Centro de Investigaciones Biológicas
del Noroeste, S.C.

Programa de estudios de posgrado.

En el uso, manejo y preservación de los recursos naturales.

Orientación en biotecnología.

Tesis

Expresión génica diferencial en el riñón de *Mycteroperca rosacea* por vacunación con ADN plasmídico.

Para obtener el grado de

Maestro en ciencias.

P r e s e n t a

Flavio Ernesto Zepeda Núñez.

La Paz, B. C. S. Agosto de 2007.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS.

En la ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 14 de Agosto de 2007, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la tesis de grado titulada:

Expresión génica diferencial en el riñón de *Mycteroperca rosacea* por vacunación genética contra *Aeromonas veronii*.

Presentada por el alumno:

Flavio Ernesto Zepeda Núñez

Aspirante al grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES, CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**.

Después de de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA.

Dr. Felipe Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez
CO-TUTOR

Dr. Vicente Gracia López
CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Conformación del comité.

El presente trabajo de investigación se desarrollo principalmente en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana y el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Unidad de Patología Marina del CIBNOR, bajo la supervisión del Dr. Felipe Ascencio Valle y el Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez, respectivamente.

El comité tutorial y revisor de tesis, estuvo integrado por:

Dr. Felipe Ascencio Valle (Director).
Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez (Tutor).
Dr. Vicente Gracia López (Tutor).

El jurado de examen estuvo integrado por:

Dr. Felipe Ascencio Valle.
Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez.
Dra. Gracia Gómez Anduro

Suplente:
Dr. Ángel Campa Córdova

Resumen

Ante la necesidad de producir tecnologías profilácticas que apoyen el desarrollo de los sistemas de piscicultura productiva; el mejoramiento de la vacunación, a partir de nuevas estrategias, como la vacunación genética; ha hecho que esta técnica terapéutica, sea el componente esencial en las operaciones de piscicultura a gran escala. Sin embargo, uno de los principales retos en la investigación inmunológica, es analizar los factores genéticos que influencian la respuesta inmune de peces a bacterias.

Por lo cual, en este estudio se analizó la expresión génica diferencial en el riñón de *M. rosacea* con la técnica de despliegue diferencial del ADNc (Liang y Pardee, 1992), a partir de un bioensayo de vacunación genética con el vector plasmídico pOMP48-LP: construido con el gen *omp48* de la bacteria *Aeromonas veronii* (Vázquez *et al.*, 2003), que codifica para una proteína de membrana externa (Omp48) antigénica; incluido en el vector pcDNA3-LP de expresión y secreción para células de pez (Collet y Secombes, 2005).

Del análisis de despliegue diferencial del ADNc se obtuvieron 7 EST´s semejantes a secuencias génicas de teleósteos con función hipotética con 5 genes (*IGSF11*, *SKIV2L*, *Yippee*, *MERTK* y *AP*) relacionados al sistema inmune. El despliegue diferencial de estas EST´s determinadas en el tejido renal, mostró evidencia sobre la capacidad de la vacunación genética, en estimular una respuesta inmune específica bacteriana, sin efectos inflamatorios.

Palabras clave: Vacuna genética, vacuna de ADN, *Aeromonas*, *Mycteroperca rosacea*, peces, riñón, inmunología, despliegue diferencial, EST, *IGSF11*, *SKIV2L*, *Yippee*, *MERTK*, *AP*.

Abstract

In the face of the necessity to support the development of productive aquaculture systems prophylactic technologies have been developed; one of the new strategies in improved vaccination techniques is genetic vaccination and this therapeutic technique has become the preferred method in immunization operations of large scale fisheries. However, one of the main challenges of immunological studies is the analysis and understanding of the genetic factors that influence the immune response of fish to bacteria.

In this study genic expression of a genetic vaccination was analyzed utilizing differential display of DNAc in the kidney of *M. rosacea* (Liang and Pardee, 1992), starting from a bioassay of the genetic vaccination with the vector plasmidic OMP48-LP: built with the gene omp48 of the *Aeromonas veronii* (Vázquez *et al.*, 2003), that codes for an antigenic outer membrane protein (Omp48); included in the vector pcDNA3-LP of expression and secretion for cells of fish (Collet and Secombes, 2005).

From the analysis of differential display of the ADNc 7 EST´s were obtained similar to genetic sequences of teleosts with hypothetical function with 5 genes (*IGSF11*, *SKIV2L*, *Yippee*, *MERTK* y *AP*)) in relation to the immune system. The differential display technique of these EST´s with kidney tissue showed the capacity for genetic vaccination, stimulating a specific immune response to the bacteria without inflammatory effects.

Keywords: Genetic vaccine, DNA vaccine, *Aeromonas*, *Mycteroperca rosacea*, fish, kidney, immunology, differential display, EST, *IGSF11*, *SKIV2L*, *Yippee*, *MERTK*, *AP*.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis tres amores…

Hilda Alicia Núñez Palenius "Mi madre"

Consuelo Zepeda Núñez "Mi hermana"

Flavio Zepeda Herrera "Mi padre"

Prefiero utilizar las letras de aquellos que tienen la mano mejor adaptada al corazón.

Me encanta Dios.

Me encanta Dios. Es un viejo magnifico que no se toma en serio. A él le gusta jugar y juega. Y a veces se le pasa la mano y nos rompe una pierna y nos aplasta definitivamente. Pero esto sucede porque es un poco cegatón y bastante torpe de las manos.

Nos ha enviado a algunos tipos excepcionales como ***Osho****, o Buda, o Cristo o Mahoma, o* ***mi abuela Chelo****, para que nos digan que nos portemos bien. Pero eso a él no le preocupa mucho: nos conoce. Sabe que el* ***pez*** *grande se traga al chico, que la lagartija grande se traga a la pequeña****, que el hombre se traga al hombre****. Y* ***por eso inventó la muerte: para que la vida -no tú ni yo- la vida sea para siempre****.*

Ahora los científicos salen con su teoría del ***Bing Bang****... Pero ¿qué importa si el universo se expande interminablemente o se contrae? Esto es asunto sólo para agencias de viajes.*

A mi me encanta Dios**. Ha puesto orden en las galaxias y distribuye bien el tránsito en el camino de las hormigas. **Y es tan juguetón y travieso que el otro día descubrí que ha hecho -frente al ataque de los anbióticos- ¡bacterias mutantes!

Viejo sabio o niño explorador, cuando deja de jugar con sus soldaditos de plomo y de carne y hueso, hace campos de flores o pinta el cielo de manera increíble.

Mueve una mano y hace el mar, mueve otra y hace el bosque. Y cuando pasa por encima de nosotros, quedan las nubes, pedazos de su aliento.

Dicen que a veces se enfurece y hace terremotos, manda tormentas, caudales de fuego, vientos desatados, aguas alevosas, castigos y desastres. Pero esto es mentira.

Es la tierra que cambia -y se agita y crece- cuando Dios se aleja.

***Dios siempre esta de buen humor**. Por eso **es el preferido de mis padres**, **el escogido de mi hija**, **mi hermana**, **la mujer más amada**, el perrito y la pulga, la piedra más antigua, el pétalo más tierno, el aroma más dulce, la noche insondable, el borboteo de luz, **el manantial que soy**.*

A mi me gusta, a mi me encanta Dios.

Que Dios bendiga a Dios.

(Jaime Sabines, 1999) modificado.

Agradecimientos

Agradezco a mi directo de tesis, Dr. Felipe Ascencio Valle, por la coordinación que llevó acabo para la realización de este trabajo de investigación. En especial agradezco el gran apoyo que me brindo mi tutor, Dr. Roberto Vázquez; ya que su aportación y desempeño fue del grado de un codirector.

Un agradecimiento a mi tutora suplente, Dra. Gracia Gómez, por sus importantes aportaciones para la realización del documento de tesis. En especial agradezco a todos los compañeros (amigos) y personal que trabaja en los laboratorios de Patogénesis Microbiana y Biología Molecular de Plantas, por todo su apoyo e importante crítica, que me ayudó a realizar y enriquecer este trabajo de investigación.

Agradezco a los técnicos que laboran en el área de cultivo, Jorge Sandoval Soto, Jorge Angulo Calvillo y al investigador Guillermo Portillo Clark por su apoyo en la realización del cultivo y bioensayo de vacunación de peces; así, como a la técnica María Romero Geraldo por su apoyo en los trabajos de disección y manipulación de peces.

A toda la gente que labora en las diferentes áreas de este centro de investigaciones, muchas gracias, por los servicios y facilidades que me brindaron con el desempeño de su trabajo.

Prefacio

La información generada se presentó en el congreso nacional:

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍAY BIOINGENIERÍA, AC.

XII CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA 25 - 29 JUNIO DE 2007, MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO.

Zepeda-Núñez F.E., Ávila-Mendoza J., Ascencio-Valle F. y Vázquez-Juárez R.C. (2007). Expresión génica diferencial en el riñón de *Mycteroperca rosacea* por vacunación con ADN. Modalidad de trabajo libre en cartel del área VIII. Genómica.

Índice

Acta de revisión de tesis…….. II

Conformación de comités……...… III

Resumen……. IV

Abstract…… V

Dedicatoria……. VI

Agradecimientos…….…. VIII

Prefacio…….. IX

Índice……...… X

Lista de figuras……..… XII

Lista de tablas……..… XIII

Abreviaturas…… XIV

I. Introducción…… 1

1. Sistema inmune de peces teleósteos…….… 2

2. Órganos linfoides…….… 3

a. Órganos linfoides primarios…… 3

b. Órganos linfoides secundarios…….… 4

3. Sistema inmune innato……...…… 5

a. Defensa innata celular…… 5

b. Defensa innata humoral……..… 7

4. Sistema inmune adaptativo……...… 12

a. Defensa adaptativa celular…… 12

b. Defensa adaptativa humoral……..… 13

5. Técnicas profilácticas en la piscicultura……..… 16

a. Vacunas en teleósteos……..… 18

b. Condiciones para una óptima inmunización. ……...… 19

c. Vacuna genética……..… 19

d. Expresión inmunogénica ……..…… 23

6. Bacteria Aeromonas. ……..… 25

7. *Mycteroperca rosacea*, cabrilla sardinera…… 25
II. Antecedentes…… 27
1. Vacunación contra aeromonas en teleósteos……..… 27
III. Justificación…… 29
IV. Hipótesis……..… 30
V. Objetivo…… 30
1. Objetivos particulares……..… 30
VI. Material y métodos…… 31
1. Ingeniería genética de la vacuna pOMP48-LP……...… 31
2. Sistema del piscicultivo……..… 31
3. Bioensayo de vacunación……...… 32
4. Disección del tejido renal, extracción del ARN total y síntesis de ADNc…... 32
5. Análisis del despliegue diferencial de ADNc……..… 33
6. Secuanciación de las EST´s y análisis bioinformático……..… 33
VII. Resultados…… 35
VIII. Discusión……..… 45
IX. Conclusiones……... 48
X. Literatura citada…… 49

Lista de figuras

Figura 1. Efecto de la vacunación contra la furunculosis de *A. salmonicida*, sobre el decremento en el uso de antibióticos para la piscicultura del salmón en Noruega de 1974 al 2003……. 17

Figura 2. Esquema general de una vacuna genética……... 20

Figura 3.Representación del mecanismo de vacunación genética en la generación de las respuestas celular y humoral antígeno-específica……. 22

Figura 4. Morfología general de un pez de 56 cm de longitud estándar de la especie *Mycteroperca rosacea*……..... 26

Figura 5. Construcción de la vacuna pOMP48-LP……. 37

Figura 6. Oligonucleótidos utilizados para la síntesis y amplificación del ADNc; bandas de las subpoblaciones APC y APG, seleccionadas por su despliegue diferencial…….. 38

Figura 7. Productos de la PCR del ADNc extraído de las bandas cortadas del gel de poliacrilamida y productos de la PCR de clones en el análisis de verificación del inserto de ADNc clonado en el vector pGEM-T……..… 39

Lista de tablas

Tabla I. Patógenos bacterianos importantes en la piscicultura……... 18

Tabla II. Nombre, descripción y siglas de las versiones de la herramienta BLAST, para secuencias nucleotídicas del NCBI…….. 34

Tabla III. Oligonucleótidos diseñados para amplificar por la PCR, el gen *omp48* para la vacuna pOMP48-LP……..... 35

Tabla IV. Bandas cortadas del gel de poliacrilamida, Oligo-dT" utilizado en la síntesis del ADNc, extracción del ADNc, clones positivos en la técnica de clonación con el vector pGEM-T, verificación del inserto de ADNc por PCR y EST determinadas……. 40

Tabla V. Análisis de redundancia con la herramienta CLUSTAL W (1.83) entre las 7 EST´s procesadas……... 40

Tabla VI. Resumen del análisis de similitud BLAST de las 5 EST´s determinadas……... 44

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo *.
ACP	Ruta del complemento alternativa *.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ADNg	Ácido desoxirribonucleico génómico.
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico.
AP	Fosfatasa alcalina *.
APC	Célula presentadora de antígeno *.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
BGH	Hormona de crecimiento bovino
BLAST	Programa para búsqueda de alineamiento local básico *.
°C	Grados centigrados.
CCP	Ruta del complemento clásica *.
CDS	Secuencia codificante *.
CMV	Citomegalovirus.
CPS	Polisacarido-C *.
CRP	Proteína C-reactiva *.
CTL	Linfocito T citolítico *.
DD	Despliegue diferencial.
DEPC	Dietilpirocarbonato
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble hebra *.
EBI	Instituto Europeo de Bioinformática *.
ECP	Proteína extracelular *.
EGC	Células eosinofílicas granulares *.
EST	Marca de secuencia expresada *.
FAM	Molécula con función asociada *.
Fc	Fragmento cristalizable *.
FcR	Receptor de Fc *.
g	Gramos.
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino *.

GCAP	Fosfatasa alcalina de cèlulas germinales *.
HCG	Gonadotropina coriónica humana *.
HeLa	Cepa estable de un epitelio celular maligno humano, derivado del carcinoma epidermoide cervical de Henrietta Lacks *.
hGH	Hormona de crecimiento humano *.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos *.
IAP	Fosfatasa alcalina intestinal *.
IEL	Linfocitos intraepiteliales *.
IFN	Interferón.
Ig	Inmunoglobulina.
IGSF11	Gen de la superfamilia de las imunoglobulinas 11 *.
IHNV	Infección del virus de necrosis hematopoyética *.
IL	Interleucina.
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido.
IUCN	Unión internacional para la conservación de la naturaleza y los recursos naturales *.
L	Litros.
LB	Luria-Bertoni.
LCP	Ruta del complemento de la lectina *.
LPS	Lipopolisacáridos.
MAC	Complejo de ataque a la membrana *.
MAF	Factor de activación de macrófagos *.
MASP	MBL-asociada a serin proteasa *.
MBL	Lectina unida a manosa *.
MERTK	Gen c-MER proto-oncogen tirosina quinasa
mg	Miligramos.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad *.
mm	Milímetros.
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica *.
NCC	Células citotóxicas inespecíficas *..
NK	Célula asesina natural *..
Oligo-dT	Oligonucleótido politimilado
OMP	Proteína de membrana externa *.
ORF	Marco de lectura abierta *.

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida *.
PAS-GL	Leucocitos granulares ácido-Schiff positivos *.
PBS	Buffer salino con fosfato *.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa *.
pH	Potencial de Hidrógeno.
PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria *.
poly (A)	Poliadenilación *.
poly(A)$^-$ RNA	Ácido ribonucleico deficientemente politimilado *.
RBC	Célula roja sanguínea *.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción inversa *.
SKIV2L	Gen semejante a la superasesina viralicídica 2 *.
SSH	Hibridación sustractiva por supresión *.
TCR	Receptores de células T *.
TGFβ	Factor de crecimiento y transformación beta *.
Th	Linfocito T cooperador *.
Tm	Temperatura de alineamiento *.
TM	Forma transmembranal *.
TNAP	Fosfatasa de tejido inespecífico *.
TNF	Factor de necrosis tumoral *.
USD	Dólar estadounidense *.
UV	Luz ultravioleta *.
VHS	Septicemia hemorrágica viral *.
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactósido
μg	Microgramos.
μL	Microlitros.

* Siglas en inglés.

Introducción.

Uno de los principales retos que enfrenta la investigación inmunológica moderna, es la identificación de las moléculas que actúan como factores genéticos; con el fin de analizar su influencia en la respuesta inmune a infecciones y en la susceptibilidad diferencial ante retos contra microbios. Por lo cual, se han establecido algunas especies de animales como modelo de estudio (tales como *C. elegans* y *Drosophila*). Sin embargo, aún con la conservación evolutiva de las principales vías de la inmunidad innata, la extrapolación de los resultados, a partir de estos invertebrados a mamíferos no es siempre directa. Ante esta problemática se ha determinado el uso de peces como modelo inmunológico, ya que en ellos ha sido posible examinar la expresión génica de un sistema inmune completamente desarrollado contra genes antigénicos bacterianos; un claro ejemplo es el pez cebra *Danio rerio*, el cual fue establecido como un sistema modelo alternativo y complementario al uso de ratones (Trede *et al.*, 2004).

Con el desarrollo de estos estudios, se han determinado marcadores de secuencia expresada "EST", obtenidos del tejido inmune de peces no tratados y tratados con inmunoestimulantes, tales como peptidoglicanos y lipopolisacáridos "LPS"; mitógenos, como la concanavalina A y LPS; así como de peces infectados con virus (Tsoi *et al.*, 2004). En estudios de genómica funcional a gran escala, se han utilizado múltiples vías para examinar la expresión de varios genes bajo condiciones diferenciales específicas. Estas técnicas incluyen análisis serial de expresión de genes, hibridación substractiva por supresión "SSH", despliegue diferencial "DD" y recientemente chips de ADN complementario "ADNc" y arreglos. Existen ventajas y dificultades inherentes en cada una de estas técnicas, pero todas han sido utilizadas con varios grados de éxito en el estudio de la respuesta inmune (Tsoi *et al.*, 2004).

