



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFEECTO DE OLIGODEOXINUCLEOTIDOS CpG  
SOBRE LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA  
INMUNE, ANTIOXIDANTE Y MORFOLOGÍA  
INTESTINAL DE PARGO AMARILLO (*Lutjanus  
argentiventris*)**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

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

Presenta

**YLENIA MURILLO HIGUERA**

La Paz, Baja California Sur, enero 2017.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:20 horas del día 16 del Mes de ENERO del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

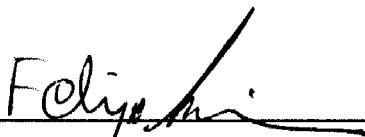
**"EFECTO DE OLIGODEOXINUCLEOTIDOS CpG SOBRE LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE, ANTIOXIDANTE Y MORFOLOGÍA INTESTINAL DE PARGO AMARILLO (*Lutjanus argentiventris*)"**

Presentada por el alumno:

**Murillo Higuera Ylenia**

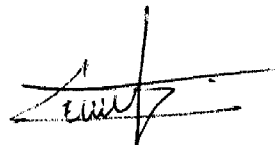
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

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



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Director de Tesis

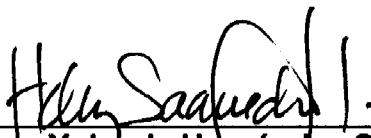
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos E. Angulo Valadez  
Co-Tutor



Dra. Gracia A. Gomez Anduro  
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Carlos E. Angulo Valadez

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dra. Gracia A. Gómez Anduro

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Carlos E. Angulo Valadez

Dra. Gracia A. Gómez Anduro

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Carlos E. Angulo Valadez

Dra. Gracia A. Gómez Anduro

## **SUPLENTE**

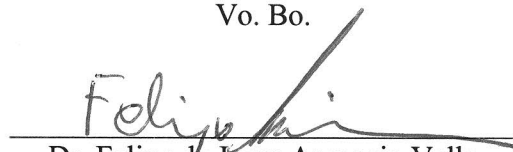
Dr. Dariel Tovar Ramírez

## RESUMEN

Los oligodeoxinucleótidos Citocina- Guanina (ODN CpG) son secuencias sintéticas cortas de ADN que contiene dinucleótidos CpG no metilados reconocidos a través del Receptor Tipo Toll-9 (TLR9), que han demostrado activar el sistema inmune de peces al ser administrados vía intraperitoneal, sin presentar daño histopatológico asociado a la inmunoestimulación. Sin embargo este efecto depende de la longitud de la secuencia, el número de motivos CpG, posición, espaciado y las bases circundantes de estos motivos, catalogándolos como especie-específico. Actualmente, el estudio de los órganos asociados a la producción de mucus en peces (como la piel, branquias, nasofaringe e intestino) ha ido en incremento, por ser el primer contacto entre agentes patógenos y huésped, resultando ser una de las primeras barreras del sistema inmune. Sin embargo, se desconoce si los ODN CpG pueden tener un efecto inmunoestimulante en este tipo de tejido en peces, específicamente en la producción de mucus. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto inmunoestimulante de diferentes ODN CpG sintéticos en el pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*). Se llevó a cabo un experimento *in vivo* con juveniles (*L. argentiventris*), donde se evaluaron 7 diferentes tratamientos (inyección intraperitoneal), cinco tratamientos con diferentes CpGs, un tratamiento con *Vibrio parahaemolyticus* + PBS y un control con PBS. Se realizaron cuatro muestreos (día 1, 3, 7 y 10) de hígado, bazo e intestino. Se determinó la actividad enzimática antioxidante, expresión de genes inmunorelevantes, el análisis histológico de intestino por microscopía óptica, así como la cuantificación de mucinas ácidas y neutras. Los resultados obtenidos demostraron que los ODN CpG1826, 1670 y 2006, tienen la capacidad de modular la expresión tanto en bazo como intestino de interleucinas proinflamatorias *IL- $\beta$*  e *IL-8* (4 veces más que el control), factores de transcripción asociados a la maduración de células T y B (*ILF2/NF45*) y producción de interferón (*IRF7*). Así mismo, se observó un incremento en la producción de mucinas neutras sin registro de daños histopatológicos en intestino; no se observó un efecto significativo en la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT) descartando un posible efecto por estrés. Así mismo, pudimos comprobar que uno de los principales componentes que afecta la respuesta inmune de *L. argentiventris* por la administración vía intraperitoneal de ODN CpG, tanto en bazo como en intestino, son los factores humorales asociados a la respuesta proinflamatoria. Sin embargo, no se observó la sobreexpresión de *TLR9* y *NF $\kappa$ B*, sugiriendo un posible efecto de regulación negativa en la expresión o el reconocimiento por el *TLR21*, un homólogo del patrón de reconocimiento de *TLR9* en peces y aves.

**Palabras clave:** *Teleósteos, Receptor tipo toll, GALT, inmunoestimulación.*

Vo. Bo.

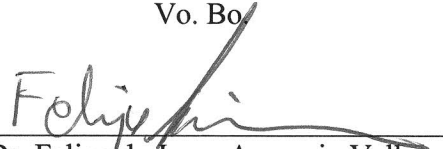
  
Dr. Felipe de Jesus Ascencio Valle  
Director de Tesis

## SUMMARY

Cytosine-Guanine oligonucleotides (CpG ODN) are synthetic short-DNA sequences with non-methylated CpG motifs recognized by Toll-like receptor 9, has improved the response of immune system when are intraperitoneally administered, without histopathological injury associated to immunostimulation. However, their actions are depending of CpG motifs spacing, position, surrounding bases and sequence length, being species-specific. Recently research of organs associated production mucus has been increasing, for being the first interaction between pathogens and host considering it an immune barrier. Nevertheless, the immunostimulatory effect by the CpG ODN on this type of fish organs are unknown, specially mucus production. Therefore, the objective of this research was to evaluate the immunostimulatory effect of different synthetic ODN CpG on yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*). Five CpG ODN and *Vibrio parahemolyticus* were administered by intraperitoneally injection on juveniles yellow snapper, PBS was use as a negative control. Four sampling (day 1, 3, 7, 10) of liver, spleen and gut were performed. Antioxidant enzymatic activity, quantification of immunorelevant genes, intestinal histological analysis by optical microscopy, as well as the quantification of acid and neutral mucins were determined. The results obtained demonstrated that CpG ODNs 1826, 1670 and 2006 have the ability to modulate spleen and gut expression of proinflammatory IL- $\beta$  and IL-8 interleukins (4 times more than control), and associated transcription factors on T and B cells maturation (ILF2 / NF45) and interferon production (IRF7). A neutral mucin increase was also observed, without histopathological intestine damage. There was no significant effect on antioxidant enzymes activity (SOD, CAT) ruling out a possible stress effect. Likewise, we verified through a factorial analysis that one of the main components that affects the immune response of *L. argentiventris* by the intraperitoneal administration of CpG ODN in spleen and intestine are the humoral factors associated with the pro-inflammatory response. No overexpression of TLR9 and NF $\kappa$ B was register, suggesting a TLR9 expression negative regulatory effect or recognition by TLR 21, a homologue recognition receptor TLR9 on fish and birds.

**Key words:** Teleosts, Toll-like receptor, GALT, immunostimulaton.

Vo. Bo

  
Dr. Felipe de Jesus Ascencio Valle  
Director de Tesis

## **DEDICATORIA**

“Con amor y respeto:

Para mi familia, que me han visto caer y levantarme.

Gracias por creer en mí”

## **AGRADECIMIENTOS**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por permitirme realizar mis estudios de posgrado de maestría. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca No.337406 otorgada.

A la Dirección de Estudios de Posgrado por todas las facilidades otorgadas en trámites realizados, en especial a Tania Veronica Núñez Valdez del Departamento de Control Escolar y al Lic. Horacio Sandoval Gómez del Laboratorio de Cómputo por permitirnos hacer uso de las instalaciones en periodo de extraclase.

A mi Director de tesis, el Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, por darme la libertad de aventurarme en este trayecto, por confiar y creer en mí.

Mis Tutores, el Dr. Carlos E. Angulo y la Dra. Gracia A. Gómez, por todas sus correcciones, aportaciones y consejos en el desarrollo de esta tesis.

Dr. Juan Carlos Pérez, por la amable donación de los organismos empleados.

M. en C. Pablo Monsalvo Spencer del Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos y al Biol. Gabriel Robles del Laboratorio de Cultivo de Moluscos, así como a la M. en C. Miriam G. Angulo y IBQ. Rodolfo Osuna, por su apoyo durante la realización del bioensayo y participación en los muestreos.

Dra. Martha C. Reyes Becerril, técnico de Laboratorio de Patogénesis Microbiana, por sus ideas y apoyo en el desarrollo metodológico del proyecto, así como su cariño y preocupación durante mi estancia en el CIBNOR.

M. en C. Julio A. Hernández, técnico del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por permitirme hacer uso de equipos y reactivos, pero principalmente por su amistad.

Biol. Patricia Hinojosa Baltazar técnico del Laboratorio de Fisiología Comparada y la Técnico en Acuicultura María Eulalia Meza Chávez del Laboratorio de Histología e Histoquímica, al responsable del Laboratorio de Genética Molecular, M. en C. Delia Irene Rojas Posadas por el acceso a laboratorio y uso de equipo; así mismo me gustaría agradecer a la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo por las asesorías otorgadas en las técnicas e interpretación de datos de histológicos e histoquímicas.

De manera muy particular me gustaría agradecer al responsable del Laboratorio de Microscopía Electrónica Ariel Arturo Cruz Villacorta, por su cariño y conocimientos compartidos.

Brindar mi más sincero agradecimiento a todos mis compañeros y amigos de los laboratorios de Patogénesis Microbiana, Biología Molecular de Plantas y del grupo de Inmunología y Vacunología. En especial al Dr. Mario Rojas, M. en C. Beatríz Meza, IBQ. Erika Alamillo, M. en C. Esteban Velázquez, Dra. Gorrete Solís, M. en C. Yeni Morales por todos los conocimientos brindados, por sus aportaciones y apoyo en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de la maestría. Sergio (Dr.) ha sido un placer coincidir con Usted, gracias por su amistad, su cariño, por las tardes de estadística y qPCR. Eric (mi gordo-amigo), solo nos queda transcender, gracias por tu compañía, tus consejos, las noche de alitas y artesanales. Annie ha sido un placer caer y levantarme a tu lado, tu amistad es muy valiosa para mí, gracias. Yunti, el primer año de maestría no tendría sentido si no tu hubiera conocido, en la distancia conservo nuestra amistad. Crys y Ricardo muchas gracias por los buenos momentos compartidos, los llevó con gran cariño cerca de mi corazón.

Muy en especial a mis amigos Rubí y Hamid. Gracias por su amistad, por los viajes, las comidas, fiestas, atardeceres, amaneceres, por la ciencia, los objetivos logrados y por lo que no también, por apoyarme en mis mejores y peores momentos. Ustedes no solo son mis amigos, son mi familia y siempre estaré orgullosa de ustedes. Gracias por quererme y preocuparse por mí, pero sobre todo por confiar en mí, cuando ni yo lo hacía.

Hamid, bendigo el momento en que la vida te puso frente a mí. Lo hizo cuando más necesitaba de un amigo que me entendiera, para así poder superarme y crecer juntos. Gracias por ser mi compañero de vida en ese momento, te quiero mucho amigo.

Rubís, tu eres mi persona. No puedo pedirle a Dios mejor amiga que tú. Gracias por dejarme ser parte de tu vida, por tu apoyo como profesionista, mujer y persona. He tenido el gusto de compartir esta etapa contigo y espero en Dios me conceda ser parte de muchas más.

Pero sobre todo, quiero agradecer a mi familia. A mis padres por su apoyo incondicional, por permitirme poco a poco ir cumpliendo mis sueños, por su paciencia, su ternura y amor. A mis hermanas que han sido mi soporte y mi fuente de inspiración. Gracias por seguir creyendo en mí.

Y por sobre todas las cosas a Dios, por darme la fuerza, la esperanza para continuar este viaje, por dejar en mi vida solo lo indispensable, lo verdadero.

*“Podrás arrastrarme en el fango y a pesar de todo, como el polvo me levantaré” – Maya Angelou.*



## CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	ii
<b>Summary</b> .....	iii
<b>Dedicatoria</b> .....	iv
<b>Agradecimientos</b> .....	v
<b>Contenido</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	ix
<b>Lista de tablas</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Impulso de la acuicultura en México. ....	3
2.2 <i>Lutjanus argentiventris</i> como modelo de estudio.....	4
2.3 Panorama de salud de acuicultura .....	5
2.3 Respuesta inmune en teleósteos.....	6
2.3.1 Respuesta inmune innata. ....	6
2.3.2 Respuesta inmune adaptativa. ....	9
2.4 Inmunidad de las mucosas .....	11
2.4.1 Tejido linfoide asociado intestino (GALT) .....	11
2.5 Receptores de Reconocimiento de Patrones .....	13
2.5.1 Receptores Tipo Toll (TLR).....	14
2.5.2 Activación y señalización mediada por TLRs.....	14
2.6 Oligonucleótidos CpG y su uso como inmunoestimulantes en peces. ....	17
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>5. PREGUNTA CIENTÍFICA</b> .....	22
<b>6. HIPOTESIS</b> .....	22
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	22
7.1 Objetivo general.....	22
7.2 Objetivos particulares .....	22
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	23
6.1 Bioensayo con peces juveniles .....	23
6.1.1 <i>Lutjanus argentiventris</i> .....	23
6.1.2 Diseño experimental y muestreo. ....	23
6.3. Cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes. ....	25
6.3.1. Obtención de muestra. ....	25

6.3.2. Actividad de la enzima superóxido dismutasa. ....	25
6.3.3. Actividad de la enzima catalasa. ....	26
6.4. Análisis morfológico del tejido intestinal. ....	26
6.4. Cuantificación por PCR en tiempo real de genes relacionados con el sistema inmune. ....	27
6.4.1 Extracción de ácido ribonucleico total (ARN) y síntesis de ADN complementario (cDNA). ....	27
6.4.2 Oligos empleados en RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR).....	28
6.4.3Estandarización de la eficiencia de amplificación de genes empleados en RT-qPCR.....	33
6.4.4 Análisis de estabilidad del gen de referencia. ....	34
6.4.5 Análisis de la expresión génica diferencial .....	35
6.7 Análisis estadístico. ....	36
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
7.1 Actividad de enzimas antioxidantes. ....	37
7.2 Análisis histológico de muestras de intestino. ....	39
7.3 Genes empleados en el análisis de cuantificación de expresión de genes. ....	43
7.3.1 Obtención de secuencias específicas de <i>Lutjanus argentiventris</i> .....	43
7.3.2 Evaluación de la estabilidad de genes de referencia .....	45
7.4 Cuantificación de la expresión relativa de genes inmunorelevantes .....	46
7.5 Análisis de correlación entre variable determinadas. ....	51
7.5.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	52
7.5.2 ODN CpG 1668.....	53
7.5.3 ODN CpG 1826.....	54
7.5.4 ODN CpG D.....	55
7.5.5 ODN CpG 1670.....	55
7.5.6 ODN CpG 2006.....	56
<b>8. DISCUSIÓN.</b> .....	<b>58</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>70</b>
<b>11. LITERATURA CITADA.</b> .....	<b>71</b>

## Lista de figuras.

<b>Figura 1.</b> Distribución del <i>Lutjanus argentiventris</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Vía de señalización de TLRs en peces.....	16
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental de bloques.....	23
<b>Figura 4.</b> Resultados actividad antioxidante CAT-SOD .....	38
<b>Figura 5.</b> Fotografías de intestino. Microscopía óptica .....	41
<b>Figura 6.</b> Amplicones generados con el diseño de oligos inespecíficos.....	43
<b>Figura 7.</b> Amplicones con oligos específicos de los genes <i>IL8</i> , <i>IRF7</i> , <i>TLR9</i> .....	44
<b>Figura 8.</b> Curvas de disociación de oligos específicos para qPCR.....	45
<b>Figura 9.</b> Curvas de disociación de oligos específicos qPCR: 18S, B-actina, EF-1 $\alpha$ .....	45
<b>Figura 10.</b> Análisis de estabilidad de genes de referencia.....	46
<b>Figura 11.</b> Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en bazo.....	47
<b>Figura 12.</b> Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en intestino.....	48
<b>Figura 13.</b> Matriz de correlación de Pearson tratamiento con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	52
<b>Figura 14.</b> Matriz de correlación de Pearson tratamientoODN CpG 1668.....	53
<b>Figura 15.</b> Matriz de correlación de Pearson tratamientoODN CpG 1826.....	54
<b>Figura 16.</b> Matriz de correlación de Pearson tratamientoODN CpG 1670.....	56
<b>Figura 17.</b> Matriz de correlación de Pearson tratamientoODN CpG 2006.....	57

**Lista de tablas.**

<b>Tabla I.</b> Tratamientos empleados en el bioensayo con peces juveniles .....	24
<b>Tabla II.</b> Oligos empleados en el análisis de la expresión relativa.....	32
<b>Tabla III.</b> Valores de eficiencia de reacción de oligos evaluados.....	34
<b>Tabla IV.</b> Efecto de ODN CpG sobre la actividad de enzimas antioxidantes.....	37
<b>Tabla V.</b> Resultados de cuantificación morfológica en intestino.....	40
<b>Tabla VI.</b> Determinación de variables histopatológicas.....	42
<b>Tabla VII.</b> Resultados de alineamiento local de secuencias específicas de <i>Lutjanus argentiventris</i> .....	43
<b>Tabla VIII.</b> Clasificación de variables para el análisis factorial.....	51
<b>Tabla IX.</b> Tratamiento con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	53
<b>Tabla X.</b> Tratamiento ODN CpG 1668.....	54
<b>Tabla XI.</b> Tratamiento ODN CpG 1826.....	55
<b>Tabla XII.</b> Tratamiento ODN CpG 1670. ....	56
<b>Tabla XIII.</b> Tratamiento ODN CpG 2006.....	57

## 1. INTRODUCCIÓN

Ante el contexto del cambio climático, la incertidumbre financiera y económica, y la alta competencia por los recursos naturales, la acuicultura representa una actividad económica, fuente importante de alimentos (FAO, 2014, 2016). En el año de 2014 la acuicultura representó el 44% de producción pesquera teniendo ganancias que ascienden a US\$160.2 billiones (FAO, 2016). En México el mayor desarrollo de acuicultura tanto en volumen como valor se encuentra en el Noroeste del país (CONAPESCA, 2014). En la península de Baja California, Baja California Sur y Sonora se tiene el mayor número de proyectos sobre peces marinos, algunos en fase experimental y otros con experiencia comercial como el cultivo de atún en ranchos marinos, al norte de la ciudad de Ensenada B.C. e Isla Cedros B. C. S (Avilés-Quevedo, 2002; INAPESCA, 2015).

Actualmente el fomento a la maricultura de especies demersales (huachinango, huachinango rojo, lisa, pargo, tiburón, cazón, peto, macarela reina) se ha incrementado, esto debido a su alto valor comercial, su reproducción y la capacidad de desarrollarse en los sistemas de cultivo ya sea en tierra o en jaulas reproductoras (SAGARPA, 2013). *Lutjanus argentiventris* o pargo amarillo como comúnmente es conocido, se encuentra estrechamente ligado al fondo rocoso de la plataforma continental, habitando principalmente arrecifes rocosos y/o coralinos, manglares, y en algunas ocasiones en zonas arenosas de hasta 60m de profundidad (Aburto, 2007; Aburto-Orepeza *et al.*, 2009; TinHan *et al.*, 2014). El cultivo de esta especie se encuentra en fase experimental (Guerrero-Tortolero *et al.*, 1999; Muhlia-Melo *et al.*, 2003; Piñon *et al.*, 2009; Maldonado-García *et al.*, 2012; Lucano-Ramírez *et al.*, 2014), sin embargo, las condiciones de cultivo, provocan en los peces un estado de estrés debilitando el estado de salud de los organismos y comprometiendo su sistema inmune ante la infección de organismos oportunistas.

Las buenas prácticas de manejo en los sistemas de producción acuícola son puntos de control en el cultivo de peces, sin embargo es necesario contar con medidas de prevención que no comprometan la pérdida total de los cultivos ante enfermedades (Faruk *et al.*, 2004; Bondad-Reantaso *et al.*, 2005; Alda *et al.*, 2010). En la actualidad se impulsa en sobremanera el uso de inmunoestimulantes, moléculas orgánicas o inorgánicas que tienen como objetivo

activar o incrementar la respuesta inmune innata o la respuesta específica (adaptativa) (Petrunov *et al.*, 2007; Labh y Shakya, 2014).

Una de las estrategias empleadas en este trabajo refiere al uso de oligodeoxinucleotidos Citocina-Guanina (ODN CpG). Los ODN CpG son secuencias sintéticas de DNA que asemejan los motivos repetidos CpG en el DNA bacteriano y parásitos, reconocidos por el receptor tipo toll 9 (TLR9) (Krieg, 2002; Teixeira *et al.*, 2002); estos ODN CpG incrementan la diferenciación de células de memoria, modulan la producción de citocinas proinflamatorias, incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno y no provocan daños histológicos asociados a la inmunoestimulación (Krieg *et al.*, 1995, 2002; Klinman, 2004; Byadgi *et al.*, 2014a); todo esto confiere al huésped protección inmunitaria, manteniéndolo en un estado de alerta ante la infección de patógenos (Labh y Shakya, 2014). Sin embargo, el efecto de estas secuencias se ha reportado depende de su longitud, el número de motivos CpG, posición, espaciado y las bases circundantes de estos motivos, además de ser descritos como especie-específico (Yeh *et al.*, 2013).

Actualmente, no se cuentan con reportes del uso de ODN CpG en pargo amarillo, por lo que su estudio representa un aporte al conocimiento científico y como generación en nuevas alternativas de inmunoestimulantes en el área de acuicultura, con perspectivas de uso como medida profiláctica.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Impulso de la acuicultura en México.

De acuerdo al reporte de la FAO (2016) la acuicultura en el 2014 representó cerca el 44.1% (73.8 millones de toneladas) de la producción de organismos marinos para consumo, teniendo ganancias de \$160.2 billones US. En México, esta actividad está en vías de desarrollo, sin embargo, el país se encuentra dentro de los 18 mayores países productores de captura de pesca ocupando el número 16 con una producción neta de 1 467 790 toneladas (FAO, 2014). El impulso a la acuicultura en el país no solo radica en satisfacer la demanda alimenticia, sino también en la generación de empleos y conservación de especies nativas (Cámara de Diputados de los Estados Unidos Mexicanos, 2013).

Las especies empleadas en acuicultura en México generalmente corresponden a organismos exóticos y/o a especies distribuidas a lo largo de la línea continental pero que no son endémicas, esta introducción de especies, se teme llegue a desplazar la especies nativas provocando un desequilibrio de las cadenas tróficas y por tanto el nicho ecológico de las demás especies (Okolodkov *et al.*, 2007; Ibañez *et al.*, 2011; Mendoza-Alfaro *et al.*, 2011).

Por otra parte, el sesgo en la información recaudada en los avisos de arribo de la pesca ribereña, limita la toma de decisiones en el manejo pesquero de peces con escama; ejemplo de ello el alto porcentaje de captura de diferentes especies de pargo en el estado de Guerrero (44%) o en el noroeste mexicano (50%), sin ningún tipo de norma que regule su extracción o conservación (Olivera, 2010; CONAPESCA, 2013; Díaz-Uribe *et al.*, 2013; IUCN, 2015).

Es por ello que la mira de especies con potencial acuícola está siendo dirigida a organismos nativos. Reflejo de este impulso, es la inclusión a la Carta Nacional Acuícola (SAGARPA, 2013), de especies de pargo como huachinango del pacífico (*Lutjanus peru*) y al pargo lunajero (*Lutjanus gattatus*), donde se reporta la etapa completa en la engorda y parcial en la reproducción y crianza larvaria para *L. peru*. Mientras que para *L. gattatus* se cuenta con la etapa completa para la reproducción, larvicultura y pre-engorda, e incompleta para la engorda comercial. El cultivo de estas especies se encuentra en fase experimental en diferentes estados como Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Sinaloa y

Baja California Sur. Siguiendo con el impulso de especies nativas y con la finalidad de variar la dieta del consumidor se proponen nuevas alternativas de especies con potencial acuícola, como es el pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*).

## 2.2 *Lutjanus argentiventris* como modelo de estudio.

El pargo amarillo como es conocido tradicionalmente, es una especie perteneciente a la familia de los Lutjanidos. Se distribuye del sur de California hasta Perú como se puede observar en la figura 1. Este pez habita los fondos rocosos asociados a arrecifes o manglares, donde se alimenta de moluscos (pulpo), pequeños peces y crustáceos (Aburto *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2008). En la base de datos Fishbase (<http://www.fishbase.org/summary/1408>) se han reportado organismos 71cm de longitud y 13kg de peso. Estudios realizados por Piñón *et al.* (2009) reporta que el ciclo reproductivo de las hembras de pargo amarillo corresponde en el periodo de verano e invierno, con un desarrollo gonadal asincrónico.



**Figura 1.** Distribución geográfica de *Lutjanus argentiventris*. Los puntos rojos denotan los sitios de mayor incidencia de la especie (Tomado de: [http://www.aquamaps.org/receive.php?type\\_of\\_map=regular](http://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular)).



En Baja California Sur, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) y en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas – Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) a partir del año de 1999 inicia con estudios de desarrollo en confinamiento de la especie. En los reportos emitidos se informa sobre la adaptabilidad que posee el pargo amarillo al confinamiento, la capacidad de desovar espontáneamente, una alta tasa de supervivencia superior al 90% y la necesidad de dietas ricas en 55% de proteína cruda para un óptimo crecimiento y eficiencia en la utilización del alimento (Guerrero-Tortolero *et al.*, 1999; Muhlia-Melo *et al.*, 2003; Silva-Hernández, 2004; Maldonado-García *et al.*, 2012). Dadas las características anteriores, además de que en las últimas tres décadas se ha disminuido la población y talla de captura de pargo amarillo y no se cuentan con normas que regulen la pesca artesanal (Piñón *et al.*, 2009), esta especie resulta un interesante modelo de estudio en acuicultura.

### **2.3 Panorama de salud de acuicultura**

A pesar de que no existe una tecnología estándar del cultivo de peces marinos en el país, durante el desarrollo experimental en confinamiento, diferentes factores químicos, físicos o biológicos pueden generar estrés en los peces debilitando su estado de salud y por consecuencia volverse susceptibles a enfermedades (SAGARPA, 2013).

