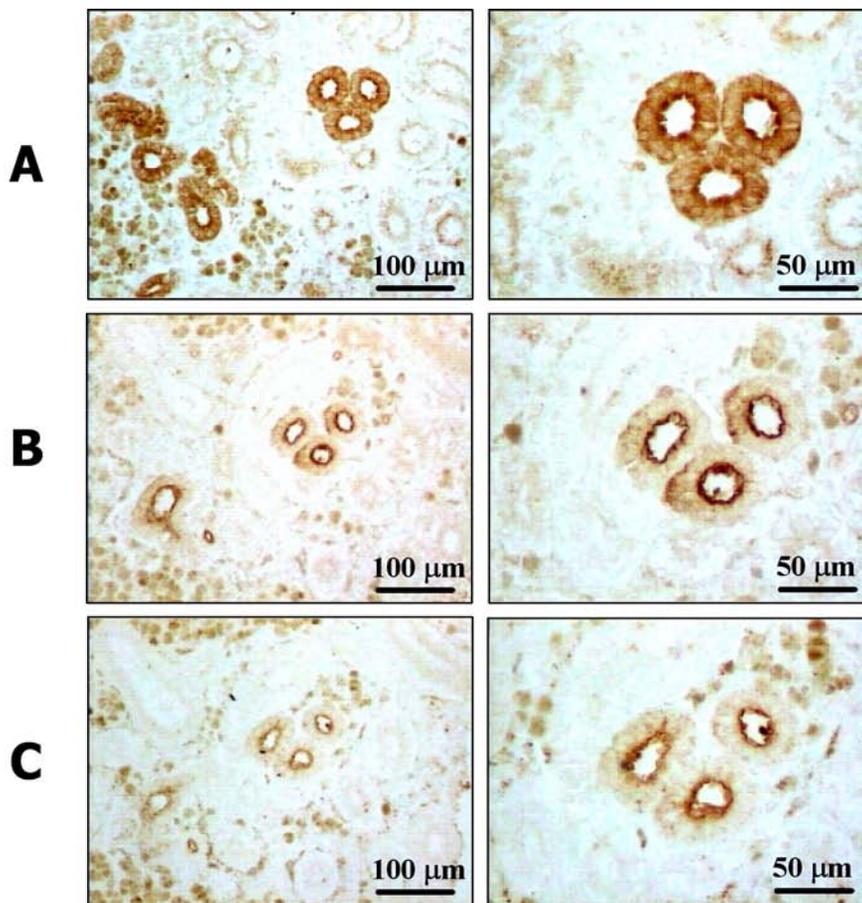


Figura 8: Detección inmunohistoquímica comparativa de calicreina glandular en cortes de riñón de carpa.

Se incubó cortes de riñón de carpa con diferentes anticuerpos anti calicreina glandular. **A)** Anti-CG carpa. **B)** Anti-CG humano. **C)** Anti-CG rata.

4.8 Detección comparativa de Inmunohistoquímica de calicreína glandular.

También se realizó inmunohistoquímicas comparativas en cortes seriados de riñón de carpa, utilizando el anticuerpo homólogo producido y dos heterólogos de humano y rata, como se muestra en la figura 8. Se aprecia que con los tres anticuerpos se obtiene la misma inmunolocalización, a nivel de los tubulos colectores proximales, principalmente hacia el lumen tubular. Por lo tanto, el anticuerpo homólogo producido y los heterólogos reconocen a las mismas proteínas, tal como se mostró en las figuras 7, correspondientes a los controles del Western Blot.

4.9 Inmunodetección de calicreína glandular en distintos órganos de carpa.

Teniendo como nueva herramienta de trabajo el anticuerpo homólogo anti-CG de carpa, se realizó una serie de reacciones inmunohistoquímicas en cortes de órganos de carpa, comparando la reacción obtenida con la del anticuerpo anti-CG del pez *Centropristis striata*.

4.9.1 Inmunodetección de calicreína glandular en músculo

Se realizaron detecciones inmunohistoquímicas en cortes transversales de músculo de carpa, con el anticuerpo anti-CG de carpa, como se muestra en la figura 9. Se puede evidenciar claramente que la inmunorreacción se localiza principalmente en las células musculares. Al contrario del anticuerpo anti-CG de *C. striata* la reacción se localiza en el tejido intercelular

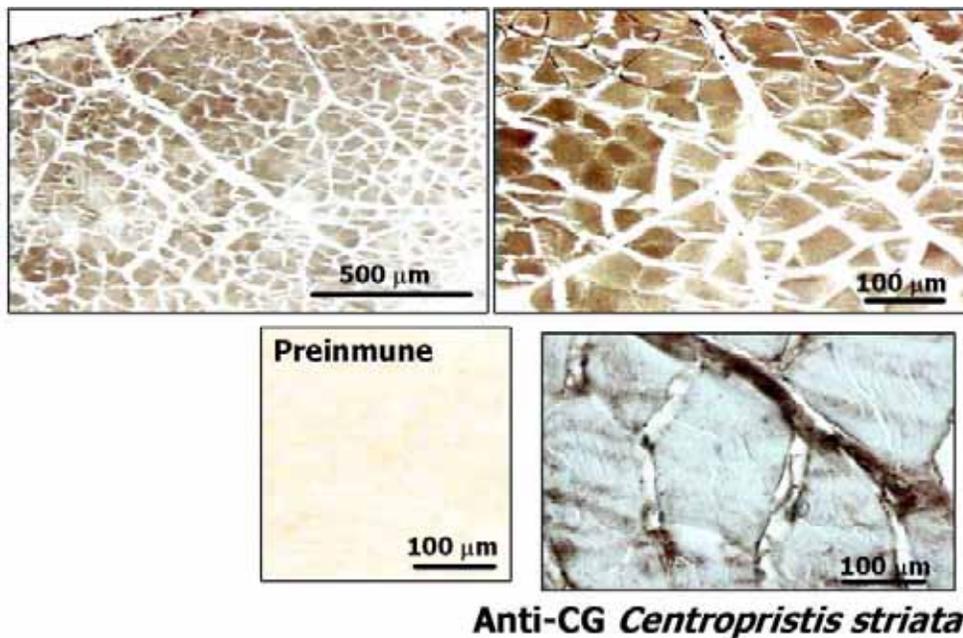


Figura 9: Inmunodetección de calicreína en cortes transversales de músculo de carpa.

Los anticuerpos fueron generados en distintos conejos, negro y blanco. Ambos antisueros fueron utilizados a una dilución 1:1000. Como control de reacción se aprecia la inmunotinción generada por el anti-calicreína de *Centropristis striata*.

4.9.2 Inmunodetección de calicreína glandular en branquias.

Se realizó en cortes sagitales de branquias de carpa, utilizando el anticuerpo anti-CG de carpa a una dilución de 1:1000. En la figura 10 se aprecia claramente una reacción específica sobre algunas células epiteliales de las branquias, principalmente en la zona basal de las láminas branquiales, al igual que con el anticuerpo heterólogo del pez *Centropristis striata*.

4.9.3 Inmunodetección de calicreína glandular en riñón de carpa.

Realizada en cortes transversales de riñón del pez, como se muestra en la figura 11. Se aprecia claramente una reacción específica sobre los túbulos distales (TD), que son fácilmente identificables por su forma regular con un lumen pequeño y en los tubulos proximales (TP), que son de mayor tamaño e irregulares. Además se observan los pigmentos propios del riñón, y una clara reacción negativa a nivel de los glomérulos. Se visualiza una reacción positiva en células del estroma renal. Como control y comparación se muestra la inmunorreacción con el anticuerpo anti-CG de *Centropristis striata*, donde se obtiene el mismo patrón de reacción en los tubulos, y también en los otros tipos celulares ya nombrados (datos no mostrados).

4.9.4 Inmunodetección de calicreína glandular en cortes de piel.

Como se muestra en la figura 12, en cortes transversales de piel de carpa, se ven los distintos estratos de la piel, con su intenso pigmento característico que se observa con claridad bajo el estrato epitelial en el control negativo. La reacción obtenida con el anticuerpo anti-CG de carpa se aprecia a nivel del estrato basal de la piel, y en algunas porciones con fuerte intensidad en la superficie de la dermis (flecha).

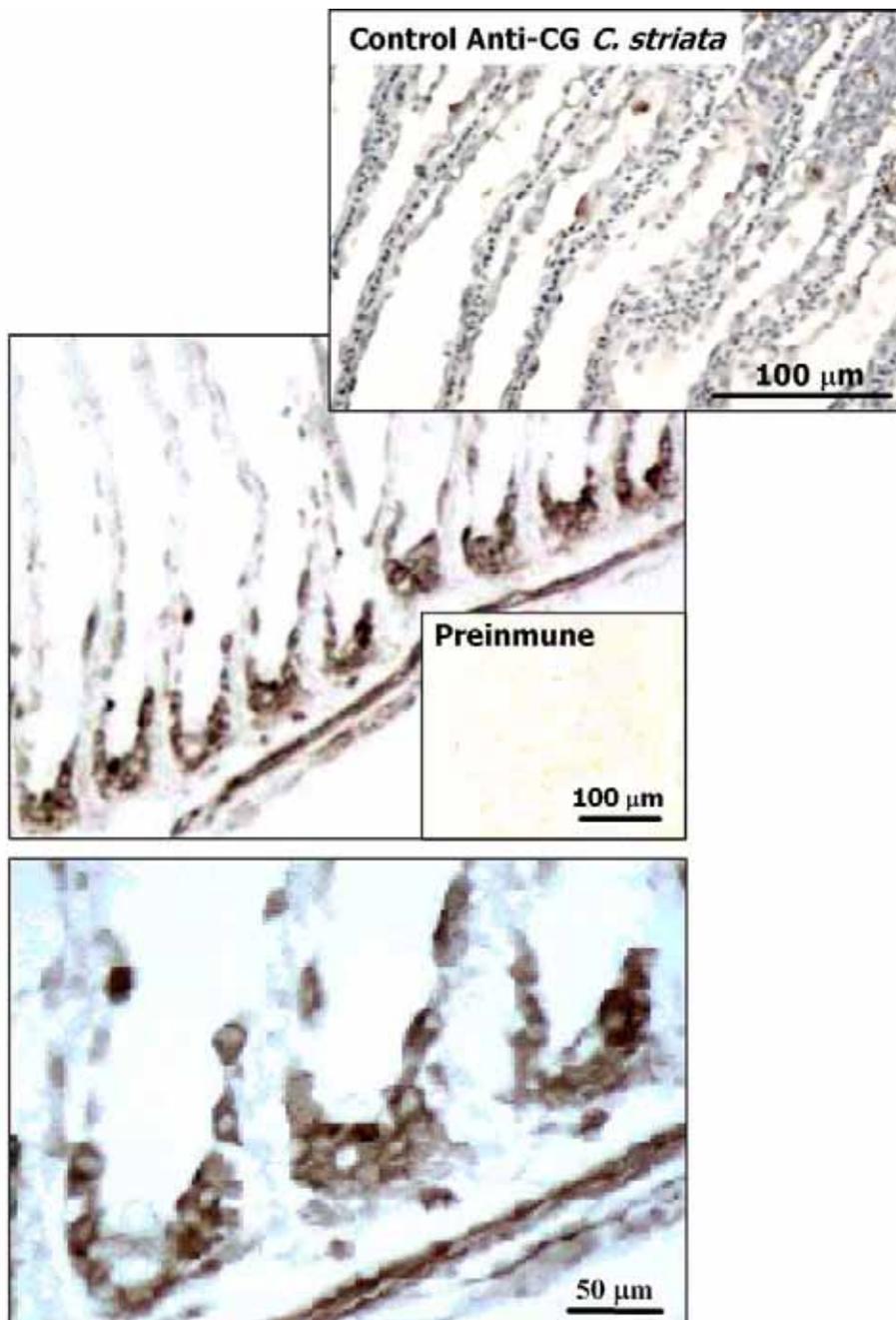


Figura 10: Inmunodetección de calicreína en cortes sagitales de branquias de carpa.

Dilución del anticuerpo anti-calicreína (carpa) 1:1000. Como control se usó anti-CG *Centropristis striata* (1:100), este tiene tinción de contraste.

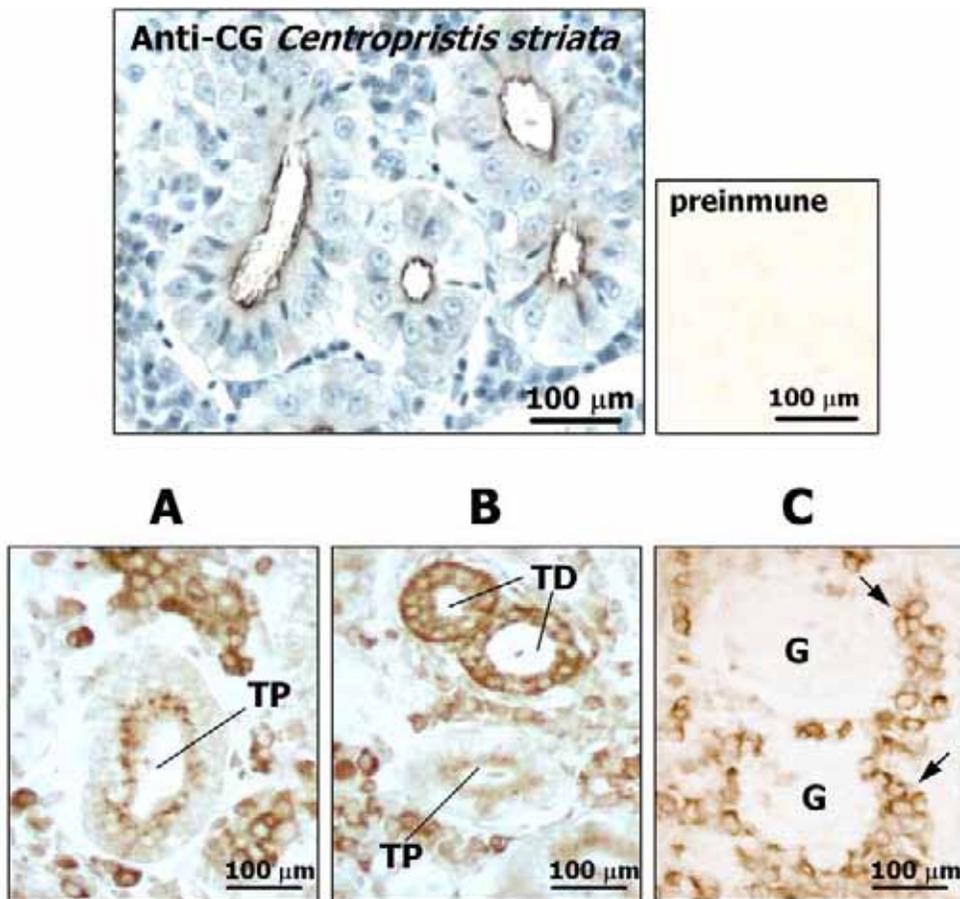


Figura 11: Inmunodetección de calicreína en cortes transversales de riñón de carpa.