Los peces son un excelente modelo inmunológico, ya que son el grupo más distantes filogenéticamente dentro de los vertebrados; con un sistema inmune innato y adaptativo característico, que presenta células B y T semejantes a las mamíferas, así como células semejantes a las asesinas naturales "NK", capaces de eliminar xenógenos marcados mediante el proceso de células citotóxicas dependientes de anticuerpos (Stafford *et al.*, 2006); aunque su respuesta inmune adaptativa es menos desarrollada que la de vertebrados

superiores, presentan un número de respuestas inmunes innatas constitutivas y estimulables para la defensa contra infecciones. Muchas especies de peces no solo poseen un número de procesos inmunes innatos, homólogos a los observados en mamíferos; sino también presentan un número de vías únicas dentro de las cuales han expandido su habilidad para reconocer y eliminar patógenos. Barreras físicas y químicas, incluyendo compuestos antimicrobianos que no solo son constitutivos, sino también pueden ser inducidos bajo infección. Los peces poseen células inmunes que son capaces de producir mediadores solubles que regulan la respuesta inflamatoria, teniendo así un sistema del complemento enteramente funcional y receptores únicos en el reconocimiento de patógenos (Plouffe *et al.*, 2005).

Los peces son por mucho los vertebrados con mayor riqueza y abundancia en especies; distribuidos en los hábitats acuáticos más extremos (Plouffe *et al.*, 2005). Actualmente se tienen determinadas 29,900 especies en la base de datos FishBase (Froese y Pauly, 2007); esta riqueza es comparable a la de los demás vertebrados en conjunto, con 26,700 especies entre anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Amundsen, 2003). Muchos de los genes que codifican moléculas asociadas con la respuesta inmune en peces, tienen su contraparte en el sistema del complemento de mamíferos, indicando que tales, representan a los precursores evolutivos de mediadores clave de la inmunidad innata y adaptativa de vertebrados (Plouffe *et al.*, 2005).

Sistema inmune de peces teleósteos.

Usualmente se divide el sistema inmune en innato (inespecífico) y adaptativo (específico). Sin embargo, la evidencia que existe en la inmunología de peces y mamíferos, muestra una combinación de estos sistemas; generalmente la respuesta innata precede a la respuesta adaptativa, activando y determinando la naturaleza de la respuesta adaptativa, para cooperar así con el mantenimiento de la homeostasis en el organismo (Magnadóttir, 2006).

Los teleósteos (peces óseos) muestran características únicas, tales como la dependencia de la temperatura para adquirir inmunidad y algunas limitaciones sobre la diversidad de anticuerpos. Por lo tanto se infiere que las funciones inmunes innatas tienen un papel mas

determinante en estos vertebrados, en comparación a los vertebrados homeotermos, tales como aves y mamíferos (Tsoi *et al.*, 2004).

Órganos linfoides.

Los teleósteos al no poseer una medula ósea linfohematopoyética, la formación de células sanguíneas y linfoides, ocurre en el riñón, timo, bazo y tejido linfoide asociado al intestino "GALT"; estos órganos asemejan estructural y funcionalmente a la médula ósea de vertebrados superiores (Zapata *et al. in* Iwama, 1996).

Órganos linfoides primarios.

El timo, riñón y bazo son los principales órganos linfoides de teleósteos. En teleósteos dulceacuícolas, el timo es el primer órgano que se hace linfoide, aunque a inicio el riñón puede contener progenitores hematopoyéticos pero no linfocitos. Sin embargo, en teleósteos marinos el orden en que los principales órganos linfoides se desarrollan es: riñón, bazo, y finalmente el timo, aunque en la larva el bazo es más eritropoyético que linfopoyético (Zapata *et al.*, 2006).

El riñón consiste de dos segmentos distintos, aunque estructuralmente similares: el anterior, cefálico o pronefros; así como el medio y posterior, también llamado mesonefros. Ambas regiones exhiben capacidad linfohematopoyética, pero esta es mayor en el pronefros, donde la función renal ha desaparecido. Estructuralmente, el pronefros se compone de una red de fibras reticulares que proporcionan soporte para el tejido linfohematopoyético, que se encuentra disperso entre un sistema sinusoidal revestido por células retículo epiteliales. En los teleósteos se han identificado células semejantes a las presentadoras de antígeno, así como a linfocitos T y B (Zapata *et al. in* Iwama, 1996). El origen y tiempo de aparición de linfocitos B en teleósteos es materia de discusión, aunque en muchos estudios se ha sugerido al riñón como origen y diferenciación de los linfocitos B (Zapata *et al.*, 2006).

En teleósteos el epitelio tímico está continuo al epitelio faríngeo, aunque su forma no es homogénea, dificultando así su demarcación (Zapata *et al.*, 2006). A nivel estructural, se compone mayoritariamente de células linfoides, principalmente células T, en distintas fases de maduración, dispuestos en una red formada por células epitelio reticulares. También

pueden encontrarse células mioides, células del tipo de los macrófagos y células granulares eosinofílicas. En ocasiones pueden aparecer nidos focales epiteliales, conocidos como corpúsculos de Hassal. En cuanto a funcionalidad, por evidencia indirecta, se sugiere que presenta la misma función que en vertebrados superiores, el ser la fuente principal de linfocitos T inmunocompetentes (Zapata *et al. in* Iwama, 1996).

Órganos linfoides secundarios.

En todos los vertebrados, los órganos linfoides periféricos secundarios, proveen la organización estructural para atrapar antígenos y procesarlos dentro de rutas apropiadas para las células que son capaces de reaccionar a estos. Por tal, los órganos linfoides en peces, que son el equivalente de la médula ósea (aparte de su función hematopoyética), el hecho presumible de participar en la respuesta inmune, los podría categorizar como órganos linfoides secundarios. Tanto el bazo como el GALT, constituyen los principales órganos linfoides periféricos (Zapata *et al.*, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

El sistema circulatorio secundario tiene similitudes con el sistema linfático de otros vertebrados; ya que evidencias indirectas sugieren, que este sistema contiene todos los tipos de leucocitos, pero no los eritrocitos encontrados en la circulación primaria y recientemente ha sido especulado que este puede estar envuelto en la reactividad inmune del pez (Zapata *et al.*, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

El bazo es el mayor órgano linfoide periférico de todos los vertebrados con mandíbula articulada “Gnatostomados”. Es un órgano filtrador de sangre que presenta un incremento en complejidad estructural, en relación al aumento de su eficiencia en la captura y procesamiento de antígenos. Sin embargo, la cantidad de tejido linfoide en el bazo de diferentes vertebrados es muy variada, reflejándose principalmente en el patrón de circulación de la sangre y/o en la ocurrencia de otros órganos linfoides periféricos. Los teleósteos que contienen abundante tejido linfohematopoyético en el riñón, presentan un bajo desarrollo del tejido linfoide en el bazo y viceversa (Zapata *et al.*, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

En todos los teleósteos, a lo largo del intestino, aparecen acumulaciones difusas de tejido linfoide; sin embargo en las especies que exhiben dos segmentos intestinales, el segundo parece estar especializado para atrapar y procesar antígenos. Aparte de la presencia de linfocitos diferenciados y células del plasma, se ha identificado en el GALT de varios teleósteos, un incremento en número de estas células, después de un reto antigénico oral (Zapata *et al.*, *in* Iwama y Nakanishi, 1996). Este tejido, difiere al de mamíferos en que, solo comprende de linfocitos intraepiteliales "IEL" diseminados a través de la mucosa, pero no en estructuras especializadas como la ileal o placas de Peyer (Bernard *et al.*, 2006).

Sistema inmune innato.

El reconocimiento de lo impropio en el sistema inmune innato, es mediado por líneas germinales que codifican una serie de proteínas receptoras para el reconocimiento de un patrón molecular característico de los microorganismos; incluyendo polisacáridos, LPS, peptidoglicanos, ADN bacteriano y ARN viral de doble hebra, así como otras moléculas no comúnmente encontradas en la superficie celular de organismos multicelulares.

Defensa innata celular.

Una variedad de leucocitos están envueltos en la defensa celular innata de peces incluyendo monocitos/macrófagos, granulocitos y células citotóxicas inespecíficas "NCC". Los macrófagos y granulocitos son células fagocíticas móviles que se encuentran en la sangre y en tejido linfoide secundario. Son particularmente importantes en la inflamación, que es la respuesta celular a la invasión microbiana y/o tejido dañado iniciando en una acumulación local de fluido y leucocitos. En menor cantidad, granulocitos móviles en tejido llamados células eosinofílicas granulares "EGC". También envueltas en la respuesta del huésped a bacterias y nuevos patógenos en la mucosa intestinal y branquial. Estas células pueden degranularse liberando agentes inmunológicos, de manera análoga a los mastocitos de mamíferos. Por otro lado, células del huésped infectadas por virus y protozoarios patógenos, pueden ser la señal para que NCC presentes en la sangre, tejido linfoide y mocoso, puedan eliminar células vía mecanismo apoptótico o necrótico (Secombes, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Una característica importante de todos estos eventos es la ausencia de especificidad, permitiendo una rápida movilización de un gran número de células. Sin embargo, a diferencia de la defensa adaptativa, no existen componentes de memoria inmune, por lo que en exposiciones subsecuentes con el mismo patógeno no conduciría a una respuesta mas eficiente. Sin embargo, las células envueltas en la inmunidad innata son hábiles para interactuar con ellas, o con los productos de células del sistema inmune adaptativo para estimularlo. Esto es particularmente efectuado durante la dilatación o las reacciones inflamatorias crónicas, que ocurren si el estimulo inflamatorio persiste (Secombes, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Las NCC en peces, son consideradas el equivalente funcional a las células NK. Las cuales pueden lisár un amplio espectro de líneas celulares tumorales de mamíferos, así como peces transformados por protozoarios parásitos. También se ha descrito en NCC una molécula con función asociada "FAM", envuelta en el reconocimiento de células marcadas. Esta FAM es similar a la vimentina y anticuerpos promovidos por la actividad inhibitoria de las NCC (Secombes, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Durante la respuesta inflamatoria, ocurren tres eventos principales. Primero hay un incremento en el suministro de sangre en el área infectada. Seguido por un incremento en la permeabilidad por capilaridad y al final una migración de leucocitos fuera de los capilares y hacia dentro del tejido circundante. Una vez dentro del tejido, migran a través del sitio de infección, atraídos por una variedad de moléculas derivadas del huésped y del patógeno. Así, cuando un patógeno gana la entrada al tejido del huésped, este encuentra rápidamente una red de células fagocíticas con potente actividad microbicida, que limita su propagación o lo elimina completamente (Secombes, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

El desarrollo de la reacción inflamatoria es controlada por mediadores, incluyendo citocinas, eicosanoides, factores del complemento y otros compuestos vaso activos liberados por fagocitos "EGC", leucocitos granulares ácido-Schiff positivos "PAS-GL" y trombocitos. El efecto rápido, ejecutado por mediadores tales como aminas vaso activas inician tal respuesta. Después, nuevamente moléculas sintetizadas tales como eicosanoides atraen y activan leucocitos que liberan mediadores que regulan la respuesta en el sitio de

infección. Sin embargo, es la persistencia de un antígeno/patógeno la que ejerce el último control (Secombes, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Los leucocitos de varias especies de teleósteos han mostrado reacciones citotóxicas espontáneas contra una amplia variedad de líneas celulares de peces y mamíferos, células infectadas con virus y protozoarios parásitos. Esto constituye otro componente de la defensa celular innata. Las NCC están presentes en órganos linfoides (timo, riñón y bazo), en la cavidad peritoneal y sangre, aunque su actividad es baja en este último. Adicionalmente, células similares a las NCC pueden ser encontradas en el hígado (células no parenquimales), pero presentan baja actividad citolítica. Muchos factores han mostrado influenciar la actividad de NCC, tales como la dieta, temperatura, estrés, administración de hormona de crecimiento, linaje y edad del pez. La actividad es mayor en juveniles y a temperaturas bajas, sugiriendo que las NCC son particularmente importantes cuando la respuesta adaptativa, mediada por linfocitos, es relativamente pobre. Sin embargo, en condiciones postestrés la actividad de las NCC es suprimida con la respuesta de los linfocitos (Secombes, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Defensa innata humoral.

El suero, moco y huevos de peces contienen una variedad de sustancias que inhiben inespecíficamente el desarrollo de microorganismos infecciosos. Estas sustancias son predominantemente proteínas o glicoproteínas que tienen su contraparte o precursor en los componentes del patógeno. Son específicas en su reacción con un solo grupo o configuración química, pero en si, son llamadas “inespecíficas” ya que, las sustancias con las cuales reaccionan son muy comunes y afectan el crecimiento de varios tipos de microorganismos. A pesar de su importancia potencial en la defensa del huésped, sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, no han sido completamente aclaradas (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Las lisozimas se encuentran en un amplio rango de vertebrados y es uno de los factores defensivos contra la invasión por microorganismos. Estos factores rompen el enlace β(1→4) entre el ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina de la capa de peptidoglicano en la pared celular de bacterias Gram-positivas, previniendo así su

proliferación. En el caso de bacteria Gram-negativas, que no son directamente dañadas por lisozimas, la enzima se vuelve efectiva después de que el sistema del complemento y otras enzimas rompen la membrana celular externa, descubriendo así la capa de peptidoglicano de la bacteria. Adicionalmente a un efecto antibacterial directo, las lisozimas promueven la fagocitosis como una opsonina o directamente mediante la activación de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. En peces, las lisozimas se distribuyen principalmente en tejidos ricos en leucocitos, tales como el pronefros, así como en sitios donde el riesgo de invasión bacteriana es alto (piel, branquias, tracto digestivo y huevos). Esto implica que las lisozimas de peces juegan un papel importante en los mecanismos de defensa del huésped contra enfermedades infecciosas (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

El sistema del complemento está compuesto por más de treinta y cinco proteínas solubles plasmáticas que juegan un papel clave en la inmunidad innata y adaptativa. Este sistema es iniciado por una o la combinación de tres rutas: la del complemento clásica "CCP", la del complemento alternativa "ACP" y la del complemento de la lectina "LCP". En la CCP, C1 es el primer activado por un complejo antígeno-anticuerpo y este es seguido por una cascada de interacciones de C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9. El efecto avanzado de los componentes del complemento C5 a C9, forman un complejo de ataque a la membrana "MAC", que induce la citólisis de la célula blanco (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996 y Boshra *et al.*, 2006).

En la ACP, C3 es directamente activado, por la presencia de factores B y D en sustancias tales como los LPS de bacterias Gram-negativas, inulina, zymosan y eritrocitos de conejo; este además, conduce a la formación de un MAC. La LCP requiere la interacción de lectinas tales como lectina unida a manosa "MBL" y ficolinas con grupos sacáridos presentes en la superficie de microbios. Después de la unión de las lectinas al sacárido microbiano, se activan las enzimas asociadas con estas lectinas MBL-asociada a serin proteasa "MASP". Estas proteasas han mostrado ser estructuralmente homólogas a los componentes del complejo C1 (C1r y C1s). Existen tres tipos de moléculas MASP-1,2,3 de los cuales su papel en la LCP permanece indeterminado. Las funciones mediadas por productos de activación del complemento en la inmunidad innata, incluye fagocitosis y citólisis de patógenos, solubilización de complejos inmunes e inflamación. Al respecto se

ha observado que, el fragmento C3/C4 unidos a antígeno o complejos inmunes, incrementa la activación y procesamiento del antígeno por células presentadoras de antígeno "APC´s", permitiendo una respuesta primaria y secundaria al antígeno más efectiva. Adicionalmente se ha demostrado que, el antígeno ligado a la porción C3d de C3 disminuye el umbral para la activación de células B, haciendo 1000-10,000 veces más inmunogénico comparado al antígeno solo (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996 y Boshra *et al.*, 2006).

El sistema del complemento de peces teleósteos, al igual que el de vertebrados superiores, puede ser activado a través de las tres rutas del complemento. Aunque la secuencia de activación y los componentes envueltos en la ruta clásica y alterna han sido caracterizados en un significante grado, se sabe muy poco acerca de los mecanismos y moléculas envueltas en la activación de la ruta de la lectina. En contraste a mamíferos, el sistema del complemento en teleósteos es activo a muy bajas temperaturas y los títulos en la ACP son mayores por varios órdenes de magnitud. Además, es interesante hacer notar que a través de la ruta alternativa, el sistema del complemento de peces medía la lisis de eritrocitos "RBC" de una variedad de especies animales, mientras que en humanos esta actividad está principalmente restringida a la lisis de RBC de conejo (Boshra *et al.*, 2006).

Esta propiedad del sistema del complemento de peces, da evidencia de un mayor reconocimiento de superficies extrañas en comparación al de mamíferos. Este amplio reconocimiento de partículas impropias puede ser debido a que, en contraste a mamíferos, algunos componentes del sistema del complemento en peces presentan isoformas. Al respecto, una de las propiedades más significantes del sistema del complemento de teleósteos, es que la proteína C3 –un componente clave–, presenta isoformas que son el producto de diferentes genes (Boshra *et al.*, 2006).

Una característica particular de estás isoformas C3, es el hecho de mostrar diferencias importantes en su eficiencia de unión a superficies activadoras del sistema del complemento. Por lo cual, se ha planteado la hipótesis de que esta particular diversidad estructural y funcional en C3 de teleósteos provee un mecanismo para reconocer un amplio rango de microorganismos, permitiendo así, expandir la capacidad de reconocimiento en la inmunidad innata del pez. Aunque esta diversificación de los componentes del sistema del

complemento en peces no se restringe a la molécula C3; ya que la combinación de títulos altos y la activación de este sistema en un amplio rango de temperaturas, junto con la diversidad de algunos componentes clave, hace al complemento un sistema muy poderoso de defensa en teleosteos (Boshra *et al.*, 2006).