Algunas de estas enfermedades pueden llegarse a traducir a grandes pérdidas económicas, las cuales pueden dividirse en dos grupos principales. En primer lugar, las debidas a una mortalidad aguda o causada por gérmenes patógenos conocidos, y, en segundo lugar, las derivadas de una baja tasa de supervivencia, cuyo origen no termina de identificarse (Lafferty *et al.*, 2015). Japón como Bangladesh han reportado pérdidas que ascienden a \$1.4 millones de dólares y el 15% del costo de producción por enfermedades. (Faruk *et al.*, 2004; Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). Mientras que en Corea del Sur, se ha reportado un porcentaje de mortalidad del 5-70% de *Paralichthys olivaceus* por *Edwardsiella tarda* en una producción de 28 millones de euros (Rodger, 2005). Así mismo, Shinn *et al.* (2015) estiman que las pérdidas asociadas a enfermedades provocadas por parásitos en el cultivo de peces a nivel mundial van desde \$107.31 millones a \$134.14 millones de dólares.

Una revisión realizada por Laffertety *et al.* (2015) se estima que las pérdidas económicas asociadas a enfermedades en salmón y mero pueden llegar al 85% incluso el 100% de la producción. De estas enfermedades el 34% son provocadas por bacterias, donde el 49% corresponden a infecciones en peces. Existen diferentes microorganismos que pueden causar enfermedades en peces bajo las condiciones óptimas de desarrollo, entre ellas encontramos a especies de los generos *Mycobacterium*, *Streptococcus* y *Vibrio*.

Las especies de *Vibrio*, no solo tienen la capacidad de infectar peces, sino también son cepas patógenas para el ser humano, el foco de infección se ha asociado a la ingesta de pescado crudo, donde estos microorganismos pueden provocar enfermedades como gastroenteritis o septicemia hemorrágica (Khouadja *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014; Lafferty *et al.*, 2015; Karunasagar, 2015). Sin embargo, ¿de qué forma los organismos se defienden de estos patógenos?

### **2.3 Respuesta inmune en teleósteos.**

Al igual que vertebrados superiores los peces han desarrollado un sistema efectivo de reconocimiento de patógenos o moléculas externas (antígeno), que activan distintas rutas de señalización que desencadenan mecanismos que pueden eliminarlos. Conocida como la respuesta inmune, esta se puede dividir en dos tipos: respuesta innata y adaptativa. Tanto la respuesta innata como adaptativa esta mediada por una serie de factores solubles y de células que constituyen la respuesta humoral y celular (Secombes y Wang, 2012).

#### **2.3.1 Respuesta inmune innata.**

La respuesta inmune innata humoral refiere a formas solubles o como receptores de membrana. Estos no solo actúan como la primera línea de defensa frente patógenos, sino también juega un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Entre estos factores se encuentran: péptidos antimicrobianos, inhibidores de proteasas, inhibidor de crecimiento, enzimas líticas, inmunoglobulinas naturales, entre otros (Kum y Sekkin, 2011). Por otra parte, la inmunidad celular innata comprende diferentes mecanismos defensivos: la inflamación, la fagocitosis y la citotoxicidad no específica, donde participan

células que fagocitan (macrófagos/monocitos, neutrófilos, células dendríticas), células cebadas, células citotóxicas no específicas y mastocitos (Gomez *et al.*, 2013).

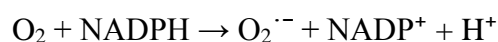
La inflamación se caracteriza por el incremento de irrigación sanguínea en el área afectada, el aumento en la permeabilidad capilar y la migración de leucocitos al tejido dañado. Este proceso puede iniciar rápidamente, al cabo de una hora posterior al desafío, y alcanzar su pico máximo después de dos días, lo cual se denomina inflamación aguda. Sin embargo si esta persiste puede conducir a la formación de granulomas o encapsulamiento de las fuentes antigénicas, denominándose inflamación crónica (Manning, 1998; Secombes, 1996). El proceso de fagocitosis en peces incluye la etapa de reconocimiento, unión, incorporación, destrucción y digestión del antígeno, un proceso conservado entre especies; diversos factores estimulan por opsonización el proceso de fagocitosis, entre ellos están las lectinas, la proteína C reactiva, el complemento, anticuerpos, etc. (Manning, 1998; Secombes, 1996). Además de fagocitar, los macrófagos colaboran de manera directa con los linfocitos por medio de la presentación de antígenos y la secreción de citoquinas (Kum y Sekkin, 2011; Alejo y Tafalla, 2011).

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas por macrófagos, linfocitos, granulocitos, células dendríticas y células epiteliales; y pueden dividirse en interferones (IFN), interlucinas (IL), factor de necrosis tumoral (TNF) y quimiocinas (Savan y Sakai, 2006). Generalmente las citoquinas producidas por macrófagos se clasifican como pro-inflamatorias ya que participan en el reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el tejido infectado, así como la activación de los mismos para la eliminación de patógenos; y entre estas podemos encontrar a: IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  y quimiocinas como IL-8 y MCP-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1) (Zhu *et al.*, 2013).

Además de participar como un elemento clave en la degradación de patógenos los fagocitos cuentan con una maquinaria oxidativa y reductora denominada, el incremento de la explosión respiratoria dependiente de oxígeno (oxygen-dependent respiratory burst), que resulta en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO, o ROS por sus siglas en

inglés), como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso (Grayfer *et al.*, 2014).

La generación de estas especies reactivas son derivadas de la reducción de oxígeno ( $O_2$ ) a anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) catalizada por una multicomponente NADPH oxidasa, la cual emplea NADPH como agente reductor. Los componentes de esta enzima se encuentran separados entre el citosol y la membrana plasmática de macrófagos y neutrofilos. Cuando las células son estimuladas, el complejo del citosol compuesto por p47phox/p67phx/p40phox y la GTPasa Rac1/Rac2, se transloca hacia membrana plasmática, formando un nuevo complejo unión membrana con las subunidades de flavocitocromo, gp91phox y p22phox. El ensamblaje de este complejo proteico le permite emplear el NADPH presente en el citosol reduciendo el oxígeno molecular (Forman y Torres, 2002).



La mayoría de este  $O_2^{\cdot-}$  reacciona rápidamente consigo mismo, al dismutarse produce oxígeno y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), las cuales son especies más inestables que pueden dañar a la célula. Para mantener la homeostasis celular de las EROs, el organismo cuenta con una maquinaria enzimática antioxidante dependiente o no de enzimas, siendo la primera la más eficiente. Estas enzimas son superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT), que juegan un papel muy importante en la generación de especies reactivas de oxígeno (Heck *et al.*, 2010). De acuerdo a lo anterior, la peroxidación del ion superóxido a  $H_2O_2$  puede ser acelerada por la enzima SOD con un incremento 104.



A pesar de que el  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  son los principales productos de la explosión respiratoria, no son empleados por los fagocitos para eliminar a los patógenos, ya que  $H_2O_2$  posee una débil actividad microbicida y  $O_2^{\cdot-}$  es completamente inocuo en el citoplasma del fagocito (England, 1984). En cambio son empleados como fuente de producción de agentes oxidantes microbicidas más potentes: halógenos oxidados o radicales oxidantes (Iles y Forman, 2002). No obstante, para evitar el posible daño a la célula la enzima glutatión

peroxidasa (GPX) se encarga de la detoxificación del  $H_2O_2$  no empleado en la producción de estos oxidantes. Además, la enzima catalasa (CAT) también cataliza esta reacción pero su afinidad por el  $H_2O_2$  es menor que la presentada por GPX (Heck *et al.*, 2010; Bhattacharya, 2015).

Además de actuar como agentes antimicrobianos, se ha demostrado que las EROs afectan diferentes rutas y moléculas de señalización; lo que incluye factores de transcripción, tirosina quinasa, tirosina fosfatasa (PTP, por su acrónimo en inglés), la amplia familia de serina-treonina quinazas (ERKs o MAPK quinazas activadas por mitógenos), JNKs (quinasa N-terminal c-jun), y GTPasas pequeñas, entre otras (Hensley *et al.*, 2000; Bedard y Krause, 2007). También se ha demostrado que las EROs pueden regular la producción de citoquinas en macrófagos a través de mecanismo dependiente de  $NF-\kappa\beta$  (Kaul y Forman, 1996; Sanlioglu *et al.*, 2001; Forman y Torres, 2001).

### **2.3.2 Respuesta inmune adaptativa.**

La respuesta inmune adaptativa comprende una red de células, proteínas y genes, altamente efectiva y especializada, que trabajan en conjunto para que un organismo tenga la capacidad de defenderse de un patógeno e incrementar dicha respuesta ante una reinfección. Al igual que la respuesta innata, la respuesta específica o adaptativa, se compone por una respuesta celular y humoral. Las células que caracterizan la respuesta específica son los linfocitos que pueden clasificarse como células B y T, mientras que la respuesta humoral comprende principalmente inmunoglobulinas (anticuerpos), y los productos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por su acrónimo en inglés) que permiten diferenciar la clonación de células B y T (Ellis, 1999; Rauta *et al.*, 2012; Sunyer, 2013).

Las inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas del tipo gamma globulina formadas típicamente por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), las cuales proporcionan dos sitios de unión idénticos a los antígenos en el dominio terminal variable amino (V) de ambas cadenas H y L. El extremo carboxilo terminal en la cadena H es un dominio constante el cual define los diferentes isotipos (clases) de Igs (Secombes y Wang, 2012). En peces se han descrito 5 tipos de inmunoglobulinas, IgM, IgD (equivalente a IgA en mamíferos), IgT, IgZ e IgH que pueden ser expresadas como moléculas de membrana en las células o

secretadas en el plasma (Danilova *et al.*, 2005; Savan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013). Estas Igs tienen como función generar un patrón de reconocimiento de estructuras conservadas en agentes externos, que posteriormente son presentados a células de la respuesta inmune adaptativa (células B) generando memoria, por la clonación de inmunoglobulinas (Zhang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013)

Las células T poseen ciertas moléculas denominadas CD (cluster differentiation), que juegan un papel muy importante en el reconocimiento de células presentadoras de antígenos infectadas, los cuales son CD3, TCR (receptor de células T), CD4+ y CD8+ (Salinas, 2015). La asociación del TCR con CD4+ o CD8+ permite reconocer los péptidos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I ó II) presente en las células presentadoras de antígenos (ACP), activando la función específica de la célula T a través de la vía de fosforilización de tirosina CD3 (Secombes y Wang, 2012; Fischer *et al.*, 2013). TCR/CD8+ está encargado de la función afectora de la inmunidad celular, mediante el reconocimiento del MHC-I, que presenta péptidos antigénicos de origen intracelular (virus), y que tiene como finalidad la destrucción de la célula marcada (T citotóxicas). Mientras que TCR/CD4+, reconoce los péptidos (extracelular) asociados al MHC-II y que activa diferentes respuestas inmunes (T cooperadores), y que se distinguen por el tipo de interleucinas que producen, así como la expresión de factores de transcripción y su función (Castro *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013).

Se pueden diferenciar 4 tipos de células T cooperadoras (Th); Th1, Th2, Th17 e inducible T-reguladora (iTreg). La respuesta Th1 se caracteriza por la producción de IFN, la cual es muy importante ante infecciones por virus. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y IL-25 para expulsar parásitos extracelulares. La respuesta Th17 se caracteriza por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 que controla bacterias extracelulares y hongos. Mientras que la respuesta de iTreg mantiene la tolerancia y regula la homeostasis de linfocitos, mediante un proceso de retroalimentación (feedback) positivo sobre IFN para Th1, IL-4 en Th2, IL-21 para Th17. Mientras que IL-2 es una interleucina que tiene una actividad muy importante al ser responsable de la clonación de células T y participar en la

diferenciación y sobrevivencia de células T afectoras y células NK (Castro *et al.*, 2011; Secombes y Wang, 2012; Fischer *et al.*, 2013)

## **2.4 Inmunidad de las mucosas**

### **2.4.1 Tejido linfoide asociado intestino (GALT)**

De acuerdo con Secombes y Wang (2012), las células involucradas en la respuesta inmune están distribuidas en diferentes órganos y tejidos para que pueden funcionar de una forma más eficiente. Estas estructuras se conoce como sistema linfoide el cual puede estar encapsulada en órganos o distribuido de forma difusa en el tejido linfoide. Los linfocitos, que son una de las principales células que participan en la respuesta inmune, son producidos en los órganos linfoides primarios y funcionan en los órganos linfoides secundarios (Boehm *et al.*, 2012). En peces marinos, los órganos linfoides primarios son el riñón cefálico y el timo; y los secundarios se refieren al bazo y al tejido asociado a mucosas (intestino, branquia, piel, órgano olfativo) (Zapata *et al.*, 2006; Salinas, 2015).

El estudio del tejido asociado a las mucosas, específicamente en intestino (GALT, por sus siglas en inglés) ha tenido un alto realce en los últimos años, al ser el principal punto de encuentro entre patógenos ó bacterias comensales, y el huésped (Sommer y Bäckhed, 2013). Además, en intestino se han descrito un gran número de componentes de la respuesta inmune, principalmente células reconocedoras de patrones moleculares asociados a patógenos, células presentadoras de antígenos y células productoras de anticuerpos (Hébert *et al.*, 2002; Fuglem *et al.*, 2010), donde evidencia científica afirma que en carpa, estas células son primeramente generadas en intestino antes que en órganos linfoides primarios, como el timo (Huttenhuis *et al.*, 2006).

El GALT, juega un doble papel en los organismos: la digestión/absorción de nutrientes y en mantener la homeostasis inmune, al proteger contra microorganismos potencialmente dañinos (Salinas, 2015). Comparado con mamíferos, en peces el GALT está organizado de una forma menos compleja, ya que no aparece formando agregados estructurados como son las placas de Peyer y la formación de criptas no está completamente definida, más bien asemejan invaginaciones del epitelio que se denominan pseudocriptas

(Petersen, 2015). De manera general, el tejido intestinal está compuesto por cuatro capas que, desde dentro de la luz del tracto digestivo hacia fuera son: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La capa mucosa está formada por un epitelio con su correspondiente membrana basal y bajo ella una capa de tejido conectivo denominada lamina propia. La submucosa está constituida por fibras de tejido conectivo, y la muscular se divide a su vez en dos, la muscular interna (fibras musculares dispuestas longitudinalmente) y la externa (fibras musculares dispuestas de forma circular). Por último, la serosa está compuesta por fibras de tejido conectivo laxo y un epitelio plano simple. Las células linfoides encontradas en el intestino de peces se localizan tanto en el epitelio (y se denominan leucocitos intraepiteliales, IELs por sus siglas en inglés) como en la lámina propia (denominándose leucocitos de la lámina propia o LPLs) (Rombout *et al.*, 1993, 2011).

Al igual que en vertebrados superiores el intestino de peces produce constantemente glicoproteínas denominadas mucinas que recubre la lamina propia proporcionando el espacio para llevar a cabo el intercambio molecular entre componentes exógenos y los mecanismos de reconocimientos del huésped (Inami *et al.*, 2009; Cao y Wang, 2009; Gomez *et al.*, 2013). El mucus es producido por células especializadas denominadas Goblets, que se encuentran en gran proporción recubriendo el ápice de las vellosidades. Podemos identificar diferentes tipos de mucinas de acuerdo a su estructura química y al tipo de técnica histoquímica que se esté usando (Sarasquete *et al.*, 2001; Neuhaus *et al.*, 2007; Cao y Wang, 2009; Leknes, 2011).

El método PAS tiene muchas aplicaciones, particularmente en la demostración de distintos hidratos de carbono, tanto solos o combinados con otras moléculas como proteínas, que se tiñen de rojo o rosa; y esta coloración se logra mediante la ruptura de los enlaces carbono-carbono de los 1,2- glicoles con un oxidante, el ácido periódico, generando dialdéhidos, que después reaccionan con el reactivo incoloro de Schiff (fucsina-ácido sulforoso). El azul alciano interactúa principalmente con estructuras carboxiladas y sulfatadas mediante un enlace iónico para la tinción de mucinas y esta técnica se puede combinar con la reacción de PAS para diferenciar entre las mucinas epiteliales ácidas (azules) y neutras (fucsia) (Qintarelli *et al.*, 1964; Lowe y Anderson, 2015).



Se conoce poco sobre la función de mucinas en peces, pero se menciona que las mucinas ácidas participan protegiendo contra la translocación de bacterias y las mucinas neutras participan en procesos de digestión y absorción (Deplancke y Gaskins, 2001; Kim y Ho, 2010). Además, Kim y Ho (2010), mencionan que la producción de esta red de mucopolisacáridos puede ser regulada por dos principales factores. El primero de ellos refiere a la activación de rutas de señalización por factores de transcripción que pueden interactuar con promotores en la transcripción; mientras que el segundo incluye factores bioactivos, como microorganismos, productos de microorganismos, toxinas, hormonas/neuropéptidos, entre otros.

## **2.5 Receptores de Reconocimiento de Patrones**

Un paso importante para dar inicio a los mecanismos de la defensa inmune, es el reconocimiento de material dañino que posteriormente activa una señalización en cascada. Los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR por su nombre en inglés) son los activadores claves. Los PRR son expresados por células del sistema inmune, incluyendo monocitos, macrófagos y neutrófilos, células dendríticas (DCs) (células linfoides). En peces existen diferentes órganos especializados de la respuesta inmune en los cuales se sintetizan y distribuyen células (Rebl *et al.*, 2009; Palti, 2011; Gómez y Balcázar, 2008; Rombout *et al.*, 2011).

Existen por lo menos 3 grandes grupos de PRRs: gen Receptor Tipo Inducible Ácido Retinoico I (RIG-I) (RLRs); Dominio de Oligomerización de Unión a Nucleótidos (receptores tipo NOD/NLR); Receptores Tipo Ausente Melanoma (ALRS); y Receptores Tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés). Los receptores RIG-I son capaces de discriminar entre ARN del huésped del ARN derivado de virus, incrementando posteriormente la producción de interferón. Este reconocimiento se basa en la estructura química del extremo 5' del ARN: el ARNm del huésped posee la capucha de 7-metilguanosina mientras que el ARN de virus no.

Existen diferentes tipos de NODs, conservados entre especies: los NOD1 -2, se encargan de diferenciar patógenos por el reconocimiento de componentes de la pared celular,

principalmente ácido diaminopimélico (DAP, bacterias gram negativas) y muramil dipéptido (MDP, bacterias gram positivas y negativas), mediante la interacción de repeticiones ricas en leucinas en el extremo C-terminal. Estos pueden trabajar en conjunto con los TLR regulando la inflamación y la respuesta apoptótica. Pero los NOD tienen como resultado final la formación de un complejo proteico denominado inflamosoma, mientras que los TLR activan la producción de citoquinas, como interleucinas e interferón, que son críticos en la activación de la respuesta inmune (Fukata *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2011).

### **2.5.1 Receptores Tipo Toll (TLR)**

Los Receptores Tipo Toll (TLR) son glicoproteínas transmembranal tipo 1 que comparten un dominio en el citoplasma llamado TIR (Receptor Toll/Interleucina 1 [IL-1]) y contiene en sus dominios N-terminales extracelulares (compuestos de 550 a 980 aminoácidos) una secuencia Repetida Rica en Leucinas (LRRs). Ésta secuencia LRRs confiere la especificidad por los PAMPs, componentes estructurales de virus, hongos, parásitos o bacterias. Los TLRs se pueden expresar en la superficie celular, en los endosomas o en el citosol de células huésped. Estos se diferencian entre sí por números, por ejemplo el TLR4 en mamíferos reconoce lipopolisacárido (LPS), TLR3 reconoce ARN de doble cadena, y el TLR9 motivos Citocina-Guanina presentes en el DNA (Pietretti y Wiegertjes, 2014). En mamíferos se han descrito un total de 21 receptores de membrana que reconocen de forma particular moléculas exógenas o propias.

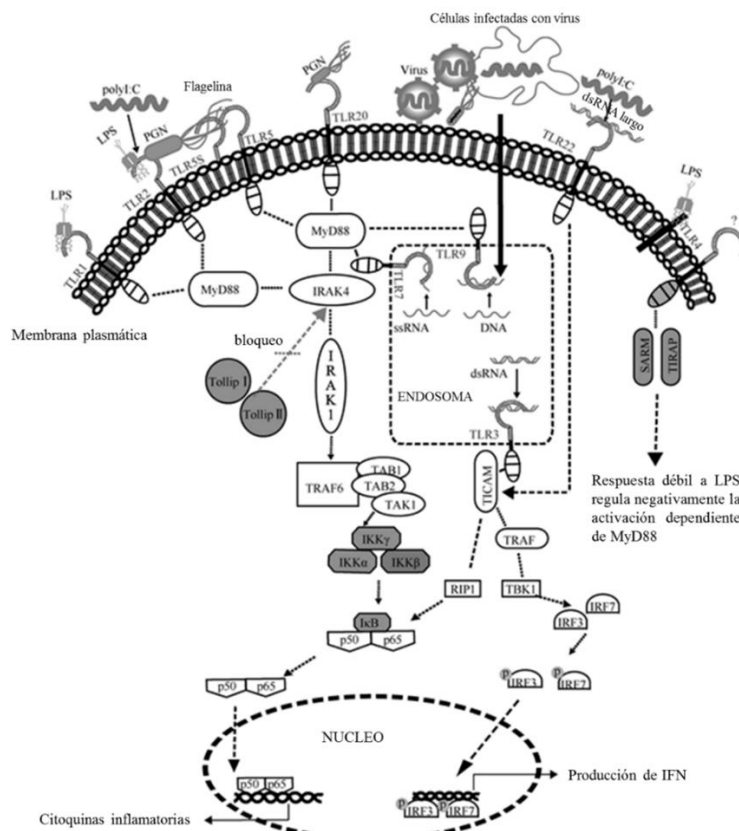
### **2.5.2 Activación y señalización mediada por TLRs**

Una vez que los TLR han reconocido el PAMP específico activan la cascada de señalización ya sea específica o compartida. Ésta, mediante la proliferación de factores de transcripción, modulan la expresión de citocinas proinflamatorias o proteínas de la fase aguda que son componentes de la respuesta humoral y que activaran la respuesta celular y proseguirán a la destrucción del agente patógeno. Hay dos vías de señalización asociadas con los TLRs: la vía de señalización dependiente de la proteína 88 Primaria de Diferenciación Mieloide (MyD88) o la independiente de MyD88 o llamada por algunos autores como dependiente del Dominio TRIF (TIR - que contiene proteína adaptadora inductora de IFN (Interferon) descrita en mamíferos. La vía MyD88-independiente involucra el adaptador

TRIF que contiene al adaptador del dominio TIR, la relación MyD88-TRIF activa TRAF6 [Factor 6 asociado al receptor TNF (Factor de Necrosis Tumoral)] y así promueve la producción del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). TRIF también activa IRF-3, que induce la transcripción de IFN- $\beta$ . La señalización a través de TLR-3 (reconoce ARN de doble cadena) siempre produce IFN, una proteína específicamente dirigida contra virus, ya que TLR3 es vía dependiente de TRIF. En mamíferos los TLRs a excepción del TLR3 como ya mencionado, siguen la cascada de señalización dependiente de MyD88. En esta ruta el dominio TIR de los TLR interactúan con MyD88 activando al factor de transcripción NF- $\kappa$ B por la destrucción del inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) a través de la fosforilación de proteínas I $\kappa$ B quinasas (IKK) las cuales son quinasas de la familia IRAK (Asociada al receptor de IL-1), activadas por la interacción de IRAK con TRAF6 que es activado por la interacción de MyD88-TLR, dejando NF- $\kappa$ B libre para entrar al núcleo y aumentar la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias como: IL-6, IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12 (Yi *et al.*, 2003). Por otra parte, el MyD88 unido a los receptores TLR7 o TLR9 pueden asociarse al IRF7 (Factor de Transcripción 7) a través de la señalización de quinasas MAP (quinasas activadas por mitógenos (estimulador de la división celular)) induciendo la producción de interferon (IFN) tipo I, como se puede observar en la figura 2. En peces se han caracterizado alrededor de 20 tipos de TLR que conservan homología con los expresados en mamíferos: TLR1, 2, 3, 4, 5M, 5S, 7, 8, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y 26. Sin embargo, los estudios de caracterización molecular de vías de señalización solo han descritos la interacción del TLR con la molécula adaptador (Kawai y Akira, 2007; Takano *et al.*, 2011; Rauta *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Específicamente el Receptor Tipo Toll 9 reconoce motivos no metilados de Citocina-Guanina en el ADN. Estos motivos se encuentran presentes 20 veces más en el ADN bacteriano en comparación con el ADN de vertebrados donde están metilados. La metilación en el ADN participa en la regulación transcripcional, bloqueando el reconocimiento de secuencias por las ARN polimerasas, y estas secuencias no tienen influencia sobre la respuesta inmune (Krieg *et al.*, 2002).

Dado lo anterior los vertebrados pueden diferenciar entre el ADN propio y el exógeno vía TLR9, siendo este un punto de control en el reconocimiento de patógenos. La función del Receptor Tipo Toll 9 en mamíferos se encuentra bien descrita, sin embargo su función detallada en vertebrados inferiores aún es desconocida. El TLR9 se ha caracterizado en diferentes especies de teleósteos, así como el perfil de expresión de proteínas resultante de la cascada de señalización. En estudios realizados por Takano *et al.* (2007), Skjaeveland *et al.* (2008), Yu *et al.* (2009), Kongchum *et al.* (2011), Byaggi *et al.* (2014b) los TLR9 conservan su dominio TIR, así como la secuencia repetida rica en leucina (LRR). Sin embargo, difieren en número y distribución espacial, reportando de 13 hasta 21 LRR; de igual forma se reporta que se conservan los aminoácidos de ácido aspártico y tirosina, que suponen mantiene el reconocimiento con los motivos. Lo cual puede deberse a la diferencia en la presión de la evolución de cada especie de pez.



