



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE TRANSFERRINA Y
FERRITINA DEL PARGO AMARILLO (*Lutjanus
argentiventris*) EXPUESTOS A HIERRO Y A LA
INFECCIÓN CON *Aeromonas hydrophila*.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

P r e s e n t a

Miriam Goretty Angulo Villavicencio

La Paz, Baja California Sur, Octubre de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 09:55 horas del día 18 del Mes de Septiembre del 2015, 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:

“CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE TRANSFERRINA Y FERRITINA DEL PARGO AMARILLO (*Lutjanus argentiventris*) EXPUESTOS A HIERRO Y A LA INFECCIÓN CON *Aeromonas hydrophila*”

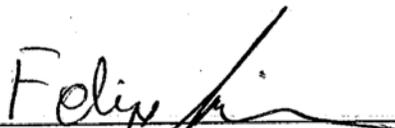
Presentada por el alumno:

Miriam Goretty Angulo Villavicencio

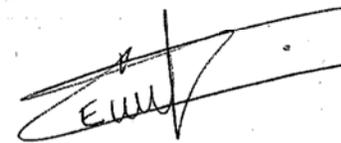
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

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

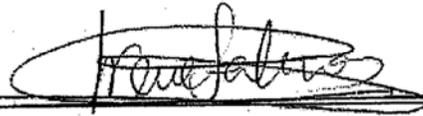
LA COMISION REVISORA



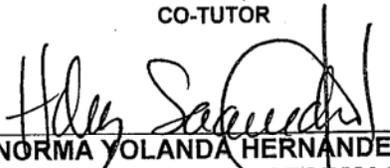
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
CO-TUTOR



Dra. Irene Salinas Remiro
CO-TUTOR



DRA. NORMA YOLANDA HERNANDEZ SAAVEDRA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis:

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-tutor:

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-tutora:

Dra. Irene Salinas Remiro
Universidad de Nuevo México.

Comité revisor de tesis:

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Irene Salinas Remiro

Jurado de Examen de grado:

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Irene Salinas Remiro

Suplente

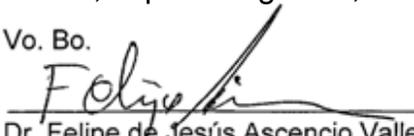
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

RESUMEN

El hierro es un elemento esencial que es requerido para el crecimiento y supervivencia de la mayoría de los organismos. Sin embargo, en cantidades excesivas el hierro puede ser tóxico. Para mantener la homeostasis de este elemento, los organismos cuentan con un mecanismo de regulación que es llevado a cabo mediante la interacción de varios genes, entre ellos los codificantes para las proteínas ferritina y transferrina. El pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) es considerado un candidato potencial de cultivo, sin embargo, está expuesto a infecciones bacterianas que compiten por el hierro disponible; y en general, existe poca información acerca de la respuesta inmune a nivel transcripcional en esta especie. El objetivo de esta tesis fue caracterizar y cuantificar los niveles de expresión de ferritina y transferrina en peces expuestos a una sobrecarga o deficiencia de hierro y retados con *Aeromonas hydrophila*. En este estudio se obtuvo la secuencia completa de ADNc de transferrina y ferritina M con una longitud de 2,482 y 1,076pb, y con un ORF de 2,073 y 531pb, respectivamente; y una secuencia deducida de aminoácidos de 690 residuos para transferrina y 176 residuos para ferritina M. Los resultados de expresión génica mostraron diferentes patrones de expresión dependiente de tejido. Se observó una disminución en la expresión de transferrina en hígado, intestino y piel de peces infectados tanto en condiciones con sobrecarga de hierro como con quelante. Los niveles de expresión de ferritina M y H aumentaron significativamente en branquia después de la infección en las dos condiciones de disponibilidad de hierro. Esto sugiere que ferritina y transferrina juegan una función importante durante una infección bacteriana en pargo amarillo.

Palabras clave: Pargo amarillo, *Lutjanus argentiventris*, hierro, transferrina, ferritina, expresión génica, *Aeromonas hydrophila*.

Vo. Bo.



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

ABSTRACT

Iron is an essential element required for growth and survival of most organisms. However, iron is toxic when present in excess. Organisms have an adjustment mechanism for maintaining iron homeostasis, which is carried out through the interaction of several genes, including those coding for the proteins ferritin and transferrin. Yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*) is considered a potential candidate aquaculture species, however; little is known about the immune response of yellow snapper at the transcriptional level. Therefore, the purpose of this study was to clone the full-length cDNA sequence of transferrin and ferritin M and quantify the expression levels of these genes in yellow snapper exposed to iron overload or deficiency and infection with the bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. The complete cDNA sequences of transferrin and ferritin M were obtained using RACE technique. The full-length cDNA was 2,482 and 1,076 bp respectively, showing an ORF of 2,073 and 531 bp; and deduced amino acid sequence of 690 residues for transferrin and 176 residues for ferritin M. Moreover, the expression levels were measured by real-time PCR (RT-qPCR) using the EF-1 α gene as an endogenous control. Results showed different patterns of tissue-specific expression. Expression of transferrin in liver, intestine and skin was lower in infected fish in both iron and chelating conditions compared to uninfected controls. Expression levels of ferritin M and H increased significantly in gill after infection in both iron treatments. This suggests that ferritin and transferrin play an important role during pathogenic infection in yellow snapper.

Keywords: Yellow snapper, *Lutjanus argentiventris*, iron, transferrin, ferritin, gene expression, *Aeromonas hydrophila*.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes me guían y apoyan siempre

AGRADECIMIENTOS

Agradezco considerablemente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con el número 301912 para la obtención de mi grado de Maestra en Ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, al personal administrativo y docente por todas las facilidades prestadas durante mi estancia en la institución.

Al Dr. Felipe Ascencio, por todo el apoyo brindado, sus enseñanzas, consejos y por guiarme durante este camino. Gracias por creer en mí.

Al Dr. Carlos Angulo, quien indudablemente estuvo dispuesto a ayudarme siempre que lo necesitaba y sus grandes enseñanzas para mi formación.

A la Dra. Irene Salinas, quien me recibió con los brazos abiertos en la Universidad de Nuevo México, su hospitalidad, guía, enseñanzas y sobre todo su paciencia hacia mí. Aprovecho para agradecer de igual manera a mis compañeros durante mi paso en esta universidad. My friends Bani and Ali, who always gave me their help, thank you! To Lucca, Thomas, Cecelia, Jane and Samantha.

A la Dra. Martha Reyes técnico responsable del laboratorio de patogénesis microbiana, gracias por toda la confianza que ha depositado en mí, por su inigualable apoyo, por introducirme al mundo de los peces e inmunología y enseñarme tanto de ellos. Gracias por su ayuda desde el diseño experimental, muestreos, laboratorio y escritura. ¡Gracias infinitas!.

A la Dra. Gracia Gómez quien me brindo su valioso tiempo y apoyo en una sección de mi trabajo. ¡Muchas gracias! También agradezco al M.C. Julio Hernández, técnico del laboratorio de Biología Molecular de Plantas.

Doy también mis sinceros agradecimientos a quienes estuvieron detrás del bioensayo realizado para poder sacar adelante mi trabajo: al Dr. Juan Carlos

Pérez Urbiola, por ayudarnos con las trampas para peces y la identificación de pargo amarillo, a Jorge Angulo y Enrique Calvillo por facilitarnos la obtención de los peces en las salidas de campo, al M.C. Pablo Monsalvo técnico del laboratorio húmedo y a Gabriel Robles por brindarnos todas las facilidades para la realización del bioensayo.

A todos mis compañeros de los laboratorios de Patogénesis Microbiana y Biología Molecular de plantas. A mis hermanitas Erika e Ylenia, quienes siempre me brindaban su mano.

Mis grandes agradecimientos a todos mis compañeros de maestría, que indudablemente encontré amistades muy valiosas, donde siempre nos alentábamos unos a otros.

Y mi más grande agradecimiento va para mis padres Juanita y José Alfredo, quienes sin dudar me apoyaron en cada momento, en cada decisión y en cada aprieto, gracias por ser los mejores toda la vida. A mis hermanos, sobre todo a mi gordito Alejandro, que aún de lejos recibo su apoyo incondicional en todos los aspectos.

A ti mi gor, por estar a mi lado, apoyarme siempre y escucharme cuando más lo necesito. Gracias mi Agus!

CONTENIDO

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Pargo amarillo (<i>Lutjanus argentiventris</i>)	5
2.1.1 Distribución e importancia comercial del pargo amarillo (<i>L. argentiventris</i>)	6
2.2 Enfermedades en acuicultura de peces.....	7
2.3 Metabolismo de hierro en peces	9
2.3.1 Transferrina.....	11
2.3.2 Ferritina H y M	12
2.4 Sistema inmune de peces.....	14
2.5 Mecanismos de obtención de hierro por patógenos	17
2.5.1 Mecanismo de obtención de hierro por <i>Aeromonas hydrophila</i>	18
2.6 Quelante (Deferasirox).....	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos particulares	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Peces y bioensayo.....	23
6.2 <i>A. hydrophila</i>	25
6.3 Reto infeccioso	26
6.4 Muestreo	26

6.5 Determinación de hierro por espectrofotometría de absorción atómica.....	27
6.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	27
6.7 Diseño de oligos no específicos para PCR punto final	27
6.7.1 Amplificación de los genes.....	28
6.7.2 Clonación, secuenciación y diseño de oligonucleótidos específicos.....	28
6.8 Caracterización de los genes ferritina subunidad M y transferrina.....	29
6.8.1 Análisis bioinformático y análisis de la estructura	30
6.9 Perfil de expresión de transferrina, ferritina M y H.....	31
6.9.1 Análisis estadísticos.....	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Acumulación de hierro en tejidos	32
7.2 Caracterización de secuencia de ADNc completa de ferritina M y transferrina.....	33
7.2.1 Secuencia de ADNc de transferrina.....	33
7.3 Expresión génica de transferrina, ferritina M y H	44
7.3.1 Niveles de expresión basal de transferrina, ferritina M y H.....	44
7.3.2 Niveles de expresión de transferrina a las 24 y 96 horas post-tratamiento y reto infeccioso	46
7.3.3 Niveles de expresión de Ferritina M a las 24 y 96 horas post-tratamiento y reto infeccioso	47
7.3.4 Niveles de expresión de Ferritina H a las 24 y 96 horas post-tratamiento y reto infeccioso	49
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	60
10. LITERATURA CITADA.....	62
11. PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN	78

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Agentes etiológicos de las enfermedades bacterianas de importancia económica que afectan a los cultivos de peces marinos..	8
Tabla II. Secuencias de oligos utilizados en este estudio.....	30
Tabla III. Concentración de hierro de muestras de agua y tejidos expuestos a tratamientos control con hierro y quelante (promedio \pm DE) por espectrofotometría de absorción atómica.....	32
Tabla IV. Tabla de identidad de la secuencia de aminoácidos de transferrina de pargo amarillo (<i>L. argentiventris</i>) así como sus dominios con otras especies.....	34
Tabla V. Tabla de identidad de la secuencia de aminoácidos de ferritina M de pargo amarillo (<i>L. argentiventris</i>) así como sus dominios con otras especies.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pargo amarillo <i>Lutjanus argentiventris</i>	5
Figura 2. Distribución del pargo amarillo. a) Distribución del pargo amarillo en México, b) Mapa de los manglares del oeste del Golfo de California.....	6
Figura 3. Vías de captación de hierro en peces.	11
Figura 4. Principales órganos involucrados en el sistema inmune de peces	16
Figura 5. Amonabactinas: cuatro sideróforos bis-catecolatos producidos por <i>Aeromonas</i>	20
Figura 6. Estructura química del deferasirox.....	21
Figura 7. Distribución de pargo amarillo en los tanques para su aclimatación.....	24
Figura 8. Esquema del montaje de tanques para el bioensayo.....	24
Figura 9. Tarjas experimentales con capacidad de 70 L.....	25
Figura 10. Inyección intraperitoneal de <i>A. hydrophila</i> a juveniles de pargo amarillo.	26
Figura 11. Programa de PCR utilizado en el termociclador.....	28
Figura 12. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de transferrinas de peces conocidos, humano y ratón.	35
Figura 13. Estructura terciaria de la transferrina de pargo amarillo.....	36
Figura 14. Análisis filogenético de transferrina de pargo amarillo.	37
Figura 15. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de <i>LaFerrM</i>	39
Figura 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la subunidad M de ferritinas de peces conocidos, humano y ratón.....	41
Figura 17. Estructura terciaria de la ferritina M de pargo amarillo.....	42
Figura 18. Análisis filogenético de ferritina M de pargo amarillo	43
Figura 19. Expresión basal de organismos de pargo amarillo sanos no tratados de: a) transferrina b) ferritina M y c) ferritina H.....	45
Figura 20. Expresión de transferrina determinada por RT-qPCR en a) hígado, b) intestino, c) branquias y d) piel de juveniles de pargo amarillo expuestos a una concentración de hierro 2X, a una deficiencia de hierro y una infección con <i>A. hydrophila</i>	47
Figura 21. Expresión de ferritina M determinada por RT-qPCR en a) hígado, b) intestino, c) branquias y d) piel de juveniles de pargo amarillo expuestos a una concentración de hierro 2X, a una deficiencia de hierro y una infección con <i>A. hydrophila</i>	49
Figura 22. Expresión de ferritina H determinada por RT-qPCR en a) hígado, b) intestino, c) branquias y d) piel de juveniles de pargo amarillo expuestos a una concentración de hierro 2X, a una deficiencia de hierro y una infección con <i>A. hydrophila</i>	51

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNp: Ácido desoxirribonucleico plasmídico.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de alimentos y agricultura de las Naciones Unidas).

IPNV: Infectious Pancreatic Necrosis Virus (Virus de la necrosis pancreática infecciosa).

VSHV: Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (Virus de la septicemia hemorrágica viral).

NHI: Infectious Haematopoietic Necrosis (Necrosis hematopoyética infecciosa).

SVCV: Spring Viraemia of Carp Virus (Virus de la viremia primaveral de la Carpa)

CCV: Channel Catfish Virus (Virus de Bagre de Canal)

DMT1: Divalent Metal Transporter 1 (Transportador de metal divalente 1)

LIP: Labile Iron Pool (Piscina de hierro lábil)

IRE: Iron Response Element (Elemento de respuesta al hierro).

IRP: Iron Response Proteins (Proteínas de respuesta al hierro).

UTR: Untranslated Region (Regiones no traducidas).

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ORF: Open Reading Frame (Marco de lectura abierto).

ICM: Intermediate Cell Mass (Masa celular intermedia).

MHC: Major Histocompatibility Complex (Complejo mayor de histocompatibilidad).

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino).

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

EST: Expressed Sequence Tag (Marcador de secuencia expresada).

RT-qPCR: Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real).

RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends (Amplificación rápida de los extremos de ADNc).

UPM: Universal Primer Mix (Oligo universal mix)

NUP: Nested Universal Primer (Oligo universal anidado)

IBRS: Iron Binding Region Signature (Región distintiva de unión a hierro).

DFX: Desferasirox

EF-1 α : Elongation Factor alpha (Factor de elongación alfa).

SSH: Suppression Subtractive Hybridization (Hibridación sustractiva por supresión).

LB: Luria Bertani medium (Medio de cultivo Bertani).

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

°C: Grados Celsius

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

mL: Mililitro

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es considerada actualmente como una actividad de gran relevancia, ya que aporta cerca del 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a alimentación (Magallón, 2007). Su importancia se ha ido incrementando a nivel mundial con tasas de crecimiento que superan el 10% anual y una producción que alcanza los 60 millones de toneladas al año (Magallón, 2007). En este escenario, México se encuentra entre los primeros países en producción acuícola de América, y se identifica como un país con gran potencial de desarrollo acuícola debido al clima, recursos naturales y especies nativas con potencial de cultivo (Avilés, 2006). Particularmente el noroeste de México es la región más importante del país por su productividad acuícola y pesquera, ya que cerca de 65% de la producción nacional proviene de esta zona (Avilés, 2006). Sin embargo, el sector acuícola mexicano y mundial se enfrenta a diversos factores ambientales que afectan su producción y por lo tanto su economía. Uno de estos problemas es la interacción entre peces y patógenos, especialmente patógenos bacterianos que ocasionan enfermedades, altas mortalidades y pérdidas en producción y dinero (Elvitigala *et al.*, 2013). Debido a este problema, uno de los retos de la acuicultura es realizar investigaciones científicas sobre los patógenos potenciales para los diferentes cultivos de peces, así como el desarrollo de nuevas vacunas para utilizarse como prevención ante las enfermedades causadas por estos patógenos. Actualmente se tienen bases de conocimiento sobre algunos aspectos relacionados con la inmunidad en peces. Se conoce que en etapas larvales y juveniles del pez no se ha desarrollado una defensa inmunitaria específica (inmunidad adaptativa) y no puede ser vacunado. Pero, con el fin de resistir a los patógenos, las larvas y los juveniles desarrollaron mecanismos no específicos (inmunidad innata) para la protección contra patógenos, que pueden apoyarse de la microbiota en el intestino (competencia entre microorganismos benéficos y patógenos) (Vadstein *et al.*, 2013). Recientemente, los estudios moleculares en especies marinas han adquirido gran interés debido al desarrollo de tecnologías con la posibilidad de obtener una gran cantidad de información genética sobre los

mecanismos y los genes candidatos implicados en respuestas inmunes (Rhee *et al.*, 2012). Lo anterior ha permitido la caracterización molecular de genes implicados en la defensa del hospedero que podrían ser utilizados para evaluar su asociación con la susceptibilidad o resistencia contra patógenos entre ellos los implicados en el metabolismo del hierro en peces marinos (Chávez-Mardones *et al.*, 2013).

El hierro es un elemento que es requerido para el crecimiento y supervivencia de muchos organismos, desempeña un papel indispensable en diversos procesos fisiológicos, como la fotosíntesis, la fijación de nitrógeno, la metanogénesis, la producción y el consumo de hidrógeno, la respiración, el ciclo del ácido tricloroacético, el transporte de oxígeno y la biosíntesis de ADN (Ong *et al.*, 2006). Sin embargo, el hierro libre acumulado en la célula es tóxico cuando éste se encuentra en exceso ya que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden dañar estructuras celulares (Kohgo *et al.*, 2008). Por lo tanto, los organismos cuentan con un mecanismo de regulación del hierro mediante su absorción en el intestino para prevenir tanto la deficiencia como el potencial tóxico de este elemento (Liu *et al.*, 2010). Ésta sensible regulación es llevada a cabo mediante la interacción de varios genes, entre ellos los codificantes para las proteínas ferritina y transferrina (Aisen *et al.*, 1980).

La ferritina es una proteína de 450 kDa de tamaño molecular y desempeña la función de almacenamiento de hierro para que éste pueda ser reutilizado biológicamente (Andrews, 2010). Estructuralmente esta proteína consta de 24 subunidades (Harrison *et al.*, 1996) las cuales le confieren la capacidad de almacenar hasta 4500 átomos por molécula (Theil, 1990). En mamíferos existen dos tipos de subunidades llamadas H (“heavy” por su inicial en inglés) y L (“light” por su inicial en inglés) con una masa molecular de 21 y 19 kDa, respectivamente, que son transcritas por diferentes genes y son ensambladas para formar heteropolímeros en diversas proporciones (Santambrogio *et al.*, 1993). Estas subunidades desempeñan diferentes funciones: la subunidad H posee un centro

ferroxidasa el cual se encarga de la oxidación del Fe (II), mientras que la subunidad L facilita la nucleación del hierro lo que proporciona varios residuos cargados negativamente en la superficie interior de la ferritina (Hu *et al.*, 2010). En peces, se ha identificado una nueva subunidad del complejo ferritina llamada M (“Middle” por su inicial en inglés) que está codificada por un gen distinto y posee sitios activos característicos tanto de la subunidad H como de la L (Zheng *et al.*, 2010).

Por otra parte, la transferrina es una proteína que también desempeña un papel crucial en el metabolismo del hierro, mediante la unión y el transporte de hierro (Crichton *et al.*, 1987). Esta proteína está compuesta por una cadena única de polipéptido de 80 kDa de tamaño molecular y contiene dos dominios, donde cada dominio representa un sitio de fijación del hierro (Yang *et al.*, 1984).