Los interferones "IFN´s" son proteínas o glicoproteínas capaces de inhibir la replicación de virus. En mamíferos se diferencian tres tipos de IFN (α, β y γ) por la base de sus propiedades bioquímicas y biológicas. Aunque IFN-α y IFN-β difieren en antigenicidad, tienen muchas similitudes y son frecuentemente agrupadas como IFN tipo I. Ambos son inducidos en células infectadas con virus o incubadas con ARN de doble hebra "dsRNA" y probablemente cualquier tipo de célula puede producirlos. En contraste, el IFN-γ tipo II no relacionado, es generalmente aceptado que linfocitos T estimulados por antígeno o mitógeno son los principales productores de IFN-γ. Adicionalmente, este difiere del IFN tipo I en su espectro de actividad biológica, que incluye regulación y diferenciación celular, así como comunicación intercelular. El IFN-γ activa células para la respuesta inmune, tales como las NK y macrófagos. Uno de los llamados factores de activación de macrófagos "MAF´s" se considera un IFN-γ y por esta razón, están ahora incluidos entre las linfocinas "citocinas" (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996; Russell y Lumsden 2005).

La producción de IFN se ha confirmado solo en teleósteos (no en peces ciclóstomos o cartilaginosos). Además ya se tiene bien establecido que las células de teleósteo pueden secretar moléculas IFN-α e IFN-β en respuesta a una infección viral o por exposición a dsRNA. Se ha observó que leucocitos de riñón de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, secretaron una molécula similar al IFN-γ con actividad antiviral y MAF posteriormente a una estimulación con un mitógeno (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996; Russell y Lumsden 2005).

La proteína C-reactiva "CRP" es la primera proteína que aparece en el plasma de humanos y animales al sufrir un daño tisular, infección o inflamación. En la fase aguda esta proteína tiene la característica de reconocer y precipitar polisacárido-C "CPS", un componente de la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*, en presencia de Ca^{2+}. Adicionalmente, CRP activa el sistema del complemento a través de la ruta clásica en combinación con este

ligando, reforzando la citotoxicidad mediada NK y macrófagos; así como solubilidad de sustancias endógenas derivadas del daño celular, tales como la cromatina. Muchos peces parecen poseer CRP en su suero. Desde la fosforilcolina que es un determinante que ocurre ampliamente en la pared celular o estructuras de la superficie de organismos invasores tales como bacterias, hongos y parásitos; esta parece tener gran similitud con el limulín de *Tachypleus tridentatus*, un CRP de pez que puede reconocer fosforilcolina, jugando un papel vital en el mecanismo de defensa del huésped como un substituto para la inmunoglobulina "Ig" (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996; Russell y Lumsden 2005).

La transferrina es una glicoproteína que enlaza hierro, jugando un papel central en el transporte de este entre los sitios de absorción, almacenamiento y utilización en todos los vertebrados. Esta molécula ha sido aislada de la mayoría de la especies de peces examinados. Su posible papel en la resistencia a enfermedades ha sido examinada, solo que los resultados han sido contradictorios (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996; Russell y Lumsden 2005).

Las lectinas (hemaglutininas) son proteínas de origen no inmune con múltiples funciones, inicialmente identificadas por la función de aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados. En vertebrados superiores, están envueltas en diversas funciones incluyendo morfogénesis, bloqueo de polispermia, escrutinio del suero en el hígado y defensa contra organismos. En peces se encuentra presente en huevos de muchas especies; pero su función biológica todavía no ha sido completamente elucidada. El moco de la piel del pez sirve como un lubricante en la locomoción y una barrera mecánica de defensa en la prevención de colonización superficial por microorganismos. Se ha determinado que contiene muchas sustancias antipatogénicas, como las IgM, lisozimas, sistema del complemento, CRP y lectinas. En el suero y/o moco de ciertas especies de peces se ha encontrado hemolisina, proteinasa, α_2-macroglobulina, quitinasa, α-precipitina, caeruloplasmina y metalotioneina (Yano, *in* Iwama y Nakanishi, 1996; Russell y Lumsden 2005).

Sistema inmune adaptativo.

Defensa adaptativa celular.

La respuesta inmune adaptativa independiente de anticuerpos, es colectivamente determinada como inmunidad mediada por células. El término se originó de la habilidad para transferir la respuesta antígeno-específica de un individuo a otro por medio de células vivas. A inicio de los años cincuentas se ha visto que las células responsables de la inmunidad adaptativa mediada por células son los linfocitos, ahora identificados como células T derivadas del timo. En mamíferos, el tipo de célula que se cree ser la responsable principal de la destrucción de aloinjertos mediado por células, es la célula T citotóxica. Estas células corresponden a una subpoblación de linfocitos T que producen el CD8 (glicoproteína transmembranal de la superfamilia de las Ig) en la membrana celular para marcar y reconocer el antígeno en asociación con el complejo principal de histocompatibilidad clase I "MHC I". Su función biológica es reconocer MHC I-antígeno alterado, por algún fragmento del propio antígeno, llevando a la destrucción de la propia célula infectada con un virus. Un evento importante que caracteriza al linfocito de vertebrados y ocurre tanto en respuesta humoral como mediada por células, es que la primera respuesta a un antígeno apropiado, activa para la proliferación de la célula reactiva específica. Este importante estado de amplificación no ha sido descrito en invertebrados, por lo cual podría ser una innovación evolutiva en el subfilum vertebrata (Manning y Nakanishi, *in* Iwama y Nakanishi, 1996). Sin embargo, este proceso ha sido restringido únicamente a gnatostomados; ya que no existe evidencia de fragmentos de genes de anticuerpos o de la maquinaria de este complejo en peces no mandibulados "aganathos" (Hansen *et al.*, 2005).

Desde los trabajos pioneros de inmunología comparativa en los años 60´s, las IgM se determinaron como el isotipo de Ig primordial y más estable en la evolución de vertebrados mandibulados. A pesar de las diferencias en el grado de polimerización de la forma secretora en diferentes grupos de vertebrados y una variante en el empalme principal de la forma transmembranal "TM" en teleósteos, la IgM fue renombrada por su estabilidad molecular, bioquímica y funcional. Este isotipo es el primero en ser expresado tanto en la ontogenia como durante la respuesta inmune humoral adaptativa, encontrándose como el principal receptor TM sobre la superficie de células B convencionales e innatas (Ohta y

Flajnik, 2006). También se ha determinado un isotipo divergente "IgT" restringido a teleósteos (Hansen *et al.*, 2005).

En vertebrados, los linfocitos B despliegan Ig´s a su superficie, mientras que los linfocitos T se caracterizan por la presencia de un tipo diferente de receptor antígeno-específico, el receptor de las células T "TCR". Ahora está establecido que los teleósteos poseen poblaciones análogas respecto a las células T y B de mamíferos. Este análisis de una dicotomía célula T/célula B en peces se fortaleció con técnicas de separación basadas en el uso de anticuerpos monoclonales (Manning y Nakanishi, *in* Iwama y Nakanishi, 1996). Las células T han sido formalmente identificadas en peces, aunque solo pocos marcadores de células T están disponibles para peces, ya que se han realizado pocos estudios sobre ontogenia de células T (Zapata *et al.*, 2006); en general presentan las mismas características funcionales y fenotípicas, con macadores CD8, CD4, CD28, CD3ϵ, TCRζ, TCRγ y TCRβ (Bernard *et al.*, 2006).

Las interacciones entre las células del sistema inmune, se ecuentran mediadas no solo por el contacto directo célula-célula, sino también a través de la liberación de factores solubles –citocinas–. Las citocinas juegan un papel regulador o intensificador dentro del sistema inmune y su rango está usualmente limitado a células en inmediata cercanía de la célula productora de citocina. Los peces producen productos solubles similares a las citocinas que actúan para orquestar los eventos en la respuesta inmune. Muchos de estos han sido identificados en ensayos biológicos con base en su función similar a la actividad de las citocinas de mamífero. Una variedad de estas, son secretadas por leucocitos de pez, entre las cuales varios factores son producidos en los mamíferos por células T $CD4^{+ve}$. Estos incluyen factores funcionalmente similares a las interleucinas "IL" IL-2, IL-3, IL-4, IFN-γ, factor de crecimiento y transformación beta "TGFβ" y factor de necrosis tumoral "TNF". Existe también, amplia evidencia del papel de las células T ayudantes en la cooperación celular (Manning y Nakanishi, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Defensa adaptativa humoral.

De todos los modos de resistencia a enfermedades en peces, los mecanismos envueltos en la defensa adaptativa humoral (anticuerpos) han sido los más explorados. Sin embargo, las

clases de peces tales como elasmobránquios y osteictios poseen medios extremadamente amplios y variables para la ejecución de metas fisiológicas, incluyendo el desarrollo de la respuesta inmune. Además, las características particulares de la respuesta inmune pueden variar ampliamente entre las especies de peces; la respuesta inmune humoral comparte algunas características básicas en forma y función con la de los mamíferos. Estas similitudes incluyen la estructura básica de la Ig, los componentes celulares para la inducción de anticuerpos y la función que desempeñan estos anticuerpos en cada actividad, como la neutralización, fijación al sistema del complemento y opsonización (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Los avances biotecnológicos sobre la inmunidad humoral en peces han desarrollado aplicaciones prácticas en el campo de la vacunación. Sucesos actuales en el análisis de genes de Ig y citocinas de peces no solo han revelado diferencias en la manera que pueden ser construidas las moléculas físicamente, sino también el proveer la inmunología con las herramientas apropiadas por las que la función del sistema inmune puede ser modulado y efectivamente reforzado vía vacunación (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Las Ig (globulinas con actividad anticuerpo) están entre las moléculas biológicas más complejas estructuralmente. Esta complejidad trasciende su forma final proteínica e incluye un mecanismo genético complicado para producir el amplio repertorio de anticuerpos. La necesidad para cada complejidad es obvia, por que dentro de su estructura debe quedar la habilidad para unirse, entre una gran diversidad, a un patógeno en específico garantizando su destrucción y remoción. En teleósteos esta molécula aparece como un tetrámero (cuatro subunidades monoméricas), conteniendo cada monómero dos cadenas proteínicas largas (~72 kDa) y dos cortas (~27 kDa). Cada célula B y su progenie clonal producen un tipo de molécula de anticuerpo. Ya que todos lo sitios de unión dentro de una molécula poseen la misma combinación de cadenas, serán idénticos en su especificidad y afinidad. Una posible excepción a este modelo podría ser la presencia de subpoblaciones de anticuerpos con distinto punto isoeléctrico y por ende con un comportamiento discontinuo en la unión al antígeno. Por lo cual, con esta evidencia se elimina la posibilidad de atestiguar la presencia de diferentes moléculas de anticuerpos por una distinción diferencial de afinidades (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

El ensamble de las moléculas de anticuerpo en peces vía enlace bisulfuro parece ser un medio por el cual la diversidad estructural es generada. Esto es distinto a lo que se ha observado en mamíferos, donde la intersubunidad del enlace bisulfuro parece ser empleada de una manera más uniforme. En contraste, una variedad de teleósteos genera una considerable diversidad estructural por no uniformidad en los enlaces de las subunidades monoméricas dentro del anticuerpo tetramérico, variando el patrón interespecíficamente. La razón precisa para esta diversidad estructural se desconoce hasta el momento, sin embargo, no se descarta que esto pudiera representar un mecanismo postraduccional, por lo cual la diversidad funcional podría ser introducida en la molécula de la Ig sin requerir la dedicación de genes con estructura específica para un mismo objetivo. Obviamente, los teleósteos han desarrollado mecanismos alternativos que permiten la producción y secreción de polímeros de Ig con varios grados de enlaces bisulfuro entre unidades o incluso una completa ausencia de tales enlaces, sin una disimulación resultante o desviación de la vía de secreción (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Las tres características consistentemente notables en las moléculas de anticuerpos de peces son: su afinidad intrínseca relativamente baja (afinidad del sitio de unión individual), la aparente falta de habilidad de los anticuerpos del suero para incrementar en afinidad posinmunización (maduración de la afinidad) y la limitada heterogeneidad en los sitios de unión del anticuerpo. Sin embargo, la relativa falta global de gran afinidad a los sitios de unión, llega a ser menos que una rareza cuando es comparada a la respuesta en IgM (isotipo pentamérico) de mamíferos. De hecho, ya que los anticuerpos de teleósteos son principalmente tetraméricos, la avidez o afinidad funcional de toda la molécula puede ser comparable o mayor que la observada en anticuerpos IgG (isotipo monomérico) de mamíferos. Estas observaciones conducen a la especulación, de que la necesidad para la expresión de Ig monoméricas, pudo haber llevado al desarrollo de mecanismos para producir sitios de unión con gran afinidad intrínseca y quizás un mayor repertorio de sitios de unión (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

El efecto más directo en la interacción de un anticuerpo con su antígeno, es el simple acto físico de bloquear una función crítica del antígeno, siendo este un receptor, un sitio de actividad enzimática o un determinante toxigénico. Otro efecto, es el producto de esta

unión multivalente y la subsecuente creación de un complejo macromolecular de antígeno-anticuerpo. Cuando este proceso de entrecruzamiento ocurre con óptimas concentraciones de antígeno, conforma una aglomeración de antígeno-anticuerpo. Si es suficientemente grande, a la larga esta aglomeración será insoluble en el plasma del cuerpo. Cuando el antígeno es molecular, el proceso es referido como precipitación y cuando es celular el proceso es determinado como aglutinación. El desarrollo de cada complejo puede ser una ventaja distinta para el huésped, ya que la materia fragmentada es fácilmente fagocitada. Pero, la estrecha proximidad de muchos anticuerpos dentro del complejo, facilita la activación del sistema del complemento o adherencia de los anticuerpos al receptor Fc "FcR" de los leucocitos que estimulan la fagocitosis de las partículas opsonizadas, además de liberar señales que estimulan la actividad microbicida de los leucocitos (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

La opsonización refiere al proceso por el cual anticuerpos u otra molécula inmunológicamente relacionada promueve la fagocitosis del antígeno. Este es usado mas específicamente con respecto al revestimiento de bacterias, hongos y parásitos con anticuerpos específicos que conllevan a la interacción y frecuentemente a la fagocitosis del organismo marcado. El papel del anticuerpo en la activación del sistema del complemento puede ser considerado como un mecanismo para enfocar la función de este potente efector contra marcadores patogénicos específicos. Simplemente la unión del anticuerpo a un antígeno resulta en el cambio conformacional de la región Fc (fragmento cristalizable) del anticuerpo que permite la unión y activación del primer componente del sistema del complemento (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Técnicas profilácticas en la piscicultura.

En la piscicultura intensiva, al producirse altas densidades en sistemas limitados, provoca estrés en los animales y por tal, una predisposición de estos a enfermedades. El control de estas enfermedades es uno de los problemas más críticos en esta industria. Ante esta situación, la piscicultura se ha apoyado con el uso de técnicas profilácticas, las cuales comprenden los procedimientos y recursos, para la conservación de la salud y preservación de la enfermedad. Entre la variedad de técnicas profilácticas, se encuentra las preventivas: como es la selección de cepas de peces tolerantes, dietas nutritivas, hormonas, prebióticos y

probióticos; así como las terapéuticas: antibióticos y vacunas. Sin embargo, el uso de antibióticos, es ahora fuertemente regulado en muchos países, debido a los estrictos requerimientos de muchas naciones, comprendidas como mercados importantes. En particular, el uso de antibióticos ha disminuido significativamente en algunos países después del desarrollo de vacunas en peces; un claro ejemplo es la acuicultura del salmón en Noruega (Fig.1), donde se muestra un marcado decremento en el uso de antibióticos, después del desarrollo de la vacuna contra la furunculosis, causada por la bacteria *Aeromonas salmonicida* (Leong, 1993; Leong *et al.*, 1997 y FAO, 2006). Por lo cual, esta técnica se ha convertido en el componente esencial en las operaciones de la piscicultura a gran escala (Leong *et al.*, 1997; Lorenzen y LaPatra, 2005; Myhr y Dalmo, 2005).

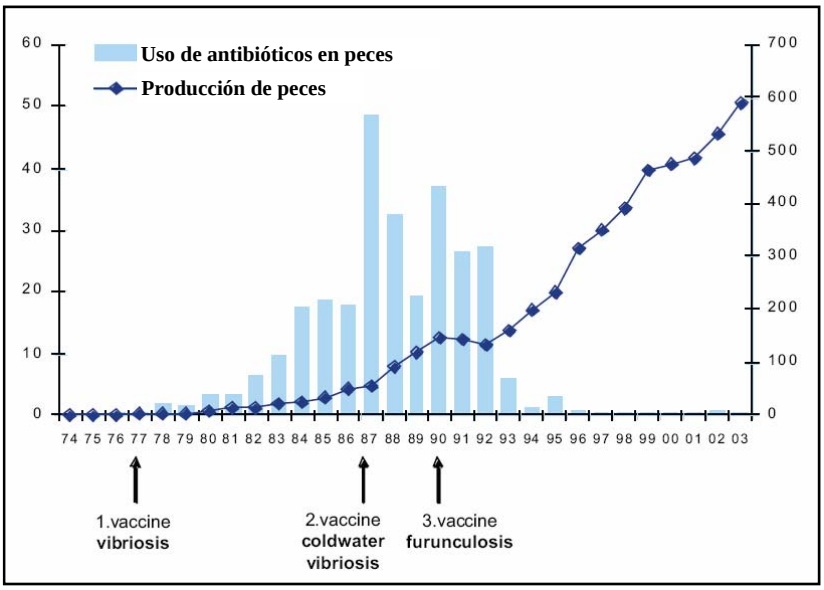

Figura 1. Efecto de la vacunación contra la furunculosis de *A. salmonicida*, sobre el decremento en el uso de antibióticos para la piscicultura del salmón en Noruega de 1974 al 2003; eje *Y* izquierdo, miles de kilogramos de antibióticos; eje *Y* derecho, miles de kilogramos en producción de peces (FAO, 2006).