**Figura 2.** Vía de señalización de TLRs; tomado y adaptado de Fan *et al.*, 2015.

## 2.6 Oligonucleotidos CpG y su uso como inmunoestimulantes en peces.

Dado el potencial y especificidad demostrada por el TLR9 sobre los motivos CpG de DNA, estos motivos fueron reproducidos sintéticamente por Krieg *et al.* (1995). Estos consisten en secuencias de DNA sintético que contiene uno o más motivos repetidos de Citosina (C), seguido de un desoxinucleótido trifosfato de Guanina (G) denominados CpG oligonucleotidos (ODN CpG). Existen diferentes tipos de ODN CpG, los cuales se clasifican en la clase A, clase B y clase C, que difieren entre sí por el número de motivos presentes en la secuencia y el tipo de enlace que une a los nucleótidos, ya sea un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato (grupo oxígeno se sustituye por un grupo sulfuro). Específicamente los CpG-ODN de la clase B contienen más de dos motivos CpG unidos por enlace fosforotioato, la modificación de este enlace le confiere una mayor resistencia a la degradación por endo-exonucleasas y RNasas, así como incrementar el potencial de atravesar la bicapa lipídica (Krieg *et al.*, 1995, 2002). La evaluación *in vitro* de estos ODN CpG ha demostrado que favorecen la diferenciación de células de memoria y la producción de anticuerpos y por consecuencia la síntesis de citocinas proinflamatorias; así mismo incrementan (aunque en menor medida comparado con los ODN CpG de la clase A) la producción de interferon e IL-2, IL-12 por células dendríticas, la activación de células T, células asesinas naturales (células NK), monocitos y neutrófilos, en animales (pollo, ratón, oveja, cerdo, perro, gato) (Mutwiri *et al.*, 2003). En estos estudios se resalta la alta especificidad del TLR9 por los ODN CpG tipo B. Sin embargo, esta especificidad no recae sobre un ODN particular, ya que las LRR se distribuyen de diferente manera tanto en número como en localización dentro de la secuencia. También se ha corroborado que el efecto inmunoestimulante es dosis dependiente, y que ante una inmunoestimulación excesiva se puede provocar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica afectando al organismo (Krieg, 1995). Sin embargo la alta especificidad del TLR9 por el ODN CpG, despierta una ruta específica de señalización y por tanto una diferenciación celular dirigida. En trabajos realizados por Krieg *et al.* (1998) demuestran que la efectividad sobre la producción de citocinas proinflamatorias se mantienen posterior a los 8 días de exposición. Dadas estas características se les ha dado un gran uso en terapia génica, ante la respuesta alérgica, para la

inmunidad protectora y como adyuvantes para mejorar la respuesta en vacunas (Klinman, 2004; Bhatia *et al.*, 2014).

En peces el uso de los ODN CpG tipo B, se han probado tanto *in vitro* como *in vivo*. En linfocitos de *Sparus aurata*, empleando los ODN CpG tipo B 1668, 1826, 2006, 1670 y el ODN CpG D (10-20 $\mu$ M), hubo una sobre-expresión de los genes: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , COX-2; TLR9, TLR5, Hep, MHCIIa, IRF-1, Mx, IgM, NCCRP-1 y CSF-1R (Cuesta *et al.*, 2008). En ensayos más recientes *in vivo* con *Catla catla* se observó que el TLR9 era expresado diferencialmente en riñón y bazo a las 2h, 4h, 6h, 8h, 12h and 24h después de haber sido inducidos con ODN CpG (B y C; 30 $\mu$ M) (Uma *et al.*, 2012); mientras que en ensayos *in vivo* con *Rachycentron canadum*, los CpG ODN 1668, 2006, 2305, 2137 (10 $\mu$ M) sobre-expresaron los genes TLR9, IL-1 $\beta$ , quimiocina CC e IgM en bazo (Byadi *et al.*, 2014a). Sin embargo, existen pocos reportes del efecto de ODN CpG sobre el tejido linfoide asociado al intestino. Recientemente, Byadi *et al.* (2014b) reportan que posterior a los 6 y 10 días de la exposición vía intraperitoneal de los ODN CpG 2137, 2395 y 1668, no se observaron signos de daño, edema, o inflamación en el tejido intestinal comparado con el control. Además, evaluaciones *in vitro* han demostrado que las secuencias de ODN CpG tipo B tienen la capacidad de modular la actividad de la explosión respiratoria y la producción de enzimas antioxidantes, donde se ha vinculado la participación de las EROs como segundos mensajeros en la estimulación de interlucinas y TNF $\alpha$ , esto observado en trabajos reportado por Aramaki *et al.* (2002) concluyen que en macrófagos de ratón, la producción de especies reactivas de oxígeno generadas por NADPH oxidasa por efecto de la estimulación con ODN CpG puede contribuir a la activación del factor de transcripción NF-kB y por tanto incrementar la producción de IL-2. Así mismo en hepatocitos murinos expuestos a ODN CpG se observó un incremento en la expresión de TLR-9 y peróxidos intracelulares, y posteriormente la inducción de la expresión de ARNm de la enzima antioxidante, Mn-SOD (Sánchez-Campillo *et al.*, 2004). De igual manera se ha evaluado un número representativo de estas secuencias como posibles adyuvantes en la administración de vacunas, demostrando una alta estabilidad e inmunogenicidad (Oxenius *et al.*, 1999; Verthelyi *et al.*, 2002; Bode *et al.*, 2011; Dar *et al.*, 2014).

El uso específico del oligodeoxinucleotido 1668 (5'TCCATGACGTTCCCTGATGCT'3) ha conferido protección ante bacterias, parásitos, virus en especies de peces como *Salmo salar* y *Paralichthys olivaceus* (Lee *et al.*, 2003; Lee y Kim, 2009; Bridle *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2001) mediante la liberación de enzimas hidrolíticas o el incremento de explosión respiratoria. Por otra parte, en estudios *in vitro* han corroborado la capacidad diferentes ODN CpG tipo B (1826-5'TCCATGACGTTCCCTGACGTT'3, 2006-5'TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT'3, 1670-5'ACCGATAACGTTGCCGGTGACG'3, D-5'ACCGATAACGTTGCCAACGTTGGT'3; 10μM) para estimular la producción de especies reactivas. Meng *et al.* (2003) en macrófagos de riñón cefálico de *Ctenopharyngodon idellus* estimulados con CPG ODN se incrementó significativamente la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Esta estimulación por oligodeoxinucleotidos se ha observado también en leucocitos de riñón cefálico de *Cyprinus carpio*, *Sparus aurata* y *Scophthalmus maximus* (Tassakka y Sakai, 2002; Cuesta *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Además se ha registrado un incremento significativo en la actividad de explosión respiratoria tanto *in vitro* como *in vivo* en *P. olivaceus* confirmando protección ante la infección con *Edwardsiella tarda* (Lee *et al.*, 2003); e incrementando la actividad fagocítica y la proliferación de linfocitos en *Cyprinus carpio* (Tassakka y Sakai, 2003). Este incremento en la explosión respiratoria ha sido vinculado por la activación del receptor TLR9, en peces este ha sido caracterizado molecularmente, observando entre estos un número y arreglo espacial diferente en las RRLs, proponiendo esta característica como la responsable la especificidad por los diferentes ODN CpG (Kawai y Akira, 2007; Rauta *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, los perfiles de expresión del TLR9 en las células del sistema inmune innato de peces y su contribución a la activación de vías de señalización río abajo son, aún desconocidas.

Kongchum *et al.* (2011) caracterizó molecularmente las proteínas MyD88 y TRAF6, que forman parte de la cascada de señalización de los TLR. En ese estudio se analizó el nivel de expresión transcritos tanto para TLR9, MyD88 y TRAF6 para determinar su funcionalidad. Se observó que el TLR9 conserva sus dominios funcionales sugiriendo una

función similar con otros vertebrados, y que su organización genómica es similar que en el pez zebra pero diferente en otros teleósteos conocidos. En este trabajo también se observó que la presencia de los dominios peptídicos altamente conservados entre carpa, pez zebra y humano de MyD88 sugieren que funciona como una proteína adaptadora. Sin embargo, TRAF6 se encuentra duplicado en carpa, pero la predicción de aminoácidos indica que codifican para proteínas funcionales y en el pez zebra se demostró que TRAF6 está involucrado en la regulación de la vía de señalización para NFkB (Phelan *et al.*, 2005). Por tanto se sugiere que al igual que en otros vertebrados, las características estructurales y funcionales de estos genes de respuesta inmune en la carpa común se conservan y se asemejan.

Sin embargo, para pargo amarillo solo existe un solo trabajo reportado por Reyes-Becerril *et al.* (2014) sobre respuesta inmune en el uso de hierro como inmunoestimulante. Por tanto dadas las propiedades que presentan los ODN CpG tipos B en la modulación del sistema inmune sin provocar daños aparentes en el tejido linfoide asociado al intestino, además la falta de conocimiento científico acerca de la modulación de TLR9 por ODN CpG en peces y la motivación en la búsqueda de nuevas alternativas profilácticas en el área de acuicultura, el uso de ODN CpG como inmunoestimulantes en pargo amarillo resulta prometedor.



#### 4. JUSTIFICACIÓN

Los cultivos de peces en acuicultura están amenazados por muchos patógenos, a menudo con consecuencias graves. En la actualidad se buscan medidas profilácticas que disminuyan las muertes asociados a estos cultivos. Actualmente el uso de inmunoestimulantes ha demostrado ser una de las estrategias más eficaces al mejorar la inmunidad del hospedero. Se ha demostrado que la administración de ODN CpG tipo B (agonistas del TLR9) como inmunoestimulantes en diferentes especies de teleósteos tiene la capacidad de modular la respuesta inmune innata y adaptativa, sin embargo su efectividad está asociada a la longitud del ODN CpG, el número de motivos CpG y las bases circundantes de estos motivos. El presente trabajo aportara conocimiento básico para comprender la modulación de la respuesta inmune de *Lutjanus argentiventris* en reconocimiento de patrones moleculares mediado por el receptor Tipo Toll 9 que reconoce los motivos CpG no metilado del DNA que se ha demostrado modula la producción de citocinas proinflamatorias y estimula el vínculo de la respuesta inmune específica.

## 5. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Los ODN CpG tipo B modularán la respuesta inmune de *Lutjanus argentiventris*, activando una respuesta mediada por la cascada de señalización del Receptor Tipo Toll-9 dependiente de MyD88, sin ocasionar daño histológico debido a la estimulación, además de provocar un aumento en la producción de mucus intestinal?

## 6. HIPOTESIS

El uso de ODN CpG en diferentes mamíferos y algunos peces ha demostrado poseer un efecto en la producción de citoquinas mediada por la cascada de señalización del receptor Tipo toll 9, sin provocar daños histopatológicos. Así mismo, se menciona que la presencia de interlucinas puede modular la producción de mucus en intestino. Sí el efecto inmunoestimulante de los ODN CpG está asociado a longitud, el número de motivos CpG y las bases circundantes de estos motivos, entonces, al menos una de las configuraciones de ODN CpG tipo B provocará una modulación de la respuesta inmune vía cascada de señalización del Receptor Tipo Toll-9, incrementando la producción de mucus en el tejido intestinal debido a la producción de interlucinas por efecto de ODN CpG tipo B en *Lutjanus argentiventris*.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de oligodeoxinucleotidos CpG (ODN CpGs), sobre la respuesta inmune y la morfología intestinal de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*)

### 7.2 Objetivos particulares

1. Cuantificar la actividad enzimática antioxidante (AOX) en *L. argentiventris* posterior a la exposición vía intraperitoneal con ODN CpGs tipo B.
2. Identificar cambios morfológicos en intestino de *L. argentiventris* posterior a la exposición vía intraperitoneal con ODN CpGs tipo B.
3. Cuantificar los transcritos de genes relacionados con el efecto inmunoestimulante de secuencias ODN CpG.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

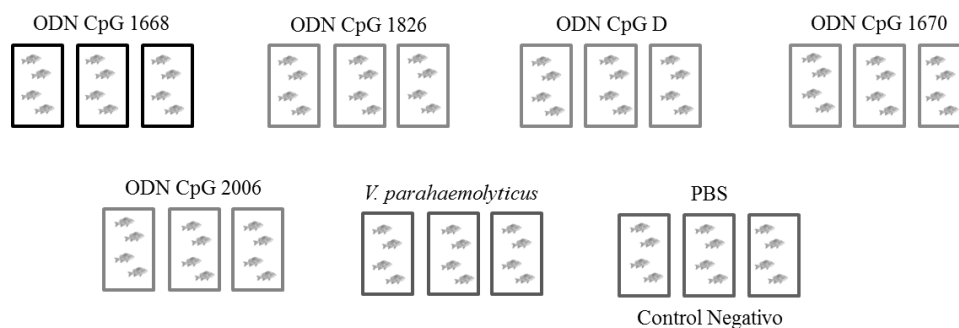
### 6.1 Bioensayo con peces juveniles

#### 6.1.1 *Lutjanus argentiventris*.

Se emplearon juveniles de pargo amarillo ( $15 \pm 5$ g) producto de un desove de pie de cría en Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR). Estos organismos fueron reubicados de los supralitorales del centro, al Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos, Unidad de Laboratorios de Servicios y Apoyo, CIBNOR S.C. Antes de ingresar al laboratorio de aclimatación los organismos fueron sumergidos en agua dulce con tiosulfato de sodio (3.6 mg/L / mg/L cloro) para eliminar posibles parásitos externos, posteriormente fueron transportados en cubetas (3 organismos/cubeta). En el laboratorio, los organismos se dividieron equitativamente en 2 tanques de 3000 L, con agua de mar filtrada (flujo continuo), a una temperatura de  $26 \pm 1.94^\circ\text{C}$ , con flujo de oxígeno y salinidad controlada (40 ups), donde fueron aclimatados durante 42 días y alimentados dos veces al día con pienso comercial *ad libitum*.

#### 6.1.2 *Diseño experimental y muestreo*.

Para llevar a cabo el estudio de inmunoestimulación en *L. argentiventris*, el diseño experimental consistió en la distribución aleatoria de 96 peces en 24 contenedores con capacidad máxima de 100 L (4 peces por tarjeta) como se muestra en la figura 3. Se mantuvieron las mismas condiciones fisicoquímicas descritas en la sección 6.1.1; sin embargo al ser un sistema cerrado, se realizó el recambio de agua y limpieza diaria por sifoneo de los contenedores.



**Figura 3.** Diseño experimental de bloques.

Los tratamientos empleados en este experimento se muestran en la Tabla I. Se eligieron 5 ODN CpG tipo B (1668, 1826, D, 1670, 2006) los cuales presentan distinto número de islas CpG, así como diferentes bases adyacentes al motivo CpG y longitud (Meng *et al.*, 2003; Carrington *et al.*, 2004; Cuesta *et al.*, 2008). Los oligonucleótidos se resuspendieron en Buffer Fosfato Salino (PBS, 10mM, pH 7.0); administrando una concentración final de 3µg/pez de cada uno de los ODN CpG. Así mismo, se empleó un tratamiento que incluía *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria gram negativa que contiene distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) que pueden activar la respuesta inmune (control positivo). Este microorganismo pertenece a la colección de cepas del laboratorio de Patógenesis Microbiana, CIBNOR S.C., la cual fue reactivada en juveniles de *L. argentiventris* de acuerdo a los postulados de Koch; para obtener el inóculo empleado como tratamiento, la bacteria se inoculó en medio Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) selectivo para el crecimiento de vibrios adicionado con 2% de NaCl, que se incubó durante 24h a 37°C. Posteriormente, se ajustó la absorbancia proporcional para obtener una concentración de 1x10<sup>8</sup>cel/mL, como diluyente se empleó PBS (10mM, pH 7.0). De igual manera se estableció un grupo al cual se administró solo PBS (10mM, pH 7.0) para descartar que la inmunoestimulación observada, fuese provocada por el estrés derivado de la manipulación de los organismos (control negativo).

**Tabla I.** Tratamientos empleados en el bioensayo con peces juveniles. Las letra en cursiva y negrita, representan las islas de Citosina-Guanina. El nombre de los ODN CpG se muestra con 4 números o letras mayúsculas.

Nombre	Dosis	Secuencia (5'-3')	Motivo CpG	Long
1668	10µg/mL	TCCATG <b>ACG</b> TTCCCTGATGCT	1	20
1826	10µg/mL	TCCATG <b>ACG</b> TTCCCTG <b>ACG</b> TT	2	20
D	10µg/mL	ACCGATA <b>ACG</b> TTGCC <b>ACG</b> TTGGT	3	24
1670	10µg/mL	ACCGATA <b>ACG</b> TTGCC <b>GGT</b> G <b>ACG</b>	4	22
2006	10µg/mL	TCG <b>T</b> CGTTTTTGT <b>CG</b> TTTTTGT <b>CG</b> TT	4	24
<i>V. parahaemolyticus</i>	1x10 <sup>8</sup> cel/mL	---	---	---
PBS (C-)	300µL	---	---	---

Antes de realizar la administración de los tratamientos, los peces se dejaron en inanición 24 h y se inyectó vía intraperitoneal una dosis de 300  $\mu\text{L}$ /pez. Posterior al 1, 3, 7 y 10 día de la administración, fueron eutanasiados aleatoriamente un total de 3 peces de cada tratamiento por muestreo, se realizó la disección de los organismos sobre una mesa desinfectada con etanol, con material de disección previamente esterilizado. Se obtuvieron muestras de bazo, intestino e hígado. Las muestras de bazo e intestino fueron colocadas en TRizol® Reagent (15596026, Invitrogen), y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en análisis de expresión de genes. También se tomó una sección del intestino delgado que se colocó en solución Davidson para su posterior tratamiento en el análisis de la morfología intestinal, mientras que la sección de hígado se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en PBS (10mM, pH 7.0) para realizar determinar la actividad de enzimas antioxidantes.

### **6.3. Cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes.**

#### **6.3.1. Obtención de muestra.**

Las muestras de hígado se homogenizaron con Polytron (VWR, PT2100) en PBS (10mM, pH 7.0), posteriormente se centrifugo a 10,000 RPM a  $4^{\circ}\text{C}$ ; el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo el cual se usó en análisis siguientes. Se determinó el contenido de proteína soluble de acuerdo al método descrito por Bradford (1976) para realizar los cálculos pertinentes de actividad enzimática.

#### **6.3.2. Actividad de la enzima superóxido dismutasa.**

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) se determinó empleando el SOD determination kit (SIGMA, 19160) de acuerdo con Peskin *et al.* (2000); 20 $\mu\text{L}$  del homogenizado isoproteico se colocó en microplaca de 96 pocillos (260860, Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™), se agregó 200  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo (WST) y 20 $\mu\text{L}$  de solución de trabajo enzimática. Se incubó 20 min -  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente la placa leyó a 450 nm en espectrofotómetro Bio-Rad (3550-UV). La actividad de SOD se representa de forma lineal por el porcentaje de inhibición de  $\text{O}_2$  producido por la enzima xantina oxidasa al reducir en presencia de un anión superóxido la sal tretazolio de Dojindo, que produce un colorante formazan soluble en agua detectable a 450nm y se calcula de acuerdo con la ecuación (1).

$$\text{Actividad de SOD (\% inhibición)} = \frac{\{[(\text{Ablanco1}-\text{Ablanco3})-\text{Amuestra}-\text{Ablanco2}]\}}{\text{Ablanco1}-\text{Ablanco3}} * 100 \quad (1)$$

Donde el Ablanco1 no contiene muestra, Ablanco2 no contiene la solución de trabajo enzimática y Ablanco3 solo contiene la solución de trabajo (WST), el buffer empleado para diluir la muestra y agua. Posteriormente se realizaron los cálculos pertinentes para expresar los resultados en Unidades por miligramo de proteína (U/mg) empleando una curva patrón con superóxido dismutasa de eritrocitos bovino (S2515 SIGMA).

### **6.3.3. Actividad de la enzima catalasa.**

La actividad de catalasa (CAT) se calculó de acuerdo a las metodologías descritas por Johansson y Borg (1988) y Park *et al.* (2011). La actividad de CAT en este método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El formaldehído producido es medido colorimétricamente con el cromógeno 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1, 2,4-triazol (Purpald). El Purpald forma específicamente un heterociclo bicíclico con aldehídos, que en los cambios de oxidación va de incoloro a un color púrpura, que puede ser medido a 540nm. Para ello 20μL del homogenizado isoproteico se colocó en microplacas de 96 pocillos (260860, Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™), se agregó 100μL PBSS (100mM, pH 7.0), 30μL de metanol (absoluto) y para dar inicio a la reacción se añadió 20μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (42mM), y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 30μL de hidróxido de potasio (KOH, 10mM) para detener la reacción y posteriormente 30μL del Purplad (46mM en 0.5M HCl), se incubó 10 min a temperatura ambiente, para detener la reacción se adicionó 10μL de peridoato de potasio (KIO<sub>4</sub> 192mM en 0.5M KOH), se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se leyó a una absorbancia de 540nm en lector de microplacas (5250040, Thermo Scientific Varioskan Flash), la actividad se determinó de acuerdo a la curva patrón (U/ml vs absorbancia) construida empleando catalasa de hígado bovino (C9322, SIGMA), expresando los resultados en unidades por miligramo de proteína (U/mg).

### **6.4. Análisis morfológico del tejido intestinal.**

Los fragmentos de intestinos fijados en solución Davidson, fueron procesados en Laboratorio de Histología e Histoquímica del Centro de Investigaciones Biológicas del

Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S, donde se colocaron en alcohol 70%, posterior se llevó a cabo la deshidratación gradual en alcohol e inclusión en parafina de las muestras. Las secciones obtenidas fueron de 4-5  $\mu\text{m}$  de ancho (Microtomo Leica, RM 2025); se realizó tinción diferencial con hematoxilina y eosina para conocer estructura celular, así como la tinción con azul alcian y ácido periódico de Schiff para determinar la producción de mucopolisacáridos. Tres laminillas por pez fueron examinadas en microscopio óptico (Olympus Bx41) en el Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR, las fotos digitales corresponden a secciones transversales longitudinales; 8 fotografías fueron tomadas al azar por laminilla. Para conocer más acerca del posible efecto en la morfología intestinal de *L. argentiventris* por los tratamientos empleados en este experimento, se realizó la medición de (1) Altura de micro vellosidades (AM), (2) leucocitos intraepiteliales (LI), melanomacrofagos (MG); (3-5) conteo diferencial y total de células Goblet (mucinas neutras – magenta (MN); mucinas ácidas – azul (MA); mezcla de mucinas – violeta (MM). El programa Image Pro Plus V4.5 se utilizó en las observaciones y mediciones de las secciones intestinales. AM fue evaluado con 8 mediciones por fotografía de la base hasta la punta; y la medición de 2-5 como recuento por área de la capa epitelial, expresados como porcentaje de cobertura. Además de realizar la cuantificación específica de componentes de la morfología se evaluaron, los posibles daños debido a una sobre-estimulación. Por tanto, se determinó el grado de inflamación de acuerdo a una escala de 0 a 3, donde 0 = normal, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = severo. Así mismo se evaluó atrofia, hipertrofia, hiperplasia, dilatación de la lámina propia registrando los cambios histopatológicos: (-) no histopatología, (+) histopatología leve, (++) histopatología moderada, e (+++) histopatología severa.

#### **6.4. Cuantificación por PCR en tiempo real de genes relacionados con el sistema inmune.**

##### **6.4.1 Extracción de ácido ribonucleico total (ARN) y síntesis de ADN complementario (DNAc).**

La extracción de ARN se realizó de bazo e intestino de acuerdo al protocolo de extracción de TRizol® Reagent (15596026, Invitrogen ). Aproximadamente 50mg de tejido se homogenizó en 500 $\mu\text{L}$  de TRizol® Reagent con Polytron (PT2100, VWR) durante 10 s (3

veces) y se prosiguió con instrucciones de proveedor, se resuspendió en 30µL de agua DEPC (Dietilpirocarbonado, 0.1% (v / v)) y se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific). Posteriormente 1µg de ARN se purificó empleando DNAase I (AMPD1, SIGMA), con la finalidad de remover la mayor cantidad posible de ADN genómico (ADNg). Para conocer la integridad de ARN las muestras se analizaron en un gel de agarosa –cloro (hipoclorito) de acuerdo a la metodología descrita por Aranda *et al.* (2012), se agregó SYBR® Safe DNA Gel Stain (S33102, Invitrogen) (1µL/ 10ml Buffer TAE 1X) y como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder (10787018, Invitrogen). La electroforesis se corrió por 35 min a un voltaje constante de 100V. Posteriormente se visualizó en fotodocumentador ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad). El ARN no empleado se guardó a -80°C.

El ADN complementario (ADNc) se generó a partir de 1µg de ARN empleando el kit de ImProm-II™ Reverse Transcription System (A3800, Promega). Obteniendo un volumen final de 20µL para la reacción: 1 µL de oligo dT 18, 1 µL dNTP Mix (10 mM) (C114B, Promega), 2.4 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (A351H, Promega), 4 µL ImProm-II™ 5X Reaction Buffer (M289A, Promega) 0.5 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (N251A, Promega), 0.8 µL de ImProm-II™ Reverse Transcriptase (M314A, Promega), las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 min, 45°C por 60 min y una incubación final a 90°C por 5 min. El ADN complementario sin emplear se almacenó a -20°C.

#### **6.4.2 Oligos empleados en RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR)**

Se hizo uso de la batería de oligos específicos de *L. argentiventris* para la técnica de qPCR, diseñados por la M.C. Miriam Goretty Angulo, disponibles en el laboratorio de Patogénesis Microbiana, CIBNOR S.C., se eligieron solo aquellos genes de interés relacionados con el usos de los ODN CpG como inmunoestimulantes y posibles genes de expresión constitutivos para ser evaluados como genes de referencia (Tabla II).

Sin embargo, dado el bajo número de secuencias específicas de genes implicados en la respuesta inmune de *L. argentiventris* disponibles y reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se optó por obtener secuencias mediante el diseño de oligos inespecíficos a partir del análisis



de secuencias por alineamientos múltiples con el programa ClustalW2. El diseño de los oligonucleótidos se realizó a partir de las secuencias de nucleótidos conservadas entre especies de teleósteos, empleando el programa Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), para determinar la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) y descartar posible formación de estructuras secundarias se emplearon los programas OligoEvaluator<sup>TM</sup> (<http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet>) y RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) respectivamente. Los oligonucleótidos se sintetizaron en IBT-UNAM. Posteriormente se comprobó su especificidad así como la temperatura de alineamiento realizando PCR de gradiente, en termociclador DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (C122688, Bio-Rad), la mezcla de reacción empleada consistió en (12.5  $\mu$ L volumen final): 1.25 $\mu$ L Buffer PCR 10X (200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0.375 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.25 $\mu$ L dNTP's (10 mM) (UI51B, Promega), 1.4 $\mu$ L oligo forward y reverse (20 pmol), 0.625  $\mu$ L de cDNA, 0.6U Platinum® Taq Polimerasa (10966018, Invitrogen); como control positivo se emplearon los oligos LaqPCR80EF-1 $\alpha$ Fw-Rv (Tabla II) y como control negativo la mezcla de reacción sin templado. El análisis de los amplicones se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (w/v) con 0.0001% (v/v) SYBR Safe (S33102, Invitrogen) en Buffer TAE 1X, para corroborar peso y cantidad de producto esperado, empleando como marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (10787018, Invitrogen).