Además del papel de estos genes en la regulación del hierro circundante, se ha encontrado que están involucrados en el sistema inmune en peces (Neves *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Wei *et al.* (2009) utilizando corvina amarilla (*Pseudosciaena crocea*) estimuladas con *Vibrio anguillarum*, se encontraron por lo menos 39 genes involucrados en el sistema inmune, entre ellos transferrina y la subunidad H de ferritina. Lo anterior es interesante porque durante una infección bacteriana, el patógeno activa respuestas con el fin de secuestrar el hierro en circulación para poder crecer y desarrollarse (Bullen *et al.*, 1978). Todos los microorganismos incluyendo bacterias comensales y patógenas producen sistemas biosintéticos y de transporte para captar el hierro de sus medios, incluyendo el de sus hospederos como plantas y animales (Pi *et al.*, 2012).

En este sentido, los peces de la familia Lutjanidae, comúnmente conocidos como pargos, son un recurso pesquero de gran importancia en el Golfo de California, principalmente a lo largo de la costa sureste de Baja California Sur (Rodríguez *et al.* 1994). En la bahía de La Paz el pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*), tiene gran importancia económica en pesquerías ya que se tienen registros de

producción de cerca de 8 toneladas por año (Ramírez, 1996) y su carne es de alta calidad. Por otro lado, el pargo amarillo al igual que otros peces, son susceptibles a enfermedades bacterianas en el medio marino, el problema se convierte más importante cuando los peces son sometidos a prácticas de cultivo intenso (Trust, 1986). Las infecciones bacterianas se asocian a menudo con una sobrecarga de hierro, la cual estimula el crecimiento de los patógenos intracelulares mediante la reducción de citoquinas y la inhibición de la función fagocítica (Walker y Walker, 2000), afectando el equilibrio entre los linfocitos T colaboradores y citotóxicos, y modificando así la respuesta proliferativa (Cunningham *et al.*, 2000). Sin embargo, se cuenta con muy poca información acerca de la respuesta inmune a nivel transcripcional de pargo amarillo, además existen pocas secuencias registradas en bases de datos de esta especie.

Por lo tanto el objetivo general de este trabajo de tesis fue caracterizar molecularmente los genes que codifican para las proteínas transferrina y ferritina M y cuantificar los niveles de expresión génica de ferritina subunidades H y M, así como transferrina, de juveniles de pargo amarillo (*L. argentiventris*) expuestas a una sobrecarga o deficiencia de hierro y retadas con *Aeromonas hydrophila*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*)

El pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) (figura 1), son peces depredadores con hábitos de alimentación variable. Todos son carnívoros, se alimentan principalmente de peces y crustáceos bentónicos, por ejemplo, decápodos, cefalópodos y gasterópodos (Allen, 1987; Sierra *et al.*, 1994). Es conocido que esta especie también se alimenta de algas, esponjas y sálpidos (Díaz, 1994; Sierra *et al.*, 1994).

Esta especie puede alcanzar a medir arriba de 1 metro de longitud, pesar 10 kg, alcanzar su madurez después de los 3 años y puede vivir arriba de 19 años (Martinez-Andrade, 2003).

Taxonomía de *L. argentiventris*

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Lutjanidae

Género: *Lutjanus*

Especie: *L. argentiventris*

Sala *et al.*, (2003) reportan agregaciones de individuos grávidos cerca de Mayo y Junio, y que su tiempo de desove es principalmente al anochecer.



Figura 1. Pargo amarillo *Lutjanus argentiventris*. (Foto tomada en el laboratorio húmedo de CIBNOR, La Paz).

2.1.1 Distribución e importancia comercial del pargo amarillo (*L. argentiventris*)

La familia de peces Lutjanidae, comúnmente llamados pargos, son un recurso pesquero de gran importancia en el Golfo de California, principalmente a lo largo del suroeste de la costa de Baja California Sur (Rodríguez *et al.*, 1994) y está distribuido desde el Golfo de California hasta Perú (Figura 2a). En bahía de La Paz el pargo amarillo es una especie importante en pesquerías, ya que alcanza una producción cerca de las 8 toneladas por año (Ramírez, 1996). La carne de esta especie tiene una alta calidad y es vendida fresca o congelada (Berdegué 1956, Fischer *et al.* 1995). *L. argentiventris* es una especie demersal, donde los adultos habitan en arrecifes rocosos y coralinos o en cuevas entre rocas (Figura 2b). Los juveniles viven principalmente en manglares, en pequeñas agregaciones (Fischer *et al.*, 1995, Thomson *et al.*, 2000). Además esta especie es de fácil adaptación al cautiverio, lo cual la hace una especie candidata para la acuicultura.



Figura 2. Distribución del pargo amarillo. a) Distribución del pargo amarillo en México, b) Mapa de los manglares del oeste del Golfo de California (manglares rocosos en azul, arenosos en color naranja) Fuente: DataMares. InteractiveResource. (<http://dx.doi.org/10.13022/M3F30F>).

2.2 Enfermedades en acuicultura de peces

La contribución de la acuicultura a la producción mundial de alimentos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas y actualmente este sector aporta la mitad del total de peces y mariscos de consumo humano (FAO, 2010). Sin embargo, la intensificación de las operaciones de cultivo en el sector acuícola ha llevado a pérdidas económicas, debidas principalmente a enfermedades infecciosas, en particular durante las etapas de producción temprana (Kiron, 2011). Algunos peces silvestres pueden aportar algunos agentes infecciosos, los cuales pueden entrar en granjas de acuicultura a través de la ingesta de agua, alimentación o reproductores infectados (Saksida *et al.*, 2014).

Los patógenos bacterianos de mayor importancia en peces, con una excepción, son Gram negativos, como *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *Yersinia ruckeri* y *Edwardsiella ictaluri*; y además *Renibacterium salmoninarum* que es una bacteria Gram positiva (Trust, 1986).

A. hydrophila es una bacteria con amplia distribución en ambientes acuáticos y estuarinos y es una habitante normal del tracto intestinal de especies silvestres de agua dulce (Popovic *et al.*, 2000). Las cepas de esta bacteria son reconocidas como patógenas no solo de peces sino también de varios vertebrados y en humano. Estos patógenos han sido asociados con varias condiciones clínicas como infecciones de heridas, septicemia aguda y enfermedades diarréicas (Cumberbatch *et al.*, 1979; Ketover *et al.*, 1973).

Los principales agentes etiológicos de enfermedades bacterianas de importancia económica que afectan a cultivos de peces marinos son enlistados en la Tabla I.

Tabla I. Agentes etiológicos de las enfermedades bacterianas de importancia económica que afectan a los cultivos de peces marinos. (Toranzo *et al.*, 2005).

Agente	Enfermedad	Principal hospedero marino
Gram negativa		
<i>Vibrio anguillarum</i>	Vibriosis	Salmónidos, rodaballo, lubina, lubina rayada, anguila, bacalao, besugo
<i>Vibrio ordalii</i>	Vibriosis	Salmónidos
<i>Vibrio salmonicida</i>	Vibriosis	Salmón atlántico, bacalao
<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibriosis	Anguilas
<i>Vibrio viscosus</i>	"Úlcera de invierno"	Salmón atlántico
<i>Pasteurella piscicida</i>	Photobacteriosis	Dorada, lubina, lenguado, lubina rayada, jurel
<i>Pasteurella skyensis</i>	Pasteurellosis	Salmón atlántico
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Furunculosis	Salmónidos, rodaballo
<i>Flexibacter maritimus</i>	Flexibacteriosis	Rodaballo, salmónidos, lenguado, lubina, dorada, besugo
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Pseudomonadiosis "Enfermedad de invierno"	Dorada, anguila, rodaballo
Gram positiva		
<i>Enterococcus seriolicida</i>	Streptococcosis	Jurel, anguila
<i>Streptococcus iniae</i>	Streptococcosis	Jurel, lenguado, lubina, perca gigante
<i>Streptococcus parauberis</i>	Streptococcosis	rodaballo
<i>Streptococcus phocae</i>	Streptococcosis BKD	Salmón atlántico
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	"enfermedad bacteriana de riñón"	Salmónidos
<i>Mycobacterium marinum</i>	Mycobacteriosis	Lubina, rodaballo
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Piscirickettsiosis	Salmónidos

Se han descrito muchos virus diferentes, algunos de ellos con gran importancia económica en acuicultura. Esta lista contiene un birnavirus: el virus de la necrosis pancreática infecciosa ("IPNV" por sus siglas en inglés) (Dobos *et al.*, 1976), tres

rabdovirus: virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV), el virus de la necrosis hematopoyética (NHI) y el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) (Hill *et al.*, 1975); y un herpesvirus: el virus de bagre de canal (CCV) (Pilcher *et al.*, 1980).

Los signos clínicos (externos e internos) causados por cada patógeno microbiano son dependientes de la especie hospedadora, la edad del pez y el estado de la enfermedad (agudo, crónico). Sin embargo, en algunos casos, no existe una correlación entre signos internos y externos. Por ejemplo, la pasteurellosis y psirickettsiosis son enfermedades sistemáticas con altas tasas de mortalidad que causan signos internos en el pez afectado, pero ellos presentan a menudo una apariencia externa saludable (Toranzo *et al.*, 2005).

Los agentes patogénicos descritos en sistemas de cultivo están usualmente presentes en poblaciones de peces silvestres. Sin embargo, en ambientes naturales, estos agentes rara vez causan mortalidades debido a la falta de condiciones estresantes que están presentes usualmente en cultivo de peces (Toranzo *et al.*, 2005).

El uso de agentes terapéuticos (desinfectantes, antibióticos, etc.) en el sector acuícola es una práctica común para la eliminación de patógenos, sin embargo, tienden a hacer poco efectivos, costosos y dañinos para el medio ambiente (Subasinghe, 1997). Además, en el caso de antibióticos, los patógenos que están siendo tratados tienden a desarrollar mecanismos de resistencia (Verschuere *et al.*, 2000). Por ello la tendencia actual va encaminada al desarrollo de medidas preventivas.

2.3 Metabolismo de hierro en peces

Los peces tienen dos rutas de adquisición del hierro, mediante la dieta y el agua (Bury *et al.*, 2003). El papel de las branquias o el intestino en la absorción de hierro está dominada por la química de este compuesto en el medio ambiente

natural. Los peces pueden secuestrar Fe de la columna de agua, y de manera similar a la situación en el intestino, Fe (II) es más biodisponible que el Fe (III) en las branquias (Bury *et al.*, 2012).

La absorción de hierro a través de las branquias es considerablemente menor que la absorción a través del intestino, lo que sugiere que este último es la vía predominante de la absorción de este elemento (Cooper *et al.*, 2006). Durante los períodos de baja ingesta dietética hierro el papel de las branquias para mantener la homeostasis hierro se hace más significativa. De hecho, Cooper y Bury (2007), infiere que la trucha arco iris podría potencialmente adquirir aproximadamente el 85% de su ingesta diaria recomendada de hierro a través de las branquias. Por lo tanto, las branquias juegan un papel complementario en la homeostasis del hierro y son capaces de obtener casi la totalidad de la ingesta de hierro requerida del agua si es necesario.

El hierro acuático atraviesan la capa de mucosa que cubre la superficie de las branquias donde ya sea por membrana férrico reductasa o agentes reductores extrínsecos de hierro (por ejemplo ascorbato), convierte el Fe (III) a Fe (II) y el Fe (II) es el sustrato para la Fe^{2+} / H^+ del transportador de metal divalente 1 (DMT1). Una vez dentro de la célula el hierro se almacena en la proteína ferritina o entra en la piscina de hierro lábil (LIP). La exportación de Fe (II) se produce a través de la ferroportina, que está vinculado a una llamada hefaestina unido a la membrana férrico oxidasa que convierte el Fe (II) de nuevo a Fe (III). El Fe (III) se une a la proteína transferrina y circula en el cuerpo (Bury *et al.*, 2012). En el intestino el hierro unido a mucinas atraviesa la capa de la mucosa; allí después del proceso de absorción es similar al que se da en branquia (Bury *et al.*, 2012). Estas dos vías de captación de hierro en peces son esquematizadas en la figura 3.

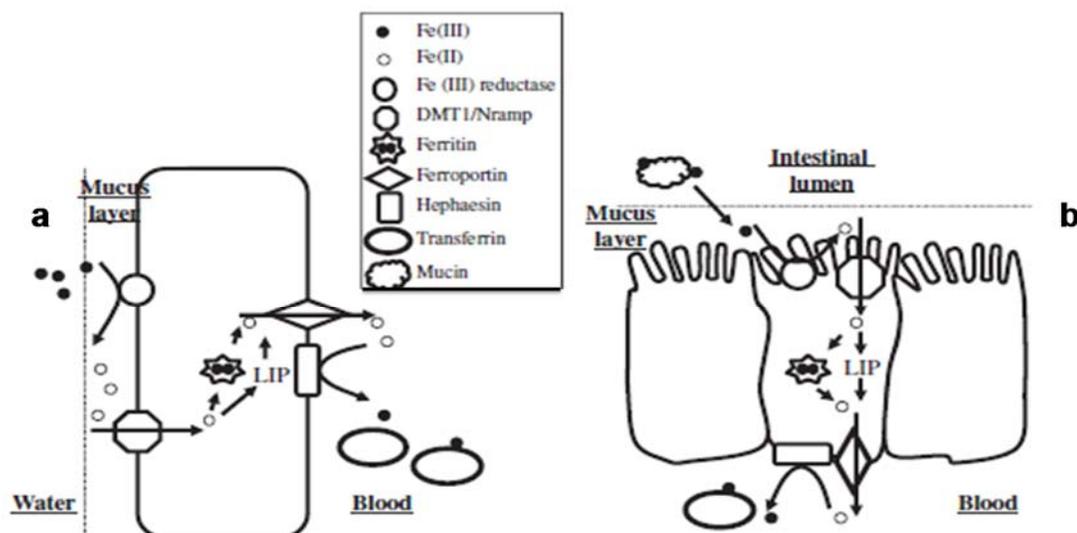


Figura 3. Vías de captación de hierro en peces. a) A través de la branquia, b) A través del intestino. Fuente: Bury *et al.*, (2012).

2.3.1 Transferrina

Las transferrinas son una superfamilia de proteínas fijadoras de hierro que tienen una función esencial en el transporte de hierro desde sitios de absorción y almacenamiento a células que requieren hierro y además son importantes en la regulación de los niveles de hierro en fluidos biológicos (Crichton *et al.*, 1987). En esta familia están incluidas: melanotransferrina, lactotransferrina, transferrina sérica y ovotransferrina (Anderson *et al.*, 2005). Las transferrinas son una sola cadena de polipéptidos de 70-80 kDa y consisten en dos lóbulos homólogos, que se cree han surgido por la duplicación de un dominio precursor (Park *et al.*, 1985), incrementando el número de sitios de unión a hierro y por tanto la funcionalidad de la proteína (Lambert *et al.*, 2005), cada uno contiene aproximadamente 335 aminoácidos, los cuales contienen un sitio único de fijación de hierro que es altamente conservado (Loer *et al.*, 1989).

La estructura, función, mecanismo de la captación, liberación y almacenamiento de hierro y control del gen de transferrina en mamíferos es un área ampliamente estudiada en las últimas décadas (Crichton *et al.*, 2002; Sawaya *et al.*, 1995; Browman *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1975). El estudio de este gen en peces

teleósteos es limitado únicamente en pocas especies de peces incluyendo los salmónidos (Kvinge *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996), cyprinidos (Sahoo *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010), y peciformes (Neves *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2008).

Por otra parte, además de que la transferrina es ampliamente conocida como una proteína de fijación de hierro, es también un componente del mecanismo de defensa no específico humoral (inmunidad innata). La asociación de la transferrina con el sistema inmune se deriva de su capacidad de restringir el hierro circundante, creando niveles bajos de hierro biodisponible y limitando el crecimiento y desarrollo de patógenos (García-Fernández *et al.*, 2011).

No obstante y a pesar de los estudios realizados, todavía hay una necesidad de comprender la relación entre el estrés celular y el nivel de la transcripción de genes que implica la respuesta inmune innata de los vertebrados marinos durante un proceso infeccioso y su relación con el hierro circundante o dietario.

2.3.2 Ferritina H y M

La ferritina es una proteína conservada evolutivamente que se encuentra en diversos organismos incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales (Halsey *et al.*, 2004; Hoeward *et al.*, 1999; Surykala *et al.*, 1999). La principal función de la ferritina es como proteína de almacenamiento de hierro celular, formando depósitos de hierro en una forma reutilizable y no tóxica biológicamente (Andrews, 2010). Estructuralmente, la ferritina es una proteína compleja que consiste de 24 subunidades y que pueden retener hasta 4000 átomos de hierro (Arosio *et al.*, 2009). La retención de hierro por la ferritina se inicia en un sitio llamado centro ferroxidasa de dihierro, donde el Fe (II) se oxida por el oxígeno molecular a Fe (III) (Levi *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 2003). La molécula de hierro ya oxidada, mueve la cavidad de ferritina, lo cual conlleva a la nucleación y mineralización del hierro, un proceso que conduce finalmente al almacenamiento de hierro (Arosio *et al.*, 2009).

Los niveles de ferritina en la célula son regulados tanto en la etapa de transcripción como de traducción por diferentes factores (Hentze *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 1996). La mayoría de las ferritinas tienen un elemento regulador de hierro (“IRE” por sus siglas en inglés Iron Responsive Element) en la región 5’ no traducida (“UTR” por sus siglas en inglés Untranslated Region), que sirve como un sitio de unión para las proteínas de respuesta de hierro (“IRP” por sus siglas en inglés Iron Responsive Proteins) que, al unirse a la región IRE, reprime la traducción de ferritina (Hentze *et al.*, 1989; Theil *et al.*, 2000).

La transcripción de ferritina puede ser modulada por diferentes factores externos, tales como la concentración de hierro, como en el estudio realizado por Wu *et al.* (2010) donde analizaron cuatro dietas diferentes de hierro: deficiente (0 mg/kg), óptima (65 mg/kg) y excesiva (1300 mg/kg and 6500 mg/kg); la infección de patógenos como *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* con una concentración de 5.0×10^5 CFUs ml⁻¹ (Neves *et al.*, 2009); o el estrés oxidativo inducido con FeCl₂, CuSO₄ y H₂O₂ con concentraciones de 20, 40 y 80 μM respectivamente (Zheng *et al.*, 2010).

Existen tres tipos de subunidades de ferritina, H, L y M, que han sido identificadas en vertebrados, de las cuales las subunidades H y L se encuentran en vertebrados superiores mientras que la subunidad M sólo ha sido identificada en vertebrados inferiores incluyendo peces (Andersen *et al.*, 1995; Giorgi *et al.*, 2008; Mignogna *et al.*, 2002). La subunidad H tiene un centro ferroxidasa que es responsable de la oxidación del hierro, mientras que la subunidad L contiene residuos cargados negativamente sobre la superficie de la cavidad que promueven el proceso de nucleación (Levi *et al.*, 1994; Santambrogio *et al.*, 1992). La subunidad M posee tanto el centro ferroxidasa como el centro de nucleación de hierro.

La subunidad H se ha caracterizado y analizado en diversas especies de peces como *Ictalurus punctatus* (Liu *et al.*, 2010b), *Dicentrarchus labrax* (Neves *et al.*, 2009) y *P. crocea* (Zhang *et al.*, 2010). Además, la subunidad M se ha identificado

y caracterizado en varios peces teleósteos, como *Cynoglossus semilaevis* (Wang *et al.*, 2011), *P. crocea* (Zhang *et al.*, 2010), *Sciaenops ocellatus* (Hu *et al.*, 2010), *Scophthalmus maximus* (Zheng *et al.*, 2010), y *Salmo salar* (Andersen *et al.*, 1995). Recientemente, se realizó un estudio en larvas de *L. argentiventris* (Reyes *et al.*, 2014), expuestas a diferentes concentraciones de hierro donde se midieron los niveles de expresión de ferritina subunidad H (*LaFerH*). En este estudio se observó un patrón claro de expresión, que dependía de las dosis administradas; donde el tratamiento con quelante (EXJADE deferasirox®) disminuyó significativamente los niveles de expresión de *LaFerH*. En cambio, los niveles de ARNm de *LaFerH* de larvas expuestas a los tratamientos Fe2x y Fe4x aumentaron significativamente. Adicionalmente, se caracterizó la secuencia completa de *LaFerH* (Número de acceso: KF873611) con una longitud de 1,231 pb, con un marco de lectura abierto de 534 pb (“ORF” por sus siglas en inglés Open Reading Frame), deduciendo una secuencia de aminoácidos de 177 residuos. Esta secuencia tiene una alta similitud con genes de la subunidad H de ferritina de otros peces, particularmente con *Lates calcarifer* (99%), *Takifugu rubripes* (97%) y *D. labrax* (97%).