Vacunas en teleósteos.

Las primeras vacunas comerciales para teleósteos, fueron autorizadas en E.U.A. y Canadá en los años setentas, llamadas bacterinas y conformadas por bacterias íntegras inactivadas completamente mediante procesos fisicoquímicos. Después, se desarrollaron las vacunas vivas atenuadas, conformadas por bacterias con virulencia atenuada por cultivo *in vitro* repetitivo o por el uso de mutágenos; así como las vacunas de subunidades, conformadas por componentes proteínicos o glicoproteínicos, obtenidos mediante técnicas de purificación. Pero ante la imposibilidad de desarrollar vacunas con técnicas convencionales contra importantes patógenos, se apoyo el desarrollo en la ingeniería genética, aplicando inicialmente, tecnología recombinante para la producción del componente antigénico mediante fermentación; posteriormente se desarrollo una nueva estrategia alterna de vacunación, que consiste en administrar al organismo receptor el gen o genes que codifiquen para las proteínas antigénicas a partir de vectores plasmídicos de ADN (Leong *et al.*, 1997; Lorenzen y LaPatra, 2005; Myhr y Dalmo, 2005).

Tabla I. Patógenos bacterianos importantes en la piscicultura; * Vacuna experimental; **Salmonidae**, incluye varias especies de salmón y trucha; **LPS**, lipopolisacarido (Leong, 1993).

Agente	Huésped	Vacuna	Antígeno
Vibrio anguillarum	Salmonidae	Bacterina, inmersión	LPS-O Ags
V. ordalii	Salmonidae	Bacterina, inmersión	LPS-O Ags
V. salmonicida	Salmonidae	Bacterina, inmersión	LPS-O Ags
V. parahaemolyticus	Tilapia	Bacterina, inmersión*	?
Yersinia ruckeri	Salmonidae	Bacterina, inmersión	?
Aeromonas salmonicida	Salmonidae	Bacterina, inmersión	LPS-(A)
A. hydrophila	Pez gato, trucha y carpa	Bacterina, inyección inmersión*	?
Flexibacter columnaris	Salmonidae, pez gato	Bacterina, inmersión*	?
Edwardsiella tarda	Pez gato y anguila	Bacterina, inyección inmersión*	LPS
E. ictaluri	Pez gato	Bacterina, inyección inmersión	LPS
Pasteurella piscicida	Pez cola amarilla	Bacterina, inmersión*	LPS (?)
Renibacterium salmoninarum	Salmonidae	Bacterina, inyección*	?
Streptococcus sp.	Trucha arco iris	Bacterina, inmersión*	?

Condiciones para una óptima inmunización.

La ruta, método y condiciones de exposición en la vacunación, tienen un impacto directo sobre el grado de estimulación y regionalización de la respuesta inmune. Estos aspectos de inmunidad son esenciales para el diseño de sistemas de liberación y elección de la inmunización. La temperatura del agua, es un factor determinante en la vacunación de peces. En peces vacunados, a temperaturas menores que las fisiológicas, se presenta un retrazo de la inmunidad protectiva o el no poder volverse inmunes. La ruta de inmunización por inyección, frecuentemente usada en mamíferos, ha demostrado ser menos práctica en peces. Por lo tanto, se han desarrollado otras técnicas para vacunación en masa; incluyendo la inmersión, baño, rocío y modos de liberación oral. Aunque impráctica, la ruta por inyección se sigue usando y en muchas instancias, ha sido el método más efectivo (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

Vacuna genética.

La vacuna genética consiste generalmente de vectores plasmídicos bacterianos de expresión eucariota (Fig. 2), que contiene el gen o genes heterólogos que codifican para la proteína antigénica del patógeno, insertado bajo el control de un promotor de expresión eucariota, permitiendo así la expresión de la proteína antigénica en la célula animal huésped. Para optimizar la eficacia de las vacunas genéticas, una importante consideración, es la apropiada selección del vector plasmídico de expresión. Los requerimientos básicos para el fundamento de este tipo de vectores, son un promotor de expresión eucariota, un sitio de clonación, una secuencia de poliadenilación, un marcador selectivo (gen de resistencia contra algún antibiótico) y un origen de replicación bacteriano (Leong *et al.*, 1997; Garmory *et al.*, 2003; Liu, 2003; Lorenzen y LaPatra, 2005; Myhr y Dalmo, 2005).

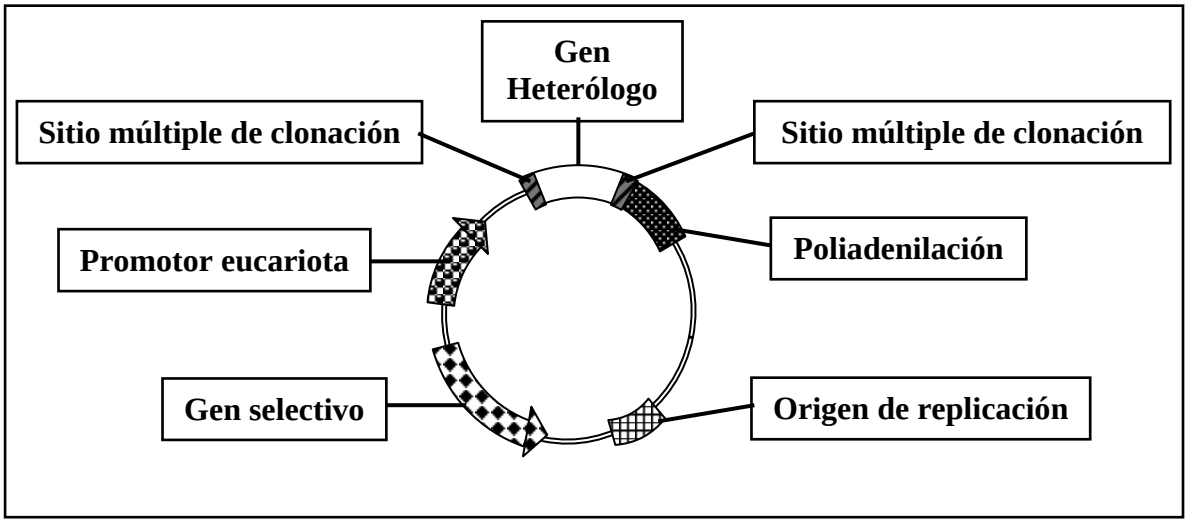

Figura 2. Esquema general de una vacuna genética, conformada por un vector plasmídico bacteriano de expresión eucariota, indicando los componentes esenciales.

En 1990, Wolff *et al.* fueron los primeros en reportar la expresión satisfactoria de plásmidos de ADN en el tejido muscular de ratón. Para 1992, Tang *et al.* reportaron la producción de una respuesta inmune por la introducción del gen de la hormona de crecimiento humano "hGH" que codifica para una proteína, directamente en la piel de ratones. Posteriormente se reportó (Ulmer *et al.*, 1993), que la inyección de ADN que codifica para una proteína antigénica del virus de influenza, confirió protección inmune al ratón. Muchos artículos han descrito y revisado la capacidad inmune inducida por vacunación genética contra una gran variedad de virus (Davis y McCluskie, 1999), bacterias (Strugnell *et al.*, 1997) y protozoarios (Kalinna, 1997) en modelos de ratones. En peces, varios reportes (iniciando con el de Anderson *et al.*, 1996), han demostrado la efectividad de las vacunas genéticas contra infecciones virales, incluyendo la infección del virus de necrosis hematopoyética "IHNV" y la septicemia hemorrágica viral "VHS" (Lorenzen *et al.*, 1998 y Corbeil *et al.*, 2000). Referente a infecciones bacterianas está el trabajo de Gómez Chiarri *et al.* (1996), donde se sugiere el potencial de las vacunas genéticas contra *Renibacterium salmoninarum*; sin embargo poco se sabe, acerca de la factibilidad en la vacunación genética frente a patógenos bacterianos en peces (Vázquez *et al.* 2005).

Ante este desconocimiento muchos esfuerzos han sido invertidos en la tecnología de vacunación genética, ya que presenta múltiples ventajas sobre las vacunas muertas, atenuadas y de subunidades de otro tipo de polímeros:

1. El ADN es muy estable y fácilmente conservable.
2. La construcción del plásmido puede ser modificada fácilmente y puede incluir más de un gen que codifique para el antígeno
3. No requieren el desarrollo de técnicas de purificación del patógeno o del antígeno inmunoprotector, ya que pueden obtenerse usando técnicas estándar de purificación de ADN.
4. La vacuna genética elimina el riesgo de virulencia residual, previene la infección y propagación de patógenos intracelulares, al inducir una fuerte y prolongada inmunidad humoral y mediada por células, ya que el antígeno nuevamente sintetizado puede estimular la respuesta inmune adaptativa.

(Takano *et al.*, 2004; Heppell y Davis, 2000; Kwang, 2000 y Leong *et al.*, 1997).

Este tipo de vacunas estimulan tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, sin la necesidad del patógeno vivo, de vectores de replicación o adyuvantes (Tanghe *et al.*, 2000). La síntesis del antígeno mediante la vacunación genética (Fig. 3), imita a la infección natural por patógenos intracelulares conduciendo a una subsecuente respuesta mediada por células y finalmente a la generación de la respuesta humoral antígeno-específica (Donnelly *et al.*, 2000; Koide *et al.*, 2000; Liu, 2003 y Srivastava *et al.*, 2003).

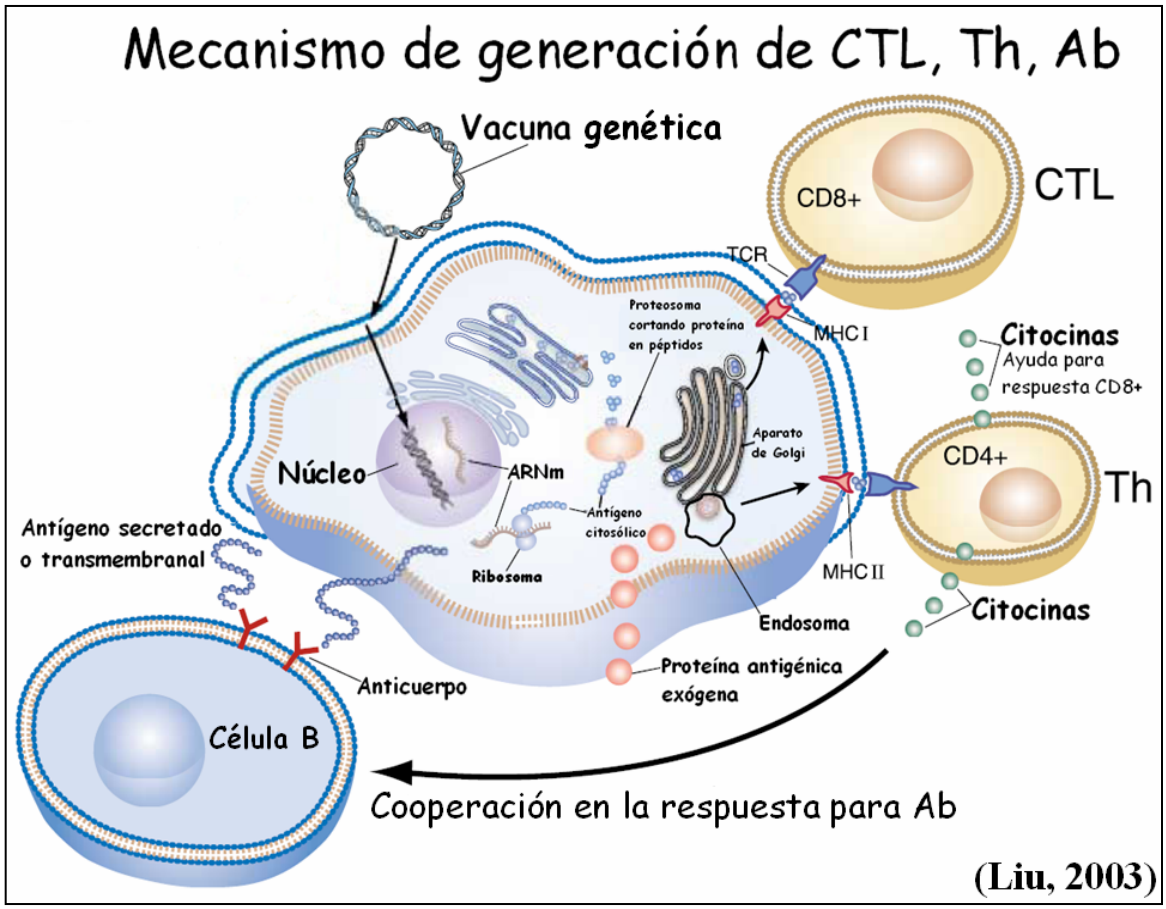

Figura 3. Representación del mecanismo de vacunación genética en la generación de las respuestas celular y humoral antígeno-específica. La célula presentadora de antígeno especializada, absorbe una proteína antígenica exógena hacia la ruta de degradación endolisosomal. La proteína es degradada a péptidos y asociada con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II "**MHC II**", que después son exhibidos sobre la superficie de la célula. Las células cooperadoras T específicas "**Th CD4+**" reconocen esta molécula compleja "péptido antigénico/MHC clase II" y son activadas para producir "ayuda en forma de **citocinas** para respuesta CD8+". Estas citocinas tienen una miríada de actividades incluyendo, respuesta de dependencia por la citosina, cooperando para activar a las células B en la producción de anticuerpos y en la respuesta de linfocitos T citolíticos "**CTL CD8+**". La activación de estos linfocitos, generalmente es dependiente de la vía de procesamiento del antígeno, reservado para proteínas intracitoplásmicas, siendo degradadas en péptidos que se asocian con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I "**MHC I"** nuevamente sintetizadas. Estos complejos cuando son presentados sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno, en conjunto con moléculas co-estimulantes, resultan en la activación del propio linfocito T CD8+. Para la respuesta de anticuerpos "**Ab**", las células B reconocen y responden a antígenos que son presentados extracelularmente, o expuestos extracelularmente mediante proteínas transmembranales (Liu, 2003).

Expresión inmunogénica.

El transcriptoma, comprende el total de todas las formas de ARN´s transcritos de un genoma, aunque algunas veces se circunscribe solo al conjunto de ARN mensajero "ARNm". Comparado con el genoma relativamente estable, el transcriptoma es altamente variable dependiendo de la expresión génica diferencial dentro de varios tejidos, estados de desarrollo, o bajo condiciones variables del medio. Esta variación no es reflejada solo por el tipo de genes expresados; sino también, por sus niveles de expresión (Kocabas *et al.*, 2002). Uno de los métodos básicos en el aislamiento y obtención de transcritos para su estudio, es la síntesis de ADNc a partir del ARNm, mediante el proceso de reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción inversa "RT-PCR". Este ADNc contiene la información de un gen "funcional", ya que se encuentra desprovisto de fragmentos no codificadores "intrones", presentes en el ADN genómico "ADNg" (Larkin *et al*., 2003).

La tecnología de Despliegue Diferencial "DD" del ADNc fue desarrollada en 1992 por Liang y Pardee, como un herramienta para identificar y reproducir una expresión diferencial de genes. Hasta ahora, han emergido múltiples variaciones de esta tecnología; sin embargo, el principio básico se ha mantenido. La estrategia general es la síntesis parcial de secuencias de ADNc a partir de subconjuntos de ARNm mediante la RT-PCR; tomando como secuencia templado a la región de poliadenilación "poly (A)" presente en el extremo 3´ de la mayoría de los ARNm de organismos eucariotas, con un oligonucleótido politimilado "5´-T_{11}" de anclaje a este extremo y una posterior amplificación de estas secuencias de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa "PCR", utilizando tanto el oligonucleótido de anclaje, así como un oligonucleótido de secuencia arbitraria (aleatorio). Esta variedad de ADNc´s es separada por tamaño mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida "PAGE" desnaturalizante; posteriormente se revelan por tinción con plata o algún otro método de fluorescencia o radiactividad. Para descubrir diferencias en la transcripción de genes, el ADNc sintetizado y amplificado a partir del ARNm extraído de organismos tratados, se despliegan en paralelo con el ADNc amplificado a partir del ARNm extraído de organismos control. Para minimizar falsos positivos, se realizan PCR por duplicado y se despliegan en conjunto, dos controles y dos tratamientos (Larkin *et al*., 2003).

La visualización e identificación de una mayor variedad de ADNc es posible usando diversas combinaciones de oligonucleótidos de anclaje y aleatorios (Larkin *et al*., 2003); ya que la probabilidad de cada cebador de anclaje para reconocer una parte de ARNm (al momento de la RT-PCR), sería de un doceavo del total de la población de ARNm, debido a que hay doce diferentes combinaciones de las dos últimas bases en el extremo 3´, omitiendo a la timina como penúltima base (Liang y Pardee, 1992). Después de la identificación de las bandas de interés por su despliegue diferencial en el gel, se extraen, se reamplifican mediante PCR con el mismo par de oligonucleótidos, se clonan y se secuencia para un posterior análisis bioinformática. Esta secuencia del ADNc que representa al extremo 3´ del ARNm, es designado como una marca de secuencia expresada "EST".