Se observa la distribución de calicreína en las distintas secciones del sistema renal de carpa; **A)** tubulos proximales (TP), **B)** tubulos proximales y distales (TD), **C)** glomerulos (G) y células del estroma renal señaladas por una flecha. Dilución del anticuerpo 1:1000. Como control se muestra la inmunoreacción con anti-CG *Centropristis striata* (este tiene tinción de contraste).

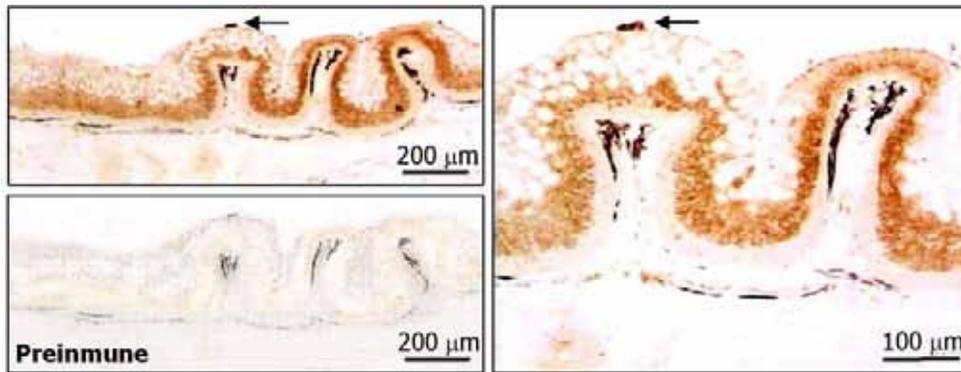


Figura 12: Inmunodetección de callicreína en cortes transversales de piel de carpa.

Se muestra la reacción obtenida en células basales de piel de carpa utilizando una dilución del anticuerpo anti CG-carpa 1:2500. Como control se muestra la reacción con suero preimmune.

4.9.5 Inmunodetección de calicreína glandular en cortes de hígado.

Realizado en cortes longitudinales de hígado de carpa, con una dilución de 1:1000 del anticuerpo anti-CG de carpa. Como muestra en la figura 13, se ve una reacción positiva, en islotes celulares bien definidos, que corresponden a parte del páncreas del pez, también se observan pigmentos propios del tejido, como se muestra en el control negativo con el suero preinmune.

4.10 Inmunohistoquímica comparativa de calicreína glandular en cortes de hipófisis.

Otro aspecto que se sometió a análisis es el efecto de la aclimatización en la expresión de CG en hipófisis de carpa comparando además dos fijadores: Formol y Bouin acuoso. Como se muestra en la figura 14, las inmunohistoquímicas fueron realizadas con el anticuerpo anti-CG de carpa, todas a la misma dilución 1:1000. En A el tejido fue fijado en Formol y en B en Bouin. Con ambos fijadores no se ve diferencia alguna en la intensidad de reacción. Sin embargo, al comparar las hipófisis obtenidas en las estaciones extremas, se evidencia claramente el aumento de la inmunorreacción en el tejido de verano, sometido a ambos fijadores.

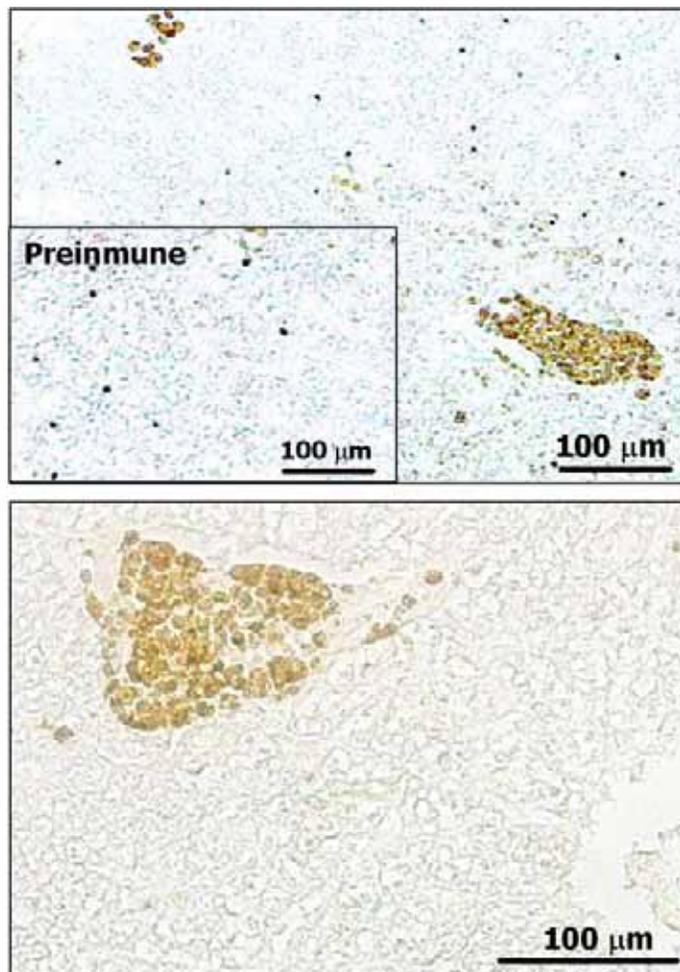


Figura 13: Inmunodetección de calicreina en cortes transversales de hígado de carpa.

Hepatopancreas de carpa inmunoteñido con el anticuerpo anti CG-carpa 1:2500. Como control se muestra la reacción con suero preinmune.

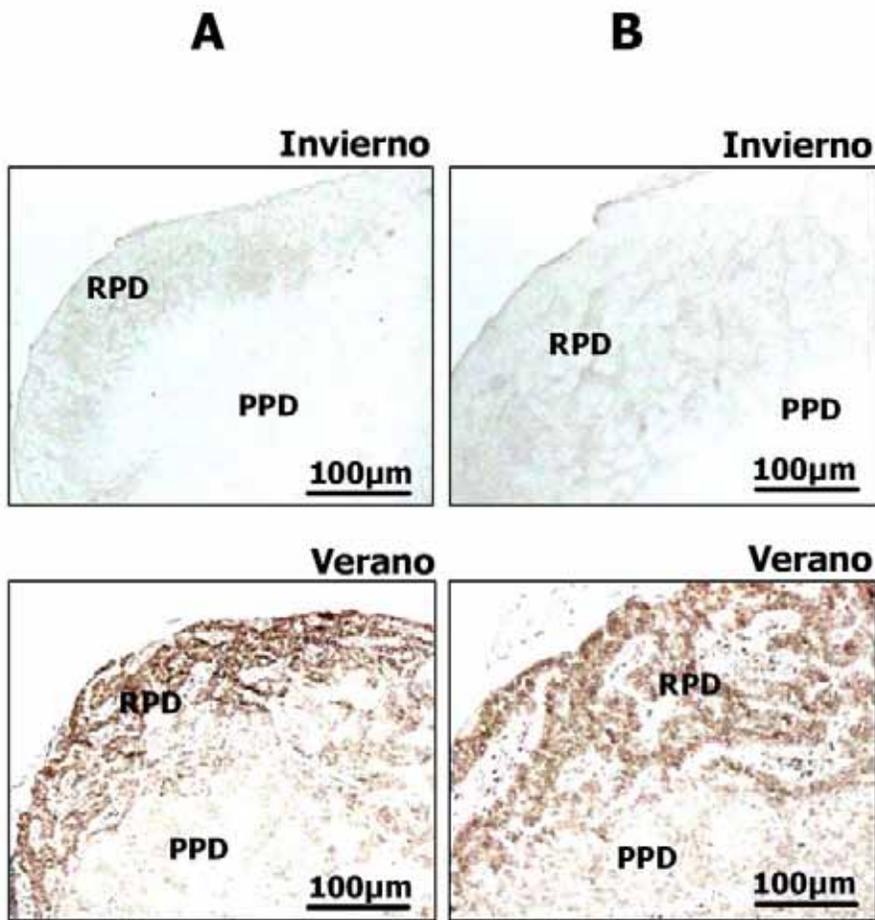


Figura 14: Comparación inmunohistoquímica de calicreína en hipófisis.

Se analizó el contenido de calicreína en pituitarias de carpas aclimatizadas a las estaciones extremas (invierno y verano), con distinto fijador. **A)** Formol. **B)** Bouin acuoso. Anticuerpo anti-CG (1:1000).

4.11 Inmunofluorescencia doble de prolactina y calicreína glandular en hipófisis de carpa por análisis confocal.

Con el fin de tratar de vislumbrar la posible colocación de prolactina y calicreína en el mismo tipo celular se realizó la inmunofluorescencia doble, detallada en materiales y métodos 3.2.15. Los cortes sagitales de hipófisis fueron tratados previamente con microonda e incubados luego con ambos anticuerpos primarios, posteriormente con los anticuerpos conjugados a distintos fluoróforos, revelando prolactina con Alexa Fluor 568 (rojo) y calicreína con Alexa Fluor 488 (verde), lo que se muestra en la figura 16. En A prolactina, B calicreína, C la sobre posición de ambas imágenes (A y B). y en D los controles realizados solo con los anticuerpos secundarios, controles para la figura 15 y 16. En la figura 16 se muestra la misma figura 15 con mayor aumento, visualizándose dos tipos celulares aparentes, uno que sintetiza prolactina y otro calicreína, no existiendo colocación alguna.

4.12 Efecto de 17β -estradiol en la expresión de calicreína glandular en distintos órganos de carpa.

Otro parámetro a estudiar fue cómo el estradiol estaría involucrado en la síntesis de calicreína y además evaluar si existe una correlación con el proceso de aclimatización. Para ello se obtuvieron muestras de verano e invierno, de carpas tratadas y no tratadas con estradiol. El tratamiento realizado en las carpas, fue descrito en el punto 3.2.3 de materiales y métodos. Para la inmunohistoquímica se empleó el suero anti-CG de carpa a una dilución de 1:1000 y se usó el mismo sistema de detección, segundo anticuerpo y amplificación mencionados en materiales y métodos

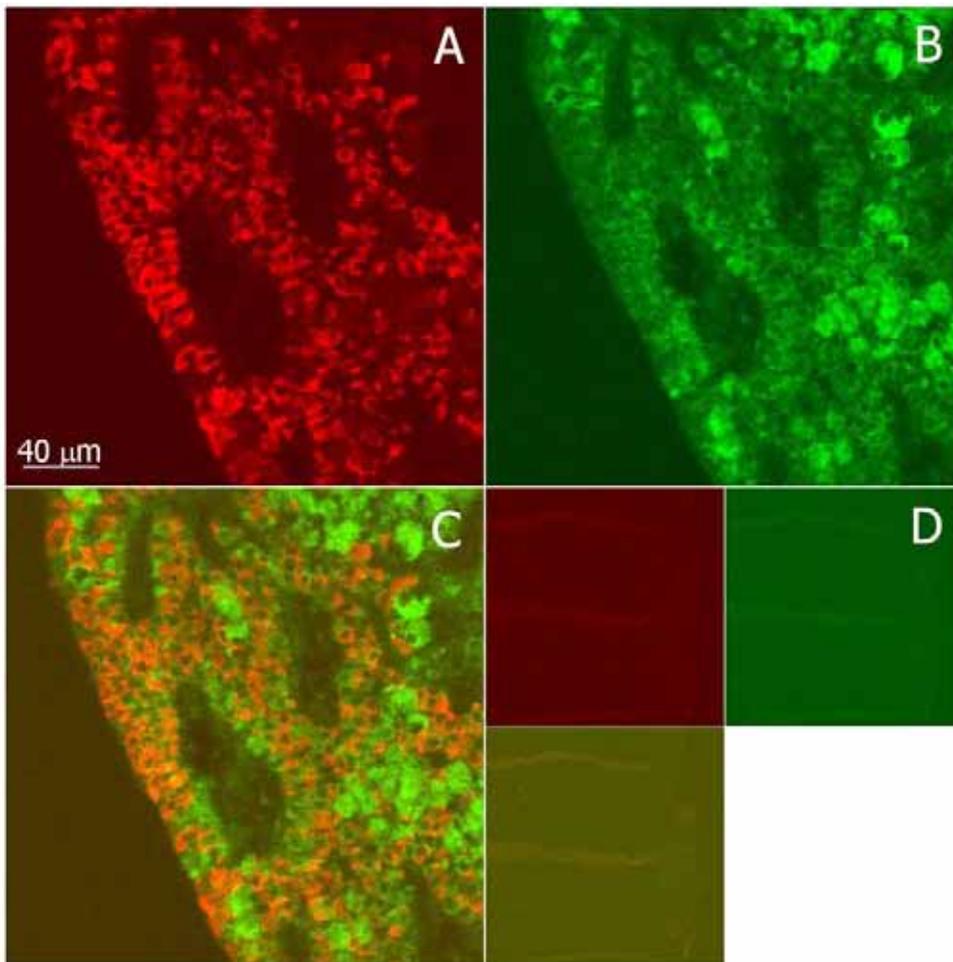


Figura 15: Localización celular de prolactina y calicreina en hipófisis de carpa por análisis confocal.

A) Prolactina fue detectada usando un anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 568 (rojo). **B)** Calicreina fue detectada usando un anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). **C)** Sobreposición de A y B. **D)** Controles de emisión sólo con los segundos anticuerpos.