2.4 Sistema inmune de peces

El sistema inmune de los peces es fisiológicamente similar a la de los vertebrados superiores, a diferencia que los peces son organismos de vida libre desde etapas embrionarias tempranas y dependen de su sistema inmune innato para la supervivencia (Rombout *et al.*, 2005). La inmunidad no específica es una defensa fundamental en los peces. Los teleósteos han sido descritos como modelos primitivos de la hematopoyesis. El primero órgano hematopoyético es llamado masa celular intermedia (“ICM” por sus siglas en inglés Intermediate Cell Mass). Con respecto al desarrollo de los órganos implicados en la respuesta inmune, la parte interior del riñón y el timo se considera estar completa antes de que ocurra la eclosión en la trucha arcoíris y el Salmón de Atlántico (Razquín *et al.*, 1990). Estos órganos no se han completado al final de la incubación de muchas especies

marinas, incluyendo la dorada (*Sparus aurata*) y el rodaballo (*S. maximus*) (Nakanishi, 1986). A pesar de estas diferencias, la secuencia de desarrollo de los principales órganos linfomieloides en teleósteos marinos es el siguiente: riñón, bazo y timo (Nakanishi, 1986) (Figura 4).

Los peces poseen poblaciones de células T, células B, células citotóxicas, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Por otra parte, los elasmobranquios y peces teleósteos son los grupos más primitivos que poseen el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y receptor de células T (Manning y Nakanishi, 1996).

El sistema inmune de peces y vertebrados superiores tienen la similitud de tener dos componentes integrales: 1) sistema inmune innato o natural formado por una serie de componentes celulares y humorales y 2) sistema inmune adaptativo, adquirido o específico, caracterizado por la respuesta inmune humoral mediante la producción de anticuerpos y por la respuesta celular, que está principalmente mediada por linfocitos T, capaces de reaccionar específicamente con antígenos (Gómez y Balcázar, 2007).

En los peces, la respuesta innata ha sido considerada como un componente esencial en la lucha contra los patógenos debido a las limitaciones del sistema inmune adaptativo, su naturaleza poiquilotérmica, su limitado repertorio de anticuerpos y la proliferación lenta, la maduración y la memoria de sus linfocitos (Whyte, 2007). Es dividida comúnmente en tres compartimentos: la barrera mucosa y epitelial, parámetros humorales y componentes celulares. La barrera mucosa y epitelial de branquia, piel y tracto digestivo son barreras importantes en peces, al ser expuestos constantemente a medios que contienen agentes potencialmente dañinos (Magnadottir, 2010). La mucosa de la piel y branquia actúan como la primera barrera de defensa a la infección (Ingram, 1980). La mucosa de peces contiene lectinas, pentraxinas, lisozimas, proteínas del complemento, péptidos antibacterianos y la inmunoglobulina M (IgM), que tienen una función importante en la inhibición de la entrada de patógenos (Saurabh y

Sahoo, 2008). Por otro lado, se han encontrado péptidos antimicrobianos en la mucosa, hígado y branquia de peces teleósteos (Birkemo *et al.*, 2003). Estos polipéptidos de bajo peso molecular son capaces de romper paredes bacterianas (Ellis, 2001). Otro proceso importante en animales poiquilotermos es la fagocitosis, donde las células principalmente involucradas son los neutrófilos y macrófagos (Secombes y Fletcher, 1992).

La respuesta inmunitaria específica se produce a través de mecanismos que implican una compleja red de células especializadas, proteínas, genes y mensajes bioquímicos que proveen los medios necesarios para que el organismo responda específicamente a antígenos (Uribe *et al.*, 2011).

En los últimos años, se han tenido avances grandes en la comprensión de la respuesta inmune de peces que ha beneficiado a la industria de la acuicultura, sin embargo, nuevos estudios de elementos del sistema inmune de peces seguirá contribuyendo en este sector para los nuevos problemas que se han suscitado debido a la variedad de patógenos.

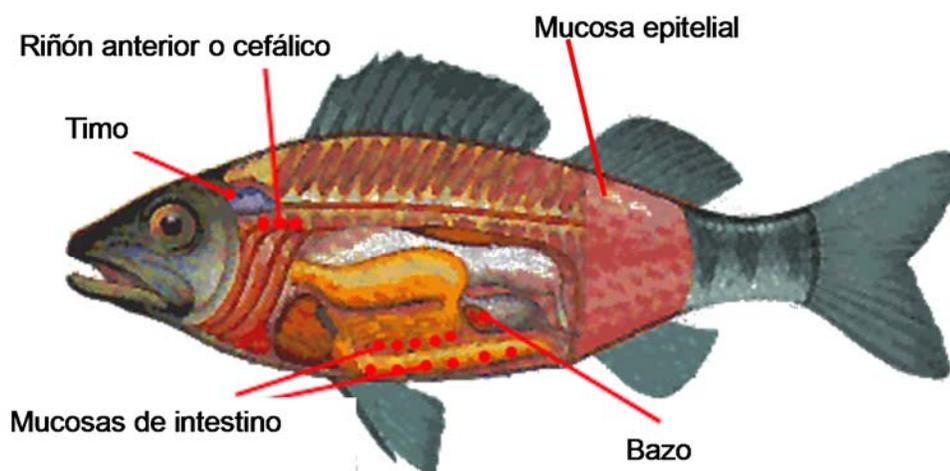


Figura 4. Principales órganos involucrados en el sistema inmune de peces. Fuente: Modificado de <http://www.revistaaquatic.com/>

2.5 Mecanismos de obtención de hierro por patógenos

La adquisición de hierro es reconocida como uno de los pasos importantes en el desarrollo de un agente patógeno en su hospedero. En este sentido se ha sugerido que la absorción de hierro podría ser un objetivo clave para el diseño de agentes quimioterapéuticos nuevos, y por lo tanto existen investigaciones llevándose a cabo para comprender las interrelaciones entre patógenos, hospedero y hierro (Ratledge *et al.*, 2000).

En ambientes aeróbicos, el hierro se encuentra principalmente oxidado de forma férrica Fe (III), que a pH 7, tiene una solubilidad de $1.4 \times 10^{-9} \text{M}$ (Chenault *et al.*, 1991). Sin embargo, esta concentración es muy baja y por tanto, los patógenos necesitan mecanismo específicos para la adquisición de hierro de su hospedero.

Los patógenos han desarrollado uno o más mecanismos para la obtención de hierro. Se han identificado dos categorías generales; la primera es el uso de los receptores que se puede unir ya sea a transferrina, lactoferrina o hemoglobina, y la segunda es mediante la producción de sideróforos que son moléculas de baja masa molecular que adquieren el hierro ya sea desde las proteínas del hospedero o de compuestos de hierro de bajo peso molecular. Los patógenos que se basan en la primera categoría generalmente tienen alta especificidad en la toma de hierro (Weinberg, 2008). Los sideróforos, que son agentes de unión a Fe (III); son producidos por muchos, más no todos los microorganismos en respuesta a una deficiencia de hierro. Los anaerobios, por ejemplo *Clostridium perfringens*, adquieren el hierro mediante la creación de su propio entorno microanaeróbico en un tejido hospedero, de modo que el hierro unido a las moléculas tales como transferrina o lactotransferrina se reduce a Fe (II) y su movilización es entonces ayudada por la acidificación simultánea del ambiente (Griffiths *et al.*, 1999). Los sideróforos también trabajan con sales férricas insolubles incluyendo hidróxido férrico, que es la manera mediante el cual los microorganismos productores de

sideróforos adquieren hierro a partir de un medio de crecimiento de laboratorio (Ratledge *et al.*, 2000).

Como resultado de sus diversos mecanismos para secuestrar el hierro, las bacterias oportunistas consiguen una concentración de hierro disponible mucho mayor. Debido a la función bioquímica central del hierro, su adquisición del ambiente del hospedero, es un determinante de virulencia bacteriana, y entonces, la inhibición de la toma de hierro puede combatir infecciones bacterianas (Weinberg, 2008).

Los sideróforos de bacterias Gram negativas son a menudo compuestos catecolato como enterobactina y su forma glicosilada (también llamado salmochelin) (Neilands, 1995).

Por otra parte, la replicación vírica requiere un aumento de la actividad metabólica celular para producir copias del genoma vírico y sintetizar las proteínas víricas, y estos procesos requieren hierro (Kowdley, 2000). Por tanto, los virus pueden multiplicarse más fácil ante células del hospedero sobrecargadas de hierro (Pietrangelo, 2009): algunos infectan de forma selectiva células que captan el hierro a través del receptor para transferrina, otros alteran la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis del hierro (Drakesmith y Prentice, 2008).

2.5.1 Mecanismo de obtención de hierro por *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila es una bacteria oportunista gram negativa, se reconocen como patógenos de varias especies de vertebrados y en el humano, se ha asociado con diversas condiciones clínicas, incluyendo septicemia y enfermedades diarreicas agudas (Ketover *et al.*, 1973). Varios factores de virulencia, incluyendo citotoxinas y enterotoxinas (Ljunh y Wadstrom, 1982; Yadav *et al.*, 1992) se han sugerido que participan en el proceso de infección. *A. hydrophila* se considera cada vez más un importante problema económico para la industria de la piscicultura (Austin y Austin, 1999).

La mayor parte de las cepas de *A. hydrophila* han demostrado que producen el sideróforo catecolato, ya sea amonabactina o enterobactina, pero no ambos. Las amonabactinas son tri- o tetrapéptidos de la secuencia Gly-L-Lys-L-Lys-D-aro, donde la glicina es un aminoácido opcional y aro puede ser un triptófano o una fenilalanina (Telford y Raymond, 1997). Dos grupos 2,2-dihidroxibenzoil están unidos mediante enlaces amida N al extremo C-terminal de la lisina y al extremo N-terminal de glicina o lisina (Figura 5). Estos restos catecol constituyen las funcionalidades quelantes de estos sideróforos (Stinzi *et al.*, 2000). La amonabactina se ha demostrado que adquiere el hierro desde el complejo de suero de los vertebrados Fe-transferrina y por lo tanto se puede considerar un factor de virulencia (Barghouthi, 1989). Massad *et al.* (1991) han presentado evidencia de una amonabactina mediada por la adquisición de hierro de la transferrina en el suero. Además encontraron que una cepa productora de amonabactinas creció en suero inactivado por calor, mientras que una cepa productora de enterobactinas no creció. Otros estudios han reportado que *A. hydrophila* es capaz de unirse a lactotransferrina y transferrina (Konopka y Neilands, 1984), lo que sugiere una posible adquisición hierro de estas moléculas por un mecanismo independiente de sideróforos.

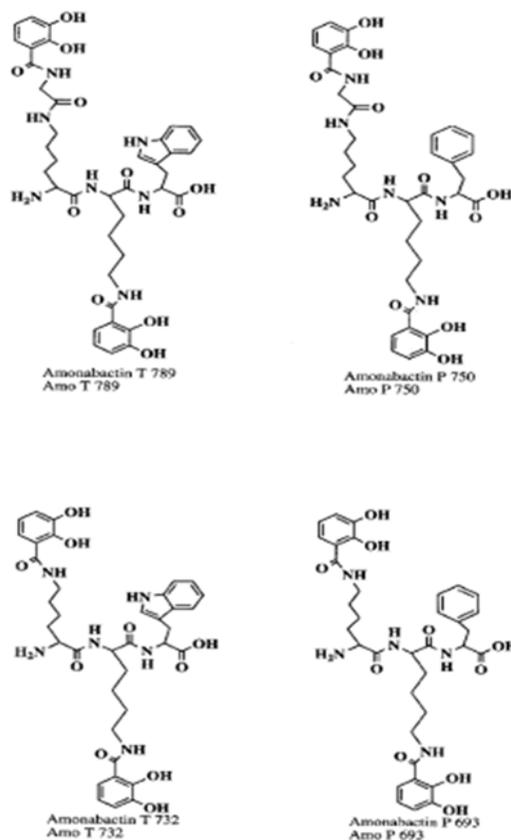


Figura 5. Amonabactinas: cuatro sideróforos bis-catecolatos producidos por *Aeromonas*. Fuente: Stinzi et al. (2000).

2.6 Quelante (Deferasirox)

El proceso de adquisición de hierro, que es crítico para el crecimiento de patógenos y su virulencia, representa una de las vías que puede ser dirigido con éxito por nuevas herramientas terapéuticas (Neres *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la restricción de hierro mejora el resultado de una serie de enfermedades infecciosas como la malaria (Mabeza *et al.*, 1999), tripanosomiasis (Arantes *et al.*, 2007), hepatitis C (Sartori *et al.*, 2001) e infecciones mycobacteriales (Douvas *et al.*, 1993). Aunque estos estudios han revelado que la privación del hierro puede ser una estrategia para inhibir la proliferación de patógenos, recae la necesidad para desarrollar nuevas moléculas quelantes de hierro que posean propiedades adecuadas (Fernandes *et al.*, 2010).

Deferasirox es un derivado de ácido benzoico bis-hidroxifenil-triazol (figura 6). El Deferasirox es un quelante activo por vía oral con una gran selectividad por el hierro. Es un quelante tridentado que moviliza los depósitos de hierro mediante la unión selectiva a la forma (Fe^{3+}) de hierro férrico (Stumpf *et al.*, 2007). Los quelantes tridentados requieren dos moléculas de ligando para unir un átomo de hierro. En humanos, la selectividad para el hierro es alta, con baja afinidad por metales traza, tales como zinc o cobre (Vanorden *et al.*, 2006).

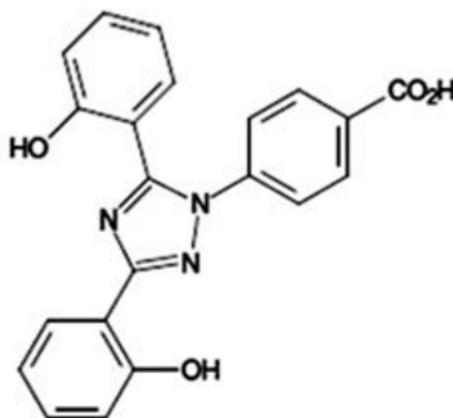


Figura 6. Estructura química del deferasirox. Fuente: Agarwal (2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Las altas mortalidades en producción de peces en acuicultura debidas a enfermedades por interacciones con patógenos es un problema desafiante que necesita ser resuelto. El estudio del sistema inmune en peces como mecanismo de defensa contra infecciones nos permite conocer la respuesta de estos contra algún patógeno. El pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) es una especie de importancia económica en México, que se ve afectada por enfermedades que son provocadas por patógenos principalmente del tipo bacterianos. Los trabajos hechos recientemente en teleósteos demuestran el papel tan importante que juega la regulación del metabolismo de hierro en la respuesta inmune mediante la restricción de hierro disponible para el crecimiento del patógeno. Por lo tanto, la caracterización y cuantificación de los niveles de expresión a nivel transcripcional de genes involucrados en el metabolismo del hierro nos servirá de estrategia para estudiar el sistema inmune de juveniles de pargo amarillo, expuestos a diferentes concentraciones de hierro y retadas con *Aeromonas hydrophila*.

4. HIPÓTESIS

Si el hierro biodisponible en diferentes especies de peces retadas con bacterias afecta su metabolismo y sistema inmune, entonces, en juveniles de pargo amarillo *L. argentiventris*:

- ❖ Se inducirá la expresión del gen codificante para ferritina después de una sobrecarga de hierro y una infección con *A. hydrophila*.
- ❖ Se inducirá la expresión del gen codificante para transferrina después de una deficiencia de hierro y se reprimirá su expresión tras la infección con *A. hydrophila*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente los genes que codifican para las proteínas transferrina y ferritina M y cuantificar los niveles de expresión génica de ferritina subunidades H y M, así como transferrina, de juveniles de pargo amarillo (*L. argentiventris*) expuestas a una sobrecarga o deficiencia de hierro y retadas con *A. hydrophila*.

5.2 Objetivos particulares

1. Clonar y caracterizar los genes de transferrina y ferritina M por la técnica de RACE.
2. Cuantificar los niveles de expresión génica de ferritina subunidades H y M, y transferrina de juveniles de pargo amarillo (*L. argentiventris*) expuestas a una deficiencia o sobrecarga de hierro y a *Aeromonas hydrophila*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Peces y bioensayo

Para este estudio se utilizaron 78 juveniles de pargo amarillo de un tamaño aproximado de 10 ± 5 gr. Los peces fueron obtenidos realizando dos salidas al campo además de la colocación de trampas sobre la ensenada de La Paz, B.C.S. Primeramente los juveniles de pargo amarillo se colocaron en dos tanques de 5000 L donde permanecieron por una semana para su aclimatación y verificar que estuvieran libres de patógenos (Figura 7). La temperatura del agua se mantuvo a 25° C, con una concentración de oxígeno disuelto de 4.3-6.9 mg/L, un pH de 7.7-8.1 y una salinidad del 35%. Posteriormente, para el experimento estos se distribuyeron en 18 tanques cilíndricos de 70 L con entradas independientes de agua de mar filtrada (Figura 9). Se tuvieron dos grupos, en el grupo 1, se

analizaron tres tratamientos por triplicado (4 organismos por tanque). 1.- agua de mar (grupo control), 2.- quelante de hierro comercial Exjade Desferasirox® a una concentración de 125 mg l⁻¹, y 3.- cloruro férrico (FeCl₃·6H₂O) a una concentración 6.8 µg l⁻¹ (Fe 2x respecto la concentración de hierro en el agua de mar) y en el grupo 2 se analizaron los mismos tratamientos más un reto infeccioso con *A. hydrophila* (Figura 8).

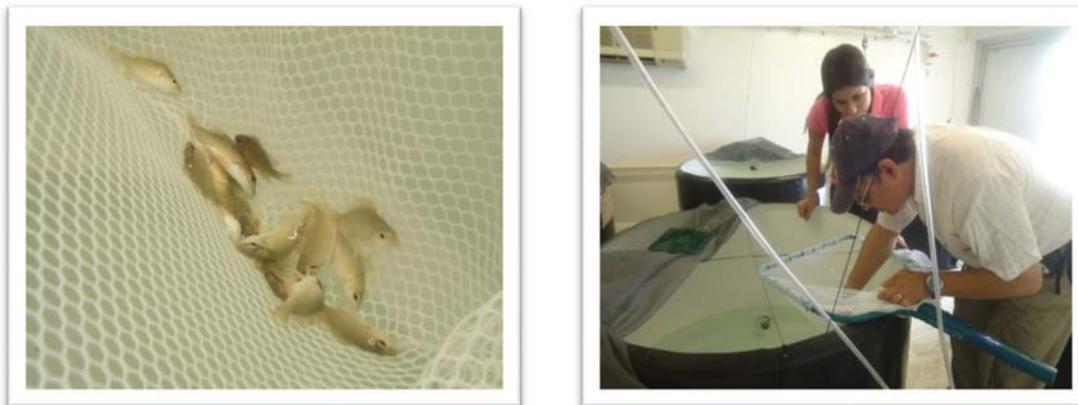


Figura 7. Distribución de pargo amarillo en los tanques para su aclimatación. Asesoría en identificación por el Dr. Juan Carlos Pérez Urbola, CIBNOR.

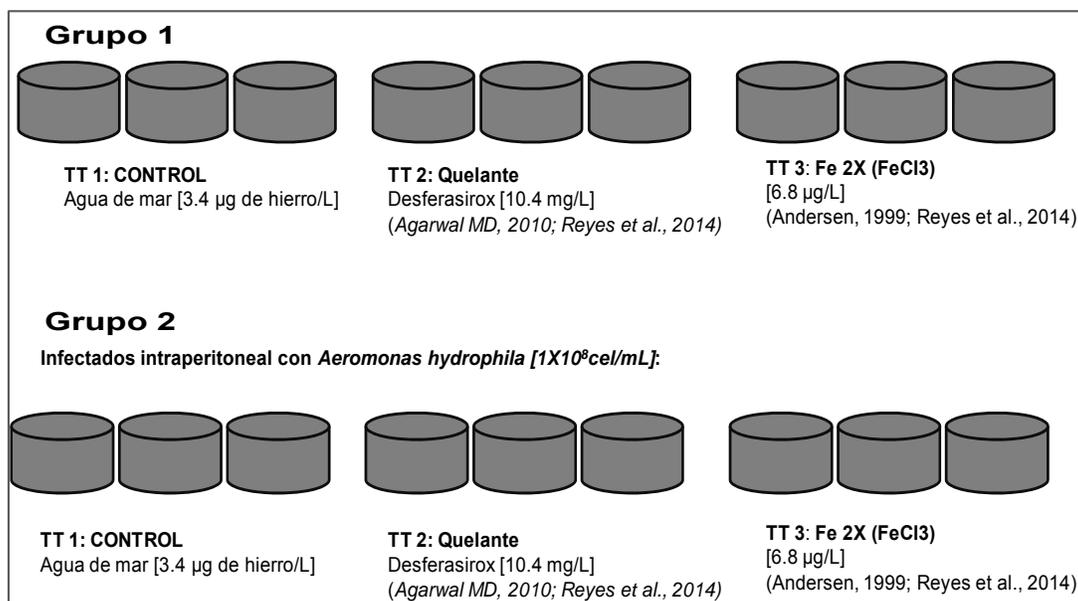


Figura 8. Esquema del montaje de tanques para el bioensayo. En cada tanque fueron colocados 4 peces los cuales fueron utilizados para el análisis de expresión génica diferencial. Además fueron colocados 3 peces más en un tanque con el tratamiento control sin infección para el análisis de expresión génica basal. Adicionalmente se distribuyó 1 pez más en un tanque de los tratamientos control, quelante y Fe2X para el análisis de espectrofotometría de absorción atómica.