Dado la obtención de nuevas secuencias de nucleótidos por amplificación de oligonucleótidos inespecíficos, fue necesario la secuenciación de los productos de PCR obtenidos, por tanto para incrementar la concentración del amplicón, este fue clonado en el vector pGEM®-TEasy I (A1360, Promega). Los productos observados en gel de agarosa, fueron purificados siguiendo el protocolo del kit Wizard Genomics DNA purification (A1120, Promega), posteriormente estos fueron concentrados empleando un concentrador al vacío (Vacufuge 5301, Eppendorf) 15 min a 60°C.

Para aumentar la probabilidad de ligación al vector de clonación se realizó un refreshing, el cual consiste en incrementar los residuos de adenina (A) en el producto de PCR, dado que el vector utilizado pGEM®-TEasy Vector (A1360, Promega), es un plásmido lineal el cual contiene en el extremo 3' residuos de timina (T) y que en la presencia de restos de A

se unen por complementariedad. Para ello se agregó Taq DNA Polymerase 10X Reaction Buffer (10342020, Invitrogen),  $MgCl_2$  50mM (10342020, Invitrogen), dATP 2mM (10216018, Invitrogen), Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ L) (10342020, Invitrogen), se incubó 2 min - 95°C, 15 min - 72°C,  $\infty$ -25°C. A continuación se ligó al vector de clonación pGEM®-TEasy, siguiendo las instrucciones del protocolo y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Posterior se realizó la transformación de células competentes *Escherichia coli* TOP10 elaboradas de acuerdo con Sambrook y Russel (2001) con  $CaCl_2$ ; la transformación se realizó de acuerdo al manual One shot® TOP10 Chemically Competents *E. coli* (C404010, Invitrogen). El cual corresponde a transformación por shock térmico de 4°C a 42°C. El vector de clonación contiene como marcadores de selección la actividad enzimática de degradación de galactosa regulada por el operon *LacZ* y un gen de resistencia a ampicilina. Una vez seleccionadas las colonias con el posible inserto, se corroboró la presencia del mismo por PCR de colonia empleando los oligos universales M13 Forward (Promega, Q5601) y M13 Reverse Primer (Promega, Q5421), siguiendo el siguiente protocolo de incubación: una temperatura de lisis celular 3min - 95°C, 1 min - 25°C, una temperatura de desnaturalización 1 min - 95°C, 35 ciclos conformados por 30s - 95°C, 55s - 55°C (alineamiento), 1 min - 72°C, una temperatura de extensión 5 min - 72°C y finalmente temperatura de 25°C indefinidamente (DNA Engine, Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad)). Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) con 0.0001% (v/v) SYBR Safe (S33102, Invitrogen) en Buffer TAE 1X, empleando como marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (3 $\mu$ L) (10787018, Invitrogen).

Una vez que se corroboró la presencia del inserto, las colonias transformadas se inocularon en 10 ml de caldo LB con ampicilina (1  $\mu$ g/mL) (A9518 SIGMA-ALDRICH) para posteriormente realizar la extracción de ADN plásmidico (ADNp) empleando el kit Pure Link® Plasmid DNA Miniprep (K210011, Invitrogen). Posteriormente el ADNp se mandó secuenciar a GeneWiz Inc. Las secuencias obtenidas fueron analizadas primero con el programa VecScreen: Screen a Sequence for Vector Contamination (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>), para descartar restos de la secuencia del vector en la secuencia problema, después se realizó un análisis de similitud de secuencias por

alineamiento local empleando el programa BLASTn disponible en la página en línea NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Las secuencias identificadas por análisis bioinformático se emplearon para el diseño de oligos específicos para qPCR. Los oligos se diseñaron considerando las siguientes características: longitud de 18-20 nt, 50 % Guanina-Citosina (GC), temperatura alineamiento 60°C, producto amplificación 100-200 pb (Bustin *et al.*, 2009). Para el diseño se utilizó el programa Primer3Plus y para evaluar dicho diseño se usaron los programas Oligo Evaluator<sup>TM</sup> y RNA fold Web Server. Una vez diseñados los oligos estos se enviaron para su síntesis al IBT de la Universidad Autónoma de México (Tabla II). Su especificidad se corroboró por PCR de gradiente y se analizó en electroforesis en gel de agarosa 1% en Buffer TAE 1X, empleando como marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (4µL) (10787018, Invitrogen).

**Tabla II.** Oligos empleados en el análisis de la expresión relativa.

Oligonucleotido	Secuencia 5' – 3'	Nombre del gen	Amplicón (pb)	No. acceso Gene Bank
<b>LaqPCR80EF-1<math>\alpha</math>Fw<sup>+</sup>*</b>	GCTGTAAGGGGCTCGGTGG	Factor de elongación 1- $\alpha$	80	---
<b>LaqPCR80EF-1<math>\alpha</math>Rv<sup>+</sup>*</b>	CCCTGCTGGCCTTGACCCTC			
<b>LaqPCR10018SFw<sup>+</sup></b>	TTGGCACCGTTTATGGTCGG	Subunidad ribosomal 18S	100	AY947839.1
<b>LaqPCR10018SRv<sup>+</sup></b>	CGAAAGCATTGCGCAAGAATGT			
<b>LaqPCR116<math>\beta</math>-actFw<sup>+</sup></b>	ATGAAGCCCAGAGCAAGAG	$\beta$ -actina	116	---
<b>LaqPCR116<math>\beta</math>-actRv<sup>+</sup></b>	CAGCTCGTTGTAGAAGTGATG			
<b>LaqPCR94TLR9Fw<sup>++</sup></b>	CATCGTTTAGAGTTCATTTCGAGGT	Receptor Tipo-Toll 9	247	---
<b>LaqPCR94TLR9Rv<sup>++</sup></b>	ATGCCATTATTTGCCAGACTTAGG			
<b>LaqPCR140ILF2Fw<sup>+</sup></b>	CTGAACGTGGCCTACAGAC	Factor 2 de Unión al potenciador de interleucina/ Factor Nuclear 45 (NF45)	140	KU598860.1
<b>LaqPCR140ILF2Rv<sup>+</sup></b>	ACCATGTCCTGCTGTTCC			
<b>LaqPCR112NF<math>\kappa</math><math>\beta</math>Fw<sup>+</sup></b>	GAACCAGATCTACAGTGCAGACGT	Proteína activadora del Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF $\kappa$ $\beta$ )	112	---
<b>LaqPCR112NF<math>\kappa</math><math>\beta</math>Rv<sup>+</sup></b>	TGGTCAGCCTTTCATCATCTATTCGC			
<b>LaqPCR195IRF7Fw<sup>++</sup></b>	GCTTAAGACCACGATCACCA	Factor de transcripción del Factor 7 regulador de interferon	195	---
<b>LaqPCR195IRF7Rv<sup>++</sup></b>	GCATAGATACCAGTTTCCCG			
<b>LaqPCR187IL8Fw<sup>++</sup></b>	AGTCTTCATCGCCTCTATCG	Interleucina 8	187	---
<b>LaqPCR187IL8Rv<sup>++</sup></b>	AATGATCTCAGTCTCCTCGC			
<b>LaqPCR173IL-1<math>\beta</math>Fw<sup>+</sup></b>	CTGCAGGTCAGTCCAAGAGG	Interleucina 1- $\beta$	173	KU598861.1
<b>LaqPCR173IL-1<math>\beta</math>Rv<sup>+</sup></b>	GTAAGGTGAGCGTAGGTCG			

Nota: \* Indica el gen empleado para normalizar los datos en el análisis de expresión relativa. + Oligonucleotidos disponibles en el laboratorio de Patogenesis Microbiana.  
<sup>++</sup>Oligonucleotidos diseñados durante este trabajo.

#### 6.4.3 Estandarización de la eficiencia de amplificación de genes empleados en RT-qPCR.

Determinar la eficiencia de la reacción es uno de los pasos más importantes antes de realizar el cálculo de la expresión relativa, ya que los componentes de la reacción están directamente relacionados con este parámetro (Bustin, 2000). La eficiencia (E) de la reacción de PCR en tiempo real se define como la capacidad que tiene una molécula de DNA de dividirse en cada ciclo, este valor puede ser calculado con la ecuación (2).

$$E = [10^{(-1/pendiente)}] - 1 \quad (2)$$

Ésta ecuación corresponde a la pendiente del modelo de regresión lineal ajustado sobre los datos de transformación logarítmica de diluciones seriadas de DNA contra su CP (punto de intercepción). El CP o Ct se refiere a un incremento estadísticamente significativo de la señal de fluorescencia en un ciclo específico sobre una línea base (umbral) que permite descartar la señal de amplificación correspondiente al fondo (Rasmussen, 2001; Livak y Schmittgen, 2001; Thermo Science Scientific, 2014). Una amplificación al 100% posee un valor de pendiente -3.322 y una eficiencia de reacción de 1 (Thermo Science Scientific, 2014).

Para calcular dicho valor, se siguió la metodología de diluciones seriadas descrita por Bustin *et al.* (2009), Romero-Geraldo y García-Lagunas (2013). Se emplearon cuatro puntos con un factor de dilución 1:5 de pool de cDNA de las muestras procesadas para construir la recta de regresión lineal; a la mezcla de reacción (15µL volumen final) se agregó 1.5µL Buffer PCR 10X (200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0.75µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.25µL dNTP's (10 mM; Promega, UI51B), 1.4µL oligo forward y reverse (20 pmol), como marcador fluorescente 0.75µL Eva Green Dye 20X (Biotum, 31000-T), 5µL de cDNA, 0.3 U Platinum® Taq Polimerasa (Invitrogen, 10966018). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Corbett 5Plex Rotorgene 6000 (Quiagen), siguiendo el programa: desnaturalización 5 min - 95°C, 40 ciclos conformados por a 15s - 95°C, 20s - 60°C (alineamiento), 25s - 72°C; y una temperatura de extensión final 5 min - 72°C. Así mismo, se construyó la curva de disociación de 70 a 95°C con un incremento de 1°C cada segundo para confirmar la especificidad de la reacción y descartar la formación de dímeros.

Los valores de eficiencia de la reacción para cada oligo tanto de los genes blancos como del posible gen de referencia sirvieron como punto de referencia para la elección del mejor modelo matemático para realizar el análisis de expresión relativa (Tabla III).

**Tabla III.** Se muestran los valores correspondientes a la pendiente del modelo de regresión lineal, la eficiencia de reacción (%) y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de los genes seleccionados tanto de interés inmunológico como de referencia.

GENES	<i>18S</i>	<i><math>\beta</math>-act</i>	<i>EF-1a</i>	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>IL8</i>	<i>TLR9</i>	<i>ILF2</i>	<i>NF<math>\kappa</math><math>\beta</math></i>	<i>IRF7</i>
Pendiente	-3.343	-3.379	-3.319	-3.321	-3.338	-3.311	-3.337	-3.225	-3.368
E	99	98	100	100	99	100	99	100	98
$R^2$	0.96	0.98	0.96	0.93	1.00	0.98	0.99	0.97	1.00

#### 6.4.4 Análisis de estabilidad del gen de referencia.

Antes de realizar los cálculos de expresión relativa es necesario seleccionar de manera adecuada el o los genes de referencia, es por ello que se desarrolló la evaluación de estabilidad de los genes de referencia, empleando el software RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>, Xie *et al.*, 2012). Este paquete bioinformático incluye los principales análisis estadísticos (programas computacionales) para determinar estabilidad de expresión, RefFinder asigna un valor adecuado a cada gen individual y calcula la media geométrica de estos valores para dar una clasificación general final.

Entre los programas computacionales se encuentran Bestkeeper, que emplea un análisis de correlación pareada entre todos los genes candidatos, de esta forma la elección del gen más estable refiere a aquel que tiene una menor contribución al resto de los genes candidatos (Pfaffl *et al.*, 2004). Normfinder, que calcula la estabilidad de la expresión de genes mediante la combinación de la variancia presente entre grupos e intragrupos, de esta manera la selección del gen de referencia es aquel que su variación es lo más cercana a cero (Andersen *et al.*, 2004). Genorm realiza un cálculo basado en las medias geométricas del valor de Ct de los genes constitutivos asignando un valor M, entre más cercano a 1, mayor estabilidad. El análisis supone que la expresión entre dos genes es idéntica en todas las muestras, independientemente de la condición experimental o tipo de célula, y el incremento en la tasa de variación de la expresión refleja el hecho de uno o ambos genes probados no se

expresan de forma estable (Vandesompele *et al.*, 2002); y por último el método comparativo delta Ct desarrollado por Silver *et al.* (2006) que adopta cierta similitud con el método de Genorm, sin embargo la comparación es realizada con los valores de  $\Delta Ct$ .

De acuerdo a lo anterior, se procedió a realizar la cuantificación de ARN mensajero de los genes elegidos como posibles candidatos, los cuales fueron *18S*,  *$\beta$ -actina* y *EF-1 $\alpha$* . La cuantificación se realizó en cada una de las muestras obtenidas de los peces sometidos a diferentes tratamientos y en el control negativo. Se empleó la siguiente mezcla de reacción 1.5  $\mu$ L Buffer PCR 10X (200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0.75  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.25  $\mu$ L dNTP's (10 mM; Promega, UI51B), 1.4  $\mu$ L oligo forward y reverse (20 pmol), como marcador fluorescente 0.75  $\mu$ L Eva Green Dye 20X (Biotum, 31000-T), 5  $\mu$ L de cDNA, 0.3 U Platinum® Taq Polimerasa (Invitrogen, 10966018) y las condiciones instrumentales descritas en el apartado 6.4.3. Los valores de Ct generados se introdujeron en el programa RefFinder para generar la clasificación general y elegir el mejor candidato de acuerdo a los análisis estadísticos realizados.

#### **6.4.5 Análisis de la expresión génica diferencial**

Posterior a la estandarización del método, el cálculo de la eficiencia de la reacción y de elegir el mejor gen de referencia, se procedió a realizar la cuantificación de la expresión génica para cada uno de los genes del sistema inmune. El método elegido para realizar dicha cuantificación corresponde al de expresión relativa, específicamente el modelo matemático descrito por Livak y Schmittgen (2001) (3). Este modelo matemático permite conocer la proporción obtenida de la relación entre los valores de Ct de las muestras con tratamiento y los valores de Ct de las muestras control, el cual es normalizado con un gen de referencia. Este método supone que tanto la eficiencia del gen blanco como el de referencia es del 100%, por tanto no requiere de un factor de corrección, ni realizar curvas estándar en cada corrida, dado que cada muestra parte de una concentración de templado específica (Pffal,2001; Livak y Schmittgen, 2001).

$$radio = 2^{-(\Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{control})} (3)$$

$$radio = 2^{-(\Delta \Delta Ct)} (4)$$

De acuerdo a lo anterior la concentración del templado fue ajustada a una concentración de 10 ng/ $\mu$ L y se siguió la metodología descrita en el apartado 6.4.3 para generar los valores de Ct, el análisis se realizó por triplicado. Una vez obtenidos estos valores se procedió a realizar el cálculo de la expresión relativa con la ecuación (4), tomando como tratamiento calibrador las muestras correspondientes al tratamiento con PBS.

### **6.7 Análisis estadístico.**

Para conocer el posible efecto estimulante de los tratamientos empleados en este proyecto se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba a posteriori de Dunnet, tomando como tratamiento control los peces a los cuales solo se administró PBS, así mismo se realizó el análisis de cambio conforme al tiempo (Tukey). Los ensayos y mediciones se realizaron por triplicado, se empleó el software SigmaPlot v.11.0, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0.05$ . Antes de realizar el análisis de varianza, se realizaron las pruebas estadísticas de normalidad y homocedasticidad con los datos. Aquellos que no presentaban una distribución normal, fueron transformados empleando el sistema de familias de distribuciones de Johnson ( $S_B$ , X acotada;  $S_L$ , X lognormal;  $S_U$ , X no-acotada) (Lagos y Vargas, 2003) con ayuda del paquete estadístico Minitab v.17.0.

Así mismo, se realizó un análisis de correlación de Pearson ( $P \leq 0.05$ ) para conocer la relación de dichas variables en cada tratamiento (STATGRAFICS Centurion XVII, V. 17.2.06) y posteriormente se realizó un Análisis Factorial para explicar de forma más clara la aportación de cada variable, en término de factores, el posible efecto inmunoestimulante (STATGRAFICS Centurion XVII, v. 17.2.06). Como método de extracción de los factores se utilizó el análisis de componentes principales, con una rotación varimax para tener una mejor interpretación de la estructura factorial, basándonos en la matriz de correlación de Pearson.



## 7. RESULTADOS

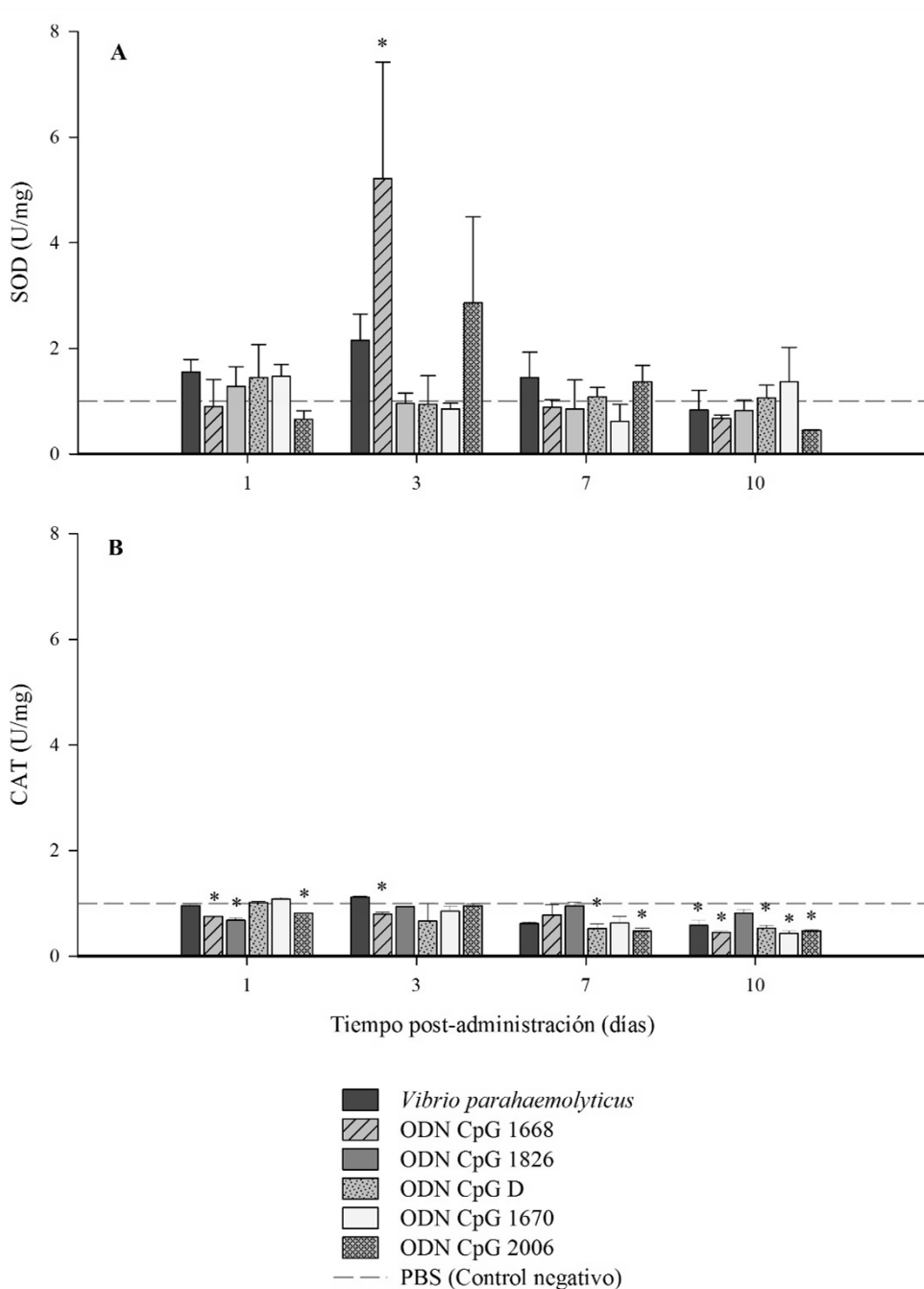
### 7.1 Actividad de enzimas antioxidantes.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos en la actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT). Se observó un incremento significativo respecto al control posterior al tercer día de la administración vía intraperitoneal del tratamiento ODN CpG 1668 en la actividad de SOD en suero (Fig. 4A), con una disminución estadística al séptimo ( $p \leq 0.05$ ) y décimo día ( $p \leq 0.001$ ) (Tabla IV). Mientras que la actividad de CAT en el grupo ODN CpG 1668 resultó significativamente menor comparada con el control PBS al primer día (ODN CpG 1668, 1826, 2006), séptimo día (ODN CpG D1 1670, 2006) y décimo día (Vp, ODN CpG 1668, 1826, 2006, D, 1670, 2006) ( $p \leq 0.05$ ), sin encontrar tratamiento que provocara un incremento significativo comparado con el control (Fig. 4B). Así mismo se apreció una reducción significativa de la actividad de CAT a través del tiempo, para los organismos expuestos al ODN CpG1668 (día 1 > día 7, 10;  $p \leq 0.05$ ) y ODN CpG 2006 (día 1, 3 > día 7;  $p \leq 0.001$ ) (Tabla 2).

**Tabla IV.** Efecto de ODN CpG sobre la actividad de enzimas antioxidantes después de 1, 3, 7 y 10 días de su administración intraperitoneal. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de actividad de CAT (U/mg) y SOD (U/mg) en extracto de hígado; el signo § denotan diferencias estadísticas significativas a través del tiempo en cada tratamiento (ANOVA; §,  $p \leq 0.05$ ; §§,  $p \leq 0.001$ ).

Día 1	PBS	Vp <sup>1</sup>	ODN CpG 1668	ODN CpG 1826	ODN CpG D	ODN CpG 1670	ODN CpG 2006
SOD (U/mg)	2.66 $\pm$ 1.18	3.41 $\pm$ 0.89	2.95 $\pm$ 0.99	2.81 $\pm$ 0.82	3.18 $\pm$ 1.37	3.23 $\pm$ 0.50	1.43 $\pm$ 0.36
CAT (U/mg)	4.02 $\pm$ 0.06	3.84 $\pm$ 0.16	3.01 $\pm$ 0.03	2.73 $\pm$ 0.18	4.08 $\pm$ 0.09	4.34 $\pm$ 0.12	3.26 $\pm$ 0.00
Día 3	PBS	Vp <sup>1</sup>	ODN CpG 1668	ODN CpG 1826	ODN CpG D	ODN CpG 1670	ODN CpG 2006
SOD (U/mg)	1.70 $\pm$ 0.02	3.63 $\pm$ 0.85	8.81 $\pm$ 3.73	1.61 $\pm$ 0.3	2.39 $\pm$ 0.73	1.44 $\pm$ 0.19	4.84 $\pm$ 2.75
CAT (U/mg)	3.14 $\pm$ 0.13	3.50 $\pm$ 0.07	2.51 $\pm$ 0.11	2.95 $\pm$ 0.03	3.12 $\pm$ 0.06	2.66 $\pm$ 0.29	2.99 $\pm$ 0.11
Día 7	PBS	Vp <sup>1</sup>	ODN CpG 1668	ODN CpG 1826	ODN CpG D	ODN CpG 1670	ODN CpG 2006
SOD (U/mg)	1.64 $\pm$ 0.31	2.30 $\pm$ 0.76	1.41 $\pm$ 0.22 <sup>§</sup>	2.02 $\pm$ 0.96	1.71 $\pm$ 0.28	1.46 $\pm$ 0.26	2.17 $\pm$ 0.49
CAT (U/mg)	2.62 $\pm$ 0.20	1.62 $\pm$ 0.06	2.04 $\pm$ 0.51 <sup>§</sup>	2.48 $\pm$ 0.17	1.37 $\pm$ 0.22	1.63 $\pm$ 0.33	1.24 $\pm$ 0.13 <sup>§</sup>
Día 10	PBS	Vp <sup>1</sup>	ODN CpG 1668	ODN CpG 1826	ODN CpG D	ODN CpG 1670	ODN CpG 2006
SOD (U/mg)	2.47 $\pm$ 0.05	2.04 $\pm$ 0.92	1.64 $\pm$ 0.17 <sup>§§</sup>	2.02 $\pm$ 0.49	2.62 $\pm$ 0.57	3.35 $\pm$ 1.61	1.11 $\pm$ 0.02
CAT (U/mg)	4.60 $\pm$ 0.32	2.49 $\pm$ 0.42	1.93 $\pm$ 0.12 <sup>§§</sup>	3.48 $\pm$ 0.32	2.25 $\pm$ 0.24	1.85 $\pm$ 0.18	2.06 $\pm$ 0.10

Nota: <sup>1</sup>V. *parahaemolitycus*.