Este tipo de estudio está diseñado también, para suministrar material apropiado hacia la construcción de arreglos de ADNc; para futuros usos en la investigación sobre los efectos de vacunación y reto contra enfermedades (Park *et al.*, 2005). En la era tecnológica de microarreglos, la técnica de DD del ADNc ofrece ventajas únicas que la mantienen entre las principales técnicas de análisis de expresión génica diferencial:

1. Simplicidad, al basarse técnicamente en PCR y electroforesis en gel de secuenciación de ADN –PAGE–.
2. Sensibilidad, ya que con 5 a 10 μg de ARN total es suficiente para cubrir la mayoría de los ARNm en una célula eucariota; además de ser una técnica básicamente secuencia-dependiente en vez de prevalencia-dependiente.
3. Reproducibilidad, en más del 99% de las bandas extraídas del DD.
4. Versatilidad, ya que más de 2 muestras de ARN pueden ser comparadas simultáneamente, permitiendo análisis complejos; además, pueden ser detectados al mismo tiempo genes subexpresados y sobre expresados; adicionalmente, es útil para cualquier especie eucariota, ya que los oligonucleótidos son generados aleatoriamente.
5. Detección de genes desconocidos, ya que no se requiere conocimiento previo de las secuencias de ARNm para ser detectado, por lo cual, es considerado un "sistema abierto", a diferencia del microarreglo que es considerado un "sistema cerrado".

(Ding y Cantor, 2004; Eisenstein, 2006).

Bacterias Aeromonas.

Las bacterias Aeromonas son organismos ubicuos, oxidasa-positiva, anaerobios facultativos, fermetadores de glucosa, bacilos Gram-negativo autóctonos de ambientes acuáticos. Han sido aislados a nivel mundial, de agua salubre, dulce, estuarina, marina, clorinada y no clorinada, ha mayor concentración en los meses cálidos. También aisladas desde hace más de 100 años, de vertebrados infectados. Tanto las aeromonas móviles y no móviles han causado serias enfermedades a peces por varias décadas. Las aeromonas móviles también han emergido como una seria amenaza microbiana para la población humana. Su naturaleza ubicua en ambientes acuáticos provee una amplia oportunidad para que vertebrados, particularmente peces y anfibios, entren en contacto con el microorganismo. Ocasionalmente, tal contacto puede conducir a una infección que, dependiendo la especie animal y la virulencia de la cepa, pueda tener como consecuencia la muerte del organismo. Las especies de aeromonas móviles son ampliamente reconocidas como patógenos primarios en una gran variedad de vertebrados poiquilotermos. Siendo determinados como agentes etológicos de diversas enfermedades que pueden presentarse como hemorragia, osteomielitis, neumonía, septicemia, estomatitis y enfermedad ulcerativa. La mayoría de los estudios de Aeromonas en aguas salinas se han realizado por su importancia como patógenos de peces o como patógenos potenciales en el humano; teniendo por lo tanto una tendencia enfocada hacia la pesquería y acuicultura; en consecuencia tomando lugar principalmente en aguas costera y estuarinas (Austin *et al*., 1996).

***Mycteroperca rosacea*, cabrilla sardinera.**

Características diagnósticas de la especie en las fases postlarvales (Fig. 4): una profundidad corporal (longitud dorso ventral) menor o casi igual a la longitud cefálica; la longitud estándar es 2.7 a 3.1 veces la profundidad corporal (en organismos de 11 a 61 cm) y de 2.6 a 2.8 la longitud de la cabeza; en adultos el ángulo del preopérculo con un lóbulo ligeramente serrado; nostrilos posteriores de adultos grandes 2 o 3 veces mayores que los nostrilos anteriores. De 38 a 43 dientes branquiales, con más de 21 en la región inferior. Aleta dorsal con XI espinas y 16 a 18 radios, las membranas interespinosas claramente dentadas; aleta anal con III espinas y 10 a 11 radios; aleta pectoral con 15 a 17 radios; aleta caudal posteriormente truncada o concava; aletas sin rayos proyectados mas allá de la

membrana de la aleta. Zona media lateral del cuerpo con escamas ctenoides; línea lateral con 72 a 77 escamas; 106 a 120 series de escamas laterales (Heemstra y Randall, 1993).

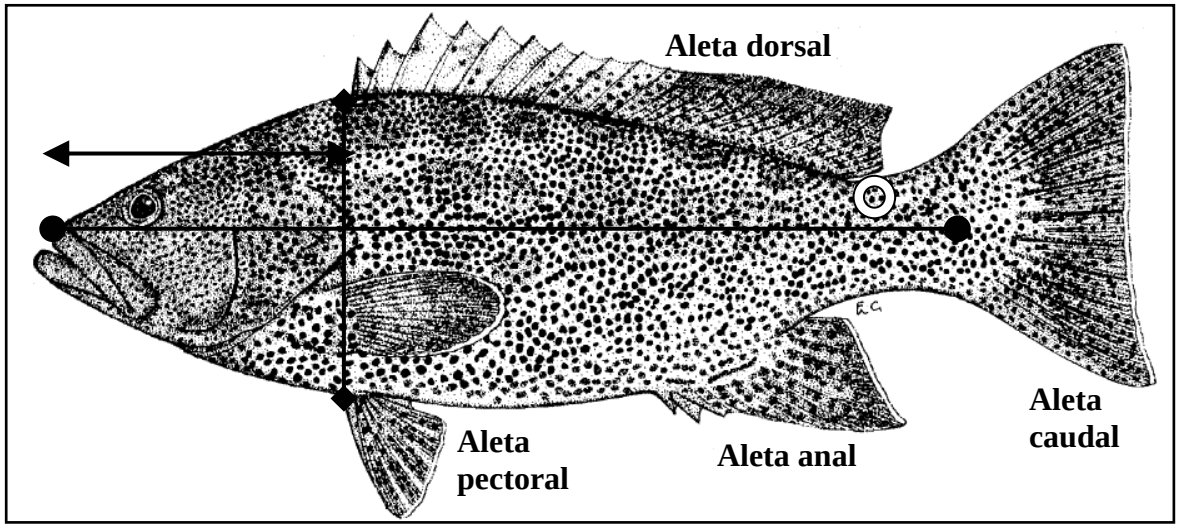

Figura 4. Morfología general de un pez de 56 cm de longitud estándar de la especie *Mycteroperca rosacea*; ● longitud estándar, ◆ profundidad corporal ó longitud dorso ventral y ► longitud cefálica; ⓪ zona de aplicación de la inyección intramuscular en el bioensayo de vacunación.

Mycteroperca rosacea es una de las cinco especies del género *Mycteroperca* en el Pacífico oriental. Se distribuye en la costa sur oriental de la Península de Baja California, a lo largo de todo el Golfo de California hasta Jalisco, México. Se encuentra en áreas rocosas costeras, a profundidades menores a los 50 m, en un rango de temperatura de 20 a 30°C y salinidad de 34 a 35‰. Poco se sabe sobre la biología de esta especie y los estudios realizados se han basado en el comportamiento alimenticio. Últimamente se han realizado estudios de inducción al desove con Gonadotropina coriónica humana "HCG", desarrollo embrionario y larval. Además, se han determinado los efectos de temperatura, salinidad en huevos y larvas reproducidos artificialmente (Gracia *et al.*, 2004). Esta especie es un candidato factible para cultivo, debido a sus características similares con otras especies de serranidos, además de presentar un alto valor en el mercado de 9-18 USD kg^{-1} y ser determinada como una especie vulnerable "IUCN 2002" (Gracia *et al.*, 2005).

Antecedentes.

Vacunación contra *Aeromonas spp.* en teleósteos.

En general, las bacterias Gram-negativas poseen una diversidad de moléculas que pueden inducir la respuesta de anticuerpos; tales como las proteínas de membrana externa "OMP´s", polisacáridos capsulares, proteasas, LPS y toxinas (Kaattari y Piganelli, *in* Iwama y Nakanishi, 1996).

El desarrollo de la vacunación inició con la producción de una vacuna de administración oral, una preparación de células completas inactivadas con cloroformo. Sin embargo, al parecer *A. salmonicida* es un ineficiente antígeno, en términos de su completa capacidad de estimular una respuesta inmune protectiva. Existen algunas controversias sobre la efectividad de formulaciones basadas en proteínas extracelulares "ECP´s". Algunos estudios indican que podrían ser buenos inmunosupresores; otros estudios describen sus beneficios en términos de inmunogenicidad. Se han presentado resultados importantes con inmunización pasiva y el uso de vacunas vivas atenuadas (mortalidades del 12.5% en salmón del Atlántico infectado con *A. salmonicida*). Células avirulentas con la capa-A alterada, han sido también sugeridas como candidato para vacunas (Austin *et al*., 1996).

Estudios con OMP´s han mostrado resultados prometedores. A partir de técnicas de inmunoblot se revelaron OMP´s reguladoras de hierro, como inmunogénicas en salmón del Atlántico; de igual manera, en vacunaciones se presentó una considerable mejoría en la protección inmune (Austin *et al*., 1996). Estas moléculas son componentes bacterianos altamente inmunogénicos, debido a que sus epítopos se encuentran generalmente, expuestos sobre la superficie celular. Las OMP de *Aeromonas spp.* han sido identificados como blancos apropiados para el desarrollo de vacunas en peces (Ellis, 1994; Hirst y Lutwyche *et al.*, 1995; Bricknell *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2000; Rahman y Hawai, 2000). Recientemente Vázquez *et al.* (2003) clonaron y caracterizaron el gen que codifica la proteína Omp48, una de las más abundantes OMP´s en *A. veronii*. Además, en sus estudios preliminares determinaron que esta proteína está envuelta en la adhesión bacteriana a cultivos de células epiteliales "HeLa", lo que determinó ser un candidato apropiado para el desarrollo de vacunas (Vázquez *et al.*, 2003 y 2004).

En el reporte sobre la construcción de vacuna genética pOMP48 usando el gen *omp48*, así como su evaluación en evocar la respuesta inmune y la protección en el teleósteo *Paralabrax maculatofasciatus*, contra infecciones experimentales de *A. veronii*; determinaron una inducción parcial en la protección contra el patógeno, incluyendo una reducción en el número de peces con alteraciones histopatológicas. Sin embargo, una de las incógnitas más relevantes en este estudio, es que la ausencia de secreción del antígeno pudo haber influido en la magnitud de la respuesta humoral inmune. En conclusión los resultados presentaron un desapruebo de esta vacuna en la inducción de una significante respuesta inmune humoral; sin embargo, si confirió protección parcial contra la infección experimental con *A. veronii*, a lo cual, sugieren que la inmunidad celular determinó la protección inmune parcial del huésped (Vázquez *et al.*, 2005).

Collet y Secombes (2005), comentan que el vector pcDNA3.1 es el plásmido usado comúnmente en las vacunas genéticas para peces. Ya que es potente en las células del pez y permite que el antígeno sea producido en el sitio de vacunación, para conducir a una respuesta temprana del interferón, seguida de una producción de anticuerpos específicos; resultando así en una rápida y eficiente protección. Sin embargo en muchos casos, para influenciar una respuesta inmune, el antígeno debe ser secretado y tender a la circulación en general.

Aunque existen plásmidos de secreción disponibles comercialmente, solo están diseñados para células de mamífero y son probablemente menos eficientes en células de pez. Ante esta problemática Collet y Secombes (2005), construyeron y caracterizaron un vector de clonación basado en el plásmido pcDNA3 y la secuencia nucleotídica que determina el péptido líder del TGF-β de *O. mykiss*. Este factor se encuentra comprendido en una superfamilia de moléculas señal extracelulares relacionadas, que desempeñan importantes funciones en la regulación del desarrollo de invertebrados y vertebrados (Lodish *et al.*, 2003). Este vector “pcDNA3-LP” ha sido diseñado para producir y secretar proteínas en células de peces, para la producción de proteínas recombinantes o diseño de vacunas genéticas.

Justificación.

Con base en la tecnología de vacunación, la cual se fundamenta en el conocimiento inmunológico de sustancias antigénicas y de componentes del sistema inmune (Leong *et al.*, 1997; Ellis, 1999), se ha determinado que, los peces son un excelente modelo inmunológico, ya que representan el grupo base de vertebrados con inmunidad innata y adaptativa (Plouffe *et al.*, 2005).

En la piscicultura, uno de los principales problemas son las enfermedades bacterianas causadas por *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp.; en particular *A. veronii*, ya que es uno de los agentes causales, junto con *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, de la septicemia hemorrágica bacteriana, la cual es considerada uno de los principales problemas económicos en la acuicultura de la zona tropical, que comprende el 40% de la superficie terrestre (Austin y Austin 1999).

Aunque varios estudios muestran, que la formulación de diferentes tipos de vacunas, conformadas por subunidades, componentes atenuados ó completamente atenuadas, proveen una protección ante infecciones contra *A. veronii*; la efectiva respuesta inmune que estimula la vacuna atenuada, puede representar un riesgo de virulencia revertida o residual. Por otro lado, las vacunas completamente inactivadas son seguras, pero generalmente pobres en inmunógenos (Grøntvedt y Espelid, 2004); consecuentemente, la investigación en vacunas está actualmente orientada al reemplazo convencional por nuevas vacunas, más efectivas y seguras, tales como las vacunas genéticas (Lorenzen y LaPatra, 2005).

En particular, el análisis de expresión génica relacionada al sistema inmune en respuesta a vacunación genética, podrá conducir a un mejor entendimiento sobre los mecanismos de inmunidad en peces (Yong *et al.*, 2005 y Kurath, 2005); ya que, como se ha observado muchos de los genes relevantes en el sistema inmune de salmónidos (IL´s, TNF´s, TGF´s, etc.), han esclarecido significantes progresos (Purcell *et al.* 2004). Estas secuencias génicas proveen nuevas herramientas para el estudio sobre la respuesta inmune de teleósteos a patógenos y vacunas. De esta manera, se pretende influir directamente en el progreso de la vacunación genética; ya que esta, debe mejorar en orden al efectivo desarrollo de estrategias y herramientas para el manejo de enfermedades en peces (Park *et al*., 2005).

Por lo cual, a pesar de que la mayoría de los sistemas de vacunación genética, confieren una protección efectiva, no podrán estar disponibles para su uso rutinario, mientras no se conozcan los mecanismos inmunológicos mediante los cuales se obtiene la protección inmune. Además, la piscicultura de nuevas especies, requiere de investigación sobre patógenos potenciales para el desarrollo de vacunas (Grøntvedt y Espelid, 2004).

Hipótesis.

El tejido renal del pez *M. rosacea* presentará una expresión génica diferencial por efecto de la vacuna pOMP48-LP, con mayor énfasis en los componentes del sistema inmune innato.

Objetivo.

Analizar la expresión génica diferencial en el riñón de *M. rosacea* por vacunación genética con el vector pOMP48-LP.

Objetivos particulares.

1. Construir la vacuna pOMP48-LP con el vector pcDNA3-LP que contenga el gen *omp48* de *A. veronii* y reproducirla para aplicarla en un tratamiento de vacunación genética.

2. Desarrollar un bioensayo de vacunación genética con peces (*M. rosacea*) inyectados con la vacuna pOMP48-LP.

3. Estudiar la expresión diferencial de genes en el riñón de *M. rosacea*, por el efecto de la vacunación, mediante DD del ADNc y el análisis de las EST´s.

Material y métodos.

Ingeniería genética de la vacuna pOMP48-LP.

La amplificación del gen antigénico se realizó mediante una PCR, utilizando como molde el ADNg de *A veronii* biotipo *veronii* cepa A186; obtenida de la Colección de Cultivos Microbianos del Hospital de la Universidad de Lund, Suecia; proporcionada por el Prof. T. Wadström. Se diseñaron oligonucleótidos directo y reverso a partir de los oligonucleótidos específicos para el gen *omp48* (Vázquez *et al.*, 2003). Las condiciones de la PCR fueron: inicialmente de una incubación a 94 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el ADNg; 35 ciclos, en los cuales cada uno incluyó, una fase de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, una fase de alineamiento a 56 °C por 1 minuto y una fase de extensión a 72 °C por 1 minuto 30 segundo; finalmente una incubación de extensión a 72 °C por 10 minutos. Posteriormente, una alícuota del gen antigénico y una del vector pcDNA3-LP proporcionado por Collet y Secombes (2005), se trataron con las endonucleasas respectivas y mediante una reacción de ligación se unieron intermolecularmente para conformar así, la vacuna pOMP48-LP. Para producir mayor cantidad de esta vacuna se clonó el plásmido pOMP48-LP en *Escherichia coli* cepa DH5α y se cultivó a 37°C, toda la noche; posteriormente se extrajo una solución concentrada del vector pOMP48-LP en buffer libre de endotoxinas del paquete de extracción de ADNp "Mega-Giga Cartridges, QIA Filter". Tanto la solución de la vacuna pOMP48-LP, como la del vector pcDNA3 (utilizado en uno de los tratamientos control) se cuantificaron por espectrofotometría y comparación de intensidad en electroforesis en gel de agarosa al 1%; finalmente, se utilizaron en una concentración de 1 μg/μL.

Sistema del piscicultivo.

Mediante el desarrollo de un sistema de producción larval y juvenil de *M. rosacea* (Gracia *et al.*, 2005), se adquirieron 56 peces con un peso promedio de 22 g. Para el bioensayo de vacunación se equiparon 6 tanques de 100 L, con agua de mar tratada con filtro de arena y UV, a 27 ± 2 °C, salinidad de 37 ‰, pH 8.2 y 7.25 mg/L de oxígeno disuelto. Se colocaron 9 a 10 peces por tanque y se alimentaron diariamente con granulado seco de 4-6 mm de grosor (56% proteína, 22% lípidos, 9% carbohidratos y 13% de ceniza), durante el periodo de aclimatación y experimental.

Bioensayo de vacunación.

Se utilizaron 2 tanques por tratamiento en las siguientes condiciones:

1. Tratamiento control, peces inyectados con la solución buffer PBS libre de endotoxinas utilizado para la elaboración de la vacuna.
2. Tratamiento control, peces inyectados con el vector pcDNA3.1 (+).
3. Tratamiento vacunado, peces inyectados con la vacuna pOMP48-LP.

El procedimiento de vacunación se realizó con base en el método realizado por Vázquez *et al.* (2005). El pez fue anestesiado por inmersión en una solución de 100 μg/mL de tricaine methane sulphonate "MS-222", posteriormente a cada pez se le inyectó intramuscularmente 20 μL de la solución del tratamiento correspondiente, en el lado izquierdo del pedúnculo de la aleta caudal, arriba de la línea lateral (Fig. 4).