Figura 9. Tarjas experimentales con capacidad de 70 L.

6.2 *Aeromonas hydrophila*

La bacteria *A. hydrophila* cepa Ah-315 usada en el presente estudio fue originalmente aislada de Salmón Atlántico infectado (*Salmo salar* L.) por el departamento de Microbiología Medica, de la Universidad de Lund, Suecia. Para su re-activación la cepa fue inyectada intraperitonealmente en pargo amarillo, siguiendo los Postulados de Koch. En resumen, la cepa fue re-activada en medio LB caldo y agar por estría cruzada. Posteriormente, la cepa fue identificada mediante un PCR de colonia, donde se amplificó una proteína de membrana con capacidad antigénica, la omp28 específica del género *Aeromonas*.

Se prepararon los inóculos bacterianos un día antes de realizar la infección experimental a los peces, se suspendió la biomasa obtenida en las placas con agar LB en 10 mL de PBS estéril (buffer salino de fosfatos), hasta ajustarla a una densidad óptica (DO)=1 ($\lambda=450\text{nm}$), que corresponde a una densidad de 1×10^9 células/mL.

6.3 Reto infeccioso

La infección experimental en los juveniles de pargo amarillo se realizó al mismo tiempo en que los tratamientos fueron añadidos al grupo dos. 100 μl de *A. hydrophila* la cual fue suspendida en PBS se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 1×10^8 células ml^{-1} por pez; el mismo volumen de PBS fue inyectado al grupo control (Figura 10).



Figura 10. Inyección intraperitoneal de *A. hydrophila* a juveniles de pargo amarillo.

6.4 Muestreo

Dos peces de cada tanque fueron muestreados a las 24 y 96 horas post-tratamiento-infección. Los peces fueron anestesiados con aceite de clavo en el agua. Se tomaron muestras de branquia, ojo, musculo, piel, intestino, cerebro, hígado, riñón cefálico y bazo e inmediatamente fueron colectados en TRIzol (Invitrogen) y guardados a -80°C para el análisis de expresión génica, mientras que peces no tratados (sanos) fueron usados para el análisis de expresión génica basal donde se tomó también muestras de mucus de piel, para esto se utilizó una espátula estéril tomando muestra de mucus lo más alejado del ano para no contaminar la muestra.

6.5 Determinación de hierro por espectrofotometría de absorción atómica

Las concentraciones de hierro en las muestras de agua (tiempo cero) y en tejidos (96 horas) se analizaron en mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (AVANTA; GBC Scientific Equipment, Dandenong, Australia) con una llama de aire de acetileno. Se utilizó material de referencia estándar certificado TORT-2 (Consejo de Investigación Nacional de Canadá, Ottawa) para comprobar la exactitud del instrumento. Los valores analíticos se encontraban dentro del rango de los valores certificados.

6.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se llevó a cabo la extracción de ARN total de las muestras almacenadas de tejidos de los juveniles de pargo amarillo mediante el uso del reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen EUA), la integridad de este se evaluó mediante la visualización en gel desnaturalizante de agarosa al 1.5% y se cuantificó su concentración mediante la lectura de su absorbancia ($\lambda=260$ y $\lambda=280$ nm) en un espectrofotómetro (Nanodrop N-1000 Spectrophotometer).

Posteriormente, para la cuantificación génica por PCR en tiempo real se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1 μ g de ARN de juveniles de pargo amarillo extraído mediante el kit de ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega, EUA).

6.7 Diseño de oligos no específicos para PCR punto final

Para el estudio génico primeramente se diseñaron oligonucleótidos o "primers" no específicos para los genes de ferritina subunidad M y transferrina a partir de secuencias de estos genes reportadas en la base de datos de organismos del suborden *percoidei*, del cual es perteneciente *L. argentiventris*, utilizando el programa bioinformático de Primer-BLAST, así como los programas OligoEvaluator™ (SIGMA-ALDRICH) y RNAfold WebServer para evaluar los parámetros de los oligos. Los oligos fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) (www.ibt.unam.mx/sintesis).

6.7.1 Amplificación de los genes

Una vez sintetizados y preparados a una concentración de 20 pm, se realizó la amplificación mediante PCR punto final de los genes de ferritina subunidad M y transferrina, para verificar que el ADNc sintetizado fuera óptimo y asegurarnos que estábamos trabajando con la secuencia deseada. Para la amplificación de los genes se utilizó el programa mostrado en la figura 11.

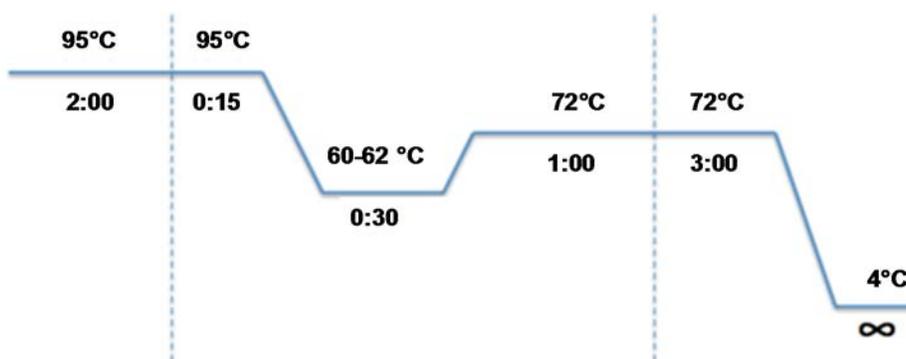


Figura 11. Programa de PCR utilizado en el termociclador.

6.7.2 Clonación, secuenciación y diseño de oligonucleótidos específicos

Los productos de PCR obtenidos fueron clonados, llevando a cabo la siguiente metodología: los productos obtenidos de transferrina y ferritina fueron ligados al vector plasmidico pGEM T-easy (Promega, EUA). Posteriormente se transformaron células químicamente competentes *E.coli*TOP10 mediante shock térmico. Las bacterias transformadas se sembraron en placas con medio agar LB con ampicilina (100µg/mL) y con X-gal (80 µg/mL). Se seleccionaron las clonas que posiblemente contenían el inserto y se realizó una PCR de colonia para la confirmación de las clonas transformadas exitosamente. Se extrajo el ADN plasmidico (ADNp), mediante el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA).

Finalmente el ADNp extraído fue enviado a secuenciar a GENEWIZ, Inc. (www.genewiz.com) para comprobar que las secuencias eran las esperadas, y al mismo tiempo poder diseñar los oligos específicos para PCR en tiempo real (RT-qPCR) y amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE, por sus siglas en ingles Rapid Amplification of cDNA Ends).

6.8 Caracterización de los genes ferritina subunidad M y transferrina

Para extraer la secuencia completa de cDNA de ferritina subunidad M y transferrina se utilizó la técnica RACE mediante el kit SMARTer™ RACE cDNA Amplification (Clontech Laboratories, Inc.) y la primer hebra de ADNc fue sintetizada usando el protocolo recomendado por el kit SMARTer™ RACE cDNA Amplification. En resumen, el extremo 5' fue amplificado usando el oligo específico TfRACE5' y el Oligo Universal A Mix (UPM, por sus siglas en inglés Universal Primer A Mix), seguido por una PCR anidada usando el oligo específico TfNes5' y el Oligo Universal Anidado A (NUP, por sus siglas en ingles Nested Universal A). Para el extremo 3', el ADNc fue amplificado por el oligo específico TfRACE3' y el oligo UPM. Las condiciones de PCR fueron: 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 67°C por 30 segundos y 72°C por 180 segundos, para finalizar con una extensión de 10 minutos. Los productos generados fueron purificados mediante Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega Co., USA), inmediatamente después, fueron ligados en el vector pGEM T-easy (Promega, EUA) mediante la enzima T4 ADN ligasa (Promega, EUA) y clonados en células químicamente competentes de *E.coli*TOP10. Se seleccionaron las clonas que posiblemente contenían el inserto y se realizó un PCR de colonia para la confirmación de las clonas transformadas exitosamente. Se extrajo el ADN plasmídico (ADNp), mediante el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA) y las muestras fueron enviadas para su secuenciación a GENEWIZ, Inc., para elucidar las secuencias completas de ferritina M y transferrina.

Tabla II. Secuencias de oligos utilizados en este estudio.

Gen	Nombre del oligo	Secuencia (5'-3')
Transferrina	TrfRACE3'	CCGCAACGAGCCTTACTATGACTAC
	TfrRACE5'	TGTCTGGTGCCATCTTTACAC
	TfrNes5'	GCCATCTTTACACAGCAGCTCGTAG
	TfqPCRfw	TGTGTCAGCTGTGCAAGG
	TfqPCRRv	TGTCTGGTGCCATCTTTACAC
Ferritina M	FerrMRACE3'	AGAACAAGAGAGGAGGACGCATC
	FerrMRACE5'	TTCACGTTCTTCTCCAGCTGCAG
	FerrMNes5'	GTTCTCCTTGAAGAAGTGGCTGAAGC
	FerrMqPCRfw	AGGCTTCAGCCACTTCTTC
	FerrMqPCRRv	CCTGGTTCACGTTCTTCTC
Ferritina H	FerrHqPCRfw	AGCGTGAACCAGTCCCTGCTG
	FerrHqPCRRv	GCGCAGGTTGGTCACCCAGT
Factor de elongación-1 α	EF-1 α PCRfw	GCTGTAAGGGGGCTCGGTGG
	EF-1 α PCRRv	CCCTGCTGGCCTTCACCCTC

6.8.1 Análisis bioinformático y análisis de la estructura

Las secuencias de nucleótidos obtenidas mediante la secuenciación se analizaron por identidad con otras secuencias conocidas utilizando el programa BLAST. Se tradujo la secuencia nucleotídica a aminoacídica mediante la herramienta Translate del programa ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos se realizó utilizando el programa ClustalW y el árbol filogenético fue construido mediante el programa MEGA 6.0 usando el método Neighbor-joining. La identificación de regiones conservadas se realizó mediante el programa PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) y el modelo 3D de la estructura secundaria por el programa Phyre2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>).

6.9 Perfil de expresión de transferrina, ferritina M y H

La primera hebra de ADNc sintetizada a partir de ARN extraído de los diferentes tejidos se utilizó como templado para detectar los niveles de expresión de transferrina, ferritina M y H mediante el análisis de PCR tiempo real (RT-qPCR).

El análisis de RT-qPCR se realizó con un equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Bio-Rad, y se utilizó el reactivo SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 10.0 μ l y contenía 5 μ l de SsoFast™ EvaGreen Supermix, 3 μ l de agua de grado biología molecular, 0.5 μ l de cada uno de los oligos a 10 pM tanto sentido como antisentido y 1 μ l de ADNc de las muestras a una concentración de 50 ng/ μ l. Las condiciones de reacción consistieron en los pasos: 95° C durante 30 s; seguido por 40 ciclos de 95° C durante 10 s, 60° C durante 10 s, y 72° C durante 10 s. Las muestras fueron comparadas con una curva estándar obtenida del 100-105% de eficiencia de amplificación. Todas las reacciones se realizaron por triplicado incluyendo un control negativo sin templado para asegurarnos que no hubiera contaminación. Los niveles de expresión relativos de ARNm de los genes blancos fueron normalizados con el gen endógeno más estable que fue el factor de elongación α (EF-1 α), el cual se analizó mediante el programa Cotton EST Database junto con los genes de 18s y β -actina.

Los resultados se obtuvieron mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001), y se expresaron como el cambio de expresión de la muestra de tratamiento respecto a la muestra control. Los valores mayores a 1 expresan un incremento con respecto al control y valores menores a 1, expresan una disminución en el gen.

6.9.1 Análisis estadísticos

Todos los bioensayos fueron realizados por triplicado y se desarrollaron tres replicas en todas las mediciones. Se obtuvo un promedio \pm la desviación estándar (DE) para cada grupo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el

análisis varianza de dos vías (ANOVA) donde fueron comparados, tiempo, tejido y tratamiento. La comparación de medias fue realizada por el análisis de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$. Todos los datos fueron analizados con el programa STATISTICA 10 (StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (Data analysis software system, versión 10).

7. RESULTADOS

7.1 Acumulación de hierro en tejidos

En la tabla III se muestra la concentración de hierro (Fe) en el agua de los diferentes tratamientos así como en los tejidos de hígado, intestino, branquia y piel analizados por espectrofotometría de absorción atómica. Estos datos no representan la toxicidad del metal. El hierro no fue detectado en el agua de mar ni con el tratamiento con quelante Exjade®.

Tabla III. Concentración de hierro de muestras de agua y tejidos expuestos a tratamientos control con hierro y quelante (promedio \pm DE) por espectrofotometría de absorción atómica.

Tratamientos	Agua (mg/ml) ^a	Hígado ^b	Tejidos (mg/kg)		
			Intestino ^b	Branquia ^b	Piel ^b
Control	ND	72.74 \pm 1.24	149.81 \pm 6.54	98.69 \pm 1.99	20.46 \pm 1.11
Fe2x	1.63 \pm 0.04	135.83 \pm 3.54	19.38 \pm 0.56	240.92 \pm 6.25	9.82 \pm 0.89
Exjade® Deferasirox	ND	110.93 \pm 1.89	50.41 \pm 1.21	63.47 \pm 3.77	8.17 \pm 0.78

ND: No detectado.

^a muestreo: 0 h post-tratamiento

^b muestreo: 96 h post-tratamiento.

7.2 Caracterización de secuencia de ADNc completa de ferritina M y transferrina

7.2.1 Secuencia de ADNc de transferrina

La secuencia de ADNc completa de transferrina de *L. argentiventris* (*LaTf*) obtenido mediante la técnica RACE fue depositada en Genbank con el número de acceso: KT254659, esta secuencia consta con una longitud total de 2,482 pares de bases (pb) y contiene un marco de lectura abierto (“ORF” por sus siglas en inglés Open Reading Frame) de 2,073 pb. La secuencia deducida de aminoácidos de transferrina de pargo amarillo consta de 690 residuos con una masa molecular calculada de 74.24 kDa y punto isoeléctrico (pI) de 5.58. La comparación de las secuencias de aminoácidos indicó la presencia de las características de la familia de la proteína transferrina, llamadas distintivos (“signatures”) 1, 2 y 3. Se encontró que *LaTf* fue altamente similar a las transferrinas de otros peces, como *Larimichthys crocea* (80%), *Pagrus major* (80%) y *D. labrax* (80%), y compartió menor identidad con el humano (47%) y ratón (48%) (Tabla IV).

Tabla IV. Tabla de identidad de la secuencia de aminoácidos de transferrina de pargo amarillo (*L. argentiventris*) así como sus dominios con otras especies.

	<i>L. argentiventris</i>		
	Cobertura (%)	Identidad (%)	No. de acceso
<i>Larimichthys crocea</i>	100	80	CAM96032.1
<i>Pagrus major</i>	100	80	AAP94279.1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	100	80	ACN80997.1
<i>Lates calcarifer</i>	97	80	AEZ51816.1
<i>Miichthys miiuy</i>	100	79	AFC68981.1
<i>Epinephelus coioides</i>	100	79	AEW43726.1
<i>Sparus aurata</i>	100	77	AEA41139.1
<i>Trachidermus fasciatus</i>	100	75	AEV21971.1
<i>Oreochromis niloticus</i>	97	73	ABB70391.1
<i>Monopterus albus</i>	97	73	AHA05992.1
<i>Oncorhynchus nerka</i>	99	69	BAA84096.1
<i>Trematomus bernacchii</i>	96	73	CAL92188.1
<i>Homo sapiens</i>	98	47	AAH59367.1
<i>Mus musculus</i>	96	48	AAL34533.1

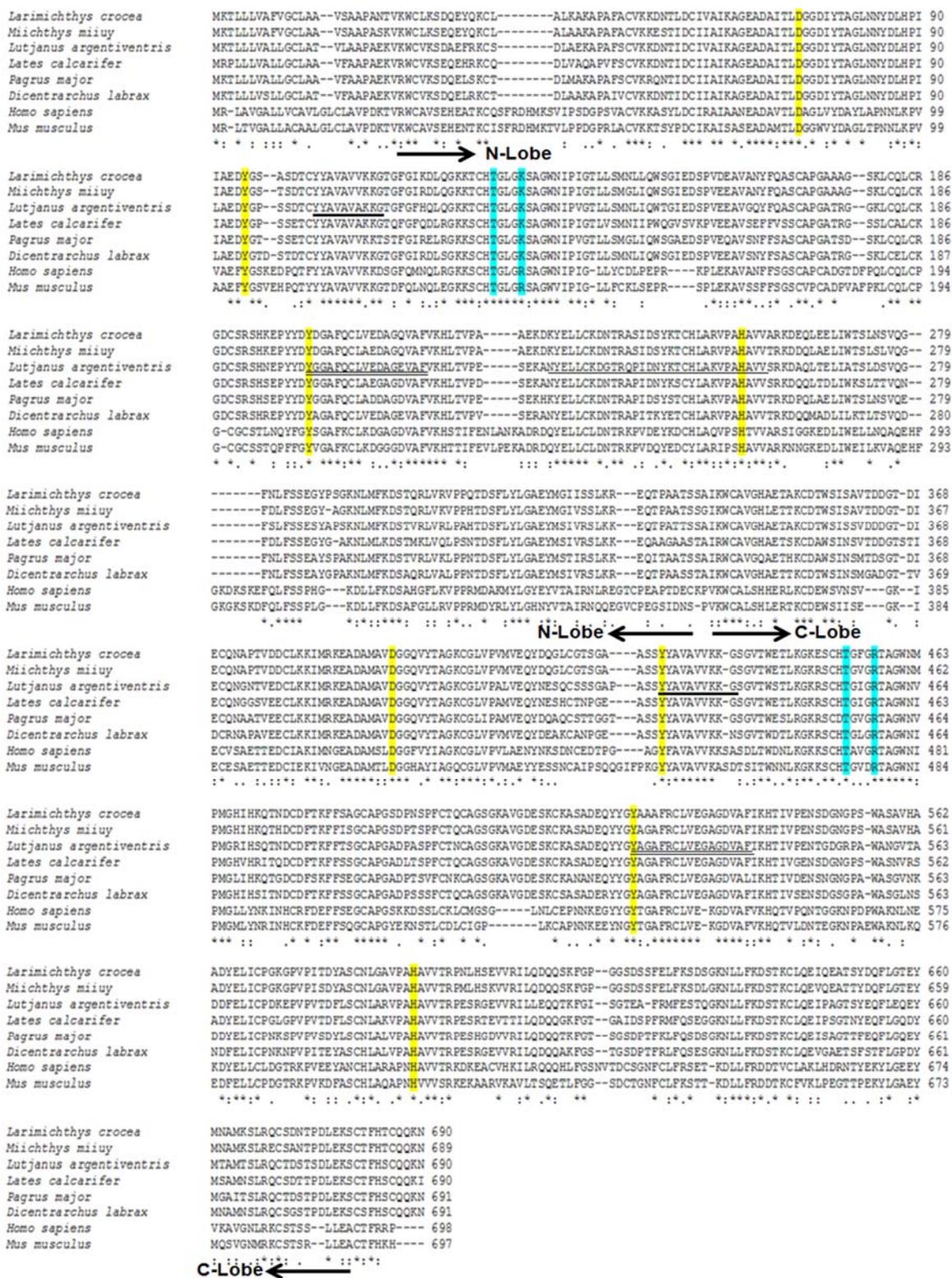


Figura 12. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de transferrinas de peces conocidos, humano y ratón. Los residuos similares se muestran en la última línea: Idéntico (*), fuerte (:), débil (.). La región de los lóbulos N y C, son indicadas con flechas. Los residuos de unión a hierro y

anión son marcados por cajas azules y amarillas, respectivamente. Las características de la familia de transferrinas se encuentran subrayadas como: distintivo o signatura 1, distintivo 2 y distintivo 3.