**Figura 4.** Efecto de ODN CpG sobre la actividad de enzimas antioxidantes en extracto de hígado después de 1, 3, 7 y 10 días de la administración intraperitoneal. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar después de ser normalizados con el grupo control (PBS, línea roja); actividad de superóxido dismutasa (A) y actividad catalasa (B); los asteriscos denotan las diferencias estadísticas significativas contra el control PBS (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

## 7.2 Análisis histológico de muestras de intestino.

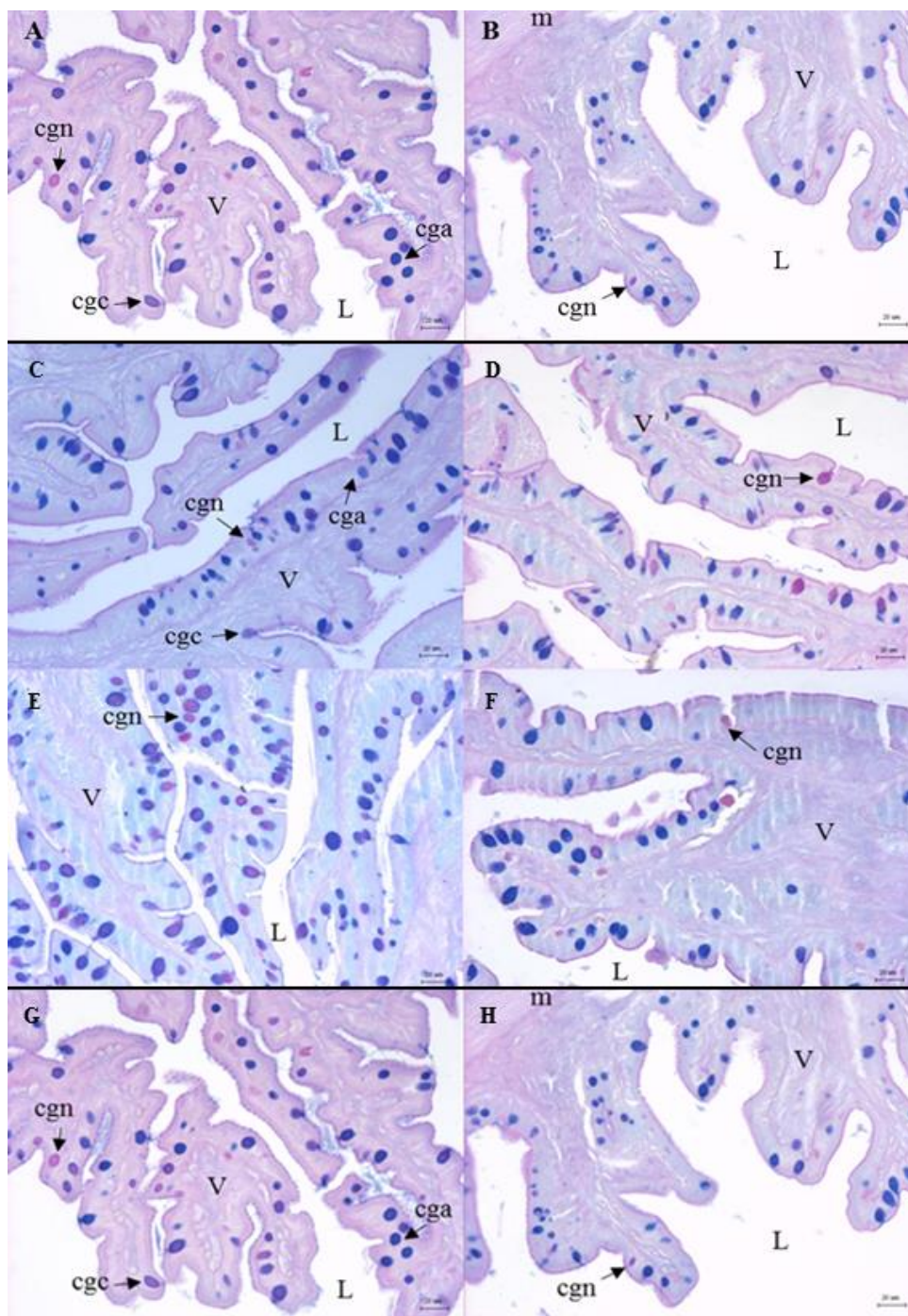
En la tabla V, se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de altura de microvellosidades (AM), el área de cobertura de linfocitos intraepiteliales (LI), de melanomacrófagos (MG), área de cobertura de mucinas ácidas producidas por células Goblets (CGA), así como de mucinas neutras (CGN) y de mucinas compuestas (CGC), el área de cobertura total de Células Goblets (CGT) y el porcentaje de cobertura epitelial ocupada por las mismas (%CG). No se encontraron diferencias significativas en la altura de las microvellosidades (AM), cobertura de linfocitos inepiteliales (LI), melanomacrófagos (MG) y en el porcentaje de cobertura epitelial ocupada por células productoras de mucinas (%GC) posterior al análisis de varianza (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, se observó una disminución de LI en los peces tratados con el ODN CpG 1668 del primer al séptimo día de muestreo ( $0.22 \pm 0.06$ ,  $p \leq 0.05$ ).

Solo se observó una mayor presencia de éstas células productoras de mucinas ácidas (CGA), en los organismos tratados con *V. parahaemolyticus* al décimo día respecto al control ( $p \leq 0.05$ ), así como el aumento de estas a través del tiempo. Una disminución significativa de CGA del séptimo al décimo día en los organismos tratados con el ODN CpG D fue registrada, pero este aumento no fue estadísticamente diferente al control negativo (PBS). Por otra parte, el área ocupada por las células productoras de mucinas neutras (CGN) fue estadísticamente inferior respecto al Control PBS ( $1.01 \pm 0.32$ ) al primer día en los organismos tratados con el ODN CpG 1670 ( $0.19 \pm 0.03$ ) (Fig. 5 A-B) y fue significativamente superior al tercer día (Control PBS,  $0.14 \pm 0.04$ ) en los tratamientos ODN CpG 1826 ( $1.20 \pm 0.65$ ), ODN CpG 1668 ( $0.83 \pm 0.12$ ), ODN CpG 1670 ( $0.77 \pm 0.29$ ) ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 5 C-F). Mientras que en los organismos tratados con el ODN CpG 2006 se observó un aumento significativo del primer día al décimo día ( $0.48 \pm 0.04 > 0.51 \pm 0.06$ ;  $p \leq 0.05$ ). En el registro de células productoras de mucinas compuestas (CGC) se observó que en los organismos tratados con *V. parahaemolyticus* al décimo día no se encontró este tipo de células (Fig. 5 G-H). Al realizar el cálculo correspondiente del total de células productoras de mucinas (CGT), no se encontraron diferencias significativas respecto al control, pero si el aumento de estas células respecto al tiempo en los tratamientos con el ODN CpG D (día 7) y ODN CpG 1670 (día 7).

**Tabla V.** Resultados histológicos e histoquímicos de intestino. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar, los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre el control ( $p \leq 0.05$ ) y el símbolo (§) los cambios significativos a través del tiempo ( $p \leq 0.05$ ). Altura de microvellosidades ( $\mu\text{m}$ ) (AM), área de cobertura de leucocitos intraepiteliales (LI); % de cobertura total de células productoras de mucinas (ACG) área total de células productoras de mucinas (CGT), CG mucinas neutras – magenta (CGN), CG productoras de mucinas acidas – azul (CGA); CG productoras de mezcla de mucinas – violeta (CGC).

<b>Día 1</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp<sup>l</sup></i>	<i>ODN CPG</i> <i>1668</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1826</i>	<i>ODN CpG</i> <i>D</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1670</i>	<i>ODN CpG</i> <i>2006</i>
AM	2.03 $\pm$ 0.01	1.45 $\pm$ 0.10	1.48 $\pm$ 0.04	1.55 $\pm$ 0.21	1.67 $\pm$ 0.18	1.72 $\pm$ 0.23	1.43 $\pm$ 0.10
LI	0.53 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.10	0.31 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.22
MG	0.00	0.10 $\pm$ 0.21	0.47 $\pm$ 0.27	0.13 $\pm$ 0.22	0.00	0.39 $\pm$ 0.41	0.00
CGA	11.93 $\pm$ 2.63	14.46 $\pm$ 0.94	8.31 $\pm$ 1.14	9.50 $\pm$ 1.04	9.35 $\pm$ 0.96	7.80 $\pm$ 2.08	8.49 $\pm$ 2.74
CGN	1.01 $\pm$ 0.32	0.66 $\pm$ 0.20	0.82 $\pm$ 0.21	1.01 $\pm$ 0.34	2.06 $\pm$ 1.22 <sup>§</sup>	0.19 $\pm$ 0.03*	0.20 $\pm$ 0.08 <sup>§</sup>
CGC	0.70 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.74	1.29 $\pm$ 0.43	1.12 $\pm$ 0.70	0.64 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.12	0.33 $\pm$ 0.08
CGT	13.63 $\pm$ 2.95	16.14 $\pm$ 0.14	10.42 $\pm$ 0.78	11.63 $\pm$ 2.08	12.06 $\pm$ 2.04	8.33 $\pm$ 1.97	9.03 $\pm$ 2.90
%CG	4.08 $\pm$ 0.81	5.48 $\pm$ 0.47	4.15 $\pm$ 0.43	5.24 $\pm$ 1.56	4.62 $\pm$ 2.20	3.41 $\pm$ 0.21	5.07 $\pm$ 0.92
<b>Día 3</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp<sup>l</sup></i>	<i>ODN CPG</i> <i>1668</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1826</i>	<i>ODN CpG</i> <i>D</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1670</i>	<i>ODN CpG</i> <i>2006</i>
AM	1.67 $\pm$ 0.09	1.63 $\pm$ 0.14	1.47 $\pm$ 0.10	1.52 $\pm$ 0.03	1.61 $\pm$ 0.16	1.76 $\pm$ 0.03	1.53 $\pm$ 0.06
LI	0.34 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.16	0.65 $\pm$ 0.22	0.42 $\pm$ 0.15	0.23 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.03
MG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03 $\pm$ 0.09	0.04 $\pm$ 0.13	0.00
CGA	10.61 $\pm$ 1.57	9.33 $\pm$ 1.66	7.56 $\pm$ 0.79	10.40 $\pm$ 3.52	11.28 $\pm$ 0.08	6.74 $\pm$ 1.02	7.13 $\pm$ 0.25
CGN	0.14 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.27	0.83 $\pm$ 0.12*	1.20 $\pm$ 0.65*	0.72 $\pm$ 0.02 <sup>§</sup>	0.77 $\pm$ 0.29*	0.48 $\pm$ 0.04
CGC	0.40 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.32	0.71 $\pm$ 0.13	0.63 $\pm$ 0.13	0.95 $\pm$ 0.46	0.50 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.03
CGT	11.15 $\pm$ 1.45	10.84 $\pm$ 1.48	9.11 $\pm$ 0.98	12.22 $\pm$ 4.04	12.94 $\pm$ 0.55	8.01 $\pm$ 0.99	8.09 $\pm$ 0.26
%CG	5.24 $\pm$ 0.60	5.61 $\pm$ 1.24	5.95 $\pm$ 1.15	5.77 $\pm$ 0.20	6.58 $\pm$ 0.35	5.41 $\pm$ 1.12	5.12 $\pm$ 0.35
<b>Día 7</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp<sup>l</sup></i>	<i>ODN CPG</i> <i>1668</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1826</i>	<i>ODN CpG</i> <i>D</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1670</i>	<i>ODN CpG</i> <i>2006</i>
AM	1.41 $\pm$ 0.09	1.53 $\pm$ 0.14	1.49 $\pm$ 0.11	1.41 $\pm$ 0.05	1.46 $\pm$ 0.15	1.47 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.10
LI	0.40 $\pm$ 0.11	0.49 $\pm$ 0.12	0.22 $\pm$ 0.06 <sup>§</sup>	0.65 $\pm$ 0.25	0.40 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.18
MG	0.10 $\pm$ 0.29	0.00	0.34 $\pm$ 0.55	0.00	0.13 $\pm$ 0.22	0.20 $\pm$ 0.28	0.00
CGA	12.27 $\pm$ 1.60	5.82 $\pm$ 0.47	12.39 $\pm$ 3.97	14.87 $\pm$ 1.60	15.73 $\pm$ 2.68	12.93 $\pm$ 2.72	11.09 $\pm$ 2.75
CGN	0.43 $\pm$ 0.30	0.90 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.21	0.40 $\pm$ 0.13	0.40 $\pm$ 0.10 <sup>§</sup>	0.19 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.10
CGC	0.41 $\pm$ 0.23	0.86 $\pm$ 0.07	0.56 $\pm$ 0.28	0.16 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.25	0.51 $\pm$ 0.32	0.21 $\pm$ 0.01
CGT	13.12 $\pm$ 2.06	7.58 $\pm$ 0.49 <sup>§</sup>	13.38 $\pm$ 3.54	15.43 $\pm$ 1.40	16.51 $\pm$ 2.97 <sup>§</sup>	13.63 $\pm$ 2.41 <sup>§</sup>	11.51 $\pm$ 2.84
%CG	3.51 $\pm$ 0.73	4.78 $\pm$ 1.04	6.21 $\pm$ 1.15	5.32 $\pm$ 0.25	2.83 $\pm$ 0.76	4.12 $\pm$ 0.21	2.34 $\pm$ 0.33
<b>Día 10</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp<sup>l</sup></i>	<i>ODN CPG</i> <i>1668</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1826</i>	<i>ODN CpG</i> <i>D</i>	<i>ODN CpG</i> <i>1670</i>	<i>ODN CpG</i> <i>2006</i>
AM	1.35 $\pm$ 0.14	1.45 $\pm$ 0.11	1.37 $\pm$ 0.04	1.70 $\pm$ 0.31	1.43 $\pm$ 0.08	1.46 $\pm$ 0.02	1.45 $\pm$ 0.01
LI	1.18 $\pm$ 0.18	0.97 $\pm$ 0.28	0.99 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.11	0.66 $\pm$ 0.06	0.77 $\pm$ 0.08	0.54 $\pm$ 0.07
MG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30 $\pm$ 0.58	0.00	0.00
CGA	6.37 $\pm$ 1.52	20.60 $\pm$ 4.44 <sup>§*</sup>	9.09 $\pm$ 0.79	8.53 $\pm$ 0.58	7.03 $\pm$ 3.02 <sup>§</sup>	10.18 $\pm$ 0.14	10.96 $\pm$ 0.84
CGN	0.66 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.27	0.60 $\pm$ 0.20	0.60 $\pm$ 0.11	1.22 $\pm$ 0.39	0.48 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.06 <sup>§</sup>
CGC	0.42 $\pm$ 0.23	0 $\pm$ 0*	0.55 $\pm$ 0.14	0.68 $\pm$ 0.11	1.30 $\pm$ 0.17	0.31 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.01
CGT	7.45 $\pm$ 1.34	21.59 $\pm$ 4.70 <sup>§</sup>	10.25 $\pm$ 0.88	9.81 $\pm$ 0.79	9.55 $\pm$ 2.62	10.97 $\pm$ 0.32	12.09 $\pm$ 0.80
%CG	4.69 $\pm$ 0.72	6.15 $\pm$ 1.15	6.91 $\pm$ 1.15	4.73 $\pm$ 1.16	6.79 $\pm$ 1.46	4.31 $\pm$ 0.32	5.27 $\pm$ 0.77

Nota: <sup>1</sup>V. *parahaemolyticus*



**Figura 5.** Fotografías de cortes transversales de intestino de *L. argentiventris*. Día 1: **A.** Control PBS, **B.** ODN CpG 1670; Día 7: **C.** Control PBS, **D.** ODN CpG 1668, **E.** ODN CpG 1826, **F.** ODN CpG 1670; Día 10 **G.** Control PBS, **H.** *V. parahaemolyticus*. Tinción con azul alcian y ácido peryódico de Schiff. V = vellosidad, L= lumen, m = mucosa, cga = célula productora de mucinas ácidas, cgn= célula productora de mucinas neutras, cgc= célula productora de mucinas compuestas. Microscopio Olympus Bx41, aumento 20X.

Cabe resaltar que no se encontraron daños histológicos referentes a inflamación, atrofia, hipertrofia, hiperplasia o dilatación de la lámina propia de acuerdo a la escala asignada (Tabla VI).

**Tabla VI.** Grado de inflamación de acuerdo a una escala de 0 a 3, donde 0 = normal, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = severo. Los cambios histopatológicos de atrofia, hipertrofia, hiperplasia, dilatación de la lámina propia (LP) se registraron de acuerdo a (-) no histopatología, (+) histopatología leve, (++) histopatología moderada, e (+++) histopatología severa.

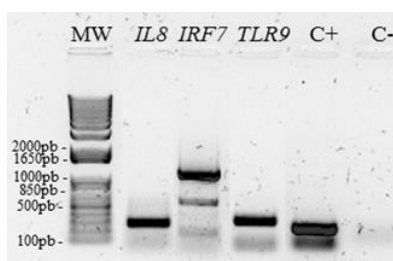
<b>Día 1</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp<sup>1</sup></i>	<i>ODN</i> <i>CPG1668</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1826</i>	<i>ODN</i> <i>CpGD</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1670</i>	<i>ODN</i> <i>CpG2006</i>
INFLAMACIÓN	0	0	0	0	0	0	0
ATROFIA	-	+	-	-	-	-	-
HIPERTROFIA	-	-	-	-	-	-	+
HIPERPLASIA	-	-	-	-	-	-	+
DILATACIÓN LP	-	-	-	-	-	-	+
<b>Día 3</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp</i>	<i>ODN</i> <i>CPG1668</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1826</i>	<i>ODN</i> <i>CpGD</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1670</i>	<i>ODN</i> <i>CpG2006</i>
INFLAMACIÓN	0	1	0	1	0	0	0
ATROFIA	-	+	-	-	-	+	-
HIPERTROFIA	-	+	-	+	-	-	-
HIPERPLASIA	-	+	-	+	-	-	-
DILATACIÓN LP	-	+	-	-	-	-	-
<b>Día 7</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp</i>	<i>ODN</i> <i>CPG1668</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1826</i>	<i>ODN</i> <i>CpGD</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1670</i>	<i>ODN</i> <i>CpG2006</i>
INFLAMACIÓN	0	0	0	0	1	0	0
ATROFIA	-	-	-	-	-	-	-
HIPERTROFIA	-	-	-	+	-	-	+
HIPERPLASIA	-	-	-	-	+	-	+
DILATACIÓN LP	-	-	-	+	+	-	+
<b>Día 10</b>	<i>PBS</i>	<i>Vp</i>	<i>ODN</i> <i>CPG1668</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1826</i>	<i>ODN</i> <i>CpGD</i>	<i>ODN</i> <i>CpG1670</i>	<i>ODN</i> <i>CpG2006</i>
INFLAMACIÓN	0	1	0	0	0	0	0
ATROFIA	-	-	-	-	-	-	-
HIPERTROFIA	-	-	-	-	-	-	-
HIPERPLASIA	-	-	-	-	-	-	-
DILATACIÓN LP	+	-	-	-	-	-	-

Nota: <sup>1</sup>*V. parahaemolyticus*.

### 7.3 Genes empleados en el análisis de cuantificación de expresión de genes.

#### 7.3.1 Obtención de secuencias específicas de *Lutjanus argentiventris*.

Se diseñaron 7 oligos por alineamientos múltiples de secuencias de interés inmunológico, de los cuales se obtuvieron 3 secuencias parciales específicas, que corresponden a los genes *IRF7* (factor de transcripción, 692 pb), *TLR9* (receptor transmembranal Tipo Toll, 341 pb) e *IL8* (interlucina, 262 pb) (Fig. 6). Estas secuencia se analizaron empleando alineamientos locales (BLASTn), donde se obtuvo el valor de similitud E y el porcentaje de identidad. En la tabla VII se muestran además los tres principales organismos con los cuales las secuencias tuvieron una mayor identidad.

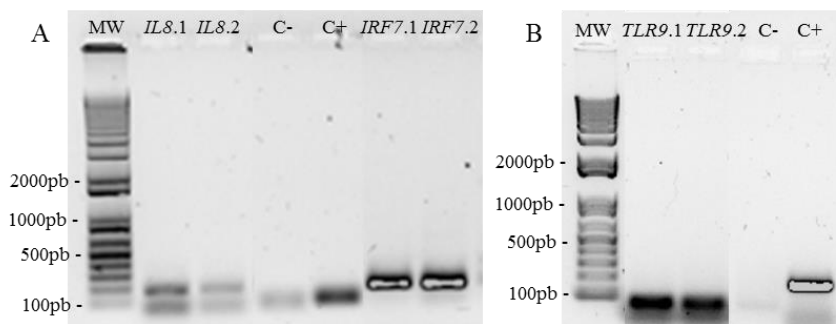


**Figura 6.** Amplicones generados utilizando los oligos inespecíficos diseñados. Las bandas fueron cortadas, purificadas y clonadas en *Escherichia coli* TOP10. Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (MW), control positivo (C+) gen *EF-1 $\alpha$* , control negativo (C-) mezcla de reacción sin templado.

**Tabla VII.** Alineamiento local con el software BLASTn de NCBI. Se presenta el gen, así como tamaño de amplicon obtenido e identidad con secuencias reportadas para otras especies de teleósteos.

Gen	Amplicon (pb)	Número de Acceso	Organismo	Valor E	Identidad
<i>IRF7</i>	692	<u>AY647434.1</u>	<i>Sineperca chuatsi</i>	0	86%
		<u>NM_001303350.1</u>	<i>Larimichthys crocea</i>	0	85%
		<u>KP861885.1</u>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	0	85%
<i>TLR9</i>	341	<u>KM507866.1</u>	<i>Lutjanus peru</i>	1e-160	97%
		<u>EU655705.1 – 704.1</u>	<i>Larimichthys crocea A-B</i>	7e-104	87%
		<u>GQ358202.1 – 201.1</u>	<i>Epinephelus coioides A-B</i>	7e-84	84%
<i>IL8</i>	262	<u>KF148634.1</u>	<i>Lutjanus sanguineus</i>	9e-117	96%
		<u>JQ513375.1</u>	<i>Sineperca chuatsi</i>	6e-94	91%
		<u>HM453864.1</u>	<i>Pagrus major</i>	3e-92	91%

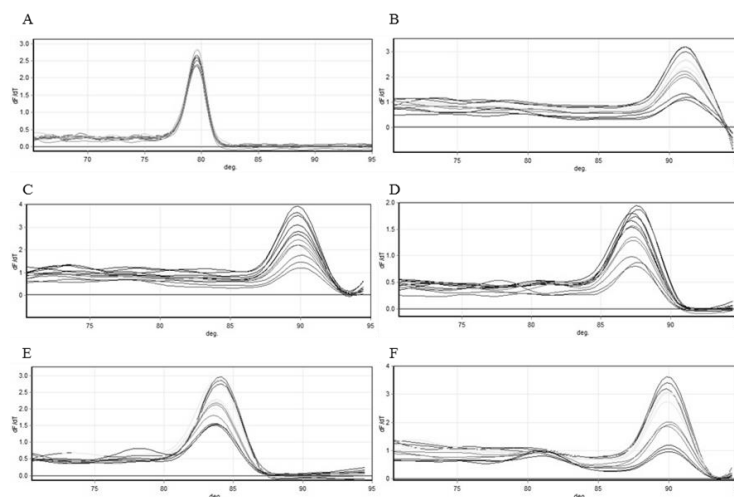
Empleando las secuencias anteriores como molde, se diseñaron los oligos correspondientes para realizar la técnica de qPCR; dichos oligos se probaron en PCR de punto final para determinar la temperatura de alineamiento (temperatura de alineamiento 60°C) y especificidad por tejido (Fig. 7).



**Figura 7.** Amplicones con oligos específicos (LaqPCRIL8, LaqPCRIRF7, LaqPCRTL9) para *L. argentiventris*. El número 1 corresponden a amplicones a partir de DNAc sintetizado con ARN de muestras de bazo y el número de 2 de muestras de intestino. Como marcador de peso molecular (MW) 1 Kb plus DNA ladder; control positivo (C+) gen *EF-1a*, control negativo (C-) mezcla de reacción sin templado.

Una vez determinada la temperatura de alineamiento se obtuvieron las curvas de disociación para corroborar la especificidad en la técnica de qPCR. Este proceso también se realizó con los oligos específicos de los genes *IL-1 $\beta$* , *NF $\kappa$  $\beta$* , *ILF2* de *L. argentiventris*. Las secuencias específicas de estos oligos fueron obtenidos en un trabajo previo de secuenciación masiva, ensamblado por el M.C Esteban Velázquez y los oligos utilizados se encuentran disponibles en el laboratorio de patogénesis microbiana (Apartado 6.4.2, Tabla II), estos oligos fueron diseñados y previamente estandarizados en PCR de punto final por la M.C. Miriam Gorreti Angulo con una temperatura de alineamiento de 60°C. Los resultados de estabilidad se resumen en la figura 8, concluyendo que los productos de amplificación son únicos teniendo una temperatura de disociación de 80–93°C. Asimismo, se observó que a bajas concentraciones de templado se puede llegar a detectar una baja señal de amplificación inespecífica por los oligos específicos para el gen *ILF2*.

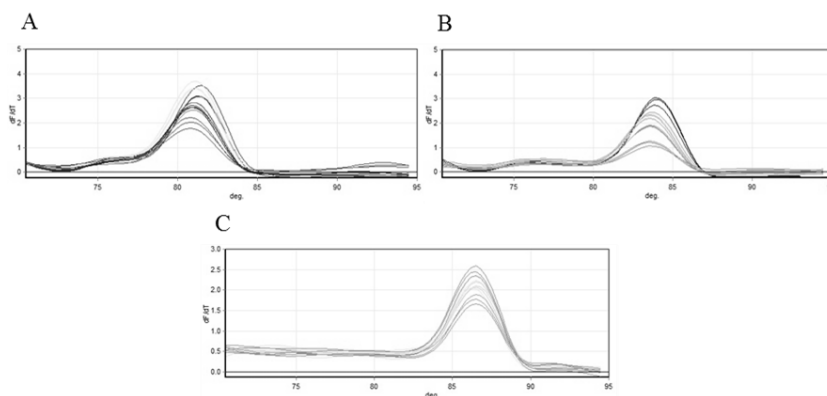




**Figura 8.** Curvas de disociación de oligos específicos para qPCR de *L. argentiventris* construidas por el software Rotor-Gene 6000 series. A) *TLR9*, B) *IRF7*, C) *IL-8*, D) *IL-1 $\beta$* , E) *NF $\kappa$  $\beta$* , F) *ILF2*

### 7.3.2 Evaluación de la estabilidad de genes de referencia

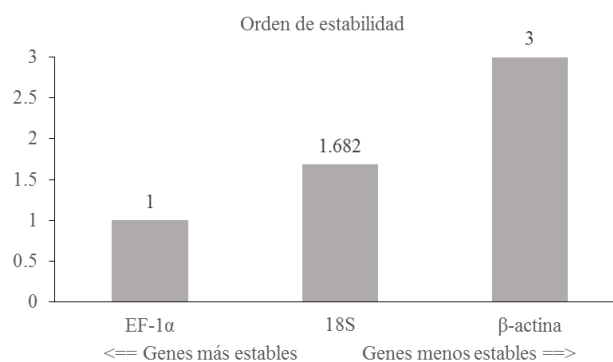
Se determinó el patrón de disociación en los productos de amplificación para la técnica de qPCR de cada uno de los oligos candidatos como genes de referencia (Fig. 9). Se corroboró la especificidad del oligo al discriminar la producción de dímeros y al encontrar una temperatura de disociación por arriba de los 80°C.