Disección del tejido renal, extracción de ARN total y síntesis de ADNc.

Los muestreos se realizaron el 2do, 5to y 6to día post-vacunación. A cada pez se le extrajo el riñón, se conservó en solución RNAlater y se almacenó a -20 °C. Debido a la baja cantidad de riñón disecado de cada organismo, se agrupó el tejido renal de los peces que correspondieran al mismo día y tratamiento. Se aisló el ARN total mediante la técnica "TRIZOL® Reagent" de invitrogen™, se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -80 °C. La síntesis de ADNc se realizó con el paquete "ImProm-II™ Reverse Transcription System" de Promega, mediante transcripción reversa "RT" utilizando X μg de ARN total y uno de los oligonucleótidos politimilados (APC o APG) del paquete de DD del ADNc "GenHunter®" en reacciones separadas. Las condiciones de la reacción de RT fueron: inicialmente solo el ARN total y el oligonucleótido politimilado en H_2O DEPC a 70 °C durante 5 minutos; posteriormente, la reacción con todos sus componentes a 25 °C por 10 minutos, 45 °C por 60 minutos y 70 °C por 15 minutos. Para la amplificación por PCR, se utilizó el oligonucleótido politimilado, previamente usado en la RT y el oligonucleótido de secuencia aleatoria RP4 del mismo paquete (Fig. 5a). Las condiciones de la PCR fueron: inicialmente 40 ciclos, en los que cada uno incluyó, una fase de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, una fase de alineamiento a 40 °C por 2 minutos y una fase de extensión a 72 °C por 1 minuto; finalmente una incubación de extensión a 72 °C por 7 minutos.

Análisis del despliegue diferencial del ADNc.

Una alícuota de cada muestra de ADNc fue desplegada mediante la técnica de PAGE 6% desnaturalizante. Después, el gel se reveló por tinción con plata. Las bandas desplegadas diferencialmente entre los tratamientos fueron cortadas para extraer el ADNc. Después 4µL de este extracto se reamplificaron por PCR, a las mismas condiciones de temperatura y con los oligonucleótidos que se usaron para su síntesis. Posteriormente, se tomaron 3.5 µL de la amplificación para ligarla al vector de clonación pGEM-T (de 3015 pb) con el paquete "pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems" de Promega. Del producto de la reacción de ligación, se emplearon 5 µL para transformar 100 µL de bacterias competentes *E. coli* cepa DH5α y se cultivaron por 12-24 h a 37 °C en placas de medio sólido LB (1.8 % de agar, 100 µg/mL de ampicilina, 40µl de X-gal a 20 mg/mL y 4 µl de IPTG a 200 mg/mL). De estos cultivos, se realizó una selección de clones positivos, con base en el principio de clonación satisfactoria de un inserto en el plásmido pGEM-T, que se fundamenta en la interrupción de la secuencia de codificación de la β-galatosidasa, para seleccionar colonias por identificación de color (clones positivos "blancas" Lac^- y negativos "azules" Lac^+) y finalmente se conservó en placas de agar LB, un inóculo de cada clon positivo. Además, de cada uno de estos clones se extrajo el plásmido, para usarlo como molde en una PCR (similar a la respectiva en la amplificación inicial de ADNc de cada clon) para verificar por bandeo, la presencia del inserto ligado y por ende los clones con ligación positiva del ADNc insertado al vector pGEM-T.

Secuenciación de las EST´s y análisis bioinformático.

El ADN plasmídico de los clones positivos se envió a la empresa "MacroGen" (Seoul, Korea) para obtener su secuencia nucleotídica. Posterior a la recepción de los archivos de secuenciación; para determinar su calidad (además de analizar el archivo cromatográfico), se identificó la secuencia de los oligonucleótidos pertinentes (o el reverso complementario de estos), así como la secuencia de los extremos del vector pGEM-T, para determinar así, la EST (secuencia del ADNc) de cada clon. A las secuencias que se les identificó el reverso complementario, se les determinó la secuencia complementaria directa. Después de procesar todas las secuencias, e identificar la EST; se realizó un análisis de alineamiento múltiple de secuencias entre las EST´s obtenidas, a partir de la herramienta CLUSTAL W (1.83) del Instituto Europeo de Bioinformática "EBI". Así como un análisis de secuencias

con el programa para búsqueda de alineamiento local básico “BLAST” del Centro Nacional de Información Biotecnológica “NCBI”, en sus diversas versiones (Tabla II), para inferir función y relaciones filogenéticas, entre secuencias nucleotídicas y proteínicas ya reportadas.

Tabla II. Nombre, descripción y siglas de las versiones de la herramienta BLAST, para secuencias nucleotídicas del NCBI.

Versión	Descripción	Siglas
BLAST-N	Versión preferente para alineamientos con secuencias nucleotídicas de otros organismos.	B-N
BLAST-N-EST	Versión anterior, pero comparando solo con la base de datos de las EST´s.	B-N-E
D-M- BLAST	Comparación de secuencias divergentes, en especial secuencias de diferentes organismos, que presentan alineamiento con bajo grado de identidad (relación filogenético).	D-M-B
D-BLAST-EST	Versión anterior, pero comparando solo con la base de datos de las EST´s.	D-B-E
BLAST-X	Compara secuencias traducidas en todos los marcos de lectura contra una base de datos de secuencias proteínicas.	B-X

Resultados.

Para la amplificación del gen *omp48* que codifica para la proteína antigénica Omp48 con un marco de lectura abierta "ORF" de 1,287 nucleótidos, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen a partir de las secuencias del codón extremo N-terminal, al codón de paro de la traducción (1,203 pb); además se adicionaron secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción: *Eco* RI en el oligonucleótido directo 48LPF y *Not* I en el oligonucleótido reverso 48LPR (Tabla III). El producto de PCR comprendió un fragmento aproximado de 1,227 pb (Fig. 5).

Tabla III. Oligonucleótidos diseñados para amplificar por la PCR, el gen *omp48* para la vacuna pOMP48-LP. Las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *Eco* RI y *Not* I en **negritas**; del gen *omp48* el codón extremo de la secuencia N-terminal en subrayado y la secuencia inversa complementaria del codón de paro de la traducción en sombreado; temperatura de alineamiento **Tm** y **Bases** nucleotídicas.

Oligonucleótidos				
Nombre	**Sentido**	**Secuencia**	**Tm**	**Bases**
48LPF	Directo	5'-GGG**G/AATTC**GTTGATTTCCACGGCTACATGCG-3'	81.6	32
48LPR	Reverso	5'-GGGG**GC/GGCCGC**TTACCACCAAGCTTCCGCTTG-3'	88.8	33

El producto de PCR del gen *omp48*, después del tratamiento con las endonucleasas de restricción respectivas, fue ligado al vector de expresión pcDNA3-LP (de 5,479 pb), que posee un promotor eucariota inmediato temprano del citomegalovirus "CMV", una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino "BGH", el gen de resistencia a la ampicilina como marcador de selección, un origen de replicación "ColE1" para su propagación en *E. coli* y una secuencia nucleotídica (63 pb) adicional para el péptido líder del TGF-β de *O. mykiss*, que le determina una función secretora de la proteína expresada en células de pez. De esta manera se construyó la vacuna pOMP48-LP de 6,687 pb (Fig. 5).

Después de extraer el tejido renal, agruparlo por tratamiento y día de muestreo; se llevó a cabo la extracción del ARN total, para conformar 9 grupos; en general, las cantidades de

tejido renal fueron muy bajas y por ende también, la cantidad de ARN total extraído –rango de 0.555 a 1.105 µg en cada muestra–, las menores cantidades se presentaron en control inyectado con pcDNA3-LP. De cada ARN total se crearon 2 subpoblaciones a partir de la síntesis del ADNc con un oligonucleótido politímilado (APC o APG) y el oligonucleótido de secuencia aleatoria RP4 (Fig. 6a); determinando así, 6 grupos control y 3 grupos vacunados por subpoblación, siendo en total 18 ADNc´s. En los ensayos de DD del ADNc, no se analizó el ADNc del control inyectado con pcDNA3.1(+), ya que fueron la muestras que presentaron menor cantidad de ARN total y por ende no se puedo sintetizar una cantidad suficiente de ADNc, para la estandarización de la técnica. La subpoblación sintetizada con APG presentó mayor diversidad de ADNc desplegado. En total se cortaron 13 bandas desplegadas diferencialmente, 9 de la subpoblación sintetizada con APG (Fig. 6c) y 4 de la subpoblación sintetizada con APC (Fig. 6b); de estas, solo se pudo extraer el ADNc de 11 (Fig. 7a).

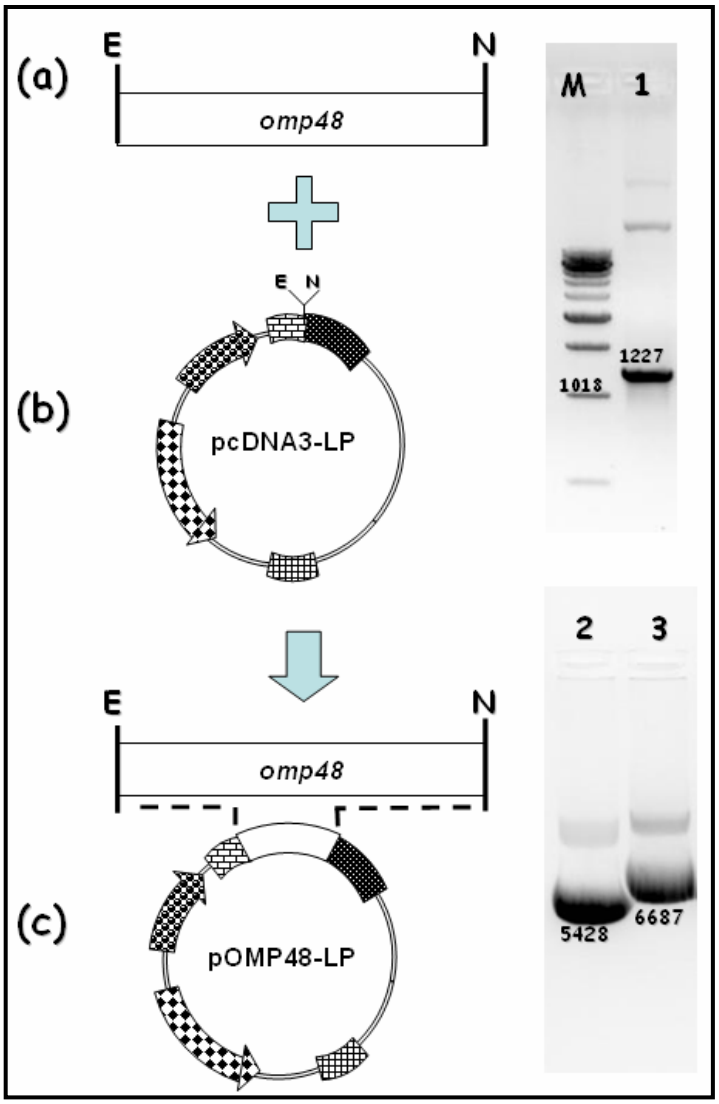

Figura 5. Construcción de la vacuna pOMP48-LP. **(a)** El gen ***omp48*** amplificado por PCR, **(b)** fue clonado en el vector de expresión pcDNA3-LP, **(c)** para generar la vacuna pOMP48-LP; **E**, sitio de reconocimiento para *Eco* RI y **N**, *Not* I; ▦ péptido líder del TGF-β de *O. mykiss*; ▩ promotor inmediato temprano del citomegalovirus, CMV; ▩ señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino, BGH pA; ▩ gen de resistencia a la ampicilina, Amp^r y ▦ origen de replicación para *E. coli*, ColE1; **1**, producto de PCR del gen *omp48*; **2**, pcDNA3.1(+); **3**, pOMP48-LP y **M**, marcador de tamaño molecular "Marker X Roche", valores en pares de bases.

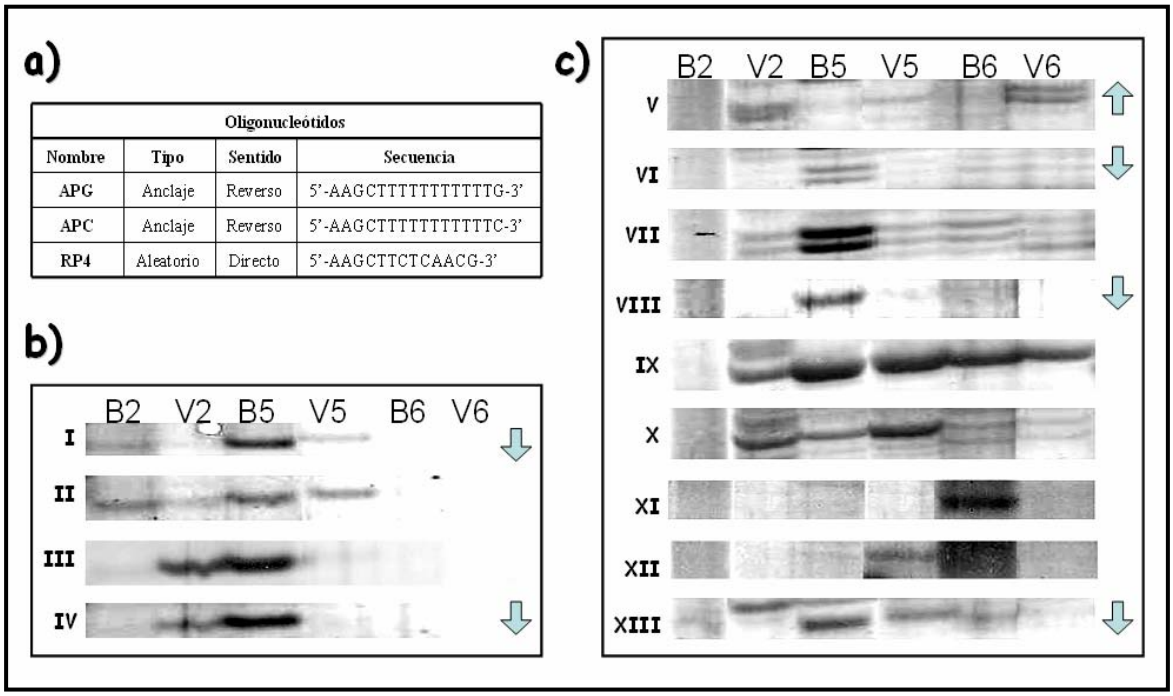

Figura 6. (**a**) Oligonucleótidos utilizados para la síntesis y amplificación del ADNc; (**b**) 4 bandas de la subpoblación APC y (**c**) 9 bandas de la subpoblación APG, seleccionadas por su despliegue diferencial. Símbolos en incisos b) y c): **B**, tratamiento peces inyectados con buffer; **V**, tratamiento peces inyectados con pOMP48-LP; **número arábigo**, días postinyección y **número romano**, signo asignado a cada banda desplegada diferencialmente; ↓ subexpresión o ↑ sobre expresión en tratamiento V, indicado solo en bandas con EST determinado.

Posteriormente, en el ensayo de transformación para la clonación de estos ADNc extraídos, se obtuvieron de 2 a 5 clones positivos por cada ADNc. No obstante, se presentaron discrepancias al comparar los clones positivos, con los obtenidos en el análisis de verificación del inserto de ADNc por la PCR; a tal grado que, todos los clones del ADNc "X", positivos en la técnica de clonación satisfactoria del pGEM-T, fueron negativos en la verificación por PCR del inserto (Fig. 7b y tabla IV).

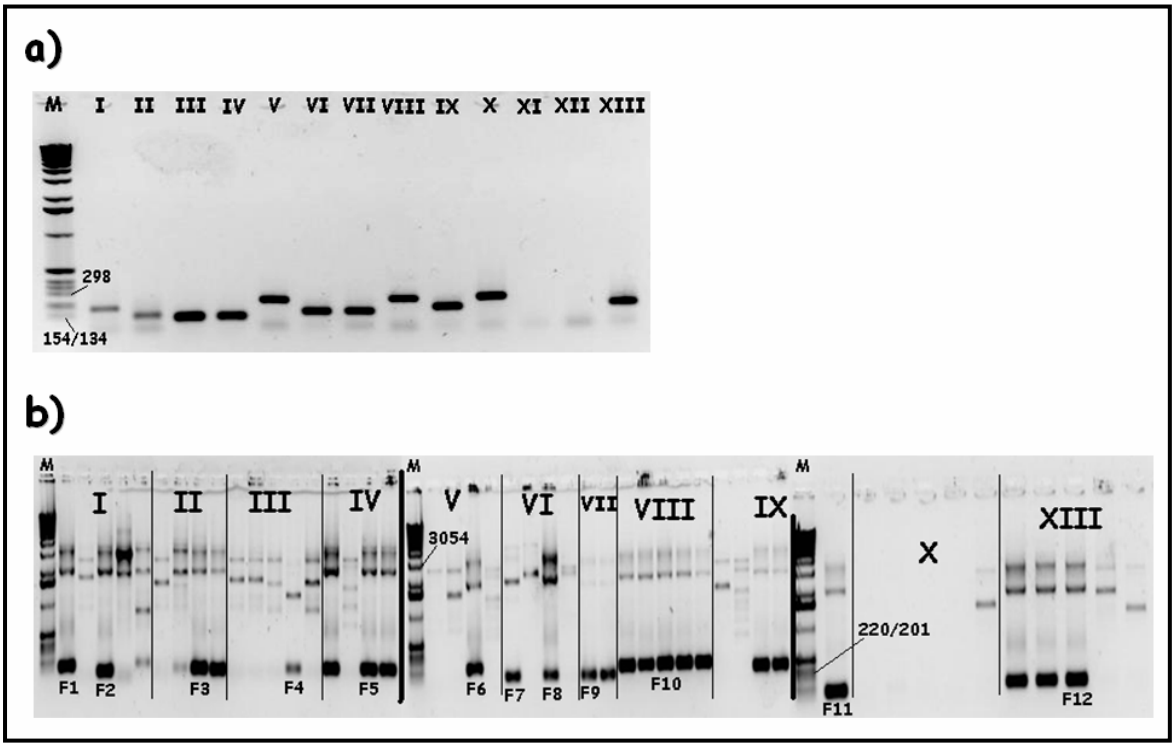

Figura 7. a) Productos de la PCR del ADNc extraído de las bandas cortadas del gel de poliacrilamida; **b**) producto de PCR de clones en el análisis de verificación del inserto de ADNc clonado en el vector pGEM-T, utilizando el plásmido extraído como templado; la presencia de la banda intensa, en la región inferior del gél, designa a los clones positivos. **Número romano**, número de banda con DD; **F** clon secuenciado; **M**, marcador de tamaño molecular "Marker X Roche", valores en pares de bases.