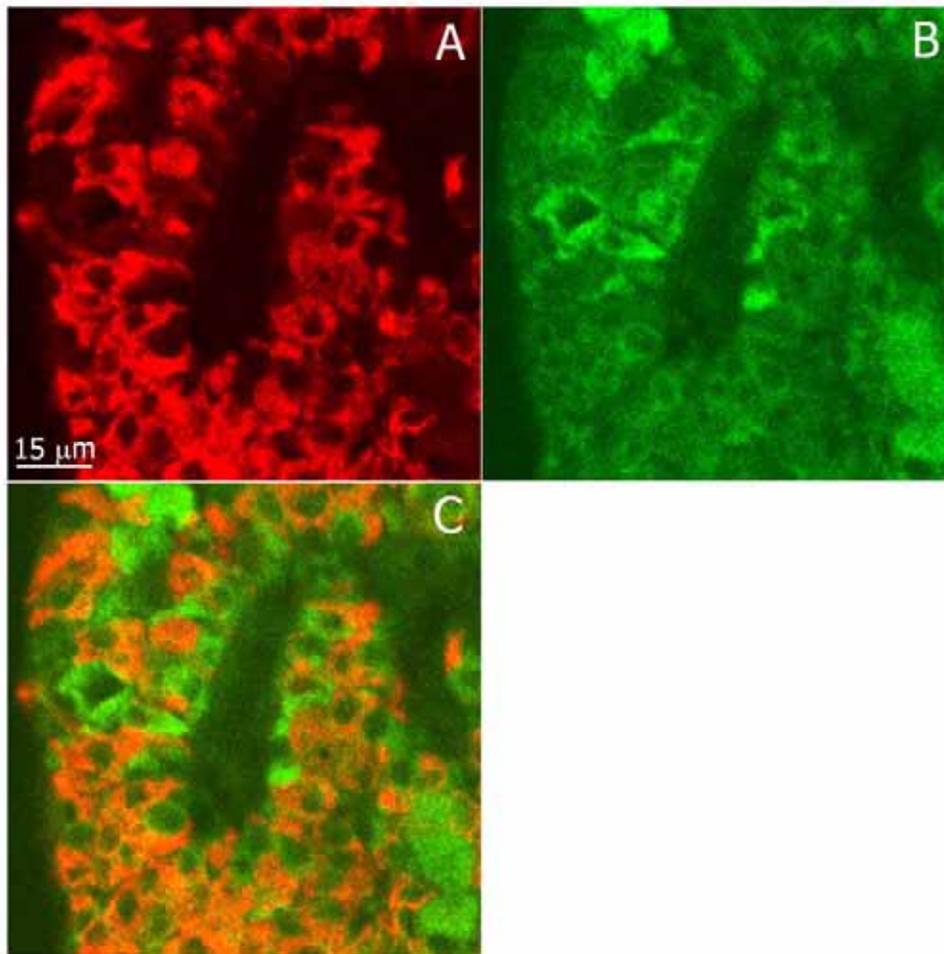


Figura 16: Localización subcelular de prolactina y calicreina en hipófisis de carpa por análisis confocal.

A) Prolactina fue detectada usando un anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 568 (rojo). B) Calicreina fue detectada usando un anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). C) Sobreposición de A y B.

Se realizó las reacciones inmunohistoquímicas en cuatro individuos no tratados y en cinco individuos tratados con estradiol. La intensidad de la reacción inmune se analizó semicuantitativamente en forma digital por el programa Image-Pro-Plus, como densidad óptica integrada (IOD). Todas las IHQ comparativas se realizaron en paralelo.

4.12.1 Inmunodetección de CG en músculo

Realizadas en cortes transversales de músculo esquelético de carpas aclimatizadas a verano e invierno y tratadas y no tratadas con estradiol. Como se muestra en la figura 17, no se aprecia un cambio significativo de la inmunorreacción entre cada estación, pero al ser inducidos con estradiol individuos de invierno, evidencian un aumento de la inmunorreacción, alrededor de 2,5 veces más con respecto a los individuos de verano, siendo apreciable a simple vista, tanto en la foto de la inmunohistoquímica, como por el análisis de densidad óptica integrada (IOD) de las imágenes procesadas, como muestra el gráfico construido a partir del análisis digital de la reacción inmunohistoquímica.

4.12.2 Inmunodetección de CG en branquias.

Realizadas en cortes sagitales de branquias de carpa aclimatizadas a invierno y verano, inyectadas y no inyectadas con estradiol. En la figura 18 se muestra la inmunohistoquímica realizada y su respectiva cuantificación, donde no se evidencia cambios significativos entre las dos estaciones en estudio, pero sí se observa un aumento claro de la inmunorreacción en las carpas de verano tratadas con la hormona. Un aumento aproximado de 2 veces, considerado un incremento significativo, que se muestra claramente en el gráfico de barras.

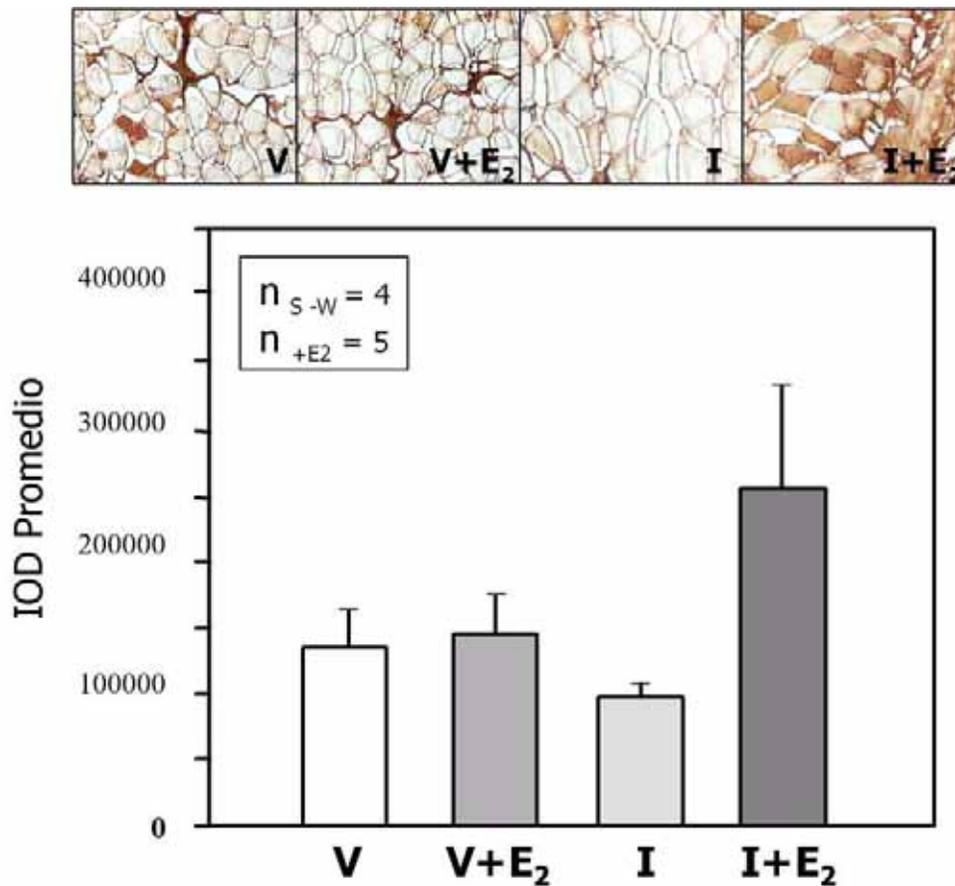


Figura 17: Efecto de 17 β -estradiol en la expresión de caliceína en músculo.

Se analizó cuantitativamente por el programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) la inmunorreacción de caliceína en músculo de carpas aclimatizadas a verano (V) e invierno (I) y al mismo tiempo tratadas con estradiol (V+E₂ e I+E₂). La inmunorreacción fue cuantificada como densidad óptica integrada (IOD).

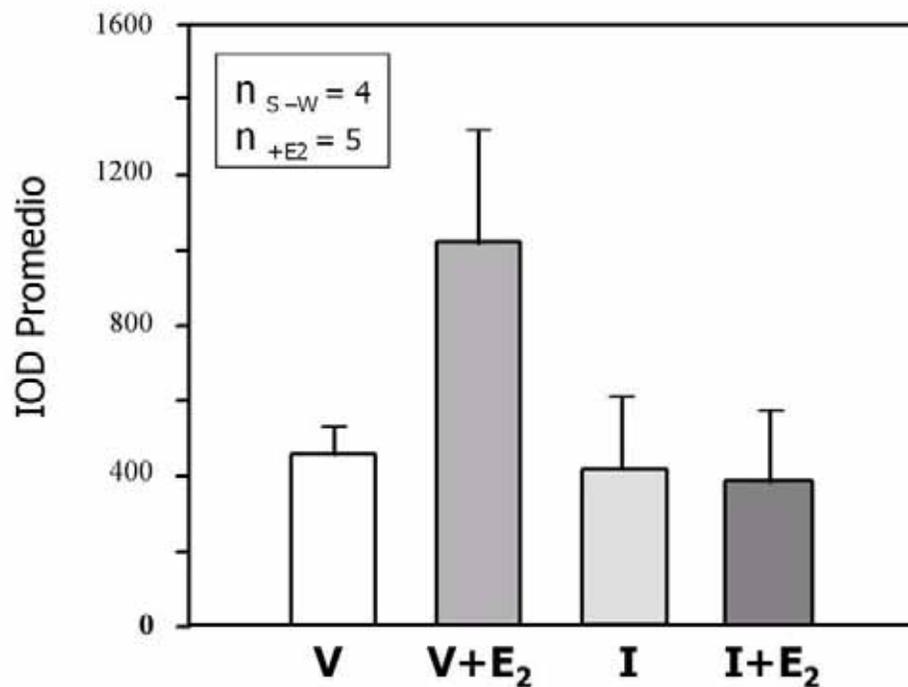
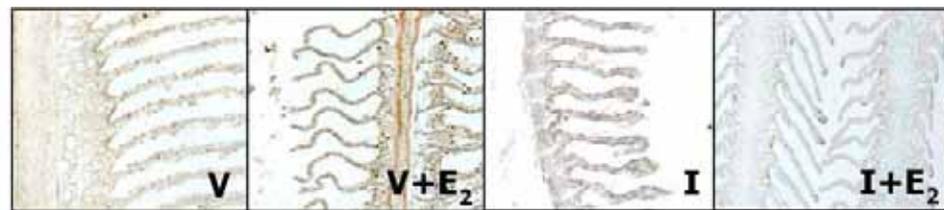


Figura 18: Efecto de 17 β -estradiol en la expresión de caliceína en branquias.

Se analizó cuantitativamente por el programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) la inmunorreacción de caliceína en músculo de carpas aclimatizadas a verano (V) e invierno (I) y al mismo tiempo tratadas con estradiol (V+E₂ e I+E₂). La inmunorreacción fue cuantificada como densidad óptica integrada (IOD).

4.12.3 Inmunodetección de CG en riñón.

Realizadas en cortes transversales de riñón de carpa aclimatizadas a las estaciones extremas, tratadas y no tratadas con estradiol. Como se muestra en la figura 19, tanto en las imágenes de las IHQ, como en la grafica de los resultados, el estrógeno parece no estar ligado al proceso de aclimatización, pero los individuos inyectados de verano presentan un aumento de 2,5 veces de inmunotinción con respecto a los no tratados. Observándose también un aumento de 1,5 veces más de reacción en los peces de invierno tratados con estradiol, que en los no estimulados de la misma estación.

4.13 Inmunodetección de calicreína glandular en explantes de hipófisis.

Estos explantes se cultivaron *in-vitro*, detallado en materiales y métodos 3.2.5 a dos temperaturas de 10°C y 23°C, simulando la temperatura del pez en el río en invierno y verano respectivamente. Estos tejidos se fijaron en Bouin acuoso y se procesaron como ya fue descrito, para realizar cortes de 5µm para Inmonohistoquímica. Los cortes se trataron previamente con microondas, y luego se incubaron con el anticuerpo anti-CG de carpa a una dilución de 1:2500. En la figura 20, se muestran las inmunohistoquímicas comparativas entre ambos estados de temperatura a los que fueron sometidos los explantes, como se aprecia no existe alguna diferencia considerable en la intensidad de reacción.

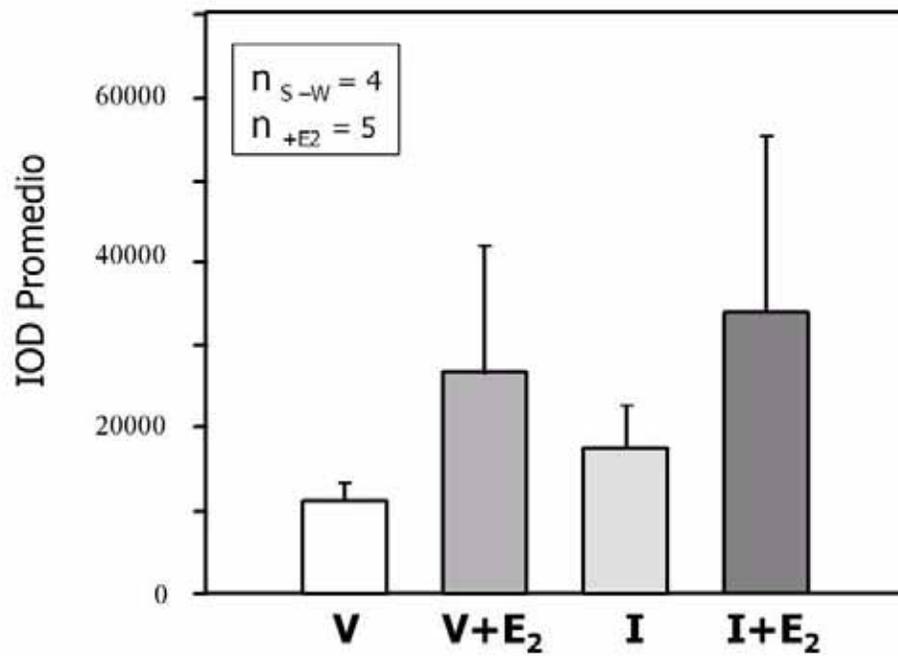
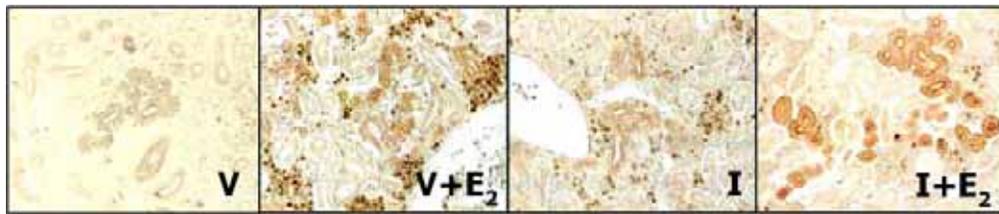


Figura 19: Efecto de 17 β -estradiol en la expresión de calcitreina en riñón.

Se analizó cuantitativamente por el programa Image-Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) la inmunorreacción de calcitreina en músculo de carpas aclimatizadas a verano (V) e invierno (I) y al mismo tiempo tratadas con estradiol (V+E₂ e I+E₂). La inmunorreacción fue cuantificada como densidad óptica integrada (IOD).