**Figura 9.** Curvas de disociación de oligos específicos para qPCR de *L. argentiventris* construidas por el software Rotor-Gene 6000 series. A) *18S*, B)  *$\beta$ -actina*, C) *EF-1 $\alpha$* .

Posterior a realizar el análisis de estabilidad de genes de referencia con el software RefFinder, se encontró que el gen *EF-1 $\alpha$*  presenta una mayor estabilidad a lo largo del experimento. Los resultados que se muestran en la figura 10 representa el orden de estabilidad

creado por el software RefFinder, al ponderar adecuadamente cada gen de acuerdo a los análisis realizados por los algoritmos Bestkeeper, Normfinder, Gennorm y análisis comparativo  $\Delta Ct$ . Entre más cercano a 1 el valor asignado, más estable es la expresión del gen.



**Figura 10.** Representación gráfica del orden de estabilidad creado por el software RefFinder, al ponderar adecuadamente cada gen de acuerdo a los análisis realizados por los algoritmos Bestkeeper, Normfinder, Gennorm y análisis comparativo  $\Delta Ct$ . Entre más cercano a uno sea el valor asignado, más estable es la expresión del gen.

#### 7.4 Cuantificación de la expresión relativa de genes inmunorelevantes

Se determinó la expresión diferencial tanto en bazo como intestino de 6 genes involucrados en la cascada de señalización del sistema inmune que corresponden al Receptor Tipo Toll 9 (*TLR9*), interlucinas 1 $\beta$  y 8 (*IL-1 $\beta$* , *IL8*) y los factores de transcripción de Interlucina 2 (*ILF2*), factor 7 regulador de interferón (*IRF7*) y de la proteína activadora del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*NF $\kappa$ B*).

Al determinar cambios significativos respecto al control, se identificó la sobreexpresión del gen *TLR9* en bazo (Fig. 11), al día 3 posterior a la administración vía intraperitoneal en los organismos tratados con el ODN CpG 1670, al 7 día con el tratamiento ODN CpG 1826 y al 10 día en los organismos tratados con *Vibrio parahaemolyticus*, ODN CpG 1668, ODN CpG 1826, ODN CpG 1670, ODN CpG 2006 (Fig.11A,  $p \leq 0.05$ ). Mientras que en intestino (Fig. 12) la activación de la transcripción de *TLR9* no presentó un aumento respecto al control, inclusive a los días 1 y 3 se observó una disminución importante de la

transcripción en los peces tratados con ODN CpG 1668, ODN CpG 1826 al día 1 y con *V. parahaemolyticus* al 3 día después de la inyección vía intraperitoneal (Fig. 12A).

El perfil de expresión de citocinas se vio ampliamente estimulado tanto en bazo como en intestino. En bazo, la transcripción de interlucina 1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ) en los peces tratados con *V. parahaemolyticus*, ODN CpG 1826, D, 1670 y 2006 incrementó por arriba de 5 veces comparado con el control posterior al 1 día de exposición, pero posterior al 3 día se observó una reducción significativa, donde al 10 día el incremento respecto al control fue solo de 2 veces más (Tukey,  $p \leq 0.05$ ), exceptuando los organismos tratados con ODN CpG 2006 ( $p=0.912$ ). Por otra parte, el patrón de expresión reportado con el ODN CpG 1668, mostró un incremento altamente significativo a través del tiempo (Tukey,  $p \leq 0.001$ ), al aumentar más de 40 veces la transcripción de *IL-1 $\beta$*  respecto al control (Fig.11B; Dunnet,  $p \leq 0.001$ ). Este patrón fue observado también en la expresión de interlucina 8 (*IL-8*), pero en este caso el aumento fue mayor a 65 veces más respecto al control (Fig. 11C).

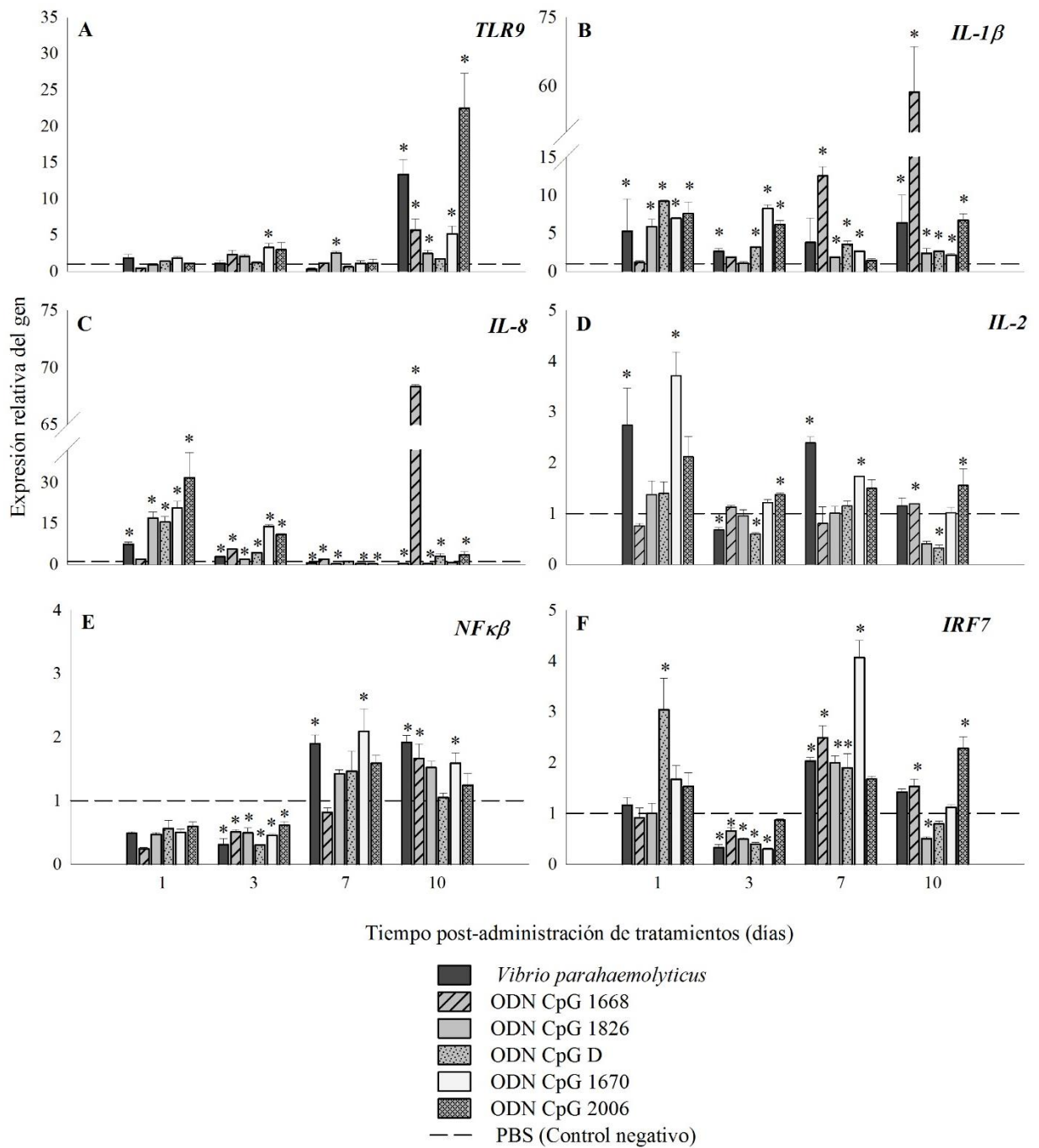
Sin embargo en intestino la sobreexpresión *IL-1 $\beta$*  estuvo presente hasta el 3 día en todos los tratamientos empleados, destacando un incremento de 20 veces más con el tratamiento ODN CpG 1670 ( $p \leq 0.001$ ); así mismo se identificó la sub-regulación de la expresión al 7 y 10 día respecto al control, no obstante el valor reportado de expresión con el tratamiento ODN CpG 1668 no presentó diferencias respecto al control ( $p > 0.05$ ; Fig. 12B). En caso contrario con la regulación de la expresión de *IL-8*, ya que al 10 día se observó una sobreexpresión en los tratamientos ODN CpG 1668 y 2006, pero solo 5 y 2 veces más que el control respectivamente. Al 3 día la sobreexpresión de *IL-8* solo se mantuvo en los peces estimulados con ODN CpG 1826 y 2006, disminuyendo drásticamente al 7 día. Mientras que no se observó un incremento de la expresión de *IL-8* respecto al control PBS con el ODN CpG D, pero sí una disminución importante del 1 día (media  $\pm$  error estándar,  $15.23 \pm 2.03$ ) al 10 día ( $2.62 \pm 0.95$ ) ( $p=0.001$ ) (Fig. 12C).

En el caso de la expresión de los distintos factores de transcripción evaluados, estos presentaron un comportamiento muy diferente entre sí. En bazo el Factor 2 de Unión al potenciador de interleucina (*ILF2*) fue sobreexpresado solo en los organismos bajo los

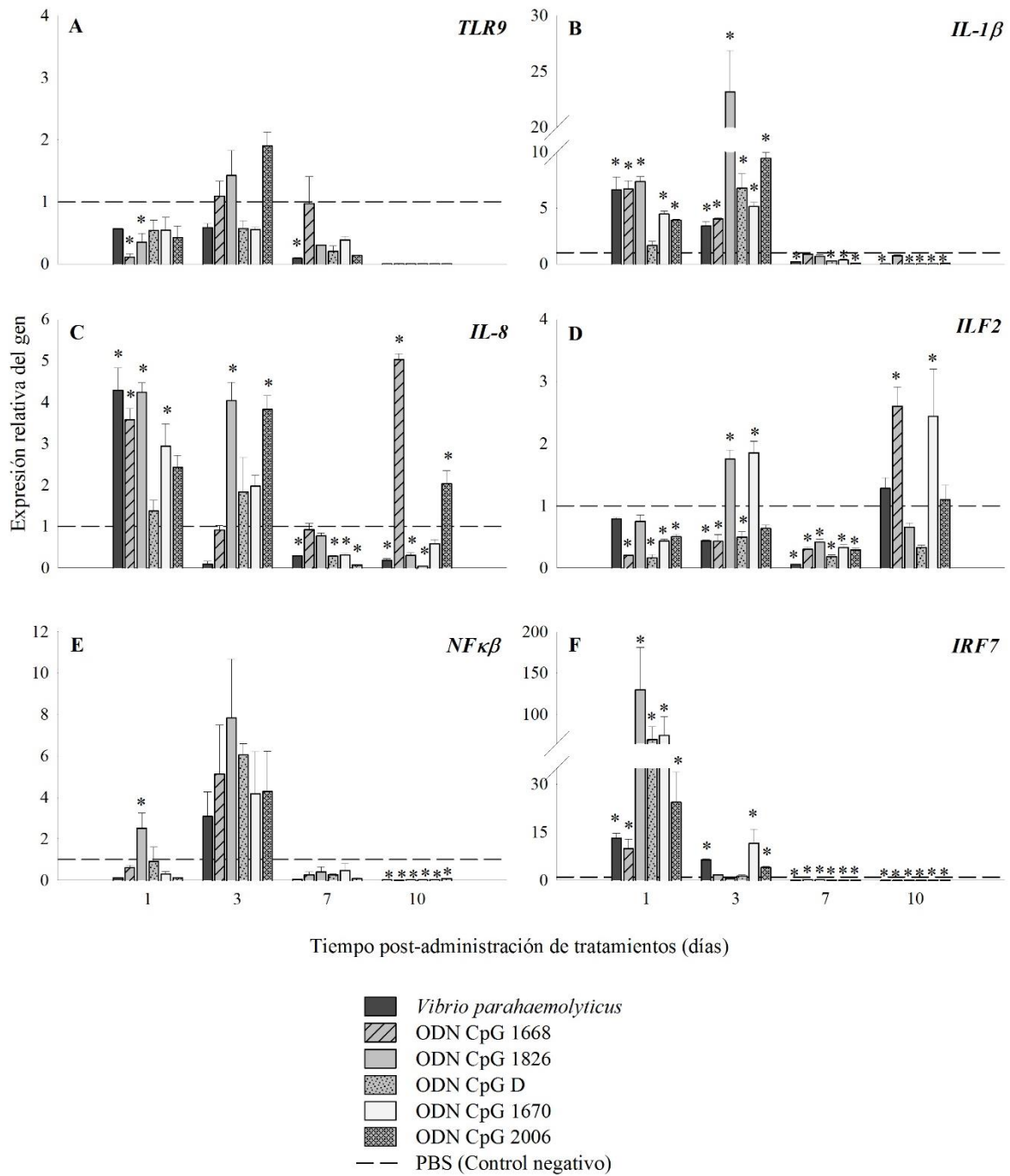
tratamientos con *V. parahaemolyticus* (1,7 día), ODN CpG 1670 (1,7 día), ODN CpG 2006 (1,10 día) y ODN CpG 1668 (10 día), mientras que con el ODN CpG D la expresión no fue estimulada, más bien existió una disminución significativa en el perfil de expresión comparado con el control PBS al 3 y 10 día (Fig. 11D). Por el contrario en intestino, los organismos tratados con ODN CpG 1826 (día 3), ODN CpG 1670 (3,10 día) y ODN CpG 1668 (10 día) un aumento de más de 1.5 respecto al control, pero en el resto de los tratamientos no existió un incremento de la expresión (Fig. 12D).

Mientras que la transcripción del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*NFκβ*), se activó al 7 y 10 día en bazo, siendo significativamente superior en los peces expuestos vía intraperitoneal a *V. parahaemolyticus*, ODN CpG 1670 y ODN CpG 1668 (Fig. 11E), al contrario con la activación de la transcripción presentado en intestino, donde esta solo fue estadísticamente diferente al control al 1 día con el tratamiento ODN CpG 1826, no obstante en la figura 12E se puede apreciar gráficamente la sobreexpresión de *NFκβ*, pero posterior al análisis de varianza esta no presento diferencias respecto al control PBS, pero si una disminución estadística del 3 al 10 día ( $p<0.001$ ) resultante en la sub-regulación de la transcripción de *NFκβ* respecto al control.

Particularmente el factor de transcripción del factor 7 regulador de interferón (*IRF7*), en bazo mostró un comportamiento distinto *ILF2* e *NFκβ*, ya que al 1 día los peces que mostraron un incremento significativo respecto al control fueron aquellos tratados con ODN CpG D, sin embargo es destacable la sub-regulación de dicha transcripción al 3 día ( $p<0.001$ ), similar con los otros factores de transcripción (Fig. 11F). Pero en intestino el ODN CpG 1826 aumento más de 100 veces, el ODN CpG D y 1670 más de 65 veces, mientras que el ODN CpG 1668 y *V. parahaemolyticus* cerca de 10 veces, al 1 día, disminuyendo drásticamente al 7 y 10 día ( $p<0.001$ ).



**Figura 11.** Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en bazo. Los datos fueron normalizados con el gen constitutivo *EF-1α* y calibrados con el grupo control (PBS, línea punteada), los asteriscos denotan diferencias significativas contra el control PBS (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 12.** Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en intestino. Los datos fueron normalizados con el gen constitutivo *EF-1α* y calibrados con el grupo control (PBS, línea punteada), los asteriscos denotan diferencias significativas contra el control PBS (ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).

### 7.5 Análisis de correlación entre variable determinadas.

Al observar la estimulación significativa de las variables determinadas en este estudio, correspondientes a la actividad enzimática antioxidante, estructura celular intestinal y la expresión de genes inmunorelevantes, se determinó el nivel de correlación existente (Pearson,  $p \leq 0.05$ ) y posteriormente se analizó la estructura de dichas correlaciones mediante un análisis factorial exploratorio para cada tratamiento empleado en este experimento. Las variables se clasificaron de acuerdo al tipo de respuesta que provoca, ya sea la activación de células o producción de componentes humorales y si estos pertenecen o derivan en la activación de una respuesta inmune innata o adaptativa (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Clasificación de variables empleadas en este trabajo.

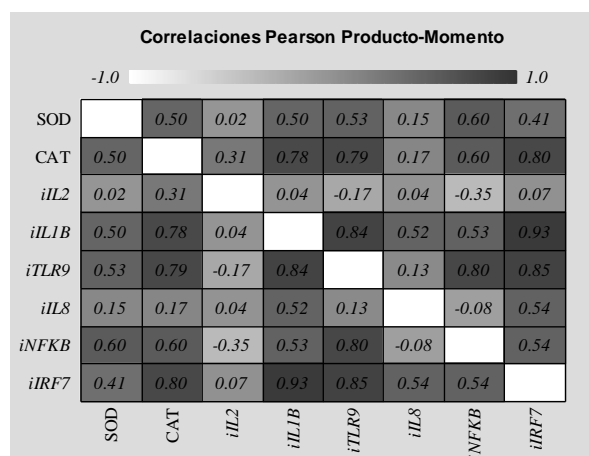
Innata	Celular	<i>IL-8, IL-1<math>\beta</math></i> , variables morfométricas (AM, LI, MG, CGN, CGC, CGT, %CG)
	Humoral	<i>NF<math>\kappa</math><math>\beta</math>, TLR9</i> , enzimas antioxidantes (SOD, CAT) <i>IRF7</i>
Adaptativa	Celular	<i>ILF2</i>
	Humoral	No se cuenta con información

Para obtener un análisis veraz y evitar una falsa interpretación de los datos se efectuó el test de esfericidad de Bartlett (1950) y se determinó el índice de Kaiser-Meyer-Olkin o medida de adecuación muestral KMO, ambas pruebas estadísticas nos permiten decidir si es viable o no realizar el análisis factorial. La prueba de esfericidad de Bartlett comprueba si la correlación entre las variables analizadas es lo suficientemente grande como para justificar la factorización de la matriz de coeficientes de correlación, mientras que el índice KMO compara los valores de las correlaciones entre las variables y sus correlaciones parciales, por tanto, si KMO es próximo a 1 es factible realizar el análisis factorial; a partir de valores de KMO superiores a 0.6 se consideran adecuados para realizar dicho análisis. Una condición importante para realizar el análisis factorial es que el número de observaciones debe de ser por lo menos 4 o 5 veces más que el número de variables, parámetro que se tomó en cuenta en el diseño del análisis factorial.

### 7.5.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Con las diferentes variables se construyó la matriz de correlación más representativa ( $p < 0.05$ , Fig. 13). La prueba de esfericidad de Barlett arrojó una chi cuadrada de 69.8452 con 28 grados de libertad y una  $p = 0.00001956$ ; mientras que el índice KMO fue de 0.630776. Posterior al análisis factorial se obtuvieron 3 componentes que en total explican el 87.567% de la varianza. El valor de carga de la variable  $> 0.85$  fue tomada en cuenta para describir las variables más importante que forman parte del factor calculado.

El análisis factorial permite disminuir el número de variables, acotándolas a aquellas que tiene un comportamiento similar de variabilidad agrupándolas en factores que explican en mayor medida el efecto del tratamiento (en este apartado *V. parahaemolyticus*) sobre el organismo modelo. El primer factor está representado en mayor proporción por la expresión en intestino de los genes *TLR9*, *NFKB* y por la actividad de catalasa (CAT) que representan variables de la respuesta inmune innata-humoral; el segundo factor por la expresión del gen *IL8* (respuesta inmune innata-celular); y el tercer factor por la activación de *ILF2* en intestino (respuesta inmune adaptativa celular) (Tabla VIII).



**Figura 13.** Matriz de correlación de Pearson más representativa del tratamiento con *Vibrio parahaemolyticus* ( $p < 0.05$ , STATGRAPHICS Centurion XVII versión 17.1.12)

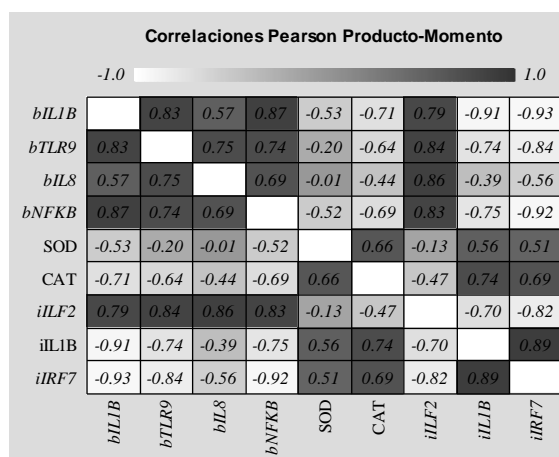


**Tabla IX.** Tratamiento con *V. parahaemolyticus*. Matriz de cargas del factor después varimax rotación. Se incluyen las variables de actividad de superóxido (SOD) y catalasa (CAT), así como la expresión de genes en intestino (i), en negrita se muestran los valores de carga superiores a 0.85.

<i>Variables</i>	<i>Factor1</i>	<i>Factor2</i>	<i>Factor3</i>	<i>Comunalidad</i>	<i>Varianza específica</i>
SOD	0.70945	0.00426451	0.0242744	0.503927	0.496073
CAT	<b>0.855053</b>	0.206032	0.363747	0.905876	0.0941237
<i>iILF2</i>	-0.0314834	0.0154064	<b>0.989027</b>	0.979402	0.020598
<i>iIL1B</i>	0.750461	0.602399	0.0606587	0.929756	0.0702437
<i>iTLR9</i>	<b>0.926866</b>	0.219187	-0.140079	0.926746	0.0732544
<i>iIL8</i>	-0.0137967	<b>0.955996</b>	0.00799137	0.914183	0.085817
<i>iNFKB</i>	<b>0.87725</b>	-0.116958	-0.354398	0.908845	0.0911549
<i>iIRF7</i>	0.735625	0.623121	0.0850463	0.936657	0.0633431

### 7.5.2 ODN CpG 1668

Con el tratamiento ODN CpG 1668, las pruebas estadísticas de la matriz de correlación ( $p < 0.05$ , Fig. 14) dieron como resultados: prueba de esfericidad de Barlett arrojó una chi cuadrada de 113.019 con 36 grados de libertad y una  $p = 6.9865E-10$ ; mientras que el índice KMO fue de 0.691474. Dados los resultados anteriores, se obtuvieron dos factores que explican el 87.097% de la varianza. El primer factor incluye variables de la respuesta inmune específica celular en intestino (*ILF2*) y de la respuesta inmune innata tanto celular (*IL8*) como humoral (*TLR9*) en bazo (b) con un alto valor de carga ( $> 0.85$ , Tabla IX). Mientras que el segundo factor está representado en gran medida por la actividad de SOD un componente de la respuesta innata humoral.



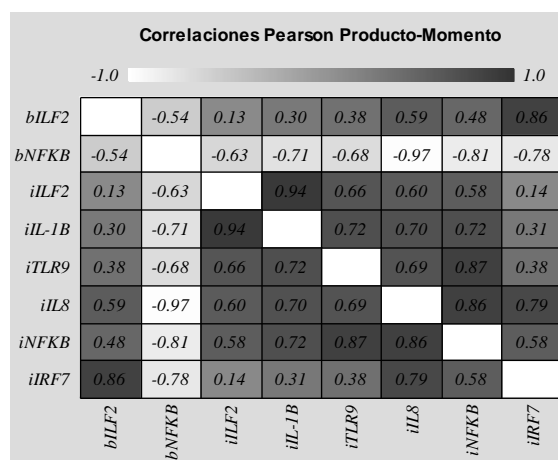
**Figura 14.** Matriz de correlación de Pearson más representativa del tratamiento ODN CpG 1668 ( $p < 0.05$ , STATGRAPHICS Centurion XVII versión 17.1.12)

**Tabla X.** Tratamiento ODN CpG 1668. Matriz de cargas del factor después varimax rotación. Se incluyen las variables de expresión génica en bazo (b) e intestino (i), así como la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT), en negrita se muestran los valores de carga superiores a 0.85.

<i>Variables</i>	<i>Factor 1</i>	<i>Factor 2</i>	<i>Comunalidad</i>	<i>Varianza específica</i>
<i>bIL1B</i>	0.672879	-0.679234	0.914126	0.0858744
<i>bTLR9</i>	<b>0.860903</b>	-0.353939	0.866427	0.133573
<i>bIL8</i>	<b>0.916754</b>	-0.00830672	0.840508	0.159492
<i>bNFκβ</i>	0.719854	-0.592311	0.869022	0.130978
SOD	0.106689	<b>0.929704</b>	0.875732	0.124268
CAT	-0.371113	0.782939	0.750719	0.249281
<i>iILF2</i>	<b>0.947935</b>	-0.223073	0.948343	0.0516572
<i>iIL-1β</i>	-0.532976	0.754926	0.853977	0.146023
<i>iIRF7</i>	-0.694935	0.661045	0.919916	0.080084

### 7.5.3 ODN CpG 1826

Los resultados posterior a las pruebas estadísticas de Barlett fue una chi cuadrada de 102.534 con 28 grados de libertad,  $p=1.95873E-10$  y para el índice de Kaiser-Meyer-Olkin = 0.684932. Posteriormente, se realizó el análisis factorial a partir de la matriz de correlación ( $p<0.05$ , Fig. 15) del cual se obtuvo como resultado la extracción de dos factores que explican el 87.211% de la varianza. El primer factor incluye las variables la expresión de *ILF2* (respuesta inmune específica-celular) e *IL-1β* en intestino (i) (respuesta inmune innata-humoral) mientras que el factor 2 incluye la expresión de *ILF2* en bazo (b) y de *IRF7* (respuesta inmune específica celular y humoral) en intestino (Tabla XI).



**Figura 15.** Matriz de correlación de Pearson más representativa del tratamiento ODN CpG 1826 ( $p<0.05$ , STATGRAPHICS Centurion XVII versión 17.1.12)

**Tabla XI.** Tratamiento ODN CpG 1826. Matriz de cargas del factor después varimax rotación. Se incluyen variables de expresión en bazo (b) e intestino (i), en negrita se muestran los valores de carga superiores a 0.85.