La proteína de *LaTf* deducida a partir de la secuencia de ADNC está compuesta de una péptido señal que va desde el aminoácido 1 al 18; además de dos lóbulos, el lóbulo N que consta del aminoácido 24 al 337, mientras que el lóbulo C va del aminoácido 340 al 680. Cada lóbulo contiene cuatro sitios de unión a hierro (Fe) (Asp-73, Tir-103, Tir-200, His-256, para lóbulo N y Asp-394, Tir-429, Tir-524, His-592 para el lóbulo C) y dos sitios de unión a anión (Thr- 128, Lys-132 en el lóbulo N y Thr-454, Arg-458 en el lóbulo C) los cuales fueron determinado mediante el programa PROSITE (figura 12).

La predicción de la estructura terciaria de *LaTf* reveló la presencia de 24 hélices en las regiones correspondientes a las posiciones de aminoácidos 11-17, 31-43, 55-63, 117-120, 136-145, 157-170, 179-184, 200-208, 219-221, 265-277, 312-326, 347-361, 376-384, 395-397, 443-446, 478-482, 494-499, 527-532, 543-550, 563-565, 601-615, 652-656, 658-669 y 675-688; mientras que se modelaron 94% de los residuos de aminoácidos de *LaTf* con un 100% de confianza según lo determinado por el programa Phyre2 (figura 13).

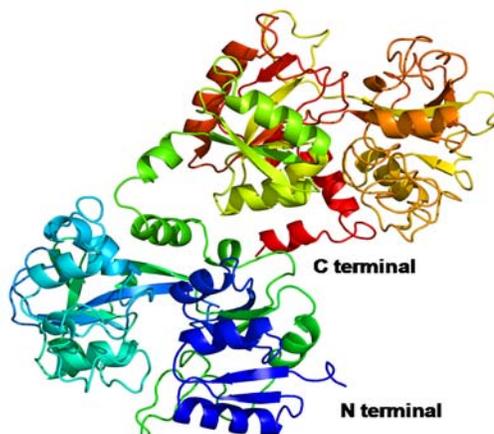


Figura 13. Estructura terciaria de la transferrina de pargo amarillo modelada mediante el programa Phyre2. Se utilizó un modelo basado en la proteína lactoferrina alcanzando una cobertura de 94%.

Además, fue construido un árbol filogenético basado en secuencias de aminoácidos de transferrinas de varios peces y mamíferos. *LaTf* fue genéticamente cercano a transferrina de *P. major* y *S. aurata* que se encuentran en la familia *sparidae* (Figura 14).

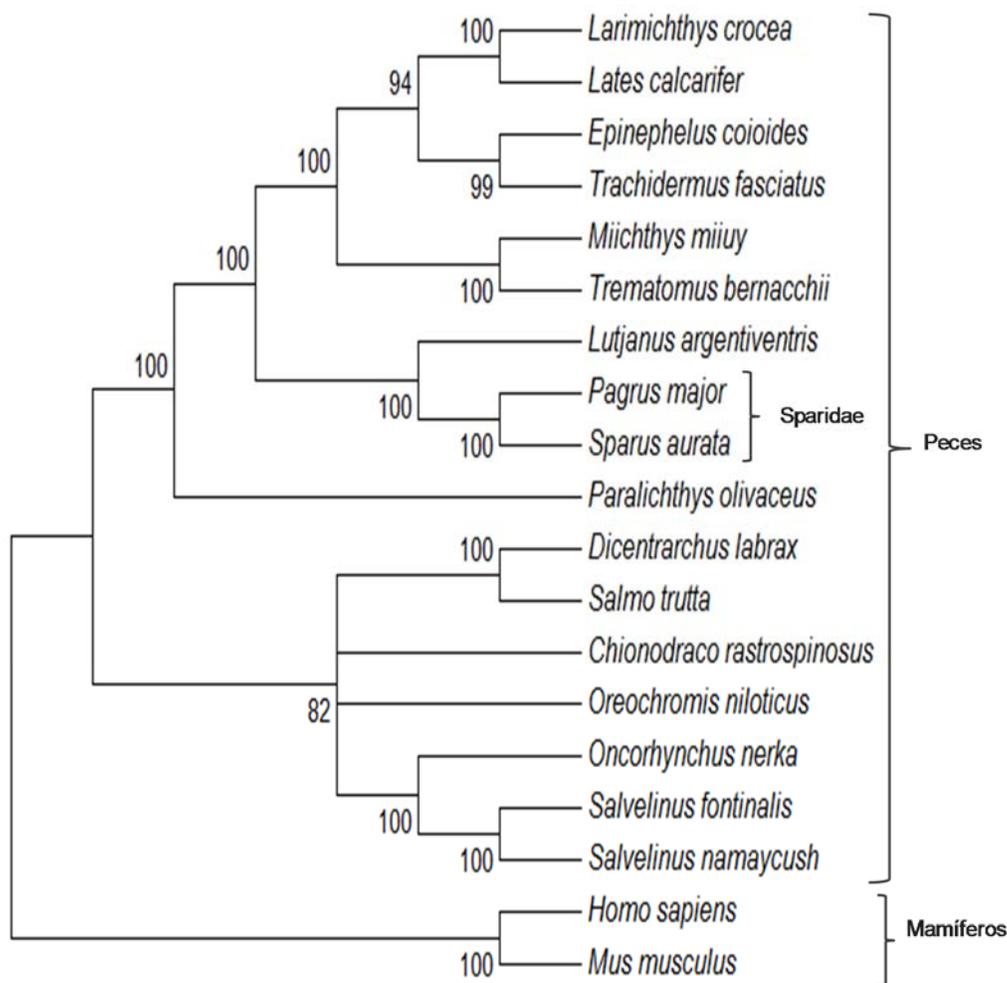


Figura 14. Análisis filogenético de transferrina de pargo amarillo. El árbol filogenético fue construido con base en el alineamiento múltiple de secuencia de aminoácidos generado en ClustalW usando el método de neighbour-joining en el programa MEGA 6. La estabilidad topológica de los árboles de neighbour-joining fue evaluada por 10,000 repeticiones de bootstrapping y el porcentaje de bootstrapping son indicados por números en los nodos.

7.2.2 Secuencia de cDNA de ferritina subunidad M

La secuencia de ADNc completa de ferritina M de *L. argentiventris* (*LaFerM*) obtenida mediante la técnica RACE fue depositada en Genbank con el número de acceso: KT727931. La secuencia de ADNc tiene una longitud de 1076 pb, en la cual la secuencia de codificación o marco de lectura abierta (“ORF” por sus siglas en inglés open reading frame) consta de 531 pb, mientras que las regiones no traducidas 5' y 3' (“UTR” por sus siglas en inglés Untranslated region) contienen 205 y 340 pb respectivamente. Se identificó dentro de la región UTR 5' un elemento regulador, el cual modula la expresión de ferritina en sobrecarga de hierro, llamado elemento de respuesta al hierro (“IRE” por sus siglas en inglés iron response element). La secuencia deducida de aminoácidos de *LaFerM* consta de 176 residuos con una masa molecular calculada de 20.5 kDa y punto isoeléctrico (pI) de 5.65. Además se identificaron dos regiones distintivas putativas de unión a hierro de la familia de las ferritinas (“IBRS” por sus siglas en inglés iron-binding region signatures); IBRS 1 que consta de la secuencia ⁵⁸EEREHAEKLLSFQNKRGGR⁷⁶ y IBRS 2 compuesto de la secuencia ¹²³DPHLCDFLETHYLDEQVEAIK¹⁴³ determinados mediante el programa PROSITE (figura 16). La comparación de las secuencias de aminoácidos indicó que *LaFerM* fue altamente similar a las transferrinas de otros peces, como *Oplegnathus fasciatus* (95%), *L. crocea* (94%) y *S. ocellatus* (94%), y compartió menor identidad con las subunidades H y L de humano (71 y 60%) y ratón (71 y 56% respectivamente) (Tabla V).

ACACCAGGGAAGAAAGCCTTGAGGAGTTCTTGCTTCAACAGTGTGTTGAACGGAACCTTCTTC
 CTTTCGTCCCGCCCTTATTTCTTCTGCTCTGCATTCCGGACAGACAAAAACCTTTTCTAC
 TTGAACACTACTGAAAAAAGTCGCCGTAAAGCTTTATTTTTGTACTGT TTTGT TAAGAA
 AAAGCACAAGAAACGCCAGC CAAAATGGAGTCCCAAGTGCCTCAGAACTACCACCGCGAC
 TGGAGGCCCGCCATCAACCGTATGGTCAACATGGAGCTGTTTGCTCCTACACCTACACT
 C E A A I N R M V N M **E** L F A S Y T **Y** T
 TCTATGGCCTTTTACTTCTCCGCGATGATGTGGCCCTCCAGGCTTCAGCCACTTCTTC
 S M A F Y F S R D D V A L P G F S H F F
 AAGGAGAACAGCCACGAGGAGAGGGAGCAGCGCCGAGAAGCTGCTGTCCTTCCAGAACAAG
 K **E** N S **H** **E** **E** R **E** **H** A E K L L S F Q N K
 AGAGGAGGACGCATCTTCCTCCAGGACATCAAGAAACCGGATCGTGATGAGTGGGGGAGC
R G G R I F L Q D I K K P D R D E W G S
 GGGCTGGAGGCCATGCAAGTGCAGTGCAGCTGGAGAAGAAGCTGAACCAGGCTTTGCTG
 G L E A M Q C A L Q L **E** K N V N Q A L L
 GACCTGCACAAGCTGGCCTCTGATCATGGAGACCCTCATCTGTGTGACTTCCTGGAGACC
D L H K L A S D H G D P H L C D F L E T
 CACTACCTGGACGAGCAGGTGGAGGCATCAAGAAGCTGGGCGACTACATTACCAACCTC
H Y L D E Q V E A I K K L G D Y I T N L
 ACCCGCATGGATGCCACACCAACAAGATGGCGGAGTACCTGTTGACAAGCACTCCCTG
 T R M D A H T N K M A E Y L F D K H S L
 GGAAGCAAGAGCTAAATGCAAAGTCCAGGATTAAGCCTGCGAGTGAAAAATTTAATGA
 G S K S -
 TACAGAAGCTTTTAAGTAAACACGCCCTTCTGCTCCAGCTGTTCACTCACTCAGCATCAT
 TTTATGTC TAATTTGCTTGGCCTGTAAAGTTGATCAGTTTTTCGTATGTTCTGGTGGCGTC
 ACTGTTTTTAAATGTCGTATAAAAGGTGATTAAATCAGGTTATGGCTTCGTCCTAATTACC
 TGTAAGCTTCCTCTGTGACATTTTAACAATGTGACTGAATGTTTTTGATCTGTTCTTA
 ATCTGAATAAATGTTTTGAGCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGT

Figura 15. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de *LaFerrM*. El elemento de respuesta al hierro (IRE) se encuentra sombreado en azul en la región UTR 5'. Las dos regiones distintivas putativas de unión a hierro (IBRS) están subrayadas. Los residuos de aminoácidos que constituyen el centro ferroxidasa en la subunidad H de mamíferos están sombreados en amarillo y los que forman el sitio de nucleación de hierro característico en la subunidad L de mamíferos se encuentran encerrados en rectángulos.

Tabla V. Tabla de identidad de la secuencia de aminoácidos de ferritina M de pargo amarillo (*L. argentiventris*) así como sus dominios con otras especies.

	<i>L. argentiventris</i>		
	Cobertura (%)	Identidad (%)	No. de acceso
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	99	95	BAM37460.1
<i>Larimichthys crocea</i>	100	94	NP_001290248.1
<i>Sciaenops ocellatus</i>	100	94	ADF80517.1
<i>Lates calcarifer</i>	100	94	ADU87112.1
<i>Epinephelus bruneus</i>	100	94	AEI87383.1
<i>Oryzias melastigma</i>	100	93	AEA30126.1
<i>Scophthalmus maximus</i>	100	91	ADI24354.1
<i>Anoplopoma fimbria</i>	100	90	ACQ57875.1
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	98	91	CAG02064.1
<i>Paralichthys olivaceus</i>	100	89	AKE47717.1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	95	93	CBM95498.1
<i>Homo sapiens</i> ferritina H	97	71	NP_002023
<i>Homo sapiens</i> ferritina L	97	60	NP_000137.2
<i>Mus musculus</i> ferritina H	97	71	NP_034369.1
<i>Mus musculus</i> ferritina L	97	56	AAB00809.1

El análisis bioinformático mediante el programa phyre2 reveló que *LaFerM* contiene características de las subunidades H y L de ferritina en mamíferos; debido a que se encontraron siete residuos de aminoácidos en las posiciones Glu-24, Tyr-31, Glu-58, Glu-59, His-62, Glu-104 y Gln-138, identificados como ligandos de metal en el centro ferroxidasa específico de la subunidad H de las ferritinas de mamíferos, al mismo tiempo se encontraron 4 residuos de aminoácidos en las posiciones E-54, H-57, E-58 y E-61 correspondientes a los sitios de nucleación de hierro en la subunidad L de mamíferos (figura 15 y 16).

La predicción de la estructura terciaria de *LaFerM* reveló la presencia de 5 hélices en las regiones correspondientes a las posiciones de aminoácidos 11-40, 45-72, 93-120, 124-154 y 159-171; mientras que se modelaron 98% de los residuos de aminoácidos de *LaFerM* con un 100% de confianza según lo determinado por el programa Phyre2 (figura 17).

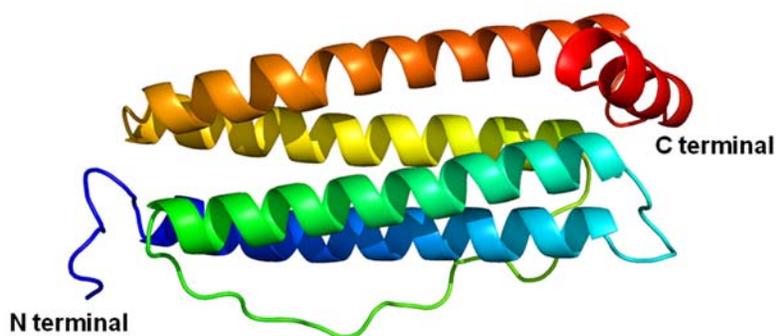


Figura 17. Estructura terciaria de la ferritina M de pargo amarillo modelada mediante el programa Phyre2. Se utilizó un modelo basado en la proteína ferritina alcanzando una cobertura de 98%.

El análisis filogenético de *LaFerM* basado en las secuencias de aminoácidos de las subunidades de ferritina de varios peces y mamíferos dio como resultado la construcción de un árbol indicando tres grupos principales: subunidades de ferritina M, H y L. (figura 18).

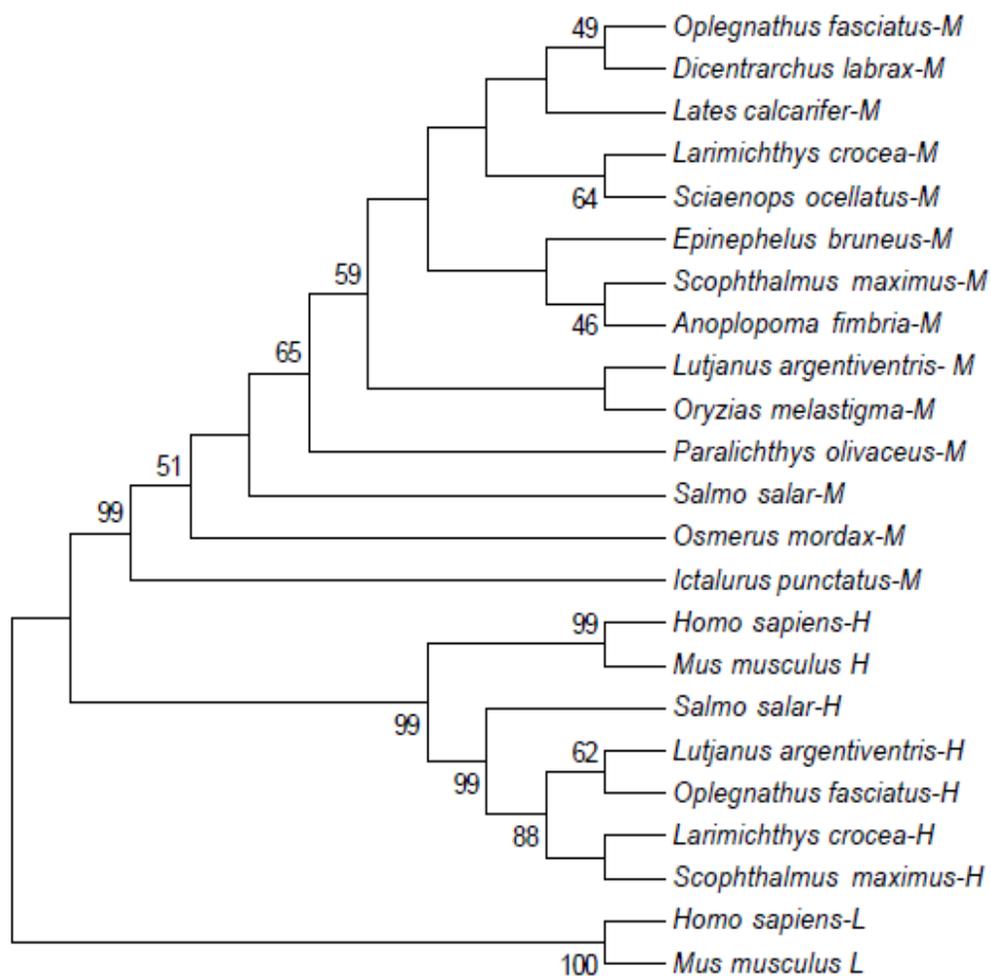


Figura 18. Análisis filogenético de ferritina M de pargo amarillo. El árbol filogenético fue construido con base en el alineamiento múltiple de secuencia de aminoácidos generado en ClustalW usando el método de neighbour-joining en el programa MEGA 6. La estabilidad topológica de los árboles de neighbour-joining fue evaluada por 10,000 repeticiones de bootstrapping y el porcentaje de bootstrapping es indicado por números en los nodos.

7.3 Expresión génica de transferrina, ferritina M y H

7.3.1 Niveles de expresión basal de transferrina, ferritina M y H.

El perfil transcripcional de tejido específico de transferrina, ferritina H y M se determinó mediante RT-PCR de tiempo real utilizando diferentes tejidos de pargo amarillo sanos no tratados (figura 19). Los transcritos de ARNm de los tres genes fueron encontrados en todos los tejidos analizados.

Los niveles de expresión de transferrina y ferritina M fueron más altos en mucus, bazo y riñón cefálico; mientras que los niveles más bajos fueron encontrados en branquia y ojo (figura 19a y 19b). Por otro lado, los niveles más altos de expresión de transcritos de ferritina H se dieron en riñón cefálico, músculo y mucus; y los más bajos fueron encontrados en piel, hígado y ojo (figura 19c).