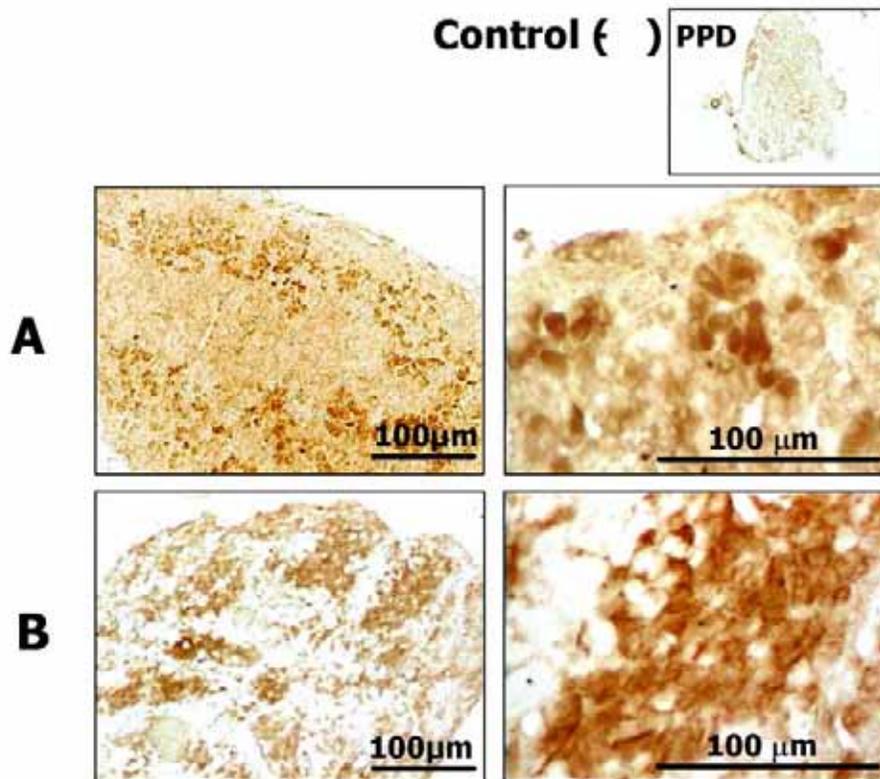


Figura 20: Inmunodetección de calicreína en explantes de hipófisis.

Se preparó explantes de pituitaria de carpas aclimatizadas a invierno, los que fueron incubados a 10°C **(A)** y 23°C **(B)**. Posteriormente, el tejido se procesó como está descrito en métodos y se realizó la inmunodetección con el suero anti-calicreina de carpa (1:2500).

4. II Calicreína glandular involucrada en el sistema inmune de *Salmo salar*.

Otro punto interesante de abordar es estudiar como se comporta la producción de esta serina proteasa en los distintos órganos de salmones, que han sido desafiados contra un patógeno, en este caso *Pisciriquettsia salmonis*. Para evaluar si que esta proteasa pudiera estar involucrada en el sistema defensivo del pez, se realizaron una serie de ensayos de inmunohistoquímica y Western blot.

Antes de evaluar la participación de CG en el sistema inmune innato del salmón, se estudió su localización en la pituitaria y su interrelación con prolactina.

4.14 Inmunofluorescencia doble de prolactina y calicreína glandular en hipófisis de salmones por análisis confocal.

Con el fin de visualizar la localización celular de prolactina y calicreína en pituitaria del salmón se realizó la inmunofluorescencia doble, detallada en materiales y métodos 3.2.15. Los cortes sagitales de hipófisis fueron tratados previamente con microonda e incubados con ambos anticuerpos primarios, posteriormente con los anticuerpos conjugados a distintos fluoróforos, evidenciando prolactina con Alexa Fluor 568 (rojo) y calicreína con Alexa Fluor 488 (verde), lo que se muestra en la figura 21. En A prolactina, B calicreína, C la sobre posición de ambas imágenes (A + B) y en D los controles realizados solo con los anticuerpos secundarios, controles para la figura 21 y 22. En la figura 22 se muestra la misma muestra de la figura 21 con mayor aumento, observándose una colocalización parcial de prolactina y calicreína. Los resultados obtenidos nos señalan que CG y PRL son generados posiblemente en los mismos tipos

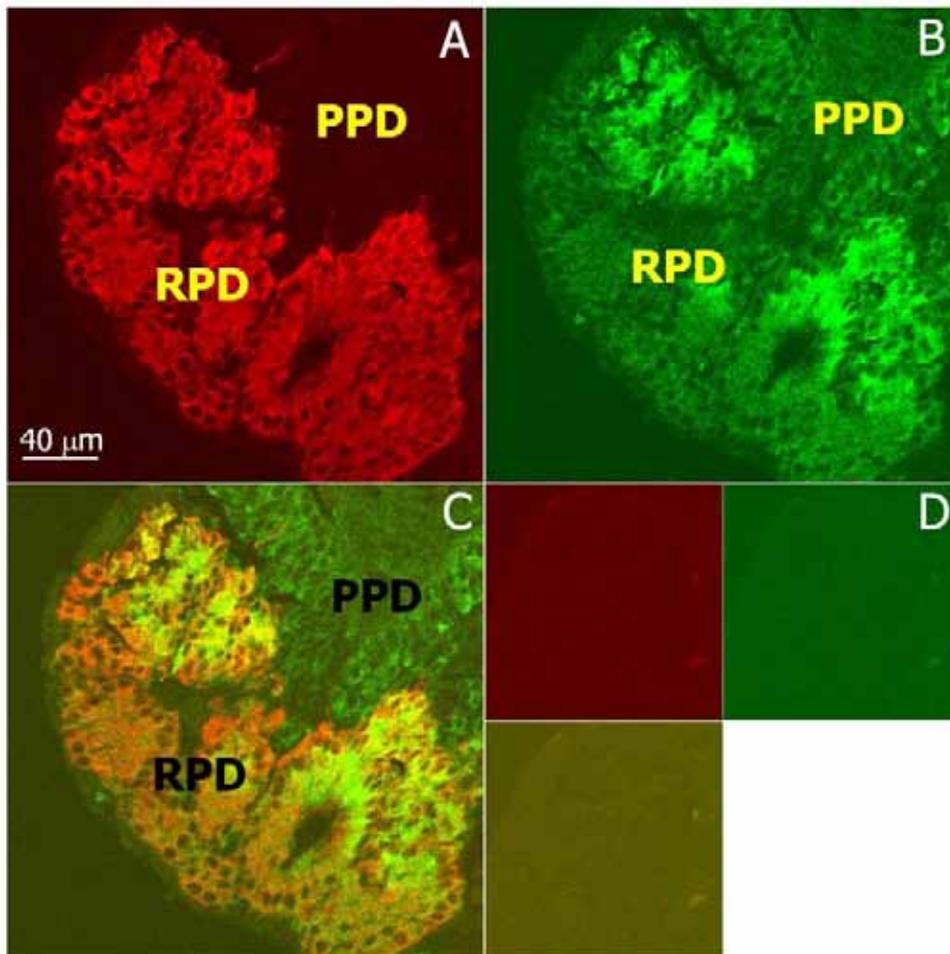


Figura 21: Localización celular de prolactina y calcitreína en hipófisis de salmón por análisis confocal.

A) Prolactina fue detectada usando un anticuerpo generado en ratón conjugado a Alexa Fluor 568 (rojo). **B)** Calcitreína fue detectada usando un anticuerpo generado en conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). **C)** Sobreposición de A y B.

D) Controles de emisión sólo con los segundos anticuerpos.

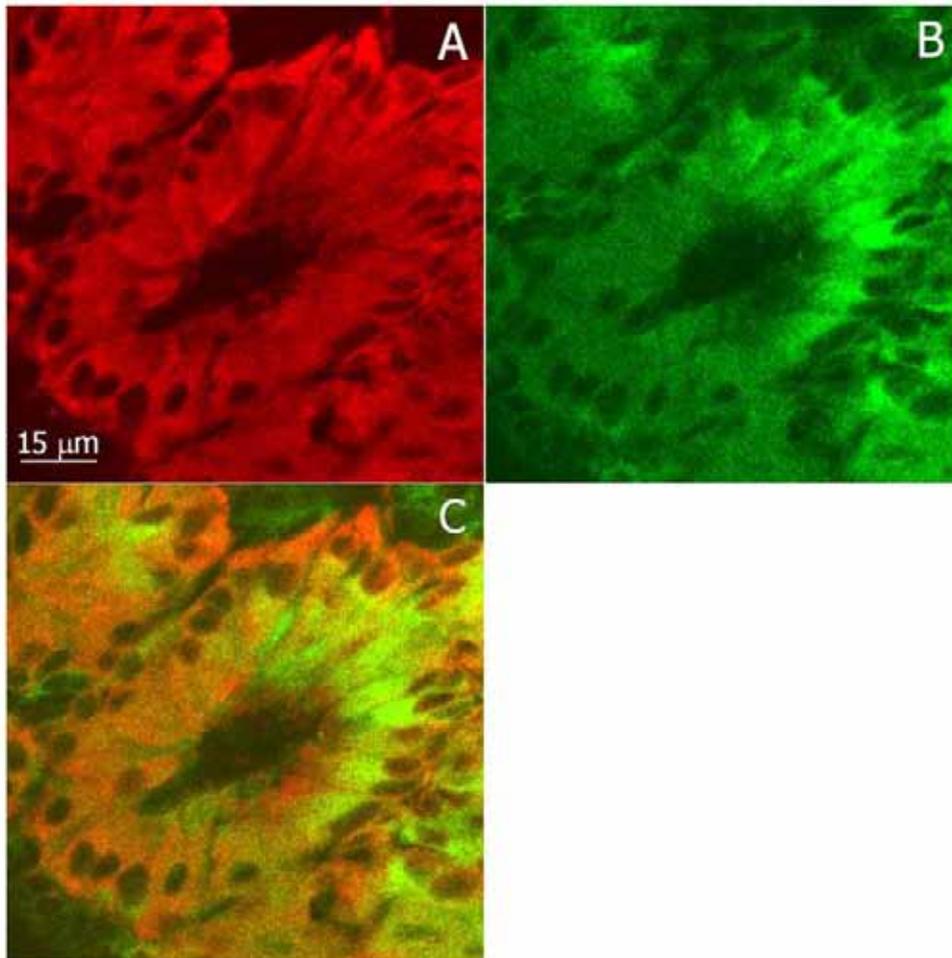


Figura 22: Localización subcelular de prolactina y calicreína en hipófisis de salmón por análisis confocal.

A) Prolactina fue detectada usando un anticuerpo generado en ratón conjugado a Alexa Fluor 568 (rojo). **B)** Calicreína fue detectada usando un anticuerpo generado en conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). **C)** Sobreposición de A y B.

celulares de la RPD, por la sobre posición del color de las reacciones, obteniéndose un color amarillo, que nos indicaría una posible colocalización.

4.15 Inmunodetección de calicreína glandular en leucocitos de *Salmo salar*.

Dentro de las células sanguíneas, se quiso estudiar el comportamiento de CG en leucocitos, debido a que estos están ligados principalmente a la defensa celular. Para ello, se obtuvieron leucocitos de salmones sanos y desafiados contra el patógeno. La obtención y el enriquecimiento de los leucocitos se detallan en el punto 3.2.6 de materiales y métodos. La inmunohistoquímica que se muestra en la figura 23 se realizó con el anticuerpo anti-CG de carpa, a una dilución de 1:1000. Las células se tiñeron con hematoxilina, para resaltar los núcleos y dar contraste a la inmunorreacción citoplasmática que se observa, con mayor intensidad en los leucocitos de los peces desafiados al patógeno, que en los individuos sanos. Esto nos muestra que existe una diferencia clara en la síntesis de CG entre los dos estados a los que se encuentran sometidos los peces.

4.16 Inmunodetección de calicreína en músculo de *Salmo salar*.

Se realizaron cortes transversales del músculo de salmones sanos y enfrentados a *P. salmonis*, y se incubó con el anticuerpo anti-CG de carpa a una dilución de 1:1000. Como se observa en la figura 24, la comparación de la inmunorreacción de peces sanos y desafiados al patógeno, evidencia claramente la mayor intensidad de reacción del anticuerpo anti-CG en los peces desafiados comparados con los sanos, siguiendo el mismo patrón mostrado, por los leucocitos de la figura anterior.

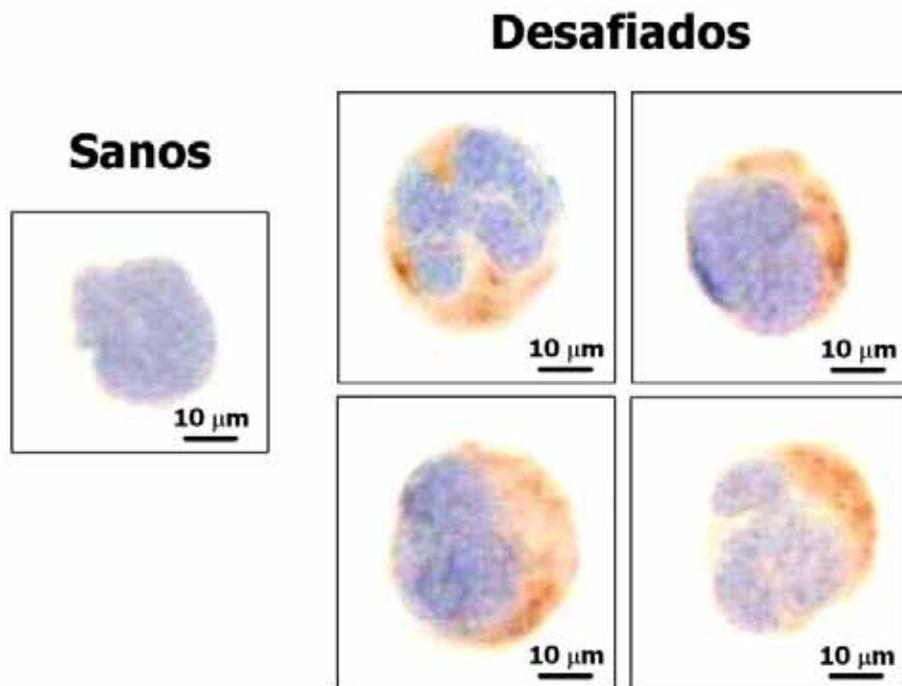


Figura 23: Inmunodetección de calicreína glandular en leucocitos de salmón.

Se analizó la expresión de calicreina en leucocitos de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. La dilución del suero anti-calicreina de carpa fue 1:1000. Como tinción de contraste para núcleos se usó hematoxilina.