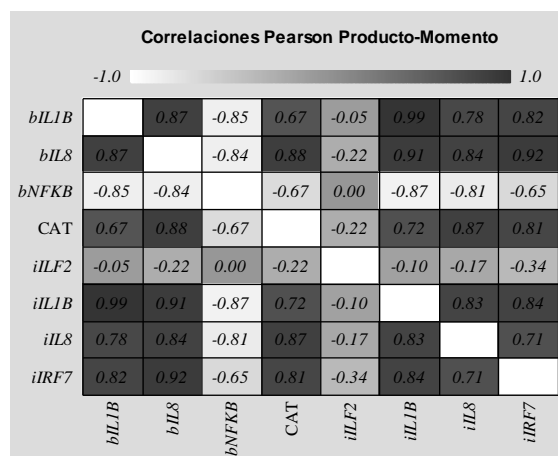
<i>Variables</i>	<i>Factor 1</i>	<i>Factor 2</i>	<i>Comunalidad</i>	<i>Varianza específica</i>
<i>bILF2</i>	0.0851529	<b>0.894744</b>	0.807818	0.192182
<i>bNFKB</i>	-0.67655	-0.659489	0.892646	0.107354
<i>iILF2</i>	<b>0.944466</b>	-0.0208981	0.892453	0.107547
<i>iIL1B</i>	<b>0.93707</b>	0.156579	0.902616	0.0973836
<i>iTLR9</i>	0.808191	0.315819	0.752914	0.247086
<i>iIL8</i>	0.657736	0.698899	0.921076	0.0789244
<i>iNFKB</i>	0.749035	0.523542	0.83515	0.16485
<i>iIRF7</i>	0.150157	<b>0.974502</b>	0.972202	0.027798

#### 7.5.4 ODN CpG D

La matriz de correlación no mostró significancia para realizar la simplificación por factores, sin embargo se observó una correlación positiva entre la expresión génica de *IL8* e *IL-1 $\beta$*  en intestino (Pearson, 0.91,  $p < 0.05$ ) y bazo (Pearson, 0.91,  $p < 0.05$ ).

#### 7.5.5 ODN CpG 1670

La matriz de correlación más representativa ( $p < 0.05$ , Fig. 16) obtuvo una chi cuadrada de 107.163 con 28 grados de libertad y  $p = 3.390914E-11$ , mientras que el índice KMO = 0.772359. Se obtuvieron dos factores que explican el 88.001% de la varianza, los cuales son representados, en primer lugar por las variables en bazo *IL8*, *IL-1 $\beta$* , *NF $\kappa$  $\beta$* ; e intestino *IL-1 $\beta$* , *IL8*, *IRF7*, que corresponde a variables tanto de la respuesta inmune innata como específica, así como humoral y celular. Mientras que el factor 2, la mayor carga está enfocada en la expresión génica de *ILF2* en intestino (respuesta inmune específica celular) (Tabla XII).



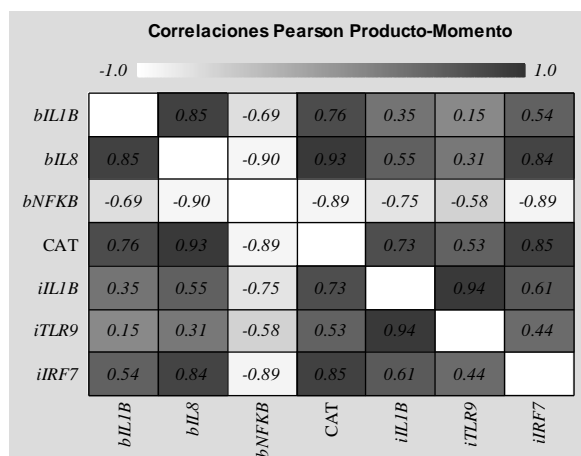
**Figura 16.** Matriz de correlación de Pearson más representativa del tratamiento ODN CpG 1670 ( $p < 0.05$ , STATGRAPHICS Centurion XVII versión 17.1.12)

**Tabla XII.** Tratamiento con el CpG ODN 1670. Matriz de cargas del factor después varimax rotación. Incluye variables de expresión de genes en bazo (b) e intestino (i), y actividad de catalasa (CAT) en hígado, en negrita se muestran los valores de carga superiores a 0.85.

<i>Variables</i>	<i>Factor 1</i>	<i>Factor 2</i>	<i>Comunalidad</i>	<i>Varianza específica</i>
<i>bIL1β</i>	<b>0.926782</b>	0.186626	0.893754	0.106246
<i>bIL8</i>	<b>0.977306</b>	-0.0439346	0.957058	0.0429424
<i>bNFκβ</i>	<b>-0.878286</b>	-0.265855	0.842066	0.157934
CAT	0.875334	-0.132621	0.783797	0.216203
<i>iILF2</i>	-0.204935	<b>0.949513</b>	0.943574	0.0564263
<i>iIL1β</i>	<b>0.955284</b>	0.140277	0.932245	0.0677546
<i>iIL8</i>	<b>0.909605</b>	0.0141362	0.827582	0.172418
<i>iIRF7</i>	<b>0.900463</b>	-0.221783	0.860021	0.139979

### 7.5.6 ODN CpG 2006

En la figura 17 se muestra la matriz de correlación ( $p < 0.05$ ) más representativa de las variables determinadas en los organismos expuestos al ODN CpG 2006. La prueba de esfericidad de Barlett obtuvo una chi cuadrada de 95.6914 con 21 grados de libertad y  $p = 1.654E-11$ ; KMO = 0.730956. La extracción de factores por el método de componentes principales arrojó 2 factores que explican en conjunto el 91.459% de la varianza. El primer factor incluye la expresión de *IL-1β*, *IL8* en bazo y la actividad de CAT en hígado, componentes que participan directa o indirectamente en la activación de la respuesta inmune innata celular. Mientras que el segundo factor está integrado por la expresión de *IL-1β* y *TLR9* en intestino (respuesta inmune innata) (Tabla XIII).



**Figura 17.** Matriz de correlación de Pearson más representativa del tratamiento ODN CpG 2006 ( $p < 0.05$ , STATGRAPHICS Centurion XVII versión 17.1.12).

**Tabla XIII.** Tratamiento ODN CpG 2006. Matriz de cargas del factor después varimax rotación. Las variables que componen el factor corresponden a la expresión de genes tanto en bazo (b) como en intestino (i) y la actividad de catalasa (CAT) en hígado; en negrita se muestran las cargas mayores 0.85.

<i>Variables</i>	<i>Factor 1</i>	<i>Factor 2</i>	<i>Comunalidad</i>	<i>Varianza específica</i>
<i>bIL1<math>\beta</math></i>	<b>0.904384</b>	-0.0154531	0.818149	0.181851
<i>bIL8</i>	<b>0.965322</b>	0.218158	0.979439	0.0205612
<i>bNFKB</i>	-0.818021	-0.514459	0.933827	0.0661732
CAT	<b>0.858581</b>	0.455665	0.944792	0.0552082
<i>iIL1<math>\beta</math></i>	0.359175	<b>0.916633</b>	0.969223	0.0307769
<i>iTLR9</i>	0.108108	<b>0.977371</b>	0.966941	0.0330585
<i>iIRF7</i>	0.784985	0.416615	0.789769	0.210231

## 8. DISCUSIÓN.

El gran potencial descrito en la diferenciación de células de memoria, producción de anticuerpos y citocinas proinflamatorias por parte de los oligodeoxinuclótidos citosina-guanina tipo B (ODN CpG B) ha dado pie para ser ampliamente probados en diferentes especies de peces con fines terapéuticos (Liu *et al.*, 2010; Caipang *et al.*, 2010; Yeh *et al.*, 2013; Byadgi *et al.*, 2016; Cárdenas-Reyna *et al.*, 2016), principalmente como adyuvantes (Klinman *et al.*, 2004). Sin embargo, la efectividad de estas secuencias se ha asociado a la longitud de la secuencia, el número de islas CpG, así como el tipo de bases circundantes de estos motivos, además se reconoce que estos actúan dependiendo la especie (Cuesta *et al.*, 2008; Pavan *et al.*, 2016).

Dado lo anterior, en el presente trabajo se evaluaron cinco diferentes configuraciones de secuencias de ODN CpG tipo B en la especie comercial *L. argentiventris*; ODN CpG 1668, 5'- TCCATG**ACG**TTCCTGATGCT-3' (TLR9 de ratón); ODN CpG 1826, 5'- TCCATG**ACG**TTCCTG**ACG**TT -3' (TLR9 murino); ODN CpG D, 5'- ACCGATA**ACG**TTGCCA**ACG**TTGGT -3' (contiene el motivo del ODN CpG 1668 **ACG**TT); ODN CpG 1670, 5'-ACCGATA**ACG**TTGCC**GGTGACG** -3' (contiene el motivo del ODN CpG 1668 **ACG**TT); ODN CpG 2006, 5' -**TCGTCG**TTTT**GT**CG**TTTT**GT**CG**TT**-3' (TLR9 humano), que asemejan los motivos estructurales de bacterias, resaltado en cursiva y negrita. Así como una resuspensión bacteriana de *V. parahaemolyticus*, reportado como patógeno de humano, abulón, camarones y peces (Lee K. *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2013; Khouadja *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2016); el hecho de ser una bacteria supone contiene un mayor número de configuraciones de islas CpG no metiladas en su material genético comparado con mamíferos (Krieg *et al.*, 1995; Krieg, 2002). Para conocer el posible efecto inmunoestimulante que pueden llegar a aportar estas secuencias se compararon los ODN CpG y *V. parahaemolyticus* con la administración vía intraperitoneal de PBS, a lo largo del tiempo (10 días). Se evaluaron diferentes parámetros de la respuesta inmune que comprende la respuesta antioxidante en hígado, expresión génica en bazo e intestino, así como cambios morfológicos en intestino.**

La actividad enzimática antioxidante en hígado está asociada a cambios provocados por estrés biótico o abiótico, por tanto el uso de este enfoque bioquímico ha sido propuesto como una alerta temprana de los cambios potencialmente dañinos en los peces estresados (Yilmaz *et al.*, 2006; Vinodhini y Narayanan, 2009; Adeyemi, 2014; Machado *et al.*, 2014). Asimismo, recordemos que este órgano está diariamente en contacto con distintos antígenos derivados de la dieta, así como restos de degradación de bacterias patógenas, por tanto también ha desarrollado un mecanismo de defensa inmune (Parker y Picut, 2012; Castro *et al.*, 2014). En trucha arcoíris la población celular se ha caracterizado por una mayor proporción de células B que expresan IgM, IgD ó IgT, que de células CD3+, CD8 $\alpha$  (linfocitos T) y debido a la activación de la transcripción, también se sugiere la presencia de linfocitos CD4 (Castro *et al.*, 2014); mientras que en tilapia (Wu *et al.*, 2016) se ha confirmado la presencia de los distintos tipos de células asesinas naturales (NK), y que pueden ser activadas directa o indirectamente por la presencia de especies reactivas de oxígeno (Aguilar, 2010; Ray *et al.*, 2012).

Las principales enzimas que mantienen el equilibrio de los radicales libres de oxígeno son superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT). SOD se encarga de la peroxidación del ion superóxido convirtiéndolo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente GPX es el encargado de la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> convirtiéndolo en agua y oxígeno molecular. Esta actividad también es realizada por la enzima CAT, sin embargo su afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es menor que la presentada por GPX, por tanto la actividad de CAT es dependiente de la concentración del peróxido de hidrógeno (Heck *et al.*, 2010; Bhattacharya, 2015). En el presente trabajo solo se observó el incremento significativo de la actividad de SOD en los peces tratados con el ODN CpG 1668 al tercer día, sin embargo este patrón no se observó en la actividad de CAT por lo que podríamos suponer de acuerdo con Heck *et al.* (2010), la enzima GPX pudo haber estado involucrada en mantener el equilibrio de la concentración peróxido de hidrógeno. Mientras que el incremento de la actividad de SOD podría estar relacionada con un efecto de modulación por el ODN, dado que también se ha reportado el incremento de especies reactivas en plasma, fagocitos, leucocitos de distintas especies de

peces con el ODN CpG 1668 (Lee *et al.*, 2003; Cuesta *et al.*, 2008b; Harikrishnan *et al.*, 2012; Cárdenas-Reyna *et al.*, 2016).

Así mismo, se observó un ligero aumento de la actividad de SOD y CAT en los organismos tratados con *Vibrio parahaemolyticus* al 1 y 3 día, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo al ser comparado con el control PBS. De acuerdo Bo *et al.* (2012) y Khouadja *et al.* (2013) *V. parahaemolyticus* es un patógeno capaz de infectar peces, siendo el hígado uno de los órganos blanco durante la infección, provocando necrosis del seno venoso hepático y degeneración hidrópica severa (Zhang *et al.*, 2016), por lo que se esperaría una alta tasa de actividad celular o enzimática que contrarrestare los efectos de la infección. Sino se utiliza una cepa patógena natural es necesario asegurar el proceso infectivo para que estos signos de patogenicidad sean observados (Paranjpye *et al.*, 2013). En el presente trabajo, se empleó una cepa criopreservada perteneciente a la colección de cepas del Laboratorio de Patógenosis Microbiana, la cual fue reactivada y aislada de hígado de *L. argentiventris*. A pesar de esto, los organismos no presentaron daños visibles en hígado, esto puede deberse a la pérdida de los factores de virulencia por criopreservación (Marston *et al.*, 2005) o la necesidad de variables ambientales óptimas que indujeran la patogenicidad, Velazquez-Roman *et al.* (2013) menciona los puntos de quiebre ocurren durante los meses cálidos, atribuido al incremento de la temperatura en el mar. Estos bajos niveles de actividad enzimática también puede ser producto de una activación preferencial en hígado de proteínas de la fase aguda o proteínas del complemento ante una infección, de acuerdo a lo reportado por Wu *et al.* (2016) posterior a la infección de tilapia con *Streptococcus agalactiae* (cepa patógena ZQ0910), donde los principales transcritos en hígado corresponden a los componentes humorales de la respuesta innata previamente descritos.

Recientemente Wu *et al.* (2016) ha sentado las bases que explican la relación entre la activación del sistema inmune de hígado e intestino mediante un análisis de transcripción y proteómica en tilapia. En este resalta el posible papel de la bilis como canal de distribución de proteínas inmunes al intestino, ya sea en homeostasis o durante la inflamación (peces retados con *S. agalactiae*, cepa ZQ0910). Asimismo, concluye que ambos órganos mantienen la homeostasis empleando estrategias propias, mediante un sistema reticuloendotelial en



hígado y una barrera mucosa en intestino, destacando en este último transcriptos asociados al reconocimiento de patrones y la activación de células B por antígenos dependientes de células T.

Sí bien el estudio de inmunoestimulación en intestino ha estado más relacionado con el uso de probióticos, prebióticos o simbióticos, por la capacidad de modificar la microbiota y de esta manera modular la respuesta inmune y la morfología intestinal (Picchiatti *et al.*, 2009; Dimitroglou *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Abid *et al.*, 2013; Standen *et al.*, 2013), autores como Byadgi *et al.* (2014) y Cárdenas-Reyna *et al.* (2016) han observado que el uso de ODN CpG, específicamente el ODN 1668, puede de igual forma modular la respuesta celular (incremento en el reclutamiento de leucocitos intraepiteliales) y de expresión génica relacionada con la respuesta inmune (*TLR9*, *IgM*, *quimiocina CC*, *MyD88*) en intestino de *L. peru* y *R. canadum*, además de descartar patologías derivadas por una posible sobrestimulación (Obermeier *et al.*, 2005)

Estos resultados concuerdan con lo encontrado en este trabajo, donde no se registraron signos aparentes de inflamación, atrofia, hipertrofia, hiperplasia o dilatación de la lamina propia, en pargo amarillo (*L. argentiventris*) posterior a ser expuesto al tratamiento con los ODN CpG; inclusive, se ha descrito tanto *in vitro* como *in vivo* (células mononucleares de humano y modelo de ratón respectivamente), que el uso de oligodeoxinocleotidos no metilados reduce significativamente la respuesta inflamatoria causada por alérgenos, al disminuir eficientemente la línea de inmunoestimulación mediada por Th2 (linfocitos cooperadores 2) e incrementar la respuesta Th1 (linfocitos cooperadores 1) (Bohle *et al.*, 1999; Duechs *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016); la cual involucra la presentación del antígeno al complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), incrementando la producción de IL-2, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , IL-12, IL-18 que estimulan la inmunidad mediada por células (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, etc.) (Romagnani *et al.*, 1999; Estrada *et al.*, 2002), y que puede resultar más atractiva que una respuesta humoral en términos de búsqueda de adyuvantes en vacunas (Coffman *et al.*, 2010).

Para conocer si este efecto se observaba de igual forma en *L. argentiventris*, se cuantificó por RT-qPCR la expresión del Factor 2 de Unión al potenciador de interleucina (ILF2/ NF45) y el factor de transcripción del factor 7 regulador de interferón. ILF2 es una proteína de unión al DNA que en conjunto con el Factor 3 de Unión al potenciador de interleucina (ILF3 ó NF90) forman el factor nuclear de células T activadas (NF-AT, por sus siglas en inglés) que regula la transcripción, modificación postranscripcional, translocación de mRNA y traducción de *IL-2*, donde esta interleucina promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de diversas poblaciones de células B, T y asesinas naturales (NK)(Zhao *et al.*, 2005; Dijkstra *et al.*, 2014). En este estudio se observó que en los organismos tratados con ODN CpG 1826 (día 3), ODN CpG 1670 (3,10 día) y ODN CpG 1668 (10 día) aumento la expresión de *ILF2*, 1.5 más veces que el control (PBS) en intestino. ILF2/NF45 ha sido caracterizado e identificado en peces como *Ctenopharyngodon idellus*, *Epinephelus coioides*, *Cynoglossus semilaevis*, *Danio rerio*, *Sparus aurata* L., *Hippoglossus hippoglossus* L., donde se ha reportado que parte de la regulación de la expresión es debida a infecciones por patógenos, parásitos o virus y que la presencia de ILF2/NF45, al igual que en mamíferos, incrementa la expresión de *IL-2* (Lin *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2013; Pérez-Córdon *et al.*, 2014; Mommens *et al.*, 2014).

Así mismo se realizó la cuantificación de transcritos de *ILF2* en bazo, el cual es uno de los principales órganos hematopoyéticos en peces, que al igual con vertebrados superiores, se encarga de la eliminación de eritrocitos viejos ó dañados; y de la maduración de linfocitos T (citotóxicos o cooperadores) y linfocitos B (productoras de anticuerpos) (Zapata *et al.*, 2006; Boehm *et al.*, 2012). En bazo se observó que los ODN CpG 1670 (1 y 7 día; 2 veces más que el control [PBS]), *V. parahaemolyticus* (1 y 7 día), ODN CpG 2006 (3 y 10 día), así como ODN CpG 1668 (10 días) modulan la expresión de *ILF2*.

La finalidad de evaluar estos órganos radica en conocer si los ODN CpG tienen un efecto inmunoestimulante al ser reconocido por lo diferentes tipos o proporciones celulares que traducen esta actividad mediante la activación de quimiocinas, mientras se evalúa su efectividad y regulación a través del tiempo. Se ha reportado que en intestino y bazo de *Oncorhynchus mykiss* existe una mayor población de células presentadores de antígenos

(ACP, por sus siglas en inglés), específicamente células dendríticas, comparado con riñón cefálico o sangre (Bernanrd *et al.*, 2006; Bassity y Clark, 2012). Sin embargo, Bassity y Clark (2012) suponen que la respuesta inmune en peces es más lenta comparado con mamíferos; mientras que Bernanrd *et al.* (2006) mencionan que posiblemente el microambiente en el intestino no es del todo apropiado para la selección y estimulación de las células T. Dado lo anterior posiblemente esto deriva en una baja estimulación de la transcripción de la proteína ILF2/NF45 en intestino; más estudios son necesarios para corroborar lo anterior. No obstante, este es uno de los primeros trabajos en demostrar la modulación de la expresión de *IFL2* por la administración intraperitoneal de ODN CpG en teleósteos.

El factor 7 regulador de interferón (*IRF7*), es el mayor factor de transcripción que regula la expresión de interferones tipo I (*IFN*) (Honda *et al.*, 2005; Ning *et al.*, 2011). Estos interferones son las principales citoquinas contra patógenos virales, al interferir en el proceso de replicación viral (Müller *et al.*, 1994; Schoggins *et al.*, 2011). Los *IFN* I se han identificado en distintas especies de teleósteos, conservando su función y regulación al igual que en mamíferos (Chang *et al.*, 2013). En el presente trabajo se observó una sobreexpresión altamente significativa del gen *IRF7* en intestino por el ODN 1826; más de 100 veces más que el control >ODN CpG 1670>ODN CpG D >ODN CpG 2006 > *V. parahaemolyticus* >ODN CpG 1668 (en orden descendente) al primer día después de la administración vía intraperitoneal; mientras que en bazo, resalta que la sobreexpresión del factor de transcripción solo fue de 2 veces más que el control con la mayoría de los ODN CpG, resaltando la inmunoestimulación por el ODN CpG 1670 (4 veces más que el control, 7 día). Este incremento en la expresión de *IRF7* deja un precedente de la posible producción de interferon. La modulación de la expresión del *IRF7* o de *IFN*, por efecto de secuencias de ODN CpG se ha identificado en *Salmo salar* (Skjæveland *et al.*, 2008; Iliev *et al.*, 2013), *P. olivaceus* (Zhou *et al.*, 2014), donde se puntualiza que la activación de factor de transcripción es dependiente de la respuesta mediada por el factor de diferenciación mieloide 88 (*MyD88*, por sus siglas en inglés), asociado al receptor tipo toll 9 (*TLR9*) y la participación de quinasas MAP (quinasas activadas por mitógenos) (Honda *et al.*, 2005; Ning *et al.*, 2011). Sin embargo, recordemos que la cascada de señalización de *TLR9* no tiene como único producto

la activación de IRF7 y posterior producción de IFN, sino que además se ha descrito puede mediar la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y quimiocinas (C, C-C, CXC (IL-8), CXXXC) por regulación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B (factor nuclear  $\kappa$ B) y AP-1 (proteína activadora 1) dependientes de la fosforilación de proteínas I $\kappa$ B quinasas (IKK) de la familia IRAK (Yi *et al.*, 2003). De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se evaluó la expresión de *TLR9*, *NF $\kappa$ B*, *IL-1 $\beta$*  e *IL-8* para conocer más acerca del efecto inmunoestimulante de los ODN CpG en pargo amarillo.

Takano *et al.* (2007), Cuesta *et al.* (2008), Yeh *et al.* (2013), Byadgi *et al.* (2014a, b) y Cárdenas-Reyna *et al.* (2016) describen que secuencias de DNA que incluyen motivos CpG incrementan la expresión de TLR9 en diferentes peces: *P. olivaceus*, *S. aurata*, *D. rerio*, *R. canadum* y *L. peru*. En esos estudios mencionan que la señalización río abajo dependiente de MyD88-NF $\kappa$ B es la responsable de la activación de citoquinas proinflamatoria como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y quimiocina C-C. En el presente trabajo se observó que, efectivamente, las secuencias de oligodeoxinucleótidos CpG promueven la sobreexpresión de *IL-1 $\beta$*  e *IL-8* tanto en intestino (1 y 3 día) como en bazo (1, 3, 7 y 10 día); pero al contrario con lo reportado, no se observó la expresión significativa de *TLR9* en intestino, mientras que en bazo se observó hasta el 10 día con el CpG ODN 2006 (> 15 veces más que el control). El mismo patrón de expresión se observó en ambos órganos con el gen *NF $\kappa$ B*, especialmente con los ODN CpG 1826, ODN CpG1670 y ODN CpG 2006. Se observó también una correlación significativa en el comportamiento de expresión de *TLR9*, *NF $\kappa$ B*, *IL-1 $\beta$*  e *IL-8* con el CpG ODN 1826 en intestino [Pearson,  $p < 0.05$ : (0.64) *TLR9*- *NF $\kappa$ B*; (0.68) *IL-1 $\beta$*  - *IL-8*, (-0.68) *TLR9*- *IL-1 $\beta$* ; (-0.79) *TLR9*-*IL-8*]. Además, mediante el análisis factorial se pudo demostrar que los componentes que más afecta a la respuesta inmune por los CpG ODN son los componentes humorales de la respuesta pro-inflamatoria (*IL-8*, *IL-1 $\beta$* ) tanto en bazo como en intestino.

Dos posibles escenarios son propuestos ante este suceso: en bazo, es posible el efecto de regulación negativa reversible en la expresión de *TLR9* por presencia de los productos (retroalimentación ó feedback en inglés). La evidencia de esto son los altos índices de sobreexpresión de *IL-1 $\beta$*  e *IL-8*, y la expresión no significativa o subregulación de *TLR9* y *NF $\kappa$ B* los primeros 3 días; a partir del 7 día la inversión de los papeles, expresión significativa

de *TLR9* y *NFκβ*, y la disminución en la expresión de *IL-1β* e *IL-8*. Este efecto ha sido descrito por Müeller *et al.* (2006) en células epiteliales de humano, donde la expresión de la proteína TLR4 y TLR3 disminuyó significativamente en presencia de IL-4 y IL-13. Sin embargo, en el caso de TLR9 es necesario realizar un análisis más profundo.

Mientras que en intestino, posiblemente estas secuencias no estén siendo reconocidas solo por el TLR9, sino que existe otro receptor involucrado que regula la expresión de citoquinas proinflamatorias por la activación del factor nuclear AP-1. Esta bipolaridad de reconocimiento, se podría asociar con el receptor tipo toll 21 (TLR21) ya que es considerado un homólogo del TLR9 en términos de respuesta en la estimulación por ODN CpG. Lo anterior se ha descrito solo en pollos (*Gallus gallus*) (Brownlie *et al.*, 2009; Keestra *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012; Chrzastek *et al.*, 2014) y varias especies de peces que poseen un número alto de copias de *TLR21* en branquia, bazo, intestino y piel (Li *et al.*, 2012; Sundaram *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Yeh *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2013; Priyathilaka *et al.*, 2014; Pang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016). Sin embargo, la cascada de señalización río abajo por efecto de los ODN CpG no se encuentra del todo caracterizada. Hasta el momento se conoce la capacidad de inducir la expresión de *TLR21* frente a CpG ODN, así como, la ya mencionada sobreexpresión de *IFN-γ*, *IL-10*, *IL-1β*, *IL-6* (Sundaram *et al.*, 2012; Chrzastek *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016) que de acuerdo con Gao *et al.* (2013) es dependiente de MyD88. Lo anterior se ha demostrado al emplear un hepta-péptido que inhibe permanente la homodimerización de MyD88 en leucocitos de riñón cefálico de *P. olivaceus* y posteriormente estimular las células con CpG ODN, donde se observó que los niveles de expresión tanto de *TLR21*, *MyD88* y *TNF* disminuyeron significativamente. Por consecuencia, se asume que el factor NFκB está implicado en esta cascada de señalización, sin embargo aún no se descarta la activación de la transcripción por AP-1.