En general, se realizó el análisis de secuenciación de cada ADNc a partir de un clon; solo para I y VI se utilizaron 2 clones, ya que se observó entre estos, diferencia en la migración electroforética del producto de PCR (Fig. 7b); en total se obtuvieron 12 archivos de secuenciación "F". En el análisis de estas, se les pudo identificar la secuencia del ADNc, determinado por la secuencia de los oligonucleótidos respectivos, solo a 7 secuencias; por lo que se volvieron a secuenciar los 5 clones negativos en la identificación de la secuencia del ADNc, con alícuotas mas concentradas de la misma muestra de ADNp extraído; sin embargo no se obtuvieron secuencias posteriores "E" favorables (Tabla IV).

Tabla IV. Bandas cortadas del gel de poliacrilamida; indicando el oligonucleótido politimilado "**Oligo-dT**" utilizado en la síntesis del ADNc; extracción del **ADNc** de la banda, **-** no obtenido y **+** obtenido; número de clones positivos en la técnica de clonación con el vector **pGEM-T**; clones positivos en la verificación del inserto de ADNc por la **PCR**; archivo de **Secuencia**s; **EST**, las marcas de secuencia expresada determinadas y **c**: EST que se le determinó secuencia complementaria directa.

Banda	Oligo-dT	ADNc	pGEM-T	PCR	Secuencia	EST
I	APC	+	5	3	F1, F2	F1, F2
II	APC	+	4	3	F3, E1	-
III	APC	+	5	1	F4, E2	-
IV	APC	+	4	3	F5	F5c
V	APG	+	4	1	F6	F6c
VI	APG	+	4	2	F7, E3, F8	F8c
VII	APG	+	2	2	F9, E4	-
VIII	APG	+	5	5	F10	F10c
IX	APG	+	5	3	F11, E5	-
X	APG	+	5	0	-	-
XI	APG	-	-	-	-	-
XII	APG	-	-	-	-	-
XIII	APG	+	5	3	F12	F12

Tabla V. Análisis de redundancia con la herramienta CLUSTAL W (1.83) entre las 7 EST´s procesadas, valores porcentuales de similitud. #, número de bases nucleotídicas de la secuencia; sombreado, valores porcentuales mayores y subrayado, valor porcentual de clones de origen común.

Sec.	F2c	F5c	F6c	F8c	F10c	F12	#
F1	26	26	31	9	7	8	177
F2		100	12	12	11	12	123
F5c			12	12	11	12	123
F6c				25	7	8	224
F8c					15	11	152
F10c						75	236
F12							183

Después se llevo a cabo, un análisis de redundancia entre las 7 EST´s, encontrando entre la mayoría, baja similitud (7 a 31%); no obstante, entre las secuencias F2 y F5 (originadas de diferentes bandas del DD), presentaron una semejanza del 100%, así como entre F10 y F12 con un 75% de similitud; en cambio secuencias de una misma banda (F1 y F2), fueron semejantes en un 26% (Tabla IV); lo cual llevó a determinar 5 EST´s (Tabla V).

En general, el análisis de BLAST para las 5 EST (Tabla VI), presentó las mayores similitudes con secuencias de especies teleósteos (valores "Score" mayores y "E" menores). La EST F1 con un DD I subexpresado en el tratamiento vacunado (Fig. 5b), fue similar al ADNg de un gen clasificado en una nueva Superfamilia de la Imunoglobulinas 11 "*IGSF11*" de ratón *Mus musculus*. Este gen está conservado en todas las especies amniotas analizadas; la proteína hípotética comprende a una inmunoglobulina con dominios tipo V y C2, dominio de unión PDZ en el C-terminal y un dominio transmembranal; muestra bajos niveles de expresión en cerebro, riñón y glándula adrenal, pero mayores niveles en testículo y ovario. El incremento en la expresión de este gen en humanos, lo han determinado como un prometedor marcador terapéutico de carcinomas gastrointestinal y hepatocelular (Watanabe *et al.*, 2005).

Las EST´s F2 y F5 con un DD I y IV subexpresado en el tratamiento vacunado (Fig. 5b), presentó mayor similitud con una secuencia completa de ARNm, EST´s y secuencias proteínicas de teleósteos, relacionadas al gen Semejante a la Superasesina Viralicídica 2 "*SKIV2L*" conservado en eucariotas, putativo de las helicasas de ARN con posible función antiviral (Tabla VI). En el genoma humano, este gen se encuentra localizado en la región del complejo principal de histocompatibilidad clase III, también llamado antígenos leucocitarios humanos "HLA III" y el interés de esta relación, es que, el HLA esta asociado a mas de 70 enfermedades (Qu *et al.*, 1998 y Shiina *et al.*, 2004). Su función es fundamental en el proceso celular de regulación de la traducción (Shiina *et al.*, 2004) y en la respuesta inflamatoria (Daekin *et al.*, 2006). Se ha determinado su presencia en los sitios de biogénesis de ribosomas y síntesis de proteínas; es estructuralmente similar a la proteína antiviral Ski2p de la levadura *Saccharomyces cereviciae*, envuelta en la regulación de la traducción del ARN deficientemente politimilado "poly(A)$^-$ RNA" (Qu *et al.*, 1998).

La EST F6 con un DD V sobre expresado en el tratamiento vacunado (Fig. 5c), tuvo la mayor e igual similitud con 22 EST´s del teleósteo *Gasterosteus aculeatus* (Tabla VI), que forman parte de un grupo de 50 EST´s representantes de un gen similar a la proteína hipotética Yippee 3 "YPEL3" del ratón noruego *Rattus norvegicus*. *Yippee* es un gen conservado en eucariotas, putativo del dominio de unión metal semejante al dedo de zinc. En ensayo "interaction trap", la proteína Yippee intracelular de *Drosophila melanogaster* interactuó con ella misma, además fuerte y específicamente con la Hemolina de la polilla *Hyalophora cecropia*. Esta proteína es una Ig que se encuentra soluble en la hemolinfa y sobre la membrana de hemocitos; se expresa constitutivamente, mas en órganos secretores, pero fuertemente sobre expresado durante el desarrollo y bajo infección bacteriana, ya que provoca un incremento en la fagocitosis, activa la proteína C quinasa, además de inhibir la agregación de hemocitos, ya que se une a bacterias y LPS. En semejanza a la expresión del gen *Yippee*, en el humano es mayor en órganos secretores, tales como el riñón, páncreas, hígado y pulmón (Roxström y Faye, 2001).

La EST F8 con un DD VI subexpresado en el tratamiento vacunado (Fig. 5c), presentó mayor similitud con 2 EST´s del teleósteo *Dicentrarchus labrax* y con el ADNg del pez cebra *Danio rerio*. También tuvo similitud con el ADNg del gen c-MER proto-oncogen Tirosina Quinasa "*MERTK*" de humano (Tabla VI). Este gen es un representante de la familia de receptores de superficie celular tirosina quinasa. Codifica para una proteína con dominio intracelular tirosina quinasa, una región transmembranal con dos dominios de fibronectina tipo III y dos dominios extracelulares, semejantes a dos Ig tipo C2, relacionados a la adhesión celular de moléculas. Se expresa en un número de tejidos externos del ojo, incluyendo, macrófagos, epitelio y tejido reproductivo. Es requerido para la acreditación de células apoctóticas por fagocitos mononucleares en ratón; por lo que, en su ausencia resulta en un progresiva autoinmunidad similar al lupus. También juega un papel en el bloqueo del choque endotóxico inducido por LPS, a través de la inhibición de la producción del TNF-α (McHenry *et al.*, 2004).

Las EST´s F10 y F12 con un DD VIII y XIII subexpresado en el tratamiento vacunado (Fig. 5c), fue similar a secuencias completas de ARNm y proteínicas de teleósteos (Tabla VI), que comprenden el grupo de genes de la Fosfatasa Alcalina (EC 3.1.3.1) "AP", una enzima dimérica presente en la mayoría de los organismos; esta metaloenzima, que contiene 2 átomos de zinc y 1 ión magnesio, cataliza la hidrólisis de fosfomonoésteres con la liberación de fosfato inorgánico, siendo su actividad óptima a pH alto (Le y Millán, 2002). En el humano existen 4 isoenzimas de AP, codificadas por 4 *loci* distintos: 3 isoenzimas tejido-específico, AP intestinal "IAP", AP placentaria "PLAP" y AP de células germinales "GCAP", con un 90-98% de homología y sus genes agrupados en el cromosoma 2; la 4ª isoenzima es tejido-inespecífico "TNAP", expresada en una variedad de tejidos a través del desarrollo, 50% semejante a las otras AP´s y su gen está localizado en el cromosoma 1 (Le y Millán, 2002). Poco se sabe acerca de su función fisiológica, pero sugieren su contribución a la protección de lesiones y en los mecanismos de neutralización de endotoxinas; en varias enfermedades humanas se ha determinado como un importante indicador, por su incremento en la concentración. En el suero de la carpa *Labeo rohita* retada con *A. hydrophila*, se incremento la concentración de la AP durante las condiciones de enfermedad (Kumar *et al.*, 2006). También, en ensayos ratón (Xu *et al.*, 2002), aumentó la concentración de AP en el tejido hepático inflamado con picryl chloride "PCl-DTH", pero disminuyó en el suero y tejido hepático no dañado; además, en ensayos de preinmunosupresión al daño tisular se observaron exacerbadas lesiones hepáticas con más cambios serios en la concentración de AP; pero en ensayos de postinmunosupresión al daño tisular, resultó en el alivio del tejido y estabilidad en la concentración de AP. Esto infiere que el enriquecimiento de AP en el tejido dañado, no fue derivado de células inflamatorias infiltradas, además de que AP podría ser un factor importante envuelto en los mecanismos contra el tejido dañado.

Tabla VI. Resumen del análisis de similitud BLAST de las 5 EST´s determinadas, información de las secuencias con mayor similitud (valores altos de Score y bajos de E). **Especie**, nombre de la especie; **Taxón**, grupo filogenético; clave de **Acceso**; **Tipo** de molécula; **Long**, número de nucleótidos o aminoácidos; **Sec%**, sección porcentual de similitud; **Ident%**, identidad porcentual; **ML**, marco de lectura de la traducción; **Store**, valor que indica el grado de similitud; **E**, valor de significancia real de la homología; **Versión**, versión BLAST con la que se hizo el análisis.

EST F1										
Especie	**Taxón**	**Acceso**	**Tipo**	**Long**	**Sec%**	**Ident%**	**ML**	**Score**	**E**	**Versión**
M. musculus	Mammalia	CT009710	ADNg	220104	17	96		51.8	$8x10^{-4}$	B-N
D. rerio	Teleostei	AL935037	ADNg	141034	14	100		48.2	0.009	B-N
D. rerio	Teleostei	BX088571	ADNg	214441	14	100		48.2	0.009	B-N
D. rerio	Teleostei	XM_001331673	ARNmC	1412	25	84		46.4	0.032	B-N
EST´s F2 y F5										
D. rerio	Teleostei	NM_001044901	ARNmC	3704	78	78		80.6	$2x10^{-12}$	D-M-B
D. rerio	Teleostei	EH441479	EST	941	78	78		80.6	$2x10^{-12}$	D-B-E
D. rerio	Teleostei	EB929016	EST	707	78	78		80.6	$2x10^{-12}$	D-B-E
D. rerio	Teleostei	EB922516	EST	352	78	78		80.6	$2x10^{-12}$	D-B-E
D. rerio	Teleostei	CT653855	EST	743	78	78		80.6	$2x10^{-12}$	D-B-E
T. nigroviridis	Teleostei	CAF92300	Proteína	1120	25	88	+1	47.8	$2x10^{-4}$	B-X
D. rerio	Teleostei	NP_001038366	Proteína	1230	24	83	+1	45.1	0.001	B-X
EST Yip F6										
G. aculeatus	Teleostei	DW666834	EST	1101	49	80		100	$2x10^{-18}$	D-B-E
G. aculeatus	Teleostei	DW595165	EST	1103	49	80		100	$2x10^{-18}$	D-B-E
G. aculeatus	Teleostei	DW592902	EST	1147	49	80		100	$2x10^{-18}$	D-B-E
G. aculeatus	Teleostei	DW025478	EST	1065	49	80		100	$2x10^{-18}$	D-B-E
18 secuencias adicionales de la misma especie, con iguales valores de similitud										
EST IgTK F8										
D. labrax	Teleostei	DV217036	EST	767	68	77		84.2	$1x10^{-13}$	B-N-E
D. labrax	Teleostei	DN832130	EST	649	50	83		78.8	$5x10^{-12}$	B-N-E
D. rerio	Teleostei	BX284640	ADNg	158537	26	85		42.8	0.33	B-N
H. sapiens	Mammalia	AK026802	ARNmC	1876	14	100		41	1.0	B-N
EST AL F10 y F12										
T. rubripes	Teleostei	NM_001032651	ARNmC	1584	60	80		131	$1x10^{-27}$	D-M-B
T. nigroviridis	Teleostei	AY145129	ARNmC	1584	64	76		116	$3x10^{-23}$	B-N
T. rubripes	Teleostei	NP_001027823	Proteína	527	56	67	+3	84.7	$1x10^{-15}$	B-X
T. nigroviridis	Teleostei	AAN64271	Proteína	527	51	74	+3	81.6	$1x10^{-14}$	B-X
T. nigroviridis	Teleostei	CAG03505	Proteína	527	51	74	+3	81.6	$1x10^{-14}$	B-X

Discusión.

Este análisis de expresión génica diferencial, confirmó la hipótesis de que, el riñón de *M. rosacea* presentó una expresión inmunogénica diferencial. Debido a que, fueron determinadas EST´s homólogas a genes relacionados al sistema inmune de vertebrados, con mayor similitud a secuencias génicas de teleósteos. De las cuales, la mayoría son homólogas a componentes del sistema inmune innato, ya que se infirió que, las funciones inmunes innatas en teleósteos, tienen un papel mas determinante, en comparación a los vertebrados homeotermos, tales como aves y mamíferos (Tsoi *et al.*, 2004).

La obtención de diferentes EST´s (F1 y F2) a partir de 1 banda, representa el mimetismo entre ADNc´s y por ende, una errónea interpretación de resultados, al determinar la expresión diferencial de un ADNc a partir de un bandeo probablemente conformado, por la sobre posición de diferentes ADNc´s en el gel de poliacrilamida; lo cual indica, una clara debilidad en esta técnica, por el hecho de basarse en procedimientos "simples" y no automatizados en comparación a técnicas más avanzadas. Sin embargo, la determinación del 100% de similitud entre las ESTs F2 y F5, provenientes de diferentes bandas con una subexpresión en ambas, junto con lo reportado sobre la expresión de SKIV2L (Daekin *et al.*, 2006), apoyan la determinación de un posible efecto de subexpresión por la ausencia de efectos de inflamación en el tejido renal de peces inyectados con la vacuna.

La presencia de las EST´s F10 y F12 con un 25% de variación entre las secuencias solo en el extremo 3´ –determinada como una región no codificante– indica la posible existencia de diferentes ARNm´s de un mismo gen, por la presencia de sitios alternativos de poliadenilación –siendo AAUAAA y AUUAAA comunes en mamíferos–, los cuales han sido determinados como importantes puntos de control para la expresión génica en un tejido o estado de desarrollo específico (Edwalds *et al.*, 1997). Otra posibilidad –por su semejanza con la AP– sería la presencia de genes homólogos, ya que en el humano existen 4 isoenzimas de AP, codificadas por 4 genes (Le y Millán, 2002).

El hecho de haber obtenido 2 EST´s iguales –F2 y F5– y 2 EST´s con 75 % de similitud –F10 y F12–, lo cuales posiblemente cada par representa un gen; infiere a no aseverar sobre la diversidad génica, solo a partir de la diversidad de ADNc´s, ya que se debe tomar en

cuenta la posible variación en la migración electroforética de un mismo ADNc. Además es indispensable determinar la existencia de variedades de ARNm´s de cada componente genético.

Ante los inconvenientes en el desarrollo de este trabajo, referentes a la poca cantidad de tejido renal obtenido y por ende, haber extraído una cantidad de ARN total, menor a la recomendada, condujeron a no poder analizar el tratamiento control inyectado con pcDNA3.1(+), así como no usar replicas de cada tratamiento para la técnica del DD de ADNc. No obstante a estas limitaciones, queda descartado el posible hecho, de que la expresión inmunogénica diferencial haya sido por efecto del vector plasmídico (componente de la vacuna) y no por la proteína antigénica Omp48 codificada a partir de la vacuna genética; ya que, como explica Vázquez *et al.* (2005) en la evaluación de la vacuna genética pOMP48, que codifica para la misma Omp48 antigénica; en el tratamiento control de peces (*Paralabrax maculatofasciatus*) inyectados con el vector pcDNA3.1 (+), no se presentó inmunoestimulación. Además, aún con el inconveniente de no haber usado replicas, en referencia al análisis bioinformático, las 7 EST`s determinadas fueron semejantes a cinco genes relacionados al sistema inmune, dos en particular con el gen *SKIV2L* que es un componente del HLA III en el sistema inmune humano.