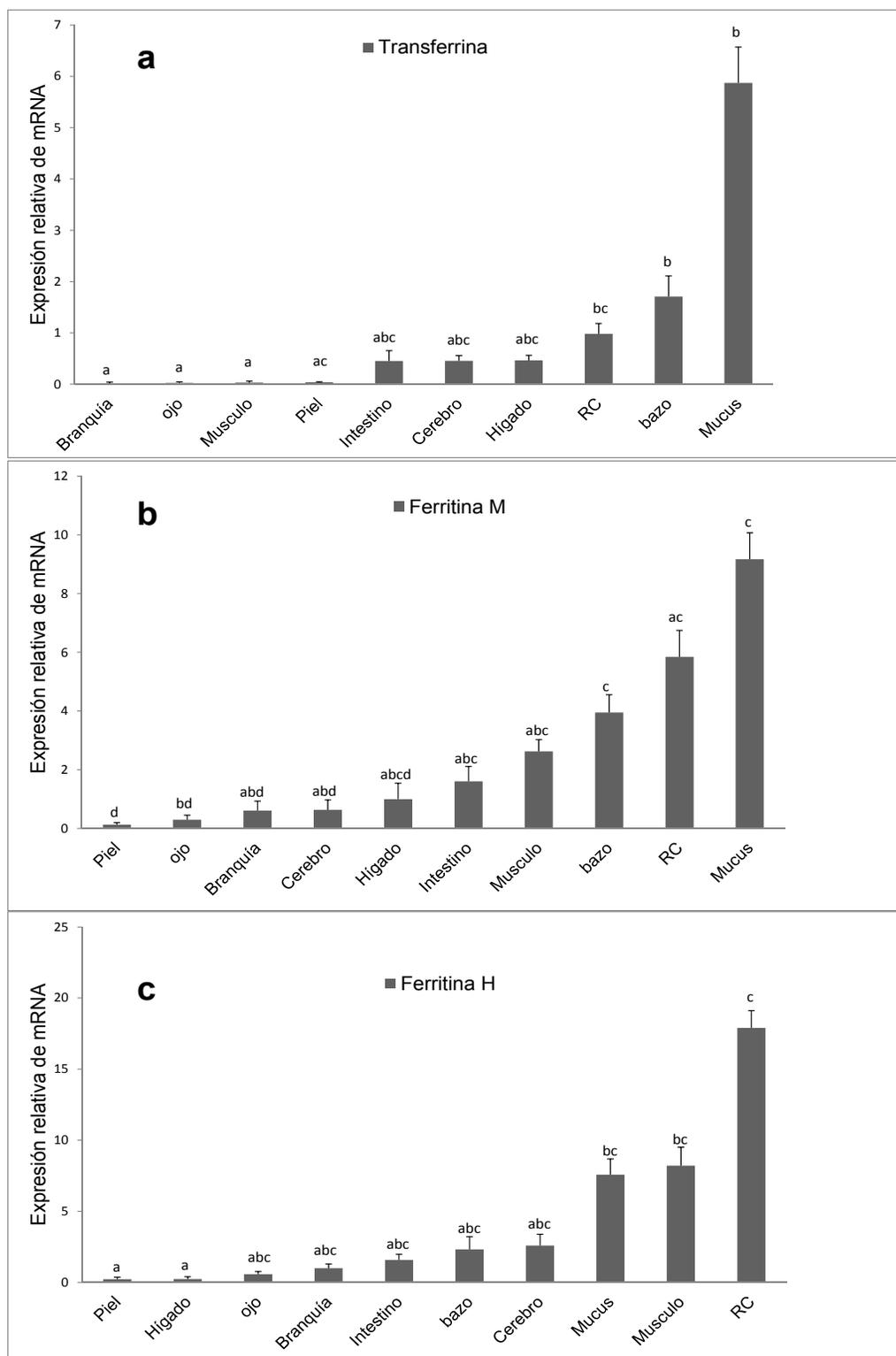


Figura 19. Expresión basal de organismos de pargo amarillo sanos no tratados de: a) transferrina b) ferritina M y c) ferritina H. RC: Riñón cefálico.

7.3.2 Niveles de expresión de transferrina a las 24 y 96 horas post-tratamiento y reto infeccioso

Los niveles de expresión relativa de ARNm de transferrina (*LaTf*) fueron determinados en los diferentes tejidos a las 24 y 96 h post-tratamiento con deferasirox (DFX) y hierro 2x en hígado aumentaron significativamente en peces que fueron expuestos al tratamiento quelante-no infectados, respecto a los peces expuestos al mismo tratamiento y también a una infección con *A. hydrophila* (quelante-infectados), esto sucedió tanto a las 24 como a las 96 horas (figura 20a). Se observó de igual manera un aumento en la expresión de transferrina a las 96 horas en intestino y piel de peces quelante-no infectados (figura 20b y 20d). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a las 24 horas en ambos tejidos. Además, se observó que en estos tres tejidos disminuyeron significativamente los niveles de expresión de *LaTf* en peces con el tratamiento quelante- infectados a las 96 horas y en hígado también a las 24 horas. Mientras que en branquia en el tratamiento quelante-infectados a las 24 horas, se observó un incremento significativo, sin embargo, a las 96 horas no hubo diferencias significativas (figura 20c). Además, se observaron diferencias significativas respecto al tiempo en branquia, se encontró una disminución en la expresión de transferrina a las 96 horas respecto a las 24 horas en el tratamiento quelante-infectados, pero no así en los demás tejidos.

En el tratamiento Fe2x no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los cuatro tejidos. Sin embargo, en hígado e intestino se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo, observando una disminución en los niveles de expresión de transferrina en peces Fe2X- infectados. Es decir, a las 96 horas se observó una supresión del gen respecto a su expresión a las 24 horas.

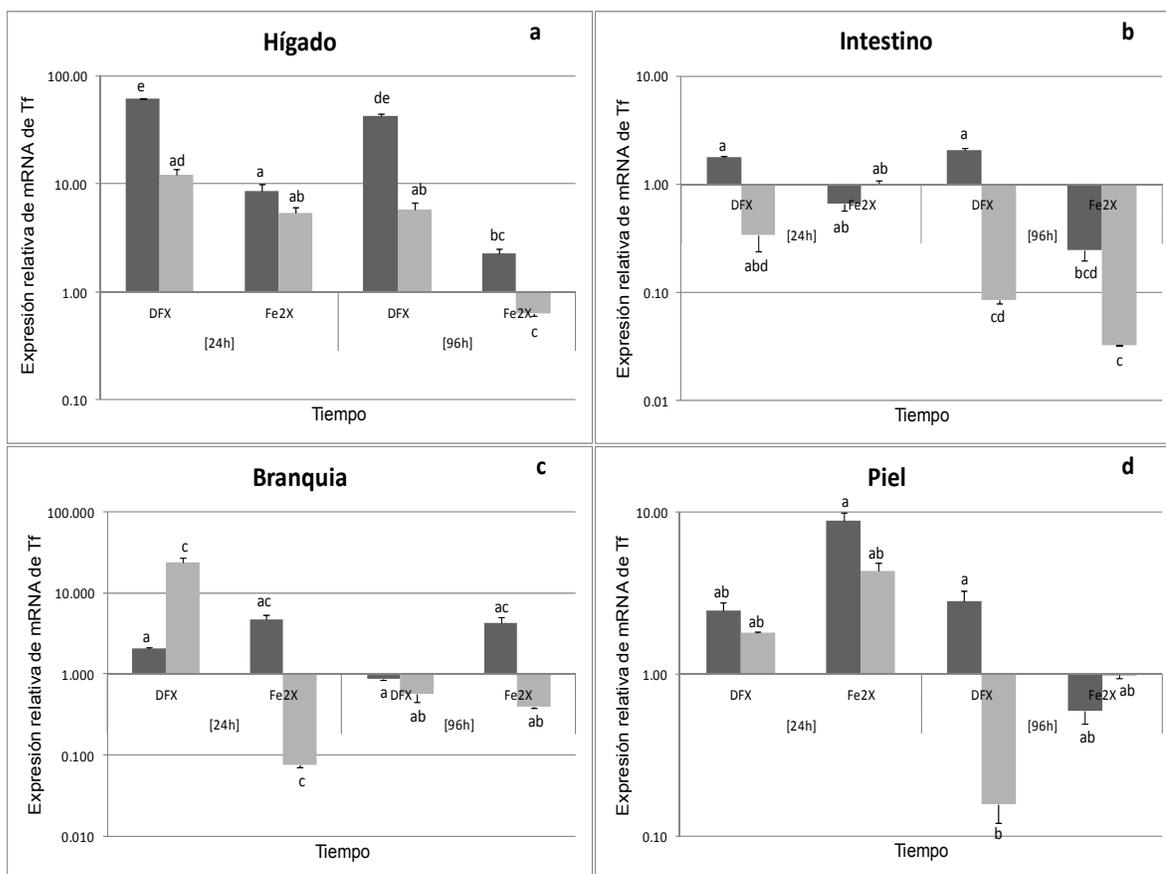


Figura 20. Expresión de transferrina determinada por RT-qPCR en a) hígado, b) intestino, c) branquias y d) piel de juveniles de pargo amarillo expuestos a una concentración de hierro 2X, a una deficiencia de hierro y una infección con *A. hydrophila*. Las barras de color gris oscuro muestran los peces no infectados, mientras que las barras gris claro muestran los peces con infección. Los datos se muestran como la media de la expresión génica relativa en relación con la expresión del gen control endógeno EF-1 α . Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) unas de otras. La barra de error representa el error estándar.

7.3.3 Niveles de expresión de Ferritina M a las 24 y 96 horas post-tratamiento y reto infeccioso

Los niveles de expresión de ARNm de ferritina M (*LaFerM*) aumentaron significativamente en hígado, intestino y piel en peces que fueron expuestos al tratamiento quelante-no infectados al tiempo de 96 horas, mientras que en peces quelante-infectados en este mismo tiempo, la expresión se ve disminuida significativamente en los tres tejidos. Sin embargo, en branquia de peces con el tratamiento quelante-no infectados, no se encontraron cambios en los niveles de

expresión de *LaFerM*, pero si se observó un claro aumento significativo en peces expuestos a quelante e infección al tiempo de 96 horas.

En el tratamiento Fe2x, se observó una disminución significativa de los niveles de expresión de ferritina M tanto en hígado como en intestino al tiempo de 24 horas post-tratamiento en peces no infectados, mientras que en peces expuestos a Fe2X-infectados se encontró que en hígado la expresión de este gen se ve aumentada (figura 21a), mientras que en intestino se observó una disminución mayor que en los peces no infectados a las 24 horas (figura 21b); por otra parte, en piel y branquias no se encontraron diferencias significativas en este tratamiento y tiempo (figura 21c y 21d).

Al tiempo de 96 horas en el tratamiento Fe2x, los niveles de expresión de *LaFerM* aumentaron significativamente en hígado en peces no infectados, mientras que, su expresión se vio disminuida en los peces infectados. Sin embargo, en branquia se observó un patrón contrario, encontrando una disminución significativa en peces no infectados y una sobreexpresión en peces infectados. En piel e intestino no se observaron diferencias significativas.

Además, en hígado e intestino, se observaron incrementos significativos en la expresión de *LaFerM* en el tratamiento con quelante-no infectados; así mismo, en el tratamiento Fe2x-no infectados se observó un incremento significativo de expresión de ferritina M en hígado y una disminución significativa en peces infectados, por el contrario, en branquias se observó una disminución significativa en la expresión de este gen en peces no infectados y un aumento en peces con infección.

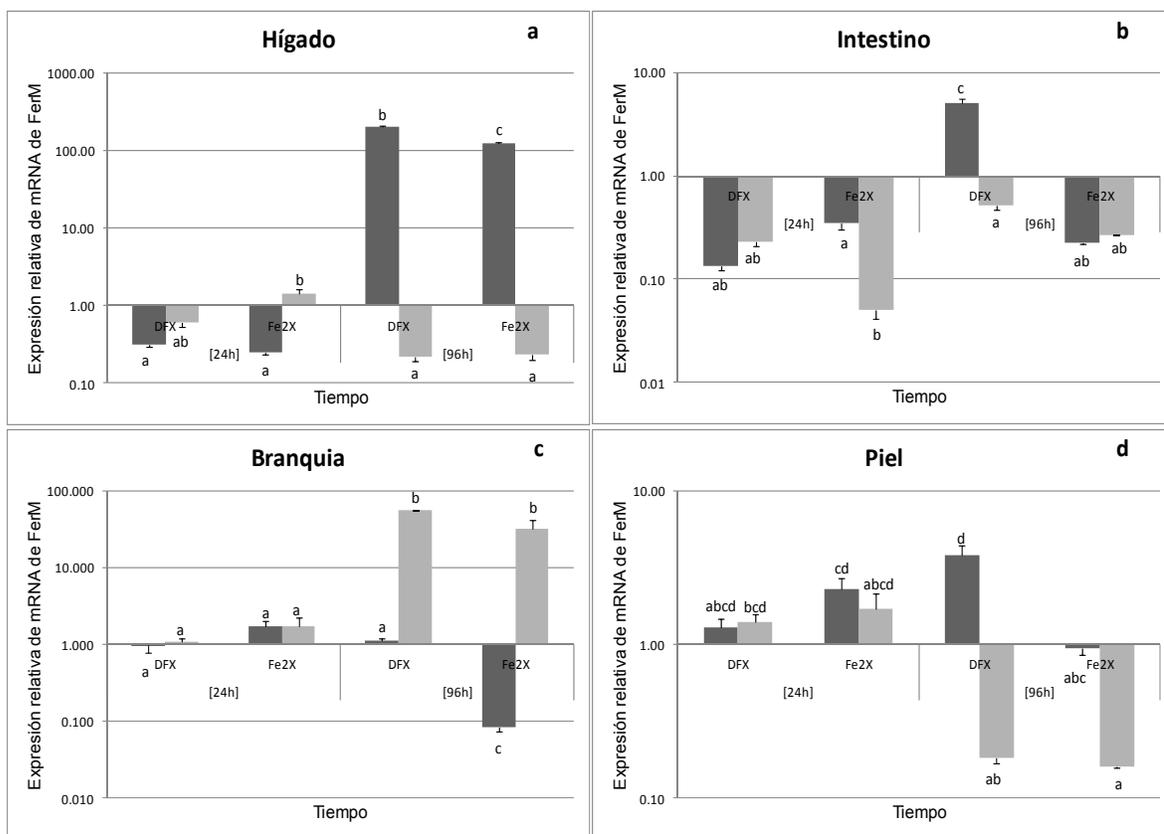


Figura 21. Expresión de ferritina M determinada por RT-qPCR en a) hígado, b) intestino, c) branquias y d) piel de juveniles de pargo amarillo expuestos a una concentración de hierro 2X, a una deficiencia de hierro y una infección con *A. hydrophila*. Las barras gris oscuro muestran los peces no infectados, mientras que las barras gris claro muestran los peces con infección. Los datos se muestran como la media de la expresión génica relativa en relación con la expresión del gen control endógeno EF-1 α . Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) unas de otras. La barra de error representa el error estándar.

7.3.4 Niveles de expresión de Ferritina H a las 24 y 96 horas post-tratamiento y reto infeccioso

Los niveles de expresión relativa de ARNm de ferritina H en el tratamiento con quelante-no infectados aumentaron significativamente en hígado, mientras que se observó una supresión en este gen en peces con infección en el tiempo de 96 horas (figura 22a). No se encontraron diferencias significativas en este tratamiento y ningún tiempo en los otros 3 tejidos analizados.

En el tratamiento Fe₂x al tiempo de 24 horas se observó en hígado e intestino una disminución significativa de la expresión de ferritina H tanto en peces infectados como en los que no fueron infectados; sin embargo, a las 96 horas en este mismo tratamiento, pero solamente en hígado, se encontró un aumento significativo en peces no infectados y una supresión en los peces con infección. En piel y branquias no hubo diferencias significativas en ningún tiempo. En branquia en peces expuesto al tratamiento Fe₂X, se encontró una supresión de ferritina H en los que no fueron infectados y un aumento de su expresión en los que si se llevó a cabo la infección (figura 22c y 22d).

Respecto al tiempo, en hígado con el tratamiento quelante-no infectado, se encontró un incremento significativo. Mientras que, en intestino este patrón se observó en los peces tratados con quelante-infectados (figura 22b). En el tratamiento Fe₂x se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo en intestino de peces infectados, donde se observó un incremento en los niveles de expresión de *LaFerH*. Sin embargo, en los demás tejidos no se encontraron diferencias significativas.

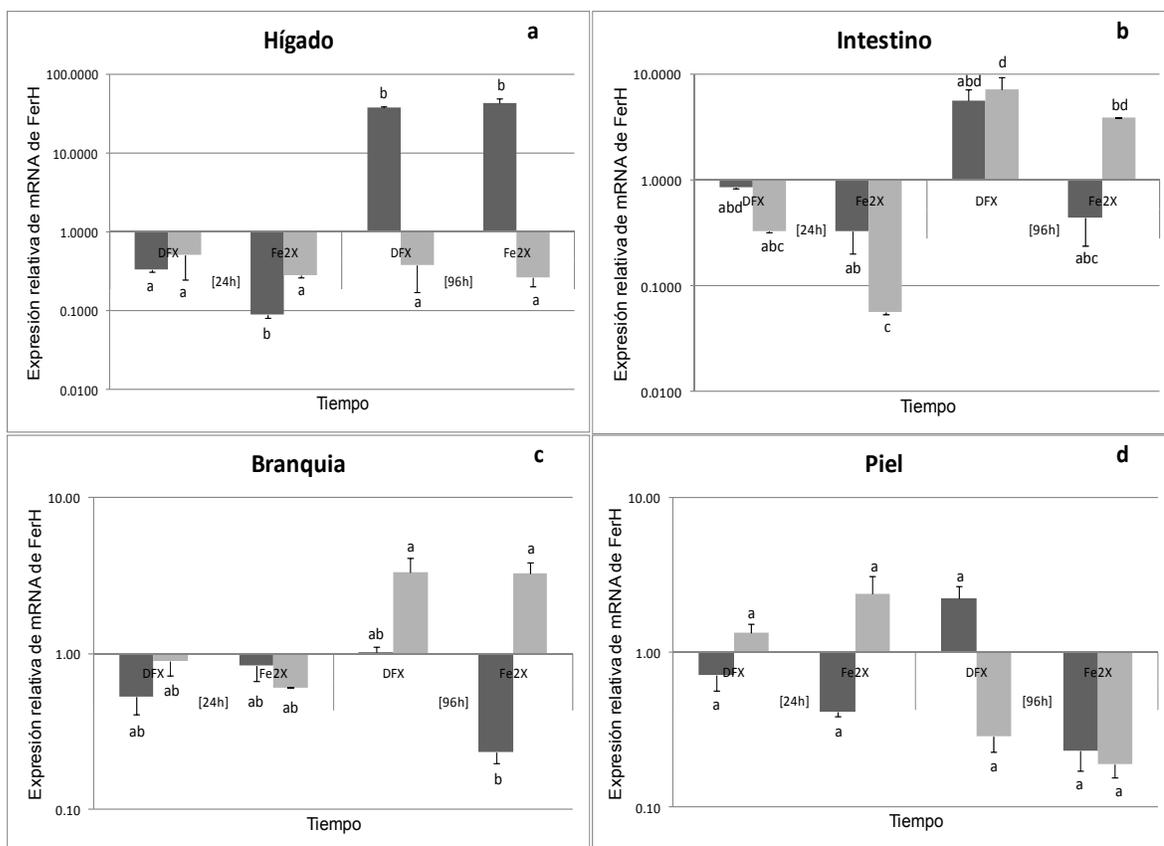


Figura 22. Expresión de ferritina H determinada por RT-qPCR en a) hígado, b) intestino, c) branquias y d) piel de juveniles de pargo amarillo expuestos a una concentración de hierro 2X, a una deficiencia de hierro y una infección con *A. hydrophila*. Las barras de color gris oscuro muestran los peces no infectados, mientras que las barras gris claro muestran los peces con infección. Los datos se muestran como la media de la expresión génica relativa en relación con la expresión del gen control endógeno EF-1 α . Las barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) unas de otras. La barra de error representa el error estándar.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio, los genes de transferrina y ferritina M de pargo amarillo fueron clonados, secuenciados y caracterizados. Se obtuvo la secuencia completa de ADNc del gen codificante para transferrina con una longitud total de 2,482 pb y un marco de lectura de 2073 pb el cual codifica 690 aminoácidos. Esto concuerda con longitudes similares de otras transferrinas en diferentes peces como la transferrina de la dorada (*Sparus aurata*) que consta de 691 aminoácidos (García-Fernández *et al.*, 2011); la transferrina de *Trachidermus fasciatus* que cuenta con 681 aminoácidos (Liu *et al.*, 2012); la transferrina del bagre de canal (*Ictalurus pucnatus*) que está compuesta por 679 aminoácidos (Liu *et al.*, 2010) y la longitud de 691 aminoácidos de esta proteína en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Neves *et al.*, 2009).

El alineamiento de la secuencia aminoacídica de transferrina de pargo amarillo se realizó con otras transferrinas de peces y mamíferos (como ratón y humano). Se observó una identidad dentro de 73 y 80% con otras especies de peces, principalmente *Larimichthys crocea*, *Pagrus major* y *Dicentrarchus labrax*; mientras que la identidad con ratón y humano fue de 48% y 47% respectivamente. Similar que en las transferrinas mencionadas, esta proteína de *L. argentiventris* contiene dos lóbulos (lóbulo-N: 24-337 y lóbulo-C: 340-680 residuos de aminoácidos). Cada lóbulo contiene cuatro sitios de unión a hierro y dos de unión a anión, los cuales actúan sinérgicamente para la unión del hierro a la molécula (Lambert *et al.*, 2005). Por otra parte, este alineamiento, también mostró la presencia de características distintivas de la familia de transferrinas, llamadas distintivo (o *signature*) 1, 2 y 3 de transferrina como son reportadas por Neves *et al.* (2009) en lubina (*D. labrax*) y por Liu *et al.* (2012) en perca de cuatro branquias (*Trachidermus fasciatus*), las cuales nos indican que esta proteína de pargo amarillo al igual que en otras especies, cumple con su función de transporte de hierro.