Por otra parte Yeh *et al.* (2013) comprobó que TLR9 y TLR21 tiene diferentes patrones en el perfil de reconocimiento frente a los ODN CpG en *D. rerio*. Por ejemplo, zebTLR9 es altamente activado por ODN CpG que contienen el motivo GTCGTT y en menor grado por las secuencias que contienen los motivos GACGTT y AACGTT; mientras que zebTLR21 es activado principalmente por los oligodeoxinucleotidos que contienen el motivo

GTCGTT, confirmando su efecto especie-específico. Estudios *in silico* han predicho que esta diferenciación de reconocimiento es debido a la estructura tridimensional que adquiere la proteína, debido a las repeticiones ricas en leucina que confieren zonas cóncavas cargadas positivamente y que pueden estar relacionadas con el reconocimiento del ligando mediante los motivos CG (Yeh *et al.*, 2012; Sundaram *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Ohto *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2016). En este estudio observamos que las secuencias que promueven un mayor efecto inmunoestimulante son aquellas que contienen 2 motivos GACGTT (ODN CpG 1826), posteriormente aquella que contiene cuatro CG dentro del motivo GACGTT, AACGTT, GTCGTT (ODN CpG 1670, 2006) y por último las secuencias que solo poseen un motivo GACGTT (CpG ODN 1668) y tres CG (ODN CpG D). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Meng *et al.* (2003) en *Ctenopharyngodon idellus* y Caipaing *et al.* (2010) en *Gadus morhua*. Además, Yeh *et al.* (2013) en *D. rerio* demostró que la secuencia del motivo CpG es mucho más importante en la activación del sistema inmune y que el número de motivos CpG no está necesariamente relacionado con una mejor respuesta inmune. Por lo tanto, a esto agregamos que posiblemente un factor importante es la distribución del motivo de CpG en la secuencia por los resultados observados en este trabajo.

Así mismo se observó que, comparado con el tratamiento de *V. parahaemolyticus*, las secuencias CpG ODN tiene un mayor efecto inmunoestimulante. *V. parahaemolyticus* es un patógeno bacteriano zoonótico (Brennan-Krohn *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) que posee una variedad de factores de virulencia como adhesinas toxinas y la secreción de efectores involucrados en el proceso de citotoxicidad y enterocitotoxicidad (Brogerg *et al.*, 2011). Éstos pueden ser reconocidos por distintos receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Fan *et al.*, 2015) de acuerdo a la disponibilidad de los mismos (Zhao *et al.*, 2013). Es por ello que posiblemente se observó la activación en la expresión de citoquinas desde el primer día pero la sobreexpresión de TLR9 hasta el día 10.

Para que un patógeno pueda generar la enfermedad en un organismo, es necesario que este logre pasar todas las barreras del sistema inmune del huésped; y una vez asociado a un tejido o célula, el patógeno encuentra un nicho apropiado para su replicación y dispersión

(Knudsen *et al.*, 1999; Namba *et al.*, 2007). En peces, una de estas barreras es la mucosa que recubre los principales órganos que están en contacto con patógenos externos: piel, branquias e intestino (Gomez *et al.*, 2013). Principalmente producido por las células Goblets, el mucus es una red de mucopolisacáridos formados esencialmente por glicoproteínas que puede clasificarse en neutras o ácidas de acuerdo a la técnica histoquímica empleada (azul alcian-PAS) (Neuhaus *et al.*, 2007). La función de las mucinas ácidas se asocia a la protección ante infecciones (Bosi *et al.*, 2005) mientras que las mucinas neutras se han relacionado en el proceso de digestibilidad de alimentos (Domeneghini *et al.*, 1998). De acuerdo con Álvarez-Pellitero (2011), la producción de esta red de mucopolisacáridos puede ser regulada por diferentes interleucinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-13 e IL-8. De acuerdo a lo anterior, se cuantificó la producción de mucinas neutras y ácidas en intestino, donde se observó un aumento en la cantidad de mucinas neutras por efecto de los ODN CpG 1826, 1668 y 1670 al día 3. Además se encontró una correlación positiva entre la expresión de IL-1  $\beta$  (0.5953) y IL-8 (0.7738) con el número de mucinas neutras en intestino con el ODN CpG 1826 ( $p < 0.05$ ). Sin embargo esta correlación no se encontró en los peces tratados con los CpG ODN 1668 y 1670.

Al décimo día, también se pudo observar el aumento significativo de mucinas ácidas con *V. parahaemolyticus*, así como la disminución y posterior aumento de estas mucinas del séptimo ( $7.58 \pm 0.49$ ) al décimo ( $21.59 \pm 4.70$ ) día ( $p < 0.05$ ). Rumio *et al.* (2004), Lee *et al.* (2006) describen la disminución de células productoras de mucinas en modelo de ratón 24 horas, así como la disminución de la expresión de TLR9 después de ser tratados con ODN CpG 1668 y con el ODN CpG 2006 respectivamente. Pero bueno, ¿por qué sucede este fenómeno? Diversos grupos de investigación sugieren que la primera respuesta biológica del organismo infectado por una bacteria patógena, es deshacerse del mucus infectado y posteriormente producir una nueva capa de mucus (Ferguson *et al.*, 1992; Lodemel *et al.*, 2001; Schroers *et al.*, 2009; Estensoro *et al.*, 2013). Por lo tanto, posiblemente en este estudio se observó esta modulación en la producción de mucinas ácidas y la expresión de TLR9 relacionada con la regeneración de células productoras de mucus y la re-expresión de TLR9.

Dado que los principales agentes causantes de enfermedades son bacterias, virus y parásitos, el uso y diseño de vacunas ha tomado un papel importante en el cultivo de peces; siendo una de los factores más importantes que ha permitido el crecimiento y éxito del cultivo extensivo (Brudeseth *et al.*, 2013). Una vacuna es una suspensión de microorganismos muertos o atuneados, sus toxinas o componentes de la pared celular, destinado a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos (WHO, 2016). Sin embargo, existen algunas limitantes en su uso tales como: su eficiencia en diferentes etapas de desarrollo, la administración de múltiples dosis, además de que la protección disminuye con el tiempo. Por lo anterior, muchas de las estrategias para mejorar estos problemas se han enfocado en mejorar la activación de la respuesta inmune innata celular, células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) especialmente células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), ya que típicamente este es el punto de inicio para la generación de memoria (Kornbluth y Stone, 2006). Es aquí donde entra el uso de los CpG como posibles adyuvantes. Algunos autores han evaluado secuencias de oligodeoxinucleotidos en conjunto con suspensiones bacterianas para la generación de resistencia ante patógenos como *R. salmoninarum* en *Oncorhynchus tshawytscha* (Rhodes *et al.*, 2004) o *Vibrio harveyi subuni* en *S. maximus* (Liu *et al.*, 2010). En los reportes anteriores, se ha observado un mayor porcentaje de sobrevivencia comparado con el uso de los CpG ODN solamente. Por lo anterior, este estudio además de aportar información valiosa en la regulación de la respuesta inmune de *L. argentiventris* por los CpG ODN, es un acercamiento para la selección de adyuvantes que mejoren la activación de la respuesta inmune y por tanto la producción de factores celulares y humorales para el reconocimiento efectivo de los patrones moleculares asociados a patógenos y su destrucción.



## 9. CONCLUSIÓN

- La actividad de SOD y CAT solo fue modulada por el ODN CpG 1668 y *V. parahaemolyticus*, pero con títulos bajos.
- No se encontraron daños histopatológicos en intestino asociados a la inmunoestimulación.
- Hubo un aumento en la cantidad de mucinas neutras en intestino por efecto de los ODN CpG 1826, 1668, 1670; el incremento de mucinas con el ODN CpG 1826 mostro una correlación positiva con la expresión de genes IL-1  $\beta$  y IL-8.
- Se determinó una sobreexpresión altamente significativa de los factores de transcripción *IRF7* y en menor medida de *ILF2*, así como de *IL-8*, *IL-1 $\beta$*  con los ODN CpG 1826, 1668, 1670 tanto en intestino como en bazo, estos últimos genes los efectores de la estimulación por los ODN CpG. Concluyendo que los ODN CpG tipo B se especializan en el reclutamiento y maduración de células de la respuesta inmune en *L. argentiventris*. Además este es uno de los primeros trabajos en reportar la modulación de ILF2 por efecto de los ODN CpG tipo B.
- Después de evaluar la respuesta antioxidante, la morfología intestinal y cuantificar la expresión de genes inmunorelevantes (*TLR9*, *IL-8*, *IL-1 $\beta$* , *IRF7*, *ILF2*, *NF $\kappa$  $\beta$* ), la conclusión es que las secuencias de ODN CpG 1826, 1670, 1688 tienen la capacidad de modular la respuesta inmune de *Lutjanus argentiventris* y la producción de mucinas sin provocar daños histológicos asociados a la inmunoestimulación. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que el ODN CpG 1826 muestra una mayor inmunoestimulación, lo que sugiere que el motivo GA/TCGTT está directamente relacionado con el proceso de activación. Sin embargo, más información es requerida para confirmar si la activación de citoquinas y factores de transcripción son reguladas por la cascada de señalización dependiente del Receptor Tipo Toll 9.

- Por tanto, la hipótesis formulada se rechaza debido a que la modulación provocada en la respuesta antioxidante, producción de mucus, así como en la expresión de interlucinas y factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune de *L. argentiventris* por efecto de ODN CpG tipo B no está relacionado directamente con la cascada de señalización del Receptor Tipo Toll-9.

## **10. RECOMENDACIONES**

- Evaluar el grado de protección del CpG ODN 1826 en *L. argentiventris* frente a un reto bacteriano o parasitario.
- Incluir un mayor número de genes implicados en la cascada de señalización río abajo, así como del receptor TLR21.

## 11. LITERATURA CITADA.

Abid, A., S. J. Davies, P. Wainnes, M. Emery, M. Castex, G. Gioacchini, O. Carnevali, R. Bickerdike, J. Romero, D. L. Merrifield. 2013. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 35(6):1948-1956.

Aburto, O. 2007. El pargo amarillo: depredador de los arrecifes. *CONABIO. Biodiversitas.* 73:8-11.

Aburto-Oropeza, O., I. Dominguez-Guerrero, J. Cota-Nieta, T. Plomozo-Lugp. 2009. Recruitment and ontogenetic hábitat shifts of the yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*) in the Gulf of California. *Mar. Biol.* 156:2461-2472.

Adeyemi, J. A. 2014. Oxidative stress and antioxidant enzymes activities in the African catfish, *Clarias gariepinus*, experimentally challenged with *Escherichia coli* and *Vibrio fischeri*. *Fish Physiol. Biochem.* 40(2):347-354.

Aguilar, J. C. 2000. Función inmunológica del hígado desde la perspectiva de la vacunación terapéutica. *Biotecnología aplicada.* 27(1):1-9.

Ahmad, A., L. Brumble, M. Maniaci. 2013. Case report *Vibrio parahaemolyticus* induced necrotizing fasciitis: an atypical organism causing an unusual presentation. *Case Reports in Infectious Diseases.* 2013:4-7.

Alday, V. 2010. El seguro de acuicultura. La necesidad de evaluación del riesgo de enfermedades para la sostenibilidad de una compañía. *Trébol.* 53:4-13.

Alejo, A., C. Tafalla. 2011. Chemokines in teleost fish species. *Dev. Comp. Immunol.* 35 (12):1215-1222.

Álvarez-Pellitero, P. 2011. Mucosal intestinal immunity and response to parasite infections in ectothermic vertebrates. *Immunology and immune system disorders.* New York Nova Science Publishers. Primera Edición. Australia. 108p.

Andersen, C. L., J. L. Jensen, T. F. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer res.* 64:5245-5250.

Aramaki, Y., S. Yotsumoto, H. Watanabe, S. Tsuchiya. 2002. NADPH-oxidase may contribute to IL-12 production in macrophages stimulated with CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Biol. Pharm. Bull.* 25(3):351-355.

Aranda, P. S., D. M. LaJoie, C. L. Jorcyk. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis.* 20(33):366-369.

- Avilés-Quevedo, A., F. Castelló-Orvay. 2002. Avances en el cultivo experimental de pargos (Pisces: Lutjanidae) en México. EN: A. Silva (ed.). Acuicultura en Latinoamérica. X Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 3° Simposio Avances y perspectivas de la Acuicultura en Chile. Universidad Católica Norte y Asociación Latinoamericana de Acuicultura. Santiago. Chile (en prensa).
- Bassity, E., T. G. Clark. 2012. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). PLoS One. 7(3).
- Bedard, K., K. H. Krause. 2007. The Nox family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87:245-313.
- Bernard, D., A. Six, L. Rigottier-Gois, S. Messiaen, S. Chilmonczyk, E. Quillet, P. Boudinot, A. Benmansour. 2006. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *J. Immunol.* 176(7):3942-3949.
- Bhatia, A., M. K. Randhawa, M. Kaur. 2014. Immunomodulatory and therapeutic potential of CpG and probiotic DNA-A Review. *IJCPA.* 1(3):130-140.
- Bhattacharya, S. 2015. Reactive oxygen species and cellular defense system. En: Rani, V., U.C.S. Yadav (eds.). Free radicals in human health and disease. Springer India. Primera edición. India, Uttar Pradesh. pp 17-29.
- Bo, J., J. P. Giesy, R. Ye, K. Wang, J. Lee, D. W. T. Au. 2012. Identification of differentially expressed genes and quantitative expression of complement genes in the liver of marine medaka *Oryzias melastigma* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics.* 7(2):191-200.
- Bode, C., G. Zhao, F. Steinhagen, T. Kinjo, D. M. Klinman. 2011. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert. Rev. Vaccines.* 10(4):99-511.
- Boehm, T., I. Hess, J. B. Swann. 2012. Evolution of lymphoid tissues. *Trends Immunol.* 33(6):315-321.
- Bohle, B., B. Jahn-Schmid, D. Maurer, D. Kraft, C. Ebner. 1999. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN- $\gamma$  production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur. J. of Immunol.* 29(7):2344-2353.
- Bondad-Reantaso, M. G., R. P. Subasinghe, J. R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, Z. Tan, M. Shariff. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet. Parasitol.* 132:249-272.
- Bosi, G., A. P. Shinn, L. Giari, E. Simoni, F. Pironi, B. S. Dezfuli. 2005. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). *J. Fish Dis.* 28:703-711.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(2):248-254.
- Brennan-Krohn, T., N. Pica, T. J. Sandora, A. McAdam. 2016. Safe to go back in the water? *Vibrio parahaemolyticus* wound infection associated with brackish water. *J. Clin. Microbiol.* 54:1414-1415.
- Bridle, A. R., R. Butler, B. F. Nowak. 2003. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides increase resistance against amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 26(6):367-371.
- Broberg, C. A., T. J. Calder, K. Orth. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.* 13:992-1001.
- Brownlie, R., J. Zhu, B. Allan, G. K. Mutwiri, L. A. Babiuk, A. Potter, P. Griebel. 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol. Immunol.* 46(15):3163-3170.
- Brudeseth, B. E., R. Wiulsrød, B. N. Fredriksen, K. Lindmo, K. E. Løkling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan., K. Gravningen. 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* 35(6):1759-1768.
- Bustin, S. A, T. Nolan. 2009. Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. En: Logan, J. K. Edwards, N. Saunders (eds.). *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press. Primera Edición. Londres, Inglaterra. 1-60pp
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25(2):169-193.
- Byadgi, O., C. I. Chang, J. W. Lee, C. C. J. Huang, T. C. Cheng. 2016. Immunostimulatory effects of non-CpG oligodeoxynucleotides on cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquacul. Int.* 24(2):595-608.
- Byadgi, O., D. Puteri, J. W. Lee, T. C. Chang, Y. H. Lee, C. Y. Chu, T. C. Cheng. 2014a. The effect of TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotides on the intestinal immune response of cobia (*Rachycentron canadum*). *J. Immunol. Res.* 2014:1-15.
- Byadgi, O., D. Puteri, Y. H. Lee, J. W. Lee, T. C. Cheng. 2014b. Identification and expression analysis of cobia (*Rachycentron canadum*) Toll-like receptor 9 gene. *Fish Shellfish Immunol.* 36:417-427.
- Caipang, C. M. A., S. Gallage, C. C. Lazado. 2010. Unmethylated CpG oligodeoxynucleotides activate head kidney leukocytes of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Fish. Physiol. Biochem.* 36:1151-1158.

- Cámara de diputados de los Estados Unidos Mexicanos. 2013. Cultivo de especies nativas impulso a la producción acuícola. Cámara. 37(4):38-39
- Cao, X. J., W. M. Wang. 2009. Histology and Mucin Histochemistry of The Digestive Tract of Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. Anat. Histol. Embryol. 38:254-261.
- Cárdenas-Reyna, T., C. Angulo, S. Hori-Oshima, E. Velázquez-Lizárraga, M. Reyes-Becerril. 2016. B-cell activating CpG ODN 1668 enhance the immune response of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Vibrio parahaemolyticus*. Dev. Comp. Immunol. 62:72-81.
- Carrington, A. C., B. Collet, J. W. Holland, C. J. Secombes. 2004. CpG oligodeoxynucleotides stimulate immune cell proliferation but not specific antibody production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Immunol. Immunopathol. 101:211-222.
- Castro, R., B. Abós, J. Pignatelli, V. G. L. Jørgensen, A. G. Granja, K. Buchmann, C. Tafalla. 2014. Early immune responses in rainbow trout liver upon viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. PLoS One. 9(10):1-13.
- Castro, R., D. Bernard, M. P. Lefranc, A. Six, A. Benmansour, P. Boudinot. 2011. T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 31(5):644-654.
- Chang, M. X., J. Zou, P. Nie, B. Huang, Z. Yu, B. Collet, C. J. Secombes. 2013. Intracellular Interferons in Fish: A Unique Means to Combat Viral Infection. PLoS Pathog. 9(11):1-7.
- Chi, H., Z. -Z. Xiao, L. Sun. 2013. Nuclear factor 45 of half smooth tongue sole *cynoglossus semilaevis*: Gene structure, expression profile, and immunoregulatory property. Fish Shellfish Immunol. 35(3):972-978.
- Chrzastek, K., D. Borowska, P. Kaiser, L. Vervelde. 2014. Class B CpG ODN stimulation upregulates expression of TLR21 and IFN- $\gamma$  in chicken Harderian gland cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 160(3-4):293-299.
- Coffman, R. L., A. Sher, R. A. Seder. 2010. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. Immunity 33(4):492-503.
- CONAPESCA. 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. México, D. F.
- CONAPESCA. 2014. Base de dato de producción anuario 2014. México, D.F.
- Cuesta, A., M. A. Esteban, J. Meseguer. 2008. The expression profile of TLR9 mRNA and ODN CpGs immunostimulatory actions in the teleost gilthead seabream points to a major role of lymphocytes. Cell. Mol. Life Sci. 65:2091-2104.

- Cui, H., Y. Yan, J. Wei, Z. Hou, Y. Huang, X. Huang, Q. Qin. 2011. Cloning, characterization, and expression analysis of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ILF2 gene (EcILF2). *Fish Shellfish Immunol.* 30(1):378-388.
- Danilova, N., J. Bussmann, K. Jekosch, L. A. Steiner. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* 6:295-302.
- Dar, A., S. Tikoo, A. Potter, L. A. Babiuk, H. Townsend, V. Gerdt, G. Mutwiri. 2014. CpG-ODNs induced changes in cytokine/chemokines genes expression associated with suppression of infectious bronchitis virus replication in chicken lungs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 160:209-217.
- Deplancke, B., H. R. Gaskins. 2001. Microbial modulation of innate defense: Goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(suppl):1131S-41S.
- Díaz-Urbe, J. G., V. M. Valdez-Ornelas, G. D. Danemann, E. Torreblanca-Ramírez, A. Castillo-López, M. Á. Cisneros-Mata. 2013. Regionalización de la pesca ribereña en el noroeste de México como base práctica para su manejo. *Cienc. Pesq.* 21(1):41-54.
- Dieffenbach, C. W., T. M. J. Lowe, G. S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* 3:S30-S37.
- Dijkstra, J. M., F. Takizawa, U. Fischer, M. Friedrich. 2014. Identification of a gene for an ancient cytokine, interleukin 15-like, in mammals; interleukins 2 and 15 co-evolved with this third family member, all sharing binding motifs for IL-15R  $\alpha$ . *Immunogenetics* 66:93-103.
- Dimitroglou, A., D. Lee, P. Spring, J. Sweetman, R. Moate, S. John. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300:182-188.
- Domenechini, C., R. Pannelle Straini, A. Veggetti. 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. *Histol. Histopathol.* 13:359-372.
- Duechs, M. J., J. E. Brunt, F. Gantner, K. J. Erb. 2012. Adjuvant effects of different TLR agonists on the induction of allergen-specific Th2 responses. *Open J. Immunol.* 2(1):17-24.
- Ellis, A. E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 9:291-308.
- England, T. 1984. Burst of Phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73:599-601.

- Estensoro, I., V. Jung-schroers, P. Álvarez-Pellitero, D. Steinhagen, A. Stijá-Bobadilla. 2013. Effects of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infection on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Teleostei) intestinal mucus: glycoprotein profile and bacterial adhesion. *Parasitol Res.* 112:567-576.
- Estrada, R. B., E. Nagore, O. Sanmartín, A. Sevilla, C. Guillén, M. Escudero, J. E. O'Connor, F. Dasi, B. Fenollosa. 2002. Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. *Actas Dermosifiliogr.* 93(2):87-101.
- Fan, Z. -J., P. -F.Zou, C. -L. Yao. 2015. Toll-like receptors (TLR) and its signaling pathway in teleost. *Acta Hydrobiol. Sinica.* 39(1):173-184.
- FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. Primera Edición. Italia, Roma. 243pp.
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Primera Edición. Italia, Roma. 200 pp
- Faruk, M. A. R., M. M. R.Sarker, M. J. Alam, M. B. Kabir. 2004. Economics loss from fish diseases on rural freshwater aquaculture of Bangladesh. *Pakistan J. Biol. Sci.* 7(12):2086-2091.
- Ferguson, H. W., D. Morrison, V. E. Ostland, J. Lumsden, P. Byrne. 1992. Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout, *O. mykiss*. *J. Comp. Pathol.* 106:255-265.
- Fischer, U., E. Olaf, T. Nakanishi. 2013. Teleost T and NK cell immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 35(2):197-206.
- Forman, H. J., M. Torres. 2001. Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life.* 51:365-371.
- Forman, H. J., M. Torres. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling, respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 166:S4-S8.
- Fuglem, B., E. Jirillo, I. Bjerkås, H. Kiyono, T. Nochi, Y. Yuki, M. Raida, U. Fisher, O. E. Koppang. 2010. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Dev. Comp. Immunol.* 34:768-774.
- Fukata, M., A. S.Vamadevan, M. T. Abreu. 2009. Review Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin. Immunol.* 21:242-253.
- Gao, H., L. Wu, J. -S. Sun, X. -Y. Geng, B. -P. Pan. 2013. Molecular characterization and expression analysis of Toll-like receptor 21 cDNA from *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.* 35(4):1138-1145.



- Gomez, D., J. O. Sunyer, I. Salinas. 2013. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* 35(6):1729-1739.
- Gómez, R. G. D., J. L. Balcázar. 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:145-154.
- Grayfer, L., J. W. Hodgkinson, M. Belosevic. 2014. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 43(2):223-242.
- Guerrero-Tortolero, D. A., A. Muhlia-Melo, J. Rodríguez-Romero. 1999. Preliminary study on the effect of stocking density on the growth and survival of the yellow snapper *Lutjanus argentiventris* confined in cages in a tidal pond. *N. Am. J. Aquac.* 61(1):82-84.
- Hansen, J. D., L. N. Vojtech, K. J. Laing. 2011. Review Sensing disease and danger: A survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev. Comp. Immunol.* 35:886-897.
- Harikrishnan, R., C. Balasundaram, M. S. Heo. 2012. Poly d,l-lactide-co-glycolic acid-liposome encapsulated ODN on innate immunity in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 147(1-2):77-85.
- He, H., K. J. Genovese, C. L. Swaggerty, K. M. MacKinnon, M. H. Kogut. 2012. Co-stimulation with TLR3 and TLR21 ligands synergistically up-regulates Th1-cytokine IFN- $\gamma$  and regulatory cytokine IL-10 expression in chicken monocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 36(4):756-760.
- Hébert, P., A. J. Ainsworth, B. Boyd. 2002. Histological enzyme and flow cytometric analysis of channel catfish intestinal tract immune cells. *Dev. Comp. Immunol.* 26(1):53-62.
- Heck, D. E., M. Shakarjian, H. D. Kim, J. D. Laskin, A. M. Vetrano. 2010. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1203:120-125.
- Hensley, K., K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman, R. Floyd. 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1456-1462.
- Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, S. Mitsuhashi, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, T. Taniguchi. 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Lett. Nat.* 434(7):772-777.
- Hong, X. P., D. Xu, Y. Zhuo, H. Q. Liu, L. Q. Lu. 2016. Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.* 39(9):1085-1097.

- Huttenhuis, H. B. T., N. Romano, C. N. Van Oosterhoud, A. J. Taverne-Thiele, L. Mastrolia, W. B. Van Muiswinkel, J. H. W. M. Rombout. 2006. The ontogeny of mucosal immune cells in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anat. Embryol. (Berl)*. 211(1):19-29.
- Ibáñez, A. L., H. Espinosa-Pérez, J. L. García-Calderón. 2011. Datos recientes de la distribución de la siembra de especies exóticas como base de la producción pesquera en aguas interiores mexicanas. *Rev. Mex. Biodiver*. 82:904-914.
- Iles, K. E., H. J. Forman, 2002. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol. Res*. 26:95-105.
- Iliev, D. B., I. Skjæveland, J. B. Jørgensen. 2013. CpG oligonucleotides bind TLR9 and RRM-containing proteins in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Immunol*. 14:1-12.
- Inami, M., A. J. Taverne-Thiele, M. Bjørgan, V. Kiron, J. H. W. M. Rombout. 2009. Immunological differences in intestine and rectum of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 26:751-759.
- INAPESCA. 2015. Impulsan producción de especies nativas con potencial acuícola en noroeste de México. México, D. F.
- IUCN. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species: Estado de conservación del género Lutjanidae. [Consulta: 02/12/2015] <http://www.iucnredlist.org/search>.
- Johansson, L. H., L. A. Borg. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem*. 