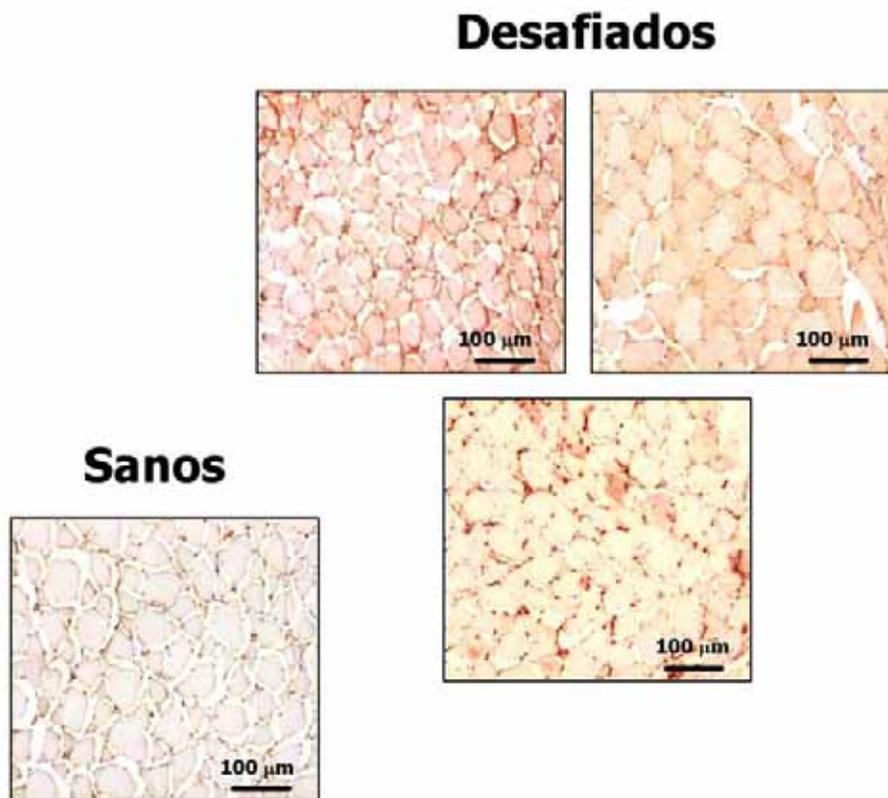


Figura 24: Inmunodetección de calcitreína glandular en músculo de salmón.

Se analizó la expresión de calcitreína en músculo de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. La dilución del suero anti-calcitreína de carpa fue 1:1000. Como tinción de contraste para núcleos se usó hematoxilina.

4.17 Inmunodetección de calicreína glandular en hipófisis de *Salmo salar*.

La inmunohistoquímica se realizó con el anticuerpo anti-CG a una dilución de 1:1000 en hipófisis cortadas saguitalmente. Y como tinción de contraste para núcleos se usó hematoxilina. Como se muestra en la figura 25, la comparación de hipófisis de animales sanos y desafiados con el patógeno ya nombrado, evidencia una clara e intensa inmunorreacción en la región de la *rostral pars distalis* (RPD) de la glándula, con un leve aumento de intensidad de reacción en las hipófisis de peces sanos.

4.18 Inmunodetección de calicreína glandular en riñón de *Salmo salar*.

4.18.1 Inmunodetección en cortes de riñón.

La inmunohistoquímica se realizó en cortes transversales del órgano, utilizando una dilución del anticuerpo anti-CG de carpa 1:1000, y hematoxilina como tinción de contraste nuclear. Se analizó nuevamente la diferencia entre peces sanos y desafiados con *P.salmonis*. Como se puede observar en la figura 26, se aprecia la diferencia entre los peces sanos y los enfrentados a la bacteria, mostrando un fuerte aumento de la inmunorreacción en los riñones de los peces desafiados. El aumento de la reacción se hace evidente a nivel de los tubulos renales y la aparición de una intensa reacción a nivel del estroma renal. Por otro lado, se aprecian los pigmentos propios del riñón (de color café muy intenso) tanto en los peces sanos, como en los enfrentados al microorganismo.

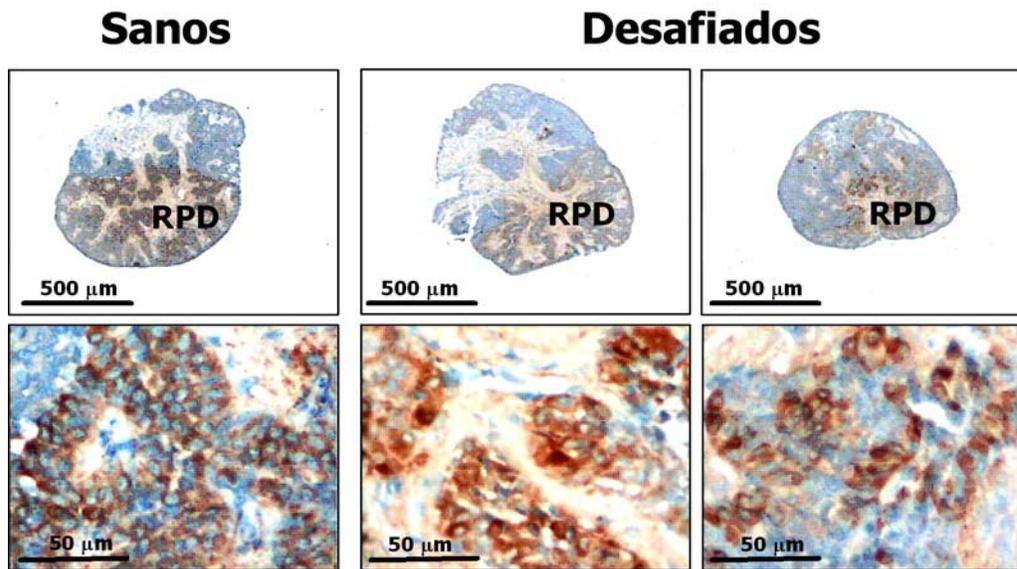


Figura 25: Inmunodetección de calcitreína glandular en hipófisis de salmón.

Se analizó la expresión de calcitreína en pituitaria de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. La dilución del suero anti-calcitreína de carpa fue 1:1000, obteniéndose reacción en la región de la *rostral pars distalis* (RPD). Como tinción de contraste para nucleos se usó hematoxilina.

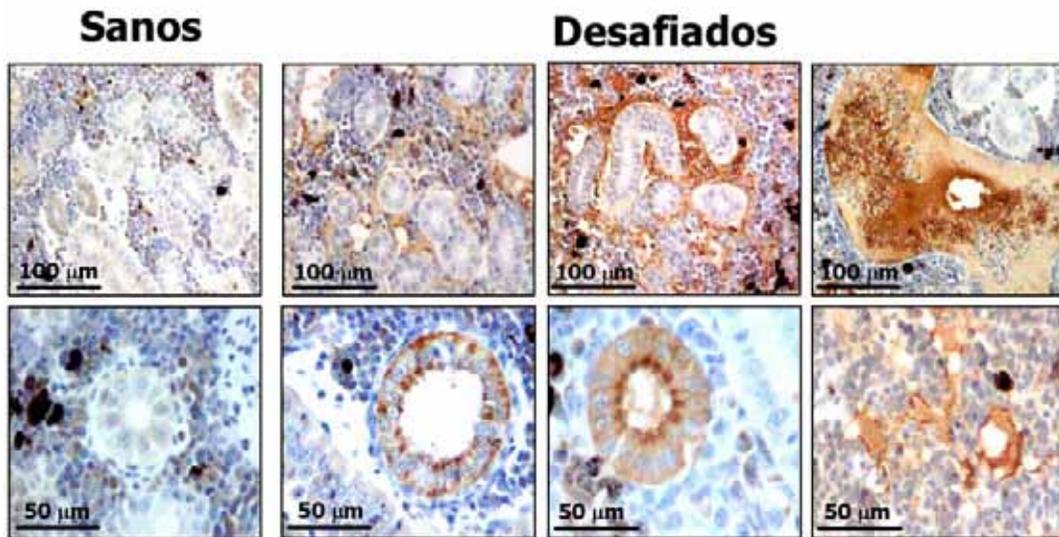


Figura 26: Inmunodetección de calicreína glandular en riñón de salmón.

Se analizó la expresión de calicreina en riñón de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. La dilución del suero anti-calicreina de carpa fue 1:1000, obteniéndose reacción en los tubulos renales cortados transversalmente y en células del estroma renal. Como tinción de contraste para nucleos se usó hematoxilina.

4.18.2 Análisis de Western blot de CG en riñón de salmones sanos y desafiados.

Además de las inmunohistoquímicas realizadas se evaluó el aumento de la inmunorreacción por ensayos de Western blot, con extractos de riñón, con el mismo anticuerpo anti-CG de carpa a la misma dilución (1:1000), como se muestra en la figura 27, donde se puede apreciar en todos los carriles la inmunotinción de una sola banda de 39 kDa, correspondiente a calicreína glandular; corroborado con el respectivo control positivo. Se aprecia una clara diferencia de intensidad de reacción entre los peces sanos y desafiados con la bacteria, siendo claramente mayor en los individuos enfermos, este resultado concuerda con la inmunohistoquímica anteriormente mostrada (figura 26).

4.19 Inmunodetección de calicreína glandular en branquias de *Salmo salar*.

Se realizaron inmunohistoquímicas comparativas entre branquias de peces sanos y sometidos al desafío con el patógeno. Se utilizó el anticuerpo anti-CG de carpa 1:1000 y como tinción de contraste para núcleos se usó hematoxilina como se muestra en la figura 28. Se evidencia la reacción esperada en las células epiteliales en la base de las láminas de las branquias, en los dos grupos experimentales, pero se ve notoriamente un aumento de la inmunotinción en los peces que fueron sometidos al desafío con el patógeno *P.salmonis*.

4.20 Inmunodetección de calicreína glandular en piel de *Salmo salar*.

Se realizaron cortes longitudinales de piel de los salmones (figura 29), y como tinción de contraste se usó hematoxilina. Como se ve, se evidencian los estratos de la

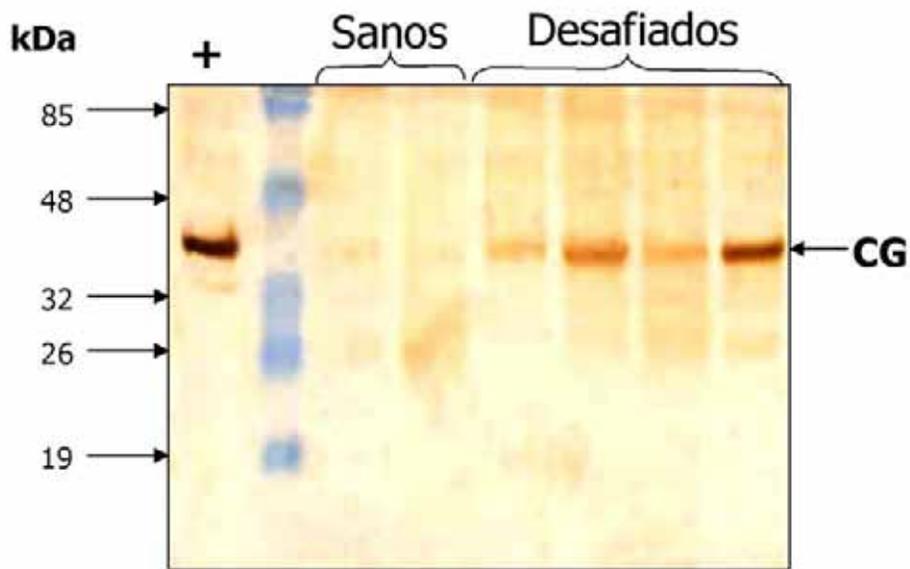


Figura 27: Western-blot para calicreína glandular en riñón.

Análisis de Western-blot con iguales cantidades de proteínas de riñón de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. (5 μ g de proteínas totales). Como control positivo (+) se cargó extracto de proteínas de músculo de carpa (5 μ g). Los tamaños de las bandas del estandar preteñido de proteínas se indican en la figura.

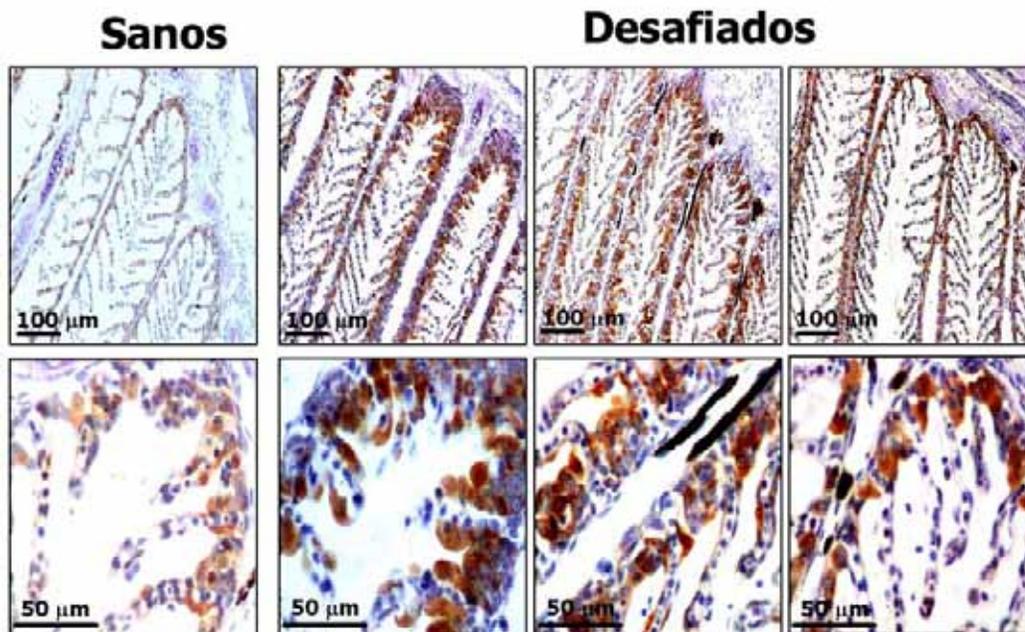


Figura 28: Inmunodetección de calcitonina glandular en branquias de salmón.

Se analizó la expresión de calcitonina en branquias de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. La dilución del suero anti-calcitonina de carpa fue 1:1000, obteniéndose reacción en células epiteliales de las laminillas branquiales. Como tinción de contraste para núcleos se usó hematoxilina.

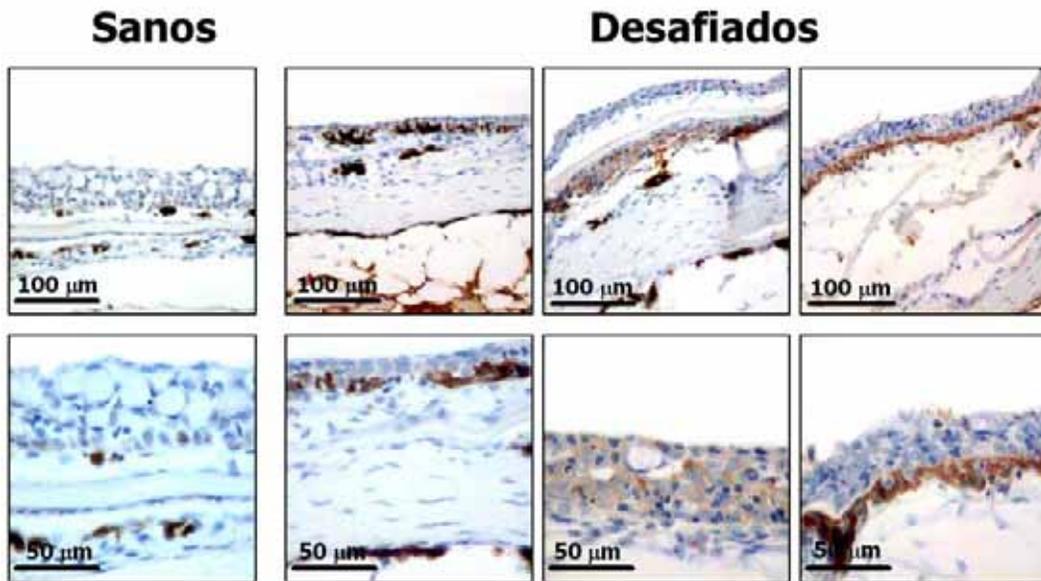


Figura 29: Inmunodetección de calcitona glandular en piel de salmón.