En el árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de 19 diferentes especies de vertebrados, se observó que la transferrina de *Lutjanus argentiventris* se agrupó con dos especies de la familia *Sparidae*, mostrando distancias más cortas y valores de *bootstrap* altos (figura 15). El análisis filogenético confirma que transferrina es de mediana a altamente conservada en los taxones de vertebrados, lo cual puede estar involucrado con las funciones de esta proteína en el metabolismo del hierro y la respuesta inmune innata; y a su vez imponer límites en la evolución de la secuencia de aminoácidos (García-Fernández *et al.*, 2011).

Se obtuvo también la secuencia de ADNc de ferritina M del pargo amarillo, la cual consta de una longitud de 1076 pb y un marco de lectura de 531 pb, codificante para 176 aminoácidos, el mismo número de residuos encontrados por Zhang *et al.* (2010) en la gran corvina amarilla (*Pseudosciaena crocea*), el draco rayado o pez hielo (*Chionodraco rastrospinosus*) (Scudiero *et al.*, 2013) y en *Oplegnathus fasciatus* (Elvitigala *et al.*, 2013); mientras que en *Cynoglossus semilaevis* secuencia deducida de aminoácidos fue de 177 (Wang *et al.*, 2011). Por otra parte, la secuencia de aminoácidos de *LaFerM* tiene los residuos que confieren la actividad ferroxidasa y la capacidad de mineralización de hierro, que se encuentran en las subunidades H y L en mamíferos, respectivamente. La secuencia de ferritina M de *L. argentiventris* comparte arriba del 85% de identidad con secuencias de otras ferritinas M de un número de especies de peces y está cercanamente relacionada con la ferritina H y L de humano y ratón. El análisis filogenético se realizó a partir de 14 secuencias de ferritina M de diferentes especies de peces: 5 secuencias de ferritina H de peces y 2 de ferritina H y L de vertebrados, y se observó como era de esperar, que las subunidades respectivas de ferritina de peces y de mamíferos se agruparon estrechamente y de forma independiente, donde ferritina M representa un clúster exclusivamente de origen piscine, comprobando su distribución restringida entre los vertebrados inferiores.

Por otra parte, Wei *et al.* (2009) realizó un estudio utilizando la gran corvina amarilla (*Pseudosciaena crocea*) retada con *Vibrio anguillarum* y encontraron 179

ESTs (acrónimo del inglés expressed sequence tag) a partir de una genoteca de hibridación sustractiva (SSH); 94 de estos EST's presentaron valores de $E < 0.00005$, de los cuales 39 fueron confirmados como genes diferentes y probablemente relacionados con el sistema inmune se encontró que los genes de ferritina subunidad H y transferrina se expresaron por efecto a la infección experimental en la corvina. En otro estudio similar, a partir de células blancas de peces juveniles de *Mycteroperca rosacea* infectados experimentalmente con el patógeno *Aeromonas hydrophila* Ah-315, se encontraron 122 EST's con identidad significativa con genes de peces teleósteos (López, 2010). Un análisis posterior de validación de esta genoteca por medio del análisis vía hibridación con un microarreglo heterólogo (microarreglo de ratón), mostró que ciertas rutas metabólicas relevantes, entre ellas la de homeostasis de hierro, están involucradas importantemente en la respuesta inmune, dichas rutas se vieron igualmente representadas cuando se realizó un análisis de secuencias provenientes de la genoteca sustractiva con la herramienta Blast2GO (López, 2010). A partir de estas observaciones, se determinó que la ruta de homeostasis del hierro podría representar una ruta relevante durante el proceso infeccioso. Por ese motivo, este trabajo planteó realizar la caracterización de los genes involucrados en esta ruta metabólica. La expresión tejido-específica de transferrina varía entre especies. En estudios realizados en peces teleósteos como dorada (*Sparus aurata*), lubina (*D. labrax*) y perca de cuatro branquias (*T. fasciatus*), la expresión de transferrina más alta fue observada en hígado, además en lubina y perca de cuatro branquias, encontraron que la expresión de este gen en cerebro fue también abundante (García-Fernández *et al.*, 2011; Neves *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). En contraste, en este estudio, la expresión más alta de transferrina fue encontrada en mucus, bazo y riñón cefálico, y de menor manera en hígado, cerebro, intestino, piel, músculo, ojo y branquia. El mucus epidérmico es la primera línea de defensa del pez, la cual funciona como protección ante agentes patógenos ambientales (Easy *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Easy *et al.*, 2012 identificaron la presencia de transferrina en mucus de piel en bacalao

(*Gadus morhua*). La presencia de esta proteína en mucus de peces puede deberse a una mayor expresión en las células epidérmicas como parte de una respuesta inmune innata tras condiciones de estrés (Easy *et al.*, 2009). En un trabajo del análisis de expresión tejido-específica de transferrina en bacalao (*Gadus morhua*) observaron que la expresión de este gen es específica entre especies de peces teleósteos, por ejemplo, el gen de transferrina fue expresado en cerebro y corazón de bacalao pero no en el salmón (Eileen *et al.*, 1996). Las secuencias de ADNc de las subunidades de ferritina han sido identificadas en pocas especies de teleósteos, por lo cual existe poca información de los perfiles de expresión en peces, especialmente de la subunidad tipo M. En el salmón Atlántico (*Salmo salar*) la expresión de ARNm de ferritina H fue detectado en hígado, gónada, riñón cefálico, corazón y bazo; mientras que la expresión de ARNm de ferritina M fue encontrado exclusivamente en gónadas (Andersen *et al.*, 1998). En peces teleósteos como el austro bacalao esmeral (*Trematomus bernacchii*) y bacalao oscuro (*Trematomus newnesi*), se demostró que su ferritina en hígado se compone tanto de la subunidad H como la M pero en bazo solo se encontraron las subunidades M (Giorgi *et al.*, 2008). En corvina amarilla se encontró que las dos subunidades de ferritina fueron expresadas en los 8 tejidos analizados en el estudio (hígado, bazo, riñón cefálico, corazón, piel, branquia, músculo y cerebro), donde la expresión de ferritina H fue similar en los 8 tejidos; mientras que la expresión de ferritina M fue más alta en hígado y músculo (Zhang *et al.*, 2010). La expresión tejido-específica de ferritina M y H de pargo amarillo fueron detectadas por PCR en tiempo real en los diez tejidos analizados (piel, ojo, branquia, cerebro, hígado, intestino, músculo, bazo, riñón cefálico y mucus), pero la expresión de ferritina M fue mayor en mucus, riñón cefálico y bazo; mientras que la expresión más alta de ferritina H fue encontrada en riñón cefálico, músculo y mucus, siendo piel el tejido con menor expresión tanto de la subunidad M como de la H.

Para entender mejor la función de transferrina y ferritina subunidades H y M en pargo amarillo, en este estudio se montaron modelos experimentales de

modulación con hierro donde se realizaron dos tratamientos: una sobrecarga y deficiencia de hierro; y un modelo experimental con una infección bacteriana. La deficiencia de hierro se basó en remover este metal del agua y del pez usando un quelante comercial llamado Desferasirox un ácido (4-[3,5-bis(2-hidroxifenil)-1,2,4-triazol-1-il]-benzónico, que es un quelante tridentado de hierro selectivo de Fe^{3+} , y requiere de dos moléculas para formar un complejo estable con cada átomo de hierro (Cappellini, 2005). Para el ambiente con sobrecarga de hierro se añadió dos veces la carga de hierro que se encuentra en el mar (Fe_{2x}) con $6.8 \mu g/L$ de cloruro de hierro ($FeCl_3$) (Andersen, 1999; Reyes *et al.*, 2014). El análisis transcripcional se analizó en hígado, intestino, branquia y piel a las 24 y 96 horas después de la infección con *Aeromonas hydrophila*. La infección se llevó a cabo intraperitonealmente con una dosis baja la cual no causó mortalidades significativas, sin embargo se observaron efectos en la expresión de los genes de transferrina y ferritina H y M después de la infección. En general los resultados nos muestran que en hígado, intestino y piel transferrina aumenta su expresión en peces sometidos a condiciones sin hierro, sugiriendo un aumento de liberación de hierro a partir de los depósitos existentes, movilizándolo hacia otros órganos a través de la molécula de transferrina (Neves *et al.*, 2009). Por otro lado, en los peces con estimulación bacteriana en este mismo tratamiento, disminuyó significativamente la expresión de transferrina, lo que puede sugerir menor disponibilidad de hierro enlazado a la molécula de transferrina para su secuestro por patógenos. Contrario a los otros tejidos anteriormente mencionados, en branquia de peces tratados con quelante al tiempo de 24 horas y que adicionalmente fueron infectados se encontró un aumento de expresión del gen de transferrina. Ha sido reportado que las transferrinas de algunos mamíferos y peces puede actuar como una proteína de fase aguda positiva o negativa (Bayne y Gerwick, 2001). En lubina, se encontró que su transferrina actúa como proteína de fase aguda positiva en cerebro, con un incremento de su expresión a las 48 horas post infección (Neves *et al.*, 2009). En hígado de bagre de canal, la expresión de transferrina aumentó después de la infección bacteriana actuando también como

proteína de fase aguda positiva (Liu *et al.*, 2010). Un estudio más demuestra que transferrina puede actuar tanto proteína de fase aguda positiva como negativa independientemente del tejido. Ding *et al.* (2015) encontraron que el gen de transferrina de *Megalobrama amblycephala* incrementó significativamente en los tres tejidos analizados (hígado, riñón cefálico y bazo) en respuesta a la infección.

Recientemente, se ha estudiado la regulación de genes y se ha encontrado que existen alteraciones estables en la expresión de genes que no son causadas por cambios en la secuencia de ADN, y a este enfoque de estudio se le llama epigenética (Jaenisch *et al.*, 2003). Varios estudios han mostrado que ciertos agentes infecciosos (*Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Campylobacter rectus*, etc.) pueden contribuir a cambios epigenéticos en el hospedero, resultantes en la aparición y progresión de algunas enfermedades (Akeel *et al.*, 2013). Los microorganismos simbióticos han sido relacionados en la variación epigenética de termotolerancia de la simbiosis de los cnidarios arrecifes de coral, los áfidos del guisante, y los cactus (Gilbert *et al.*, 2010). Se ha asociado que una de las funciones de la microbiota intestinal de mamíferos es como factor de la modificación epigenética en la patogénesis de síndromes y enfermedades metabólicas (Dumas *et al.*, 2006). De este modo, las diferentes señales bióticas y abióticas pueden producir cambios en la expresión de genes que pueden persistir después de que el efecto ha cesado (Oka *et al.*, 2011). En el presente trabajo no se estudiaron los cambios epigenéticos que pudieran estar involucrados en la condición de disponibilidad de hierro y la infección con *A. hydrophila*, sin embargo, sería importante profundizar este estudio a este nivel de regulación epigenética.

La expresión de ferritina M y H de *L. argentiventris* mostraron patrones de expresión similares entre ellas en los tejidos analizados. En hígado, se observó que en los peces tratados con sobrecarga de hierro a las 96 horas (Fe2x) tanto ferritina H como M incrementaron significativamente en peces que no fueron expuestos a *A. hydrophila*. Este mismo hallazgo se observó en grupos de peces y

larvas no infectados que fueron expuestos a ambientes con hierro, donde los niveles de expresión de ferritina H aumentaron significativamente (Liu *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2014). Esto puede sugerir una mayor síntesis necesaria de este gen para equilibrar el exceso de hierro. Sin embargo, los niveles de expresión de los dos genes se suprimieron en los peces que fueron infectados con la bacteria a las 96 horas tanto en la terapia quelante como en la sobrecarga de hierro. Además, el gen de ferritina M en el tiempo de 24 horas post-infección aumentó ligeramente su expresión. Elvitigala *et al.* (2013) encontraron que en *Oplegnathus fasciatus* con modulación de bacterias gram negativas los niveles de expresión de ferritina M aumentaron en fases tempranas (3 horas post-infección), contribuyendo en un menor biodisponibilidad de hierro para el patógeno, sin embargo, los niveles disminuyeron conforme pasó el tiempo después de la infección (6, 12 y 24 horas). Esto puede ser atribuido a la naturaleza estimulante de los patógenos a los que fueron expuestos, ya que, estos pueden ejercer mecanismos diferentes y específicos de evasión contra los mecanismos inmunes del hospedero; como se han establecidos en varias especies bacterianas (Pieters, 2001). En intestino se observó también una supresión de los genes de las dos subunidades de ferritina a las 24 horas en peces con Fe₂X-infectados, sin embargo, los niveles de expresión de ferritina H aumentan significativamente respecto al tiempo. Se ha reportado que los niveles de expresión de ARNm de la ferritina M en la corvina (*Sciaenops ocellatus*) en hígado aumentan por infección con *Edwardsiella tarda* en fase temprana (4 horas post-infección) y fase tardía (48 horas) (Hu *et al.*, 2010), sin embargo, tras la estimulación de bacterias como *Listonella anguillarum*, en hígado y bazo de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) la inducción de la transcripción de ferritina M fue en la fase tardía del experimento (24 y 48 horas) (Zhenget *al.*, 2010), mientras que en *Cynoglossus semilaevis*, la inducción de este gen se dio solo en fase temprana en hígado (1 y 4 horas) y bazo (4 horas), pero en ambas fases se indujo en riñón cefálico (Wang *et al.*, 2011). Lo que sugiere que ferritina se expresa de forma diferencial entre tejidos respecto al tiempo. Por otra parte, la branquia es el tejido que está cercanamente en contacto con el agua de mar

circundante, en un previo estudio se sugiere que este tejido no es únicamente importante para la alimentación y respiración, sino que también juega una función importante en el reconocimiento de partículas exógenas del ambiente (Calvo, 1996). En branquia de pargo amarillo a pesar de encontrar una supresión de la expresión relativa de ARNm de ferritina H y M en peces con el tratamiento Fe²⁺-no infectados a las 96 horas, su expresión aumenta potencialmente en peces expuestos a la bacteria, lo cual sugiere un almacenamiento mayor de hierro, para que los sideróforos de las bacterias tengan una menor disponibilidad de este metal y evitar obtenerlo como nutriente (Butler y Theisen, 2010). No existen estudios realizados en este tejido en peces, sin embargo, en estudios realizados en moluscos como *Conchalepas conchalepas* (pata de burro o tolina) se encontraron mayores niveles de expresión del gen de ferritina H en branquia en los moluscos que fueron retados con *Vibrio anguillarum* (Chávez-Mardones *et al.*, 2013).

9. CONCLUSIONES

- Se caracterizó el ADNc de transferrina de *L. argentiventris*, en la cual se logró identificar estructuras características de este gen; en ellas, los lóbulos N y C, así como sitios de unión a hierro. Estas regiones fueron altamente conservadas y *LaTf* tuvo un alto grado de identidad (70-80%) con otros peces.
- Se caracterizó el ADNc de ferritina M de pargo amarillo, identificando características como el elemento de respuesta al hierro (IRE), dos regiones distintivas putativas de unión al hierro (IBRS) y residuos de aminoácidos característicos de las subunidades H y L de mamíferos. Se encontró un alto grado de identidad (80-95%) de *LaFerM* con otros peces.
- Los genes de transferrina, ferritina M y H se distribuyen constitutivamente en los tejidos de pargo amarillo, siendo más abundante en mucus, bazo y riñón cefálico.
- La especie *Lutjanus argentiventris* muestra cambios a nivel transcripcional dependiente de tejido en los tres genes por efecto de la infección con *A. hydrophila* y los tratamientos con sobrecarga y deficiencia de hierro; por lo que se sugiere que estos cambios forman parte de una respuesta inmune.
- Los niveles de expresión relativa de ARNm de transferrina aumentaron en los cuatro tejidos analizados (hígado, intestino, branquia y piel) en condiciones quelante-no infectados, y disminuyeron estos niveles en hígado, intestino y piel de peces infectados tanto en condiciones con hierro y quelante; y en branquia se encontró un aumento mayor de este gen cuando los peces fueron infectados.
- Los niveles de expresión relativa de ARNm de ferritina H y M aumentaron en branquia después de la infección bacteriana tanto en peces expuestos a hierro

y quelante. Mientras que en los otros tres tejidos, se observó una disminución en los niveles de expresión en peces retados con *Aeromonas hydrophila*.

- Este estudio sugiere que la transferrina y ferritina, además de su participación en el metabolismo del hierro, tiene una función importante durante una infección bacteriana en *L. argentiventris*.
- Aunque se detectaron niveles altos de transcripción basal de transferrina y ferritina (H y M) en el mucus epidérmico, incentivando aún más su función como primera barrera de defensa, sería necesario llevar a cabo un análisis de expresión génica diferencial con un reto bacteriano.

10. LITERATURA CITADA

Aisen P., y I. Listowsky. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem.* 49(1): 357-393.

Akeel, R. 2013. Role of epigenetic reprogramming of host genes in bacterial pathogenesis. *Saudi J Biol Sci.* 20(4): 305-309.

Allen, G. R. 1987. Synopsis of the circumtropical fish genus *Lutjanus* (Lutjanidae). En: Polovina, J. J. y S. Ralston (eds.): *Tropical snappers and groupers: biology and fisheries management*, Westview Press, Boulder, EE.UU. 33-87p.

Adrian G. S. 1988. Transferrin: evolution and genetic regulation of expression. *Adv Genet.* 25: 1-38.

Andersen O., A. Dehli, H. Standal, T. A. Giskegjerde, R. Karstensen, K. A. Rørvik. 1995. Two ferritin subunits of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cloning of the liver cDNAs and antibody preparation. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 4(2):164-170.

Andersen Ø., K. Pantopoulos, H. T. Kao, M. Muckenthaler, J. H. Youson, V. Pieribone. 1998. Regulation of iron metabolism in the sanguivore lamprey *Lampetra fluviatilis*. *Eur J Biochem.* 254(2):223-229.

Andrews S. C. 2010. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *BBA-Gen Subjects.* 1800(8): 691-705.

Austin B., y D. A. Austin. 2007. *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*. Springer Science & Business Media. Tercera edición. Ltd, Chichester, UK. 552p.

Bayne C. J. y L. Gerwick. 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev Comp Immunol.* 25(8): 725-743.

- Berdegú A. J. 1956. Peces de importancia comercial en las costas noroccidental de México. Secretaría de Marina, División General de Pesca, México. 345 p
- Birkemo G. A., T. Luders, O. Andersen, I. F. Nes, J. Nissen-Meyer. 2003. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *J Biochem Mol Biol Biophys*. 1646: 207–215.
- Bullen J. J., H. J. Rogers, E. Griffiths. 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 80:1-35.
- Bury N. R., Walker P. A., Glover C. N. 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. *J Exp Biol*. 206(1): 11-23.
- Bustin S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25(2): 169-193.
- Butler A., yR. M. Theisen. 2010. Iron (III)–siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. *Coord Chem Rev*. 254(3): 288-296.
- Calvo J. A. M. P. 1996. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. La perfusión de branquias como modelo de valoración de la calidad de agua y su relación con la producción intensiva de truchas. Madrid, 1996.
- Cappellini M. D. 2005. Iron-chelating therapy with the new oral agent ICL670 (Exjade®). *Best Pract Res Cl Ha*. 18(2): 289-298.
- Chávez-Mardones J., V. Valenzuela-Muñoz, G. Núñez-Acuña, W. Maldonado-Aguayo, C. Gallardo-Escárte. 2013. *Concholepas concholepas* Ferritin H-like subunit (CcFer): Molecular characterization and single nucleotide polymorphism associated to innate immune response. *Fish Shellfish Immunol*. 35(3): 910-917.
- Chen S. L., M. Y. Xu, X. S. Ji, G. C. Yu, Y. Liu. 2005. Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream. (*Chrysophrys major*). *Antimicrob Agents Chemother*. 49(4): 1608-1612.

Chen J., Y. H. Shi, M. Y. Li. 2008. Changes in transferrin and hepcidin genes expression in the liver of the fish *Pseudosciaena crocea* following exposure to cadmium. *Arch Toxicol.* 82(8): 525-530.

Chenault S. S., yC. F. Earhart. 1991. Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol.* 5(6): 1405-1413.

Cooper, C. A., R. D. Handy, & N. R. Bury. (2006). The effects of dietary iron concentration on gastrointestinal and branchial assimilation of both iron and cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 79(2): 167-175.

Crichton R. R., yM. Charlotheaux-Wauters. 1987. Iron transport and storage. *Eur J Biochem.* 164(3): 485-506.

Cumberbatch N., M. J. Gurwith, C. Langston, R. B. Sack, J. L. Brunton. 1979. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect Immun.* 23(3): 829-837.