También, es clara la baja cobertura de análisis de todo el transcriptoma renal de *M. rosacea*, ya que el uso de solo 2 combinaciones de oligonucleótidos, determina un rango de análisis probable de un 4% del transcriptoma (Liang y Pardee, 1994). Sin embargo, la expresión diferencial de las EST`s determinadas, muestran evidencia del efecto inmune de las vacunas genéticas, similar a una infección intracelular capaz de generar una respuesta inmune, sin reversión a virulencia, representada en los efectos de inflamación (Takano, 2004); ya que las EST`s F2, F5, F10 y F12 semejantes a los genes *SKIV2L* y *AP* (indicadores de infección viral, e inflamación por su función directa en tales procesos), presentaron subexpresión en el tratamiento vacunado; a diferencia de la EST F6 semejante al gen *Yippee* que codifica para una proteína intracelular que interactúa con una Ig relacionada a infecciones bacterianas y que presentó una sobre expresión en el tratamiento vacunado.

Estas expresiones diferenciales muestran cierta evidencia de una probable respuesta inmune específica, ya que hubo sobre expresión (en los 3 días de muestreo) de un componente relacionado a interacciones específicas con Ig´s propias de infecciones bacterianas, debido al posible efecto antigénico de la proteína Omp48, que codificó la vacuna pOMP48-LP; además la subexpresión de los EST´s similares a *IGSF11* y *MERTK*, determinados como componentes de respuestas a carcinoma y autoinmunidad, además de ser inespecíficos del tejido renal. En general estas variaciones en la expresión génica de estos componentes, dan evidencia sobre las modificaciones en el sistema inmune del organismo para el control de su homeostasis ante una inmunoestimulación, al disminuir la expresión de componentes no relacionados a la respuesta inmune específica bacteriana a la cual fue estimulado el organismo por la vacunación. Es de importancia recalcar, que a partir de este estudio, se obtuvieron EST´s de genes (*IGSF11* y *MERTK*) no reportados con anterioridad en otras especies de peces.

El estudio de las EST´s, aún con la desventaja de ser secuencias de porciones predominantemente, de la región 3´ no codificante de los ARNm´s (Larkin *et al.*, 2003), fue de gran relevancia; ya que brindo la información esencial, para identificar a los genes expresados diferencialmente en un tejido y estado inmunológico específico; además, proporcionó información adicional sobre un posible sistema de poliadenilación alternativa, lo cual da evidencia sobre la posible existencia de mecanismos de control en la expresión génica de teleósteos (Liu y Graber, 2006). No obstante, un paso importante en el análisis de genómica funcional, es el descifrar, la secuencia codificante “CDS” completa de cada gen (Furuno *et al.*, 2007) y a partir de esta; validar la identificación y expresión génica diferencial con procedimientos cuantitativos, ya que la técnica de DD del ADNc es semicuantitativa (Larkin *et al.*, 2003).

Conclusiones.

- El riñón de *M. rosacea* presentó una expresión inmunogénica diferencial, determinada por siete EST´s homólogas de genes relacionados al sistema inmune de vertebrados, con mayor similitud a secuencias de teleósteos. La mayoría de estas son homólogas a componentes del sistema inmune innato.

- Los genes *IGSF11* y *MERTK* (determinados por las EST´s F1 y F8), que codifican para receptores tipo Ig´s inespecíficos del tejido renal, no habían sido reportados en peces.

- Las EST´s F2 y F5 con 100% de similitud; fueron homólogas al *SKIV2L*, un componente del HLA III relacionado a la actividad antiviral y respuesta inflamatoria.

- Las EST´s F10 y F12 con 25% de diferencia en el extremo 3´ y por lo cual, determinados como posibles variedades de ARNm de un gen o como ARNm´s de genes homólogos; fueron similares a la *AP*, con función relacionada en la protección de lesiones y en los mecanismos de neutralización de endotoxinas.

- El despliegue diferencial de las siete EST´s, da evidencia sobre la capacidad de la vacunación genética, en estimular una respuesta inmune específica bacteriana, sin efectos inflamatorios.

Literatura citada.

1. Amundsen T. 2003. Fishes as models in studies of sexual selection and parental care. **Journal of Fish Biology**. Noruega. 63(A):17-52.
2. Anderson E.D., Mourich D.V., Fahrenkrug S.C., LaPatra S., Shepherd J., Leong J.A. 1996. Genetic immunization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) against infectious hematopoietic necrosis virus. **Mol Mar Biol Biotechnol**. E.U.A. 5 (2): 114-122.
3. Austin B., Altwegg M., Gosling P.J. y Joseph S.W. 1996. **The genus *Aeromonas***. John Wiley & Sons. 350 pp.
4. Austin B. y Austin D.A. 1999. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. New York: Springer Verlag.
5. Bernard D., Six A., Gois L.R., Messiaen S., Chilmonczyk S., Quillet E., Boudinot P. y Benmansour A. 2006. Phenotypic and Functional Similarity of Gut Intraepithelial and Systemic T Cells in a Teleost Fish. **The Journal of Immunology**. Francia. 176: 3942–3949.
6. Boshra H., Li J. y Sunyer J.O. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology.** E.U.A. 20: 239-262.
7. Bricknell I.R., King J.A., Bowden T.J. y Ellis A.E. 1999. Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**. R.U. 9(2): 139-151.
8. Collet B. y Secombes C.J. 2005. Construction and analysis of a secreting expression vector for fish cells. **Vaccine**. R.U. 23: 1534-1539.
9. Corbeil S., LaPatra S.E., Anderson E.D., Kurath G. 2000. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. **Vaccine**. E.U.A. 18: 2817-2824.

10. Davis H.L. y McCluskie M.J. 1999. DNA vaccines for viral diseases. **Microbes Infect**. Canada. 1 (1): 7-21.

11. Deakin J.E., Papenfuss A.T., Belov K., Cross J.G.R., Coggill P., Palmer S., Sims S., Speed T.P., Beck S. y Marshall J.A. 2006. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. **BMC Genomics**. Australia y R.U. 7(281): 1-14.

12. Ding C. y Cantor C.R. 2004. Quantitative Analysis of Nucleic Acids - the Last Few Years of Progress. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. E.U.A. 37(1): 1-10.

13. Donnelly J.J., Liu M.A., y Ulmer J.B. 2000. Antigen Presentation and DNA Vaccines. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. E.U.A. 162: S190-S193.

14. Edwalds G.G., Veraldi K.L. y Milcarek C. 1997. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? **Nucleic Acids Research**. E.U.A. 25(13): 2547–2561.

15. Ellis A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. **Fish & Shellfish Immunology**. R.U. 9: 291-308.

16. Fang H.M., Ling K.C., Ge R. y Sin M. 2000. Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas),against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesion. **Journal of Fish Diseases**. Singapur. 23: 137-45.

17. FAO Fisheries Department 2006. State of world aquaculture 2006. **FAO Fisheries Technical Paper**. No.500. 134 pp.

18. Froese R. y Pauly D. Editores. 2007. FishBase. World Wide Web publicación electrónica. **www.fishbase.org**, versión (02/2007).

19. Garmony H.S., Brown K.A. y Titball R.W. 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. **Genetic Vaccines and Therapy**. R.U. 1 (2): 1-5.

20. Gómez-Chiarri M., Brown L.L. y Levine R.P. 1996. Protection against *Renibacterium salmoninarum* infection by DNA-based immunization. San Francisco State University, American Fisheries Society. 155-157.

21. Gracia L.V., Kiewek M.M. y Maldonado G.M. 2004. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *M. rosacea*. **Aquaculture**. México. 237: 485-498.

22. Gracia L.V., Kiewek M.M., Maldonado G.M., Monsalvo S.P., Portillo C.G., Civera C.R., Linares A.M., Robles M.M. y Mazón S.J. 2005. Larvae and juvenile production of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). **Aquaculture Research**. México. 36: 110-112.

23. Grøntvedt R.N. y Espelid S. 2004. Vaccination and immune responses against atypical Aeromonas salmonicida in spotted wolffish (Anarhichas minor Olafsen) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**. Noruega. 16 (3): 271-85.

24. Hansen J.D., Landis E.D., Philliphs R.B. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **PNAS**. E.U.A. 102(19): 6919–6924.

25. Heemstra P.C. y Randall J.E. 1993. **FAO species catalogue**. Vol. 16. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. 125(16). FAO. Roma.

26. Heppell J. y Davis H.L. 2000. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. **Adv Drug Deliv Rev**. Canada. 43(1): 29-43.

27. Hirst I.D. y Ellis A.E. 1994. Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. **Fish & Shellfish Immunology**. R.U. 4 (1): 29-45.

28. Iwama G. y Nakanishi T. 1996. **THE FISH IMMUNE SYSTEM Organism, Pathogen, and Environment.** Vol. 15 de la serie FISH PHYSIOLOGY .ACADEMIC PRESS. 380 pp.

29. Kalinna, B.H. 1997. DNA vaccines for parasitic infections. **Immunol. Cell Biol**. Australia. 75: 370-375.

30. Kocabas A.M., Li P., Cao D., Karsi A., He C., Patterson A., Ju Z., Dunham R.A. y Liu Z. 2002. Expression profile of the channel catfish spleen: analysis of genes involved in immune functions. **Marine Biotechnology**. E.U.A. 4: 526-536.

31. Koide Y., Nagata T., Yoshida A. y Uchijima M. 2000. DNA Vaccines. **Jpn. J. Pharmacol**. Japón. 83: 167-174.

32. Kumar R., Mukherjee S.C., Prasad K.P. y Pal A.K. 2006. Evaluation of Bacillus subtilis as a probiotic to Indian major carp Labeo rohita (Ham.). **Aquaculture Research**. India. 37: 1215-1221

33. Kurath G. 2005. Overview of recent DNA vaccine development for fish. **Progress in Fish Vaccinology**. E.U.A. 121:201-213.

34. Kwang J. 2000. Fishing for vaccines. **Nat Biotechnol**. Singapur. 18 (11): 1145-6.

35. Larkin P., Knoebla I. y Denslow N.D. 2003. Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology**. E.U.A. Parte B 136: 149-161.

36. Le D.M.H. 2002. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**. E.U.A. 277(51): 49808-49814.

37. Leong J.C. 1993. Molecular and biotechnological approaches to fish vaccines. **Current Opinion in Biotechnology**. E.U.A. 4: 286-293.

38. Leong J.C., Anderson E., Bootland L.M., Chiou P.-W., Johnson M., Kim C., Mourich D. y Trobidge G. 1997. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. **Fish Vaccinology**. E.U.A. 90: 267-277.

39. Liang P. y Pardee A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**. 257: 967–971.

40. Liu D. y Graber J.H. 2006. Quantitative comparison of EST libraries requires compensation for systematic biases in cDNA generation. **BMC Bioinformatics**. 7(77): 1-10.

41. Liu M.A. 2003. DNA vaccines: a review. **Journal of Internal Medicine**. 253: 402-410.

42. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scout M.P., Zipursky L. y Darnell J. 2003. **Biología Celular y Molecular**, 5ª edn. Editorial Médica Panamericana. 1084 pp.

43. Lorenzen N. y LaPatra S.E. 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. **Rev. sci. tech. Off int. Epiz.** 24 (1): 201-213.

44. Lorenzen N., Lorenzen E., Einer J.K., Heppell J., Wu T. y Davis H.1998. Protective immunity of VHS in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) following DNA vaccination. **Fish & Shellfish Immunology.** 8: 261-270.

45. Lutwyche P., Exner M.M., Hancock R.E. y Trust T.J. 1995. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. **Infection and Immunity**. 63: 3137-3142.

46. Magnadottir B., Lange S., Gudmundsdottir S., Bøgwald J. y Dalmo R.A. (2005) Ontogeny of humoral immune parameters in fish. **Fish & Shellfish Immunology.** 19: 429-439.

47. McHenry C.L., Liu Y., Feng W., Nair A.R. Feathers K.L., Ding X., Gal A., Vollrath D., Sieving P.A. y Thompson D.A. 2004. *MERTK* Arginine-844-Cysteine in a Patient with Severe Rod–Cone Dystrophy: Loss of Mutant Protein Function in Transfected Cells. **IOVS**. 45(5): 1456-1462.

48. Myhr A.I., Dalmo R.A. 2005. Introduction of genetic engineering in aquaculture: Ecological and ethical implications for science and governance. **Aquaculture**. 250: 542-554.

49. Ohta Y. y Flajnik M. 2006. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. **PNAS**. 103(28): 10723–10728.

50. Park K.C., Osborne J.A., Tsoi S.C., Brown L.L. y Jonson S.C. 2005. Expressed sequence tags análisis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and soleen tisúes following vaccination against *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish immunology**. 18: 393-415.

51. Plouffe D.A., Hanington P.C., Walsh J.G., Wilson E.C. y Belosevic M. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. **Xenotransplantation**. 12: 266–277.

52. Purcell M.K., Kurath G., Garver K.A., Herwig R.P. y Winton J.R. 2004. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. **Fish & Shellfish Immunology**. 17 (5): 447-462.

53. Qu X., Yang Z., Zhang S., Shen L., Dangel A.W., Hughes J.H., Redman K.L., Wu L.C., Yu C.Y. 1998. The human DEVH-box protein Ski2w from the HLA is localized in nucleoli and ribosomes. **Nucleic Acids Research**. 26(17): 4068-4077.

54. Rahman M.H. y Kawai K. 2000 Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. **Fish & Shellfish Immunology**. 10: 379-382.

55. Roxström K.L. y Faye I. 2001. The Drosophila gene Yippee reveals a novel family of putative zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes. **Insect Molecular Biology**. 10(1): 77-86.

56. Russell S. y Lumsden J.S. 2005. Function and heterogeneity of fish lectins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 108: 111-120.

57. Shiina T., Inoko H. y Kulski J.K. 2004. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. **Tissue Antigens**. 64: 631–649.

58. Srivastava I.K., PhD y Liu M.A., MD 2003. Gene Vaccines. **Annals of Internal Medicine**. 138 (7): 550-559.

59. Stafford J.L., Bengtén E., Pasquier L.D., McIntosh R.D., Quiniou S.M., Clem L.W. Miller N.W. Wilson M. 2006. A novel family of diversified immunoregulatory receptors in teleosts is homologous to both mammalian Fc receptors and molecules encoded within the leukocyte receptor complex. **Immunogenetics**. E.U.A. 58: 758–773.

60. Strugnell R.A., Drew D., Mercieca J., Dinatale S., Firez N., Dunstan S.J., Simmons C.P. y Vadolas J. 1997. DNA vaccines for bacterial infections. **Immunol. Cell Biol**. 75: 364-369.

61. Takano T., Iwahori A., Hirono I. y Aoki T. 2004. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. **Fish & Shellfish Immunology**. 17 (4): 367-374.

62. Tang D., De Vit M., Johnston S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature.** 356: 152-154.

63. Tanghe A., Denis O., Lambrecht B., Motte V., van den Berg T. y Huygen K. 2000. Tuberculosis DNA Vaccine Encoding Ag85A Is Immunogenic and Protective When Administered by Intramuscular Needle Injection but Not by Epidermal Gene Gun Bombardment. **Infection and Immunity**. Bélgica. 68 (7): 3854–3860.

64. Trede N.S., Langenau D.M., Traver D., Look A.T. y Zon L.I. 2004. The use of Zebrafish to understand immunity. **Immunity**. E.U.A. 20: 367-379.

65. Tsoi S.C.M., Ewart K.V., Penny S., Melville K. Liebscher R.S., Brown L.L. y Douglas S.E. 2004. Identification of immune-relevant genes from atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. **Mar. Biotechnol.** 6: 199-214.

66. Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Randall D.R., DeWitt C.M., Friedman A., Hawe L.A., Leander K.R., Martinez D., Perry H.C., Shiver J.W., Montgomery D.L. y Liu M.A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**. 259: 1745-1749.

67. Vázquez-Juárez R.C., Barrera-Saldana H.A., Hernandez-Saavedra N.Y., Gomez-Chiarri M. y Ascencio F. 2003. Molecular cloning, sequencing and characterization of *omp48*, the gene encoding for an antigenic outer membrane protein from *Aeromonas veronii*. **Journal of Applied Microbiology**. México. 94: 908-918.

68. Vázquez-Juárez R.C., Gomez-Chiarri M., Barrera-Saldana H., Hernandez-Saavedra N., Dumas S. y Ascencio F. 2005. Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii*. **Fish & Shellfish Immunology**. México. 19 (2): 153-163.

69. Vázquez-Juárez R.C., Romero-Geraldo M.J. y Ascencio F. 2004. Adhesive properties of a LamB-like outer membrane protein and its contribution to *Aeromonas veronii* adhesion. **Journal of Applied Microbiology**. México. 96: 700-708.

70. Watanabe T., Suda T., Tsunoda T., Uchida N., Ura K., Kato T., Hasegawa S., Satoh S., Ohgi S., Tahara H., Furukawa Y. y Nakamura Y. 2005. Identification of immunoglobulin superfamily 11 (IGSF11) as a novel target for cancer immunotherapy of gastrointestinal and hepatocellular carcinomas. **Cancer Sci**. 96(8): 498-506.

71. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. y Felgner P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. **Science**. E.U.A. 247: 1465-1468.

72. Xu Q., Lu Z.H., Zhang X.M. 2002. A novel role of alkaline phosphatase in protection from immunological liver injury in mice. **Liver**. 22: 8-14

73. Yong B.J., Ohira T., Hirono I. y Aoki T. 2005. Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) following DNA vaccination. **Fish & Shellfish Immunology**. Japón. 18 (2): 135-47.

74. Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutiérrez-de Frías C. y Cortés A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish & Shellfish Immunology**. España. 20: 126-136.