Se analizó la expresión de calcitona en piel de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. La dilución del suero anti-calcitona de carpa fue 1:1000, obteniéndose reacción en varios estratos de la piel. Como tinción de contraste para nucleos se usó hematoxilina.

piel, junto con el pigmento característico propio de los primeros estratos de esta. Comparando los cortes de individuos sanos y desafiados con *P. salmonis*, podemos evidenciar que existe nuevamente un aumento de la inmunotinción en las células epiteliales de la piel de los peces desafiados.

4.21 Inmunodetección de calicreína glandular en mucus de *Salmo salar*.

Con la base de los resultados ya obtenidos en la inmunohistoquímica anti-CG en piel, se quiso evaluar directamente la presencia de esta serina proteasa en el mucus secretado por la piel del pez en estado normal y cuando está en contacto con el patógeno en estudio. Con esa idea se obtuvieron los siguientes resultados.

4.21.1 Immuno-dot para CG en mucus de salmón.

Como se detalla en la figura 30, cada spot sembrado corresponde a 1 μ l de mucus tanto de los peces sanos como desafiados. Se evidencia una clara diferencia de la intensidad de reacción entre ambas condiciones experimentales, casi igualándose la intensidad de los spot sembrados de los peces desafiados con el control positivo, que corresponde a un extracto de proteínas totales de músculo de carpa, como se sabe, muy abundante en calicreína glandular.

4.21.2 Inmunodetección de calicreína glandular en mucus de salmón.

Para corroborar el resultado anterior, se evaluó la presencia de CG en el mucus de los peces por análisis de Western blot, tal como se detalla en la figura 31. En A se aprecia el fraccionamiento de las proteínas de los peces sanos y desafiados, donde se cargó igual volumen de muestra, junto con el correspondiente control positivo. El gel fue teñido con azul de Coomassie, mostrando similares patrones de bandas, visualizándose

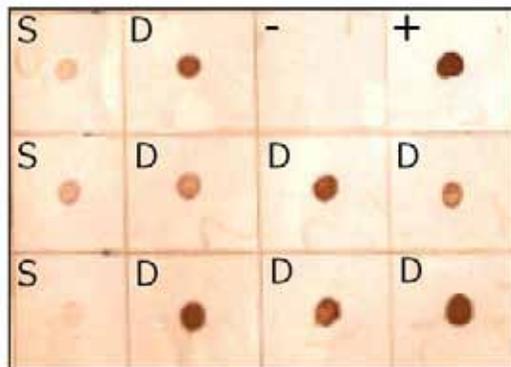


Figura 30: Inmuno-dot para calicreina en mucus de salmón.

Se analizó la presencia de calicreina en mucus de peces sanos (S) y desafiados (D) con *P. salmonis*. Se sembró 1 μ l de muestra por *spot* y se utilizó como control positivo, extracto de proteínas de homogenizado de músculo de carpa (+) y como control negativo BSA (-). La dilución del suero anti-calicreina de carpa fue 1:1000.

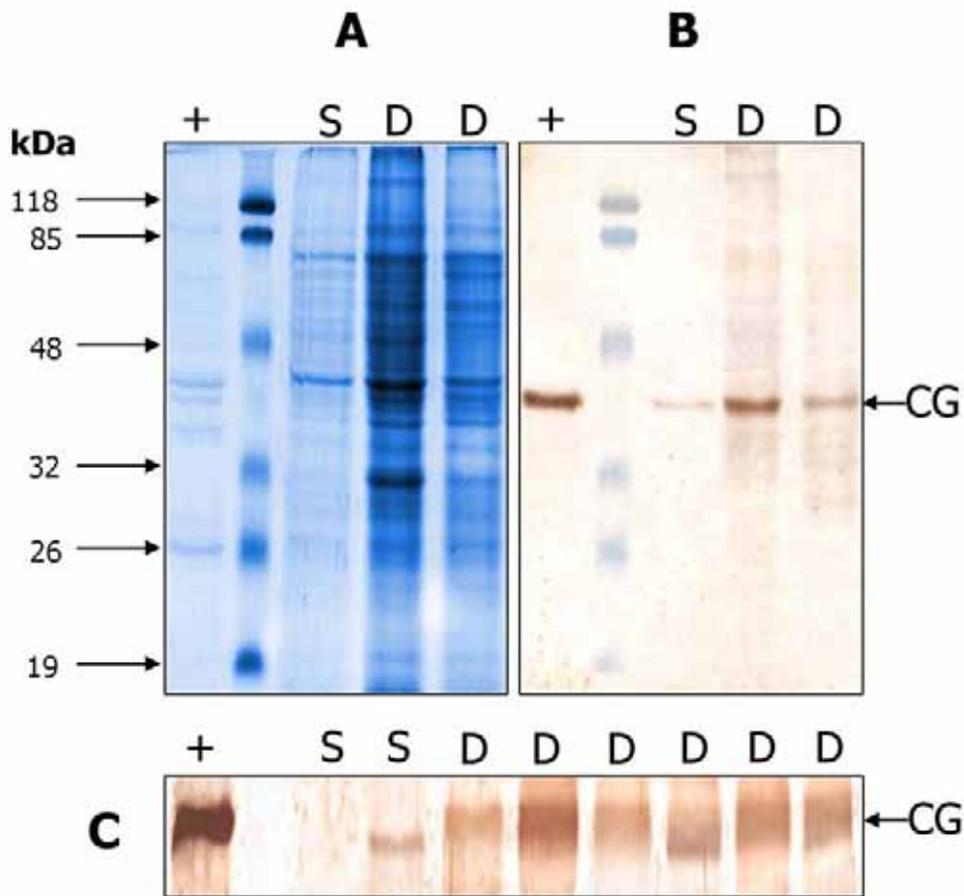


Figura 31: Inmunodetección de calicreina en mucus de salmón.

A) Patron electroforético (PAGE 12% en condiciones denaturantes) de proteínas de mucus de peces sanos (S) y desafiados (D). Se cargó 2 μ l de muestra en cada carril y como control positivo (+) proteínas de músculo de carpa (5 μ g).

B) Western-blot del gel A, para calicreína en mucus de peces sanos (S) y desafiados (D) con *P. salmonis*. Los tamaños de las bandas del estándar preteñido de proteínas se indican en la figura A.

C) Western-blot con iguales cantidades de proteínas de peces sanos y desafiados con *P. salmonis*. (10 μ g totales). Control positivo (+) proteínas de músculo de carpa (10 μ g).

un aumento de proteínas en los peces expuestos al patógeno. En el panel B se visualiza el Western blot de las muestras, incubadas con el anticuerpo anti-CG a una dilución de 1:1000. Como se observa hay una banda clara que inmunorreacciona en todos los carriles con un tamaño aparente de 39 kDa, correspondiente a CG, corroborada por el control positivo. (proteínas de músculo de carpa). Además, se visualiza una diferencia clara de intensidad de reacción, aumentada en el mucus de los peces que estuvieron en contacto con el patógeno. Este resultado concuerda con el inmuno-dot realizado previamente. Este ensayo de Western blot se repitió, en forma cuantitativa, en las mismas condiciones, pero se cargó la misma concentración de proteínas por carril (10 μ l). Este experimento se realizó para evaluar si el aumento de CG se debía, a un aumento total de las proteínas presentes en el mucus de los peces en desafío. Como se muestra en la figura 32, calicreína glandular está aumentada en los carriles correspondientes a los peces desafiados, en comparación con los peces sanos. Siendo este resultado concluyente, para decir que esta proteasa aumentaría en el mucus cuando los peces están en presencia de estos microorganismos.

5. DISCUSION

5.1 Calicreína glandular en *Cyprinus carpio* y su aclimatización

Por primera vez en el año 2002 se demostró la presencia de calicreína glandular en tejidos del pez *Cyprinus carpio* (Figuroa *et al.*, 2002). Este trabajo fue el primero en mostrar la presencia de esta serina proteasa en tejidos de peces por inmunohistoquímica, el cual se realizó con un anticuerpo heterólogo del pez *Centropristis striata*. De ahí la relevancia de obtener un anticuerpo homólogo de calicreína glandular para carpa.

Para discutir la serie de resultados obtenidos, comenzamos analizando la herramienta clave para este trabajo, que es el anticuerpo homólogo anti-calicreína glandular del pez *Cyprinus carpio*. La calicreína de músculo de carpa fue obtenida con un alto grado de pureza como se mostró en la figura 2 en un gel clásico de poliacrilamida en condiciones denaturantes, y también en los geles ácido-urea, donde las condiciones de migración electroforéticas son distintas, migrando las proteínas principalmente por su carga eléctrica (figura 3). Como se demostró en estas dos figuras sólo se visualizó una banda única teñida con azul de Comassie, mostrándonos claramente la presencia de una sola proteína, correspondiente a calicreína, esto fue verificado además con el anticuerpo heterólogo anti-calicreína del pez *Centropristis striata* (Richard *et al.*, 1997a). Se realizaron estas dos clases de geles debido a que estos nos mostrarían la presencia de alguna proteína contaminante en nuestra

purificación, siendo posible que existan dos proteínas del mismo peso de molecular, pero con una muy baja probabilidad de poseer la misma carga eléctrica.

Se recurrió a esta estrategia dado que cuando se realizó este experimento no se contaba con los recursos para utilizar electroforesis bidimensional tradicional. Por ello, y teniendo presente las limitaciones de un procedimiento no óptimo, se utilizaron los geles ácido-urea como única alternativa para tratar de evidenciar el grado de purificación de calicreína glandular de carpa.

En paralelo se evaluó la calidad del anticuerpo contra calicreína en orina humana, que como se mostró en la figura 7, los tres anticuerpos probados reconocen una única banda de 85 kDa. Las diferencias estructurales de calicreína de bajo y alto peso molecular son debidas a glicosilaciones graduales en tres sitios descritos en mamíferos. Las múltiples isoformas son derivadas de distinto números de moléculas de ácido sialico unidos a los carbohidratos unidos a residuos de asparragina. Este control realizado nos entregó información de la calidad del anticuerpo y su grado de especificidad, reconociendo sin mayor problema nuestro antígeno de interés. Además se realizó un control del mismo anticuerpo pero por inmunohistoquímica, (figura 8). Como se ve en la figura tanto el anticuerpo anti-calicreína de carpa, como el anti-calicreína de humano y rata, reconocen los mismos tubulos a nivel de tejido renal en cortes seriados de riñón de carpa. Con estos datos obtenidos se pudo concluir que el anticuerpo anti-calicreína de carpa, reconoce a la proteína en condiciones denaturantes como es el caso de los geles SDS-PAGE, y también en estado nativo, o lo más cercano a su estado *in vivo*, en secciones de tejidos, fijados y embebidos en parafina.

Como se mostró en resultados, también se evaluó la presencia de calicreína por inmunohistoquímica en varios órganos de carpa, como se detalla en las figuras 9 a 11, comparando con lo descrito por Figueroa *et al.* (2002) con el anticuerpo heterólogo. El uso de este anticuerpo visualiza que se conservan los patrones de inmunotinción de ambos anticuerpos en los tejidos del pez.

Se sabía de la presencia de calicreína en peces y organismos inferiores. Esta fue descrita por Richards *et al.* (1997b), en geles SDS-PAGE mencionando dos grupos de bandas, uno alrededor de 72 kDa y otra de aproximadamente 35 kDa, en los músculos de todas las especies descritas, exceptuando tiburón, el cual presenta formas de aproximadamente 85 kDa, mientras que en hígado no evidenció inmunorreacción. Como se mostró en la parte de resultados lo primero que se evaluó fue la presencia de calicreína glandular por Western blot en extractos de distintos órganos de carpa, (figura 5), donde se visualizó la presencia de una proteína de aproximadamente de 39 kDa en músculo, hígado, hipófisis branquias y riñón. Además de otra isoforma de 72 kDa presente exclusivamente en hipófisis. Esta puede corresponder a una proteína inmadura, la misma de 39 kDa no procesada, que al ser cortada se activa; también podría corresponder a un dímero de la forma 39 kDa, con menor grado de glicosilación, esto ya había sido visto anteriormente por Richards *et al.* (1997b), aunque por otro lado no se descarta que podría corresponder también a otra isoforma con un alto grado de glicosilación. Por otro lado, llama la atención la presencia de calicreína en hígado, nunca antes descrita, ésta se puede deber a que el hígado en peces es un hepatopancreas, y al extraer el órgano y homogenizarlo puede llevar parte del páncreas donde sí está descrita esta serina proteasa (Orstavik *et al.*, 1980; Schachter *et al.*,

1979), esto se pudo validar con la inmunohistoquímica con el mismo anticuerpo donde se muestran zonas en forma de islotes inmunoteñidos que podrían corresponder a partes del páncreas (figura 13). Por su parte varios de estos resultados comparados con lo obtenido por Figueroa *et al.* (2002), con el anticuerpo heterólogo del pez *Centropristis striata*, divergen en el tamaño de las bandas obtenidas en todos los órganos, excepto en músculo, donde se conserva la banda intensa y abundante de 39 kDa. Las diferencias en los otros órganos, donde se visualizan bandas de 46 kDa y 72 kDa en hipófisis, en agalla y riñón con una banda de 52 kDa, se pueden deber a que el anticuerpo heterólogo reconoce distintas isoformas que poseen otros patrones de glicosilación diferentes de la forma de 39 kDa obtenida en todos los órganos con el anticuerpo homólogo anti-calicleína de carpa.

Ahora bien, comparando la inmunorreacción obtenida en agallas con el anticuerpo homólogo y heterólogo anti-calicleína, la reacción con el primero de estos es más intensa y se localiza fuertemente en la región más basal de las laminillas de las agallas. Por otro lado, en cortes de riñón ambos anticuerpos reconocen los mismos tipos celulares, con mayor intensidad el anticuerpo homólogo que inmunorreacciona en todas las células de los tubos distales y además reconoce parte del estroma renal, evidenciándonos que calicleína glandular podría tener un rol importante en el tejido hematopoyético del pez. Además es muy importante destacar que en esta tesis describimos la presencia de calicleína en piel de carpa, nunca antes descrita en este órgano de peces, la cual se cree tendría relación directa con el sistema defensivo del pez, pudiendo esta quizás ser secretada hacia el mucus como mecanismo de defensa contra patógenos como hongos y bacterias (Ellis *et al.*, 1999). De forma similar fue

descrita hace años la presencia de lisozima en peces, con la misma distribución en piel y mucus de salmón (Murria y Fletcher, 1976). De esta forma, el hallazgo de calicreína glandular en piel y mucus de peces, asociado a la ya descrita presencia de lisozima, puede potenciar la acción bactericida y en general antipatógenos de esta proteasa. Esto último es claramente indicativo de que calicreína estaría participando en el sistema inmune innato en peces.