Cunningham-Rundles S., P. J. Giardina, R. W. Grady, C. Califano, P. McKenzie, M. De Sousa. 2000. Effect of transfusional iron overload on immune response. *J Infect Dis.* 182(Supplement 1): S115-S121.

Denovan-Wright E. M., N. B. Ramsey, C. J. McCormick, C. B. Lazier, J. M. Wright. 1996. Nucleotide sequence of transferrin cDNAs and tissue-specific expression of the transferrin gene in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 113(2): 269-273.

Díaz U. J. G. 1994. Análisis trófico del huachinango (*Lutjanus peru*) en las bahías de La Paz y La Ventana, B.C.S., México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.

Ding Z., X. Zhao, L. Su, F. Zhou, N. Chen, J.Wu, X.Fu, F.Wu, W.Wang, H. Liu. 2015. The *Megalobrama amblycephala* transferrin and transferrin receptor genes: Molecular cloning, characterization and expression during early development and after *Aeromonas hydrophila* infection. *Dev Comp Immunol.* 49(2): 290-297.

Dobos P. 1976. Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. *Nucleic Acids Res.* 3(8): 1903-1924.

Douglas S. E., J. W.Gallant, R. S.Liebscher, A.Dacanay, S. C. Tsoi. 2003. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev Comp Immunol.* 27(6): 589-601.

Drakesmith H., yA. Prentice.2008. Viral infection and iron metabolism.*Nat Rev Microbiol.* 6(7): 541-552.

Dumas M. E., R. H.Barton, A.Toeye, O.Cloarec, C.Blancher, A.Rothwell, J.Fearnside, R.Tatoud, V.Blanc, J. C.Lindon, S. C.Mitchell, E.Holmes, M. I.McCarthy, J.Scott, D. Gauguier yJ. K. Nicholson. 2006. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci.* 103(33): 12511-12516.

Easy R. H., yN. W. Ross. 2009. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 4(3): 159-167.

Easy R. H., E. A.Trippel, M. D. B.Burt, D. K. Cone. 2012. Identification of transferrin in Atlantic cod *Gadus morhua* epidermal mucus. *J Fish Biol.* 81(6): 2059-2063.

Ellis A. E. 2001. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol.* 25: 827–839.

Elvitigala D. A. S., H. K. A.Premachandra, I.Whang, M. J.Oh, S. J.Jung, C. J.Park, J.Lee. 2013. A teleostean counterpart of ferritin M subunit from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): an active constituent in iron chelation and DNA protection against oxidative damage, with a modulated expression upon pathogen stress. *Fish Shellfish Immunol.* 35(5): 1455-1465.

FAO, 2012. << *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2012*>> Depósito de documentos de la FAO, Roma.

FAO, 2010. << *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2010*>> Depósito de documentos de la FAO, Roma.

Fernandes S. S., A.Nunes, A. R.Gomes, B.de Castro, R. C.Hider, M.Rangel, R.Appelberg, M. S. Gomes.2010. Identification of a new hexadentate iron chelator capable of restricting the intramacrophagic growth of *Mycobacterium avium*. *Microbes Infect.* 12(4): 287-294.

Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, V. H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. I Plantas e invertebrados. FAO, Roma, Italia.646 pp.

García-Fernández C., J. A. Sánchez, G. Blanco. 2011. Characterization of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) transferrin gene: Genomic structure, constitutive expression and SNP variation. *Fish Shellfish Immunol.* 31(4): 548-556.

Gilbert S. F., E.McDonald, N.Boyle, N.Buttino, L.Gyi, M.Mai, N. Prakash, J. Robinson. 2010. Symbiosis as a source of selectable epigenetic variation: taking the heat for the big guy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1540): 671-678.

Ginzinger D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 30(6): 503-512.

Giorgi A., G.Mignogna,G. Bellapadrona,M. Gattoni,R. Chiaraluce,V. Consalvi,E. Chiancone, S. Stefanini. 2008. The unusual co-assembly of H-and M-chains in the ferritin molecule from the Antarctic teleosts *Trematomus bernacchii* and *Trematomus newnesi*. Arch Biochem Biophys.478(1): 69-74.

Graham I., yJ. Williams. 1975. A comparison of glycopeptides from the transferrins of several species. Biochem J. 145: 263-279.

Griffiths E., yP. H. Williams. 1999. The Iron-Uptake Systems of Pathogenic Bacteria, Fungi, and Protozoa. En: Bullen J.J., y E. Griffiths. (eds.) Iron and Infection Molecular, Physiological and Clinical Aspects. John Wiley and Sons.Segunda edición. Chichester, England. 2:87-212

Harrison P. M., yP. Arosio. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation.BBA-Bioenergetics. 1275(3): 161-203.

Halsey T. A., A. Vazquez-Torres, D. J. Gravdahl, F. C. Fang, S. J. Libby.2004. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* oxidative stress resistance and virulence. Infect Immun.72(2): 1155-1158.

Hentze M. W.,T. A. Rouault,J. B. Harford, R. D. Klausner. 1989. Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. Science. 244(4902): 357-359.

Hentze M. W., yL. C. Kühn. 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. Proc Natl Acad Sci. 93(16): 8175-8182.

Hill B. J., B. O.Underwood,C. J. Smale, F.Brown. 1975. Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. J Gen Virol. 27: 369-378.

Howard D. H. 1999. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev. 12(3): 394-404.

Hu X.,A. C. Camus,S. Aono,E. E. Morrison,J. Dennis,K. E. Nusbaum,R. L. Judd, J.Shi. 2007. Channel catfish hepcidin expression in infection and anemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30(1): 55-69.

Hu Y. H., W. J. Zheng, L. Sun. 2010. Identification and molecular analysis of a ferritin subunit from red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Shellfish Immunol.* 28(4): 678-686.

Ingram G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection a review. *J Fish Biol.* 16: 23–60.

Jaenisch, R., yA. Bird. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 33: 245-254.

Ketover B. P.,L. S. Young, D. Armstrong. 1973. Septicemia due to *Aeromonas hydrophila*: clinical and immunologic aspects. *J Infect Dis.* 127(3): 284-290.

Kiron V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim Feed Sci Technol.* 173(1): 111-133.

Kohgo Y.,K. Ikuta,T. Ohtake,Y. Torimoto, J.Kato. 2008. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 88(1): 7-15.

Kowdley K. V. 2000. Chronic viral hepatitis and hemochromatosis. En: Barton JC, Edwards CQ, (eds.). *Hemochromatosis: Genetics, pathophysiology,diagnosis and treatment.* Cambridge University Press. Cambridge, UK,600p.

Kvingedal A. M.,K. A. Rørvik, P. Alestrøm. 1993. Cloning and characterization of Atlantic salmon (*Salmo salar*) serum transferrin cDNA. *Mol Mar Biol Biotechnol,* 2(4), 233-238.

Lambert L. A.,H. Perri, T. J.Meehan. 2005. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 140(1): 11-25.

Lee J., N. Tange, H. Yamashita, I. Hirono, T. Aoki. 1995. Cloning and characterization of transferrin cDNA from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Pathol.* 30:271-7.

Levi S., A. Luzzago, G. Cesareni, A. Cozzi, F. Franceschinelli, A. Albertini, P. Arosio. 1988. Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J Biol Chem.* 263(34): 18086-18092.

Levi S., P. Santambrogio, A. Cozzi, E. Rovida, B. Corsi, E. Tamborini, S. Spada, A. Albertini, P. Arosio. 1994. The role of the L-chain in ferritin iron incorporation: studies of homo and heteropolymers. *J Mol Biol.* 238(5): 649-654.

Liang P., yA. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 257(5072): 967-971.

Lin B., S.Chen, Z.Cao, Y. Lin, D. Mo, H. Zhang, J. Gu, M. Dong, Z. Liu, A. Xu. 2007. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. *Mol Immunol.* 44(4): 295-301.

Liu H., T. Takano, J. Abernathy, S. Wang, Z. Sha, Y. Jiang, J. Terjune, H. Kucuktas, E. Peatman, Z. Liu. 2010a. Structure and expression of transferrin gene of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish shellfish immunol.* 28(1): 159-166.

Liu H., T. Takano, E. Peatman, J. Abernathy, S. Wang, Z. Sha, H. Kucuktas, D. Xu, P. Klesius, Z. Liu. 2010b. Molecular characterization and gene expression of the channel catfish ferritin H subunit after bacterial infection and iron treatment. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 313(6): 359-368.

López T., 2010. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz BCS, México. Expresión génica diferencial en células

blancas de Cabrilla Sardinera *Mycteroperca rosacea* ante la infección experimental con *Aeromonas hydrophila*. Enero 2010.

Magallón F. J., yH.Villarreal. 2007. Desarrollo sustentable de la acuicultura en México. Orientaciones estratégicas. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*. 256p.

Manning M.J. yT. Nakanishi.1996. Cellular defenses. En: Iwama G. K., T. Nakanishi (eds.).*Fish Physiology*. XV. The fish immune system. Academic press. London, England, 159–205p.

Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish shellfish immunol*, 20(2), 137-151.

Martinez-Andrade F. 2003. A comparison of life histories and ecological aspects among snappers (Pisces: Lutjanidae). Tesis de doctorado. Faculty of the Louisiana State university and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Department of Oceanography and Coastal Sciences. Universidad Autonoma Metropolitana.

Massad G., J. E. Arceneaux, B. R. Byers.1991. Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species. *J Gen Microbiol*. 137(2): 237-241.

Mignogna G., R. Chiaraluce, V. Consalvi, S. Cavallo, S. Stefanini, E. Chiancone.2002. Ferritin from the spleen of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii* is an M-type homopolymer. *Eur J Biochem*. 269(6): 1600-1606.

Neres J., N. P. Labello, R. V.Somu,H. I. Boshoff, D. J. Wilson, J. Vannada, L. Chen, C. E. BarryIII, E. M. Bennett,C. C. Aldrich. 2008. Inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* with nucleoside bisubstrate analogues: structure– activity relationships of the nucleobase domain of 5'-O-[N-(salicyl) sulfamoyl] adenosine. *J Med Chem*. 51(17): 5349-5370.

Neves J. V., J. M. Wilson, P. N. Rodrigues. 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. *Dev Comp Immunol.* 33(7): 848-857.

Neves J. V., C. Caldas, J. M. Wilson, P. N. S. Rodrigues. 2011. Molecular mechanisms of hepcidin regulation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish shellfish immunol.* 31(6): 1154-1161.

Nakanishi T. 1986. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of the marine teleost, *Sebastes marmoratus*. *Vet Immunol Immunop.* 12(1): 213-221.

Noga E. J., A. J. Ullal, J. Corrales, J. M. Fernandes. 2011. Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 6(1): 44-54.

Oka, T., H. Sato, M. Ouchida, A. Utsunomiya, T. Yoshino. 2011. Cumulative epigenetic abnormalities in host genes with viral and microbial infection during initiation and progression of malignant lymphoma/leukemia. *Cancers.* 3(1): 568-581.

Ong S. T., J. Z. S. Ho, B. Ho, J. L. Ding. 2006. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology.* 211(4): 295-314.

Park I., E. Schaeffer, A. Sidoli, F. E. Baralle, G. N. Cohen, M. M. Zakin. 1985. Organization of the human transferrin gene: direct evidence that it originated by gene duplication. *Proc Natl Acad Sci.* 82(10): 3149-3153.

Pieters J. 2001. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol.* 13(1): 37-44.

Pietrangelo A. 2009. Iron in NASH, chronic liver diseases and HCC: how much iron is too much? *J Hepatol.* 50(2): 249-251.

Pilcher K. S. y J. L. Fryer. 1980. The Viral Diseases of Fish: A Review Through 1978: Part 1: Diseases of Proven Viral Etiology. *CRC Cr Rev Microbiol.* 7(4): 287-363.

Ramírez R. M., V. M. M. Casas, D. G. Ponce. 1996. Pesquería de escama. En: *Casas V. M. M., G. Ponce D. Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur.* SEMARNAT, FAO, INP, UABCS, CIB, CICIMAR, CETMAR, México. 287-304p.

Ratledge C.yL. G. Dover.2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 54(1): 881-941.

Razquin B. E., A. Castillo, P. López-Fierro, F. Alvarez, A. Zapata, A. J. Villena.1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*: an immuno-and enzyme-histochemical study. *J Fish Biol.* 36(2): 159-173.

Reyes-Becerril M., C. Angulo-Valadez, M. E. Macias, M. Angulo, F. Ascencio-Valle. 2014. Iron bioavailability in larvae yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*): Cloning and expression analysis of ferritin-H. *Fish shellfish immunol.* 37(2): 248-255.

Rhee J. S.,B. M. Kim,C. B. Jeong,T. Horiguchi,Y. M. Lee,I. C. Kim,J. S.Lee. 2012. Immune gene mining by pyrosequencing in the rockshell, *Thais clavigera*. *Fish shellfish immunol*, 32(5), 700-710.

Rodríguez R.J., L. A. Abitia, F. Galván, H. Chávez.1994. Composición, abundancia y riqueza específica de la ictiofauna de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Cienc Mar.* 20(3): 321-350.

- Rombout J. H. W. M., H. B. T. Huttenhuis, S. Picchiatti, G. Scapigliati. 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish shellfish immunol.* 19(5): 441-455.
- Romero J. R., L. A. A. Cárdenas, F. G. Magaña, H. C. Ramos. 1994. Composición, abundancia y riqueza específica de la ictiofauna de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Cienc Mar.* 20(3): 321-350.
- Sala E., Aburto-Oropeza O., Paredes G., Thompson G. 2003. Spawning aggregations and reproductive behavior of reef fishes in the Gulf of California. *BMar Sci.* 72(1): 103-121.
- Sahoo P. K., B. R. Mohanty, J. Kumari, A. Barat, N. Sarangi. 2009. Cloning, nucleotide sequence and phylogenetic analyses, and tissue-specific expression of the transferrin gene in *Cirrhinus mrigala* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32(6): 527-537.
- Santambrogio P., S. Levi, P. Arosio, L. Palagi, G. Vecchio, D. M. Lawson, S. J. Yewdall, P. J. Artymiuk, P. M. Harrison, R. Jappelli. 1992. Evidence that a salt bridge in the light chain contributes to the physical stability difference between heavy and light human ferritins. *J Biol Chem.* 267(20): 14077-14083.
- Santambrogio P., S. Levi, A. Cozzi, E. Rovida, A. Albertini, P. Arosio. 1993. Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *J Biol Chem.* 268(17): 12744-12748.
- Saurabh S., P. K. Sahoo. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquacult Res.* 39: 223-239.
- Sawaya B. E., E. Schaeffer. 1995. Transcription of the human transferrin gene in neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 23(12): 2206-2211.
- Secombes C. J., T. C. Fletcher. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu Rev Fish Dis.* 2: 53-71.

Scudiero R., M. G. Esposito, F. Trinchella. 2013. Middle ferritin genes from the icefish *Chionodraco rastrospinosus*: Comparative analysis and evolution of fish ferritins. *C R Biol.* 336(3): 134-141.

Shike H., C. Shimizu, X. Lauth, J. C. Burns. 2004. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates. *Dev Comp Immunol.* 28(7): 747-754.

Sierra L. M., R. Claro, O. A. Popota. 1994. Alimentación y relaciones tróficas. En: Claro R. (ed.). *Ecología de los peces marinos de Cuba*. Instituto de Oceanología. Academia de Ciencias de Cuba y Centro de Investigaciones de Quintana Roo, México. 263-320p.

Smith V. J., A. P. Desbois, E. A. Dyrinda. 2010. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Mar Drugs.* 8(4): 1213-1262.

Stumpf J. L. 2007. Deferasirox. *Am J Health Syst Pharm.* 64(6): 606-616.

Stintzi A., y K. N. Raymond. 2000. Amonabactin-mediated iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Aeromonas hydrophila*: direct measurement of individual microscopic rate constants. *J Biol Inorg Chem.* 5(1): 57-66.

Subasinghe R. 1997. Fish health and quarantine. En: *Review of the State of the World Aquaculture*. FAO Fisheries circular no. 886. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy. 45-49p.

Suryakala S., y V. Deshpande. 1999. Purification and characterization of liver ferritins from different animal species. *Vet Res Commun.* 23(3): 165-181.

Telford J. R., y K. N. Raymond. 1997. Amonabactin: a family of novel siderophores from a pathogenic bacterium. *J Biol Inorg Chem.* 2(6): 750-761.

Teskeredžić E.,I. Strunjak-Perovic,R. Čož-Rakovac. 2000. *Aeromonas hydrophila* isolated from wild freshwater fish in Croatia. *Vet Res Commun.* 24(6): 371-377.

Theil E. C. 1993. The ferritin family of iron storage proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 63: 421-421.

Theil E. C., yR. S. Eisenstein.2000. Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron responsive elements (iso-IREs). *J Biol Chem.*

Thomson D.,L.Findley, A. Kerstich. 2000. Reef fishes of the Sea of Cortez. The Rocky-Shore Fishes of the Gulf of California, University of Texas Press,Tercera edición. Texas. 374p.

Toe A.,N. Areechon, P. Srisapoome. 2012. Molecular characterization and immunological response analysis of a novel transferrin-like, pacifastin heavy chain protein in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Fish shellfish immunol.* 33(4): 801-812.

Toranzo A. E., B. Magariños, J. L. Romalde.2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture.* 246(1): 37-61

Trust T. J. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. *Annu Rev Microbiol.* 40(1): 479-502.

Uribe C.,H. Folch,R. Enriquez, G. Moran. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med-CZECH.* 56(10): 486-503.

VanOrden H. E., yT. M. Hagemann.2006. Deferasirox—an oral agent for chronic iron overload. *Ann Pharmacother.* 40(6): 1110-1117.

Verschuere, L.,G. Rombaut,P.Sorgeloos, W.Verstraete. 2000. Probiotic bacteria asbiological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 655-671.

Walker E. M., yS. M. Walker. 2000. Effects of iron overload on the immune system. *Ann Clin Lab Sci.* 30(4): 354-365.

Wang W., Zhang M., Sun L. 2011. Ferritin M of *Cynoglossus semilaevis*: an iron-binding protein and a broad-spectrum antimicrobial that depends on the integrity of the ferroxidase center and nucleation center for biological activity. *Fish shellfish immunol.* 31(2): 269-274.

Wei W., H. Xu, Q. Wang, X. Zhang, K. Chang, C. Wu, Y. Zhang. 2009. Identification of differentially expressed genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) induced by attenuated live *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture.* 291(1): 124-129.

Wood C. M., A. P. Farrell, C. J. Brauner. 2011. Homeostasis and toxicology of essential metals. (Vol. 1), Academic Press. Primera edición. Londo, U.K. 497p.

Wu C., W. Zhang, K. Mai, W. Xu, X. Wang, H. Ma, Z. Liufu. 2010. Transcriptional up-regulation of a novel ferritin homolog in abalone *Haliotis discus hannai Ino* by dietary iron. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 152(4): 424-432.

Yamashita M., N. Ojima, T. Sakamoto. 1996. Molecular cloning and cold-inducible gene expression of ferritin H subunit isoforms in rainbow trout cells. *J Biophys Chem.*, 271(43): 26908-26913.

Yang F., J. B. Lum, J. R. McGill, C. M. Moore, S. L. Naylor, P. H. Van Bragt, W. D. Baldwin, B. H. Bowman. 1984. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci.* 81(9): 2752-2756.

Zhang X., W. Wei, H. Wu, H. Xu, K. Chang, Y. Zhang. 2010. Gene cloning and characterization of ferritin H and M subunits from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Fish shellfish immunol.* 28(5): 735-742.

Zhao G.,F. Bou-Abdallah,P. Arosio,S. Levi,C. Janus-Chandler, N. DChasteen. 2003. Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide. *Biochemistry*. 42(10): 3142-3150.

Zheng W. J.,Y. H. Hu, L. Sun. 2010. Identification and analysis of a *Scophthalmus maximus* ferritin that is regulated at transcription level by oxidative stress and bacterial infection. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 156(3): 222-228.

11. PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

Del trabajo de investigación de esta tesis, se generó:

1. Reyes-Becerril, M., Angulo-Valadez, C., Macias, M. E., **Angulo, M.**, Ascencio-Valle, F. (2014). Iron bioavailability in larvae yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*): Cloning and expression analysis of ferritin-H. *Fish & shellfish immunology*, 37(2), 248-255.

2. Artículo sometido a *Fish & Shellfish Immunology* el **23 Julio 2015**.
Martha Reyes-Becerril, Carlos Angulo, **Miriam Angulo**, Felipe Ascencio-Valle. Changes in transferrin and ferritin-H gene expression after iron chelator and iron overload therapy through *Aeromonas hydrophila* infection in yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*)”.