Por otro lado es también importante comentar la presencia de calicreína en hipófisis (figura 14), donde se vio claramente la reacción bien definida en la RPD, lugar donde es sintetizada esta serina-proteasa. Lo más importante de destacar es que la intensidad de la inmunorrección es diferente entre invierno y verano, lo que puede implicar que en invierno, época en la que hay menor reacción, se pueda deber a una disminución en la síntesis de calicreína. Esta diferencia, como se ve en la figura es independiente al tipo de fijador, y se debe a todo un sistema de regulación del eje hipotálamo-hipofisiario que se activa o desactiva en cada estación extrema del año. Esto se pudo corroborar con la inmunohistoquímica en los explantes (figura 20), donde se mostró que a 10°C y 23°C, que simulan las estaciones extremas, no se evidencia mayor diferencia de inmunorreacción para calicreína glandular; esto como ya se dijo es debido a que estos explantes son trocitos de hipófisis, específicamente de *rostral pars distalis*, donde es sintetizada calicreína, y permanecen independientes de regulación hipotalámica.

También como se mostró en las figuras 15 y 16, se hizo un análisis de localización de calicreína y prolactina en hipófisis de carpa por microscopía confocal, nuestra hipótesis era obtener un alto grado de colocalización de ambas proteínas,

pensando en que calicreína podría estar involucrada en el procesamiento de prolactina, de acuerdo a antecedentes bibliográficos en mamíferos (Jones *et al.*, 1990; Vio *et al.*, 1990). Como se ve en las figuras 15 y 16, no existe colocalización, al contrario de lo observado en el mismo experimento realizado en cortes de hipófisis de salmón (figura 21 y 22), donde se aprecia una colocalización de ambas proteínas en el mismo tipo celular. Este resultado puede indicarnos que quizás exista algún tipo de interacción entre ambas; lo opuesto observado en carpa no es un resultado decisivo, debido a que se puede deber al estadio en que se encontraba el pez, invierno o verano, ya que se ha visto que algunas células que producen prolactina en invierno se apagan, deteniendo prácticamente su síntesis, quizás debido a esto algunas células que producen calicreína, no muestran inmunorreacción para prolactina (Figuroa *et al.*, 1994; 1997).

Por su parte la regulación de calicreína glandular por hormonas esteroideas ha sido ampliamente estudiada en mamíferos (Yousef *et al.*, 2001). En el laboratorio se ha reportado anteriormente que el tratamiento estrogénico no afectaría significativamente la expresión de calicreína en agalla y músculo en carpas aclimatizadas a invierno. Sin embargo el mismo estudio reportó un incremento en la señal en riñón de carpas tratadas con estrógenos (Figuroa *et al.*, 2002). Todo esto analizado con el anticuerpo heterólogo anti-calicreína glandular del pez *C. striata*. Como se mostró en las figuras 17, 18 y 19 se realizó un estudio similar usando el anticuerpo específico, donde se vio a diferencia del trabajo previo, que en carpas aclimatizadas a invierno existe un incremento de calicreína en músculo después del tratamiento con estrógenos. La presencia de calicreína en el músculo del pez se ha atribuido a la función del transporte de glucosa, contracción y relajación muscular y también la regulación del flujo

sanguíneo por la liberación de cininas del plasma o por la formación de precursores de cininógenos (Shimojo *et al.*, 1987). La función de calicreína tisular en el músculo del pez depende del tipo de músculo involucrado y en carpa de las diferencias generadas por los procesos de aclimatación (Goldspink, 1995).

Como se sabe las agallas son los mayores órganos osmorreguladores en los teleósteos que participan en la excreción de la mayoría de las sustancias nitrogenadas excedentes. Ellas poseen alta permeabilidad a iones monovalentes y permiten el paso pasivo de Na^+ y Cl^- del agua directo al plasma. Además las agallas transportan aniones monovalentes del medio ambiente en contra del gradiente de concentración, esto realizado por las células “cloruro” ubicadas en el epitelio de la misma agalla (Seidelin *et al.*, 1999). Se observó un patrón inverso de expresión de calicreína bajo el tratamiento estrogénico, entre músculo y agalla; De hecho las agallas responden a los estrógenos durante verano, mientras el tejido muscular incrementa su contenido de calicreína solamente en invierno.

La función del riñón en teleósteos es eliminar el exceso de iones divalentes como Mg^{+2} y SO_4^{2-} y conservar el agua. La parte anterior del riñón, llamada cabeza, tiene como principal función la hematopoyesis y servir como órgano endocrino. La parte posterior del riñón está relacionada con la osmorregulación y como órgano excretor (Ellis *et al.*, 1989). En carpa, el riñón conserva los iones y excreta el agua. Usando el anticuerpo homólogo anti-calicreína se demostró un incremento en los niveles de expresión de calicreína, tanto en carpas aclimatizadas a verano como invierno, destacándose el incremento de la reacción en la parte apical y en la región basolateral de las células tubulares.

La función fisiológica atribuida a calicreína glandular en peces, concuerda con las funciones ya conocidas en mamíferos que involucran osmorregulación, contracción y relajación muscular, vasodilatación y función defensiva. De esta forma muchos de los roles atribuidos al sistema calicreína-cininas en diferentes especies, tienen directa relación con los péptidos de cininas que activan a receptores de cininas B1 o B2, estos dos subtipos de receptores son expresados en peces de la misma forma descrita en mamíferos (Colon 1999).

Se puede concluir que la señal de inmunorrección obtenida con nuestro anticuerpo homólogo anti-calicreína demuestra la existencia de especificidad de tejido en respuesta al tratamiento de estrógeno *in vivo*, entre carpas aclimatizadas a las estaciones extremas. El efecto inductor diferencial de 17- β estradiol en los diferentes órganos de carpa puede ser interpretado como un signo indicativo de la expresión diferencial de los múltiples genes de calicreína descritos en mamíferos (Diamandis *et al.*, 2000). En peces y particularmente en carpa, esto se puede ver directamente incrementado por la naturaleza tetraploide de este pez (Larhammar and Risinger, 1994). En este contexto, la inducción de genes reporteros como controles frente a elementos estrogénicos, sería una herramienta de interés, como marcadores de contaminación, teniendo en cuenta que muchos de los contaminantes presentes en el agua son derivados de alqui-fenoles, los que son usados en la industria papelera y su degradación da origen a productos con actividad estrogénica. Y por su parte la degradación de estos productos ha sido reportada en agua, en sedimento de ríos, y de más interés es que ha sido detectada en la grasa de peces que han sido expuestos a este tipo de contaminantes. (Sonnenschein *et al.*, 1998). Se puede concluir que la carpa

serviría como *test* de contaminantes de agua, el beneficio de esto es que es un indicador presente ampliamente en todo el mundo y que no solo nos mostraría un aumento de los niveles de contaminación, sino tendríamos al ser vivo completo donde se podrían analizar otro tipo de parámetros, como los niveles IgM, presencia de metales pesados en la sangre entre otros.

5.2 Calicreína glandular involucrada en el sistema inmune de *Salmo salar*.

Existen antecedentes de la presencia de proteasas que contienen actividad tipo tripsina en mucus y la piel de muchos peces, (Braun *et al.*, 1990; Ellis, 1999). Y como ya se destacó anteriormente calicreína glandular posee actividad tipo tripsina, teniendo como principal señal de corte los residuos Arginina y Lisina (Schachte, 1980). Teniendo en cuenta estos antecedentes se utilizó el anticuerpo anti-calicreína glandular del pez *C. carpio*, con él se mostró por primera vez la presencia de esta serina-proteasa en *Salmo salar*.

Este ya es un hallazgo importante, pero sabiendo que esta proteasa está presente en los diversos órganos estudiados, nuestra pregunta de mayor interés fue ¿Habrá algún tipo de variación en la expresión de calicreína glandular entre peces sanos y desafiados con un patógeno? Se utilizó *Piscirickettsia salmonis* como patógeno debido a que es una de las bacterias que causa mayores problemas en la piscicultura de nuestro país.

Como se mostró de la figura 23 en adelante, entre peces sanos y desafiados se denota la diferencia de inmunorreacción de calicreína tanto en los órganos estudiados como en leucocitos y en mucus, aumentando esta considerablemente en los peces desafiados.

Es de especial interés el incremento de calicreína en riñón de los peces expuestos al patógeno, debido a que la bacteria *Piscirickettsia salmonis* tiene como uno de sus principales blancos este órgano. Como se mostró en la figura 26, en los peces desafiados se ve claramente un aumento en la inmunorreacción para calicreína, no solo en las células del riñón excretor sino también en el tejido intercelular, donde podría estar alojado este patógeno y donde además ocurre la generación de las líneas hematopoyéticas y linfocítica en peces, pudiendo existir una relación íntima con esta proteasa, actuando como una herramienta defensiva frente al microorganismo invasor, esto también fue corroborado por Western-blot (figura 27).

Este incremento de calicreína glandular también se visualizó en los leucocitos (figura 23), la cual, podría estar promoviendo la actividad leucocitaria o quizás estos secretan calicreína al torrente sanguíneo como mecanismo defensivo frente al patógeno. Por otro lado, no hay que olvidar que prolactina y calicreína están íntimamente ligadas y calicreína podría estar involucrada en el procesamiento de prolactina para su activación. Por su parte, está descrito que prolactina presenta un efecto estimulante sobre el sistema inmune, específicamente sobre la actividad de células fagocíticas (Sakai et al., 1996) y una activa participación en la mantención de los niveles de inmunoglobulinas circulantes en peces (Yada et al., 1999). Congruente con el aumento de calicreína en leucocitos se visualizó un incremento de

inmunorreacción de prolactina en este mismo tipo celular de peces desafiados (dato no publicado).

Por otro lado unos de los órganos de nuestro interés a estudiar fue la piel, pensando que esta es una barrera primaria frente a cualquier tipo de patógeno. La piel de los peces desafiados también evidenció un aumento de inmunorreacción para calicreína glandular (figura 27) al igual que el mucus secretado por estos (figura 30). Creemos que este aumento se debe a las razones ya antes dadas, pero aquí en piel y mucus calicreína está actuando localmente como barrera defensiva, junto con otras proteasas presentes en mucus como lisozima (Murria y Fletcher, 1976). Y como se vio en resultados (figura 31) no solo existe un aumento de calicreína en el mucus de los peces enfrentados al patógeno, sino que también existe un notorio incremento de la cantidad de otras proteínas del mucus, probablemente otras proteasas. Donde ocurre un aumento de la concentración de algunas y aparición de otras. Este estado de “emergencia” al que es sometido el sistema inmune, trata de utilizar todas las herramientas necesarias para poder defenderse frente a los invasores, cambiando su secreción en términos cuantitativos y cualitativos, alguna de estas podrían estar actuando sinérgicamente con calicreína, así creando una barrera defensiva aun mayor frente a los patógenos. Aun no queda claro el o los posibles mecanismos fisiológicos, por el cual calicreína glandular actuaría, pero si está claro que ella está jugando un rol determinante en el sistema innato de los peces, promoviéndolo o quizás solo actuando como una barrera más de este.

La probable participación de calicreína glandular en el sistema innato de *Salmo salar* hace interesante el abordar su estudio del punto de vista biotecnológico, teniendo

en cuenta la importancia económica de este pez y los problemas productivos que se generan en la industria por la acción de patógenos.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ball, J.N.; Batten, T.F.C. (1981) Pituitary and melanophore responses to background in *Poecilia latipinna* (Teleostei): role of the pars intermedia PAS Cell. *General Comparative Endocrinology*. **44**:233-248.
- Barry, T.P. and Grau, E.G. (1986) Estradiol-17 β and Thyrotropin-releasing hormone stimulate prolactin release from the pituitary of the teleost fish *in vitro*. *General Comparative Endocrinology*. **62**:306-314.
- Bewley, T. A. and Li, C. H. (1971) Sequence comparison of human pituitary growth hormone, human chorionic somatomammotropin and ovine pituitary lactogenic hormone. *Experientia*. **27**:1368-1371.
- Baumgarten, C. R.; Schwarting, R. and Kunkel. (1989) Localization of glandular kallikrein in nasal mucose of allergenic and noallergenic individuals. *Advances Experimental Medical Biology*. **247B**:523-528.
- Bhoola, K. D.; Bewley, J.; Crothers, D.M. Cingi, M. I. and Figueroa, C. D. (1989) Kinin receptors on epithelial cells and smooth muscle of the trachea. *Advances Experimental Medical Biology*. **274A**:421-427.
- Bhoola, K. D.; Figueroa, C. D. and Worthy, K. (1992) Bioregulation of kinins: Kallikreins, Kininogens and Kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**:1-80.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

- Chao, I. and Chao, L. (1987) Identification of latent tissue kallikrein, prolactin and growth hormone secretion in GH₃ pituitary cells using modified radioimmunoassay. *Molecular Cellular Endocrinology*. **55**:21-31.
- Chen, H.; Chiou, C. and Chang, W.(1991) Cloning and characterization of the carp prolactin gene. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1088**:315-318.
- Clements, J. A.; Fuller, P. J.; McNally, M.; Nikolaidis, I. and Funder, J. W. (1986) Estrogen regulation of kallikrein gene expression in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*. **199**:268-273.
- Clements J.A.(1989). The glandular kallikrein family of enzymes: Tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocrinology Reviews*. **10**:393-419.
- Colon J.M. (1999) Bradykinin and its receptors in nonmammalian vertebrates. *Regulation Peptide*. **79**:71-81.
- Cooke, N.E.; Coit, D.; Weiner, R.I.; Baxter, J.D. and Martial, J.A. (1980) Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *Journal. Biological Chemistry*. **255**: 6502-6510.
- Cuthbert, A. W. and Mac Vinish, L. J. (1986) Transporting epithelia as targets for kinins effects. *Advances Experimental Medical Biology*. **198A**:203-210.
- Cuthbert, A. W.; Egleme, C.; Greenwood, H.; Hickman, M.E.; Kirkland, S. C. And Mac Vinish, L. J. (1987) Calcium- and cyclic AMP- dependent chloride secretion in human colonic epithelia. *British Journal Pharmacology*. **91**:503-515.
- Diamandis E, Y. G., Luo L-Y, Magklara A, Obiezu C (2000). The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinology Metabolism*. **11**:54-60.

- Ellis, A., Roberts, R.J. , Tytler, P. (1989)The anatomy and physiology of teleosts. *Fish pathology.* 13-55.
- Ellis, A. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology* **9**:291-308.
- Ensor, D. M. and Ball, J. N. (1972) Prolactin and osmoregulation in fishes. *Federal Proceedings.* **31**:1615-1623.
- Figuroa C.D., maclver A.G., J.C. Mackenzie, Bhoola K. D. (1988) Localisation of immunoreactive kininogen and tissue kallikrein in the human nephron. *Hystochemistry.* **89**:437-442.
- Figuroa J, M. A., Alvarez M, Villanueva J Reyes A, Leon, G, Krauskopf M (1994). Prolactin gene expression and changes of prolactin pituitary level during the seasonal acclimatization of the carp. *Comparative Biochemistry Physiology.* **108B**:551-560.
- Figuroa J, R. A., Rios M, Vera M.I., Krauskopf M. (1997). Effect of temperature and photoperiod on prolactin transcription in *Cyprinus carpio*. *Zoololgal Science* **14**:353-357.
- Figuroa, J., Kausel, G., Barra, V., Fernandez, K., y Muñoz, D. (1999). Caracterización de la expresión de prolactina del pez teleósteo *Cyprinus carpio*. *Biological Research* **32**, R 141.
- Figuroa, J., Fernández, K., Haussmann, D., Richards, G., Barra V. and Kausel, G. (2002). Glandular kallikreins in the teleost *Cyprinus carpio*: Tissue distribution, possible involvement in prolactin processing and effect of 17 β -estradiol *in vivo*. *General and Comparative Endocrinology* **128**:135-142.

- Figueroa J, Martin RS, Flores C, Grothusen H, Kausel G. (2005) Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary: evidence for two expressed genes. *Journal Comparative Physiology [B]*. Feb 25 ("paper on line").
- Fuller, P.J. and Funder, J.W. (1986) The cellular physiology of glandular kallikrein. *Kidney Int.* **29**:953-964.
- Giguere, V.; Meunier, H. Veilleux, R. and Labie, F. (1982) Direct effects of sex steroids on prolactin release at the anterior pituitary level: interaction with dopamine, thyrotropin-releasing hormone, and isotutymethylxamthine. *Endocrinology.* **111**:857-862.
- Goldspink, G. (1995). Adaptation of fish to different environmental temperature by qualitative and quantitative changes in gene expression. *Journal Thermal Biology.* **20**:167-174.
- Hatala, M. and Powers, C. (1987). Biochemical Investigation of the subcellular localization of the estrogen-induced pro-glandular kallikrein in the rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology.* **49**:537-544.
- Hatala and Powers (1988) Glandular kallikrein in estrogen-induced pituitary tumors: time course of induction and correlation with prolactin *Cancer Research.* **48**:4158-4162.
- Hazel, R. J. and Prosser, C. L. (1974) Molecular mechanism of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological Reviews.* **54**:620-677.

- Hernandez, I., Poblete, A., Amthauer, R., Pessot, R., Krauskopf, M. (1992). Effect of seasonal acclimatization on estrogen-induced vitellogenesis and on the hepatic estrogen receptors in the male carp. *Biochemistry International*. **28**:559-567.
- Hochachka, P. W. and Somero, G. N. (1973) Strategies of biochemical adaptation. N.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Hjelmeland, K., Christie, M., Raa, J. (1983). Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology*. **23**: 13-22.
- Isackson, P. J.; Dunbar, J. C. and Bradshaw, R. A. (1987) Role of glandular kallikreins as growth factor processing enzymes: structural and evolutionary considerations. *Journal Cellular Biochemistry*. **33**:65-75.
- Janssens, P; and Grigg J.A. (1994). Organ and culture of fish tissues. *Biochem and Molecular Biology of Fishes*. **3**: 375-386.
- Jones, TH, Figueroa, C.D., Smith, C., Cullen, D. and Bhoola, K.D. (1990) Characterization of a tissue kallikrein in human prolactin-secreting adenomas. *Journal of Endocrinology*. **124**:327-331.
- Kausel, G., Vera, M.I., Figueroa, J., Hernandez, J., San Martin, R., Molina, A., Chavez, V.M., Muller, M., Martial, J., and Krauskopf, M. (1998). Effect of seasonal acclimatization on the expression of the carp transcription factor Pit-1. *Biochemistry Molecular Biology International*. **45**:813-821.
- Kausel G, V. M., San Martin R, Figueroa J, Molina A, Muller M, Martial J, Krauskopf M (1999). Transcription factor Pit-1 expression is modulated upon seasonal

- acclimatization of eurythermal ectotherms: identification of two Pit-1 genes in the carp *Journal Cellular Biochemistry*. **75**: 598-609.
- Kausel G., F. K., Richards G, Figueroa J. (2000). Distribution of glandular kallikrein and correlation with prolactin in *Cyprinus carpio*. *Comperative Biochemistry_Physiology*. **126/A** Suppl. 1.
- Kawauchi, H.; Yasuda, A. and Rand-Weaver, M. (1990). Evolution of prolactin and growth hormone family. *Progress in Comparative Endocrinology*. Wiley-Liss, Inc. 47-53.
- Krauskopf M, A. R., Araya A, Concha M, León G, Ríos L, Vera M I, Villanueva J (1988). Temperature acclimatization of the carp. Cellular and molecular aspects of the compensatory response. *Archivos Biología Medica Experimental*. **21**:151-157.
- Laemli, V. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*. **227**:680-685.
- Larhammar D. and Risinger C (1994) Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common *Cyprinus carpio*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **3**:59-68.
- Luck, J. (1958) A simple method for protein determination. *Journal Biological Chemistry*. **233**:1407-1414.
- McKeown, W. A. and Peter, R. E. (1975) Hypotalamic control of prolactin and thyrotropin secretion in teleost, with especial reference to recent studies in the goldfish. *General Comparative Endocrinology*. **65B**:705-709.

- MacDonald, R.J, Southard-Smith, EM, and Kroon, E. (1988). Disparate tissue specific expression of members of the tissue kallikrein multigene family of the rat. *Journal Biological Chemistry* **271**:13864-13890.
- Marin-Grez, M. (1982) Multihormonal regulation of renal kallikrein. *Biochemical Pharmacology*. **46**:3941-3947.
- Magnadóttir B., Gudmundsdóttir S., Gundmundsdóttir B.K. (1995) Study of the humoral response of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*), naturally infected with *Aeromonas salmonicida ssp. Achromogenes*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **49**:127-142.
- Margolius, H.S.(1984) The kallikrein-kinin system in the kidney. *Annual Reviews Physiology*. **46**:309-326.
- Mindroui,T.; Carretero, O. A.; Walz, D. and Scicli, A. G. (1991) Tissue kallikrein processes small proenkephalin peptides. *Biochimie Biophysical Acta*. **1076(1)**:9-14.
- Mena F., Hummelt, G., Aguayo, D., Clapp, C., Martinez de la Escalera, G. and Morales, M. (1992). Changes in molecular variants during *in vitro* transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology*. **130**:3365-3377.
- Molina, A. (1993) Expresión de prolactina hipofisiaria durante la aclimatización del pez *Cyprinus carpio*. Tesis de grado. Escuela de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- Montagne, M. N.; Dussailant, M.; Chew, L. J.; Berod, A.; Lamberts, S. J.; Carter, D. A. and Rostene, W. (1995) Estradiol induces vasoactive intestinal peptide

- and prolactin gene expression in the rat anterior pituitary independently of plasma prolactin levels. *Journal Neuroendocrinology*. **7 (3)**:225-31.
- Murray, C.K. y Fletcher (1976). The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (Pleur pl. L.) tissues. *Journal Fish Biology*. **9**:329-334.
- Niall, H. D.; Hogan, M.; Sauer, R.; Rosenblume, I. and Greenwood, F. C. (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic growth hormone: Evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proceeding National Academic Science*. USA. **68**:866-869.
- Ole-Moiyoi, O.; Pinkus, G.S.; Spragg, J. and Austen, K.F.(1979) Identification of human glandular kallikrein in the beta cell of the pancreas. *New England Journal Medical*. **300**:1289-1294.
- Orstavik, T.B. (1980) The kallikrein-kinin system in exocrine organs. *Journal Histochemistry Cytochemistry*. **28**:881-889.
- Overlack, A.; Scicli, A.G. and Carretero, O.A.(1983) Intestinal absorption of glandular kallikrein in the rat. *American Journal Physiology*. **244B**:689-694.
- Pinkus, M Maier, DC Seldin, Ole-MoiYoi, KF Austen, and J Spragg (1983) Immunohistochemical localization of glandular kallikrein in the endocrine and exocrine human pancreas. *Histochemistry Cytochemistry*. **31**:1279-1290.
- Powers, C. A. and Nasjletti, A. (1983) A kininogenase resembling glandular kallikrein in the rat pituitary pars intermedia. *Endocrinology*. **112**:1194-1200.
- Powers, C. A. (1986) Anterior pituitary glandular kallikrein: trypsin activation and estrogen regulation. *Molecular Cellular Endocrinology*. **46**:163-174.

- Powers, C. A. and Hatala, M. A. (1990) Prolactin proteolysis by glandular kallikrein; *in vitro* reaction requirements and cleavage sites, and of detection of processed prolactin *in vivo*. *Endocrinology*. **127**:1916-1927.
- Prosser, C. L. (1986) *Adaptational Biology: Molecules to organisms*. Wiley & Sons. New York.
- Richards, G., Chao J, Chung P, Chao L (1995). Purification and characterization of tissue kallikrein-like proteinases from the black sea bass (*Centropristis striata*) and the southern frog (*Rana berlandieri*). *Pharmacol Toxicol Endocrinology*. **111**:69-82.
- Richards, G., Liang Y, Chao J, Chao L (1997a). Purification, characterization and activation of fish muscle prokallikrein. *Comparative Biochemistry Physiology*. **118C**:39-58.
- Richards, G., Chao L, Chao J (1997b). Distribution of tissue kallikreins in lower vertebrates: potential physiological roles for fish kallikreins. *Comparative Biochemistry Physiology*. **118C**:49-58.
- Rigoli, D. And Barube, J. (1980) Pharmacology of bradikinin and related kinins. *Pharmacology Reviews*. **32**:1-46.
- Scicli, A.G. and Carretero, O.A. (1986) Renal Kallikrein-kinin systems. *Kidney International*. **29**:120-130.
- Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, h., (1996) In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. *Journal Endocrinology*. **151**:113-118.

- Secombes, C.J. (1996) The non-specific immune system: cellular defences. In the fish immune system: organism, pathogen and environment (G.Iwama & T. Nakanishi, eds) San Diego: *Academic Press Inc.* 63-103.
- Seidelin, M., Madsen S (1999). Endocrine control of Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell development in brown trout (*Salmo trutta*): interaction of insuline-like growth factor-I with prolactin and growth hormone. *Journal Endocrinology* **162**:127-135.
- Server, A.C. and Shooter, E.M. (1977) Nerve growth factor. *Advancement. Protein Chemistry.* **31**:339-409.
- Shachter, M. (1980) Kallikreins (kininogenases) A group of serine proteinases with bioregulatory actions. *Pharmacology Reviews.* **31**:1-17.
- Shachter, M.; Peret, M. W.; Billing, A. G. and Wheeler, G.D. (1983) Immunolocalization of the proteasa kallikrein en the colon. *Journal. Histochemistry and Cytochemistry.* **31**:1255-1260.
- Sharma, J.N.(1988) Interrelationship between the kallikrein-kinin system and hypertention. *A Review. General Pharmacology.* **19**:177-187.
- Shimojo, N.; Chao, J; Chao, L. Margolius, H.S. and Mayfield, R.K. (1987) Identification and characterization of a tissue kallikrein in rat skeletal muscle. *Biochemistry Journal.* **243**: 773-778.
- Sinha, Y. N. (1992) Prolactin Variants. *Trends Endocrinol Metab.* **3**:100-106.
- Simson, J. A.; Spicer, S. S.; Chao, J.; Grimm, L. and Margolius, H. S. (1979) Kallikrein localization in rodent salivary gland and kidney with the immunoglobulin-enzyme bridge technique. *Journal Histochemistry and Cytochemistry,* **27**:1567-1576.

- Sonnenschein, C., Soto A (1998). An Updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology*. **65**:143-150.
- Swennen, D.; Rentier-Delrue, F.; Auperin, B.; Prunet, P.; Flik, G.; Wendelaar Bonga, S.E.; Lion, M. and Martial, J. A. (1991) Production and purification of biologically active recombinant tilapia (*Oreochromis niloticus*) prolactins. *Journal Endocrinology*. **131(2)**:219-27.
- Vera, M., Kausel G, Barrera R, Leal S, Figueroa J, Quezada C (2000). Seasonal adaptation modulates the expression of the protein kinase CK2b subunit gene in the carp. *Biochemistry Biophysical Research Communication*. **271**:735-740.
- Vio, C.P, Figueroa C.D., Caorsi I. (1988) Anatomical relationships between kallikrein containing tubules and the juxtaglomerular apparatus. *American Journal of Hypertension* **1**:269-271.
- Vio, C.P.; Silva, R. and Powers, C. A. (1989) Immunocytochemical of glandular kallikrein in the rat anterior pituitary. *Advances Experimental Medical Biology*. **247B**:183-188.
- Vío, C.P. Roa, J., Silva, R. and Powers, C. (1990). Localization of immunoreactive glandular kallikrein in lactotrophs of the rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* **51**: 10-14.
- Watts M. B., Burke C. (2001). Immune responses of teleost fish. *Austria. Veterinary Journal*. **79**: 570-574.
- Wicklmayr, M.; Brunnbauer, H. and Dietze, G. (1983) The kallikrein-kinin prostaglandin system: Involvement in the control of capillary blood flow and substrate

- metabolism in skeletal muscle tissue. *Advances Experimental Medical Biology*. **156**:625-638.
- Wicklmayr, M.; Rett., K.; Fink, E.; Tschollar, W.; Dietze, G. and Mehnert, H. (1988) Local liberation of kinins by working skeletal muscle tissue in man. *Hormone Metabolism Reserch*. **20**:535.
- Wilson M., Bengtén E., Miller N., Clem W., Du Pasquier L., Warr G. (1997). A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgG. *Immunology*. **94**:4593-4597.
- Yada, T.; Nagae, M.; Moriyama, S.; Azuma, T. (1999). Effects of prolactin and growth hormona on plasma imunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* **115(1)**:46-52.
- Yasuda A, M. K.-I., Kawauchi H, Peter RE, Lin H-R, Yamaguchi K & Sano H (1987). Primary structure of common carp prolactins. *General and Comparative Endocrinology* **66**:280-290.
- Ylönen A, R. A., Herttuainen J, Bogwald J, Jarvinen M, Kalkkinen N (1999). Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) skin contains a novel kininogen and another cysteine proteinase inhibitor. *European Journal Biochemistry*. **266**:1066-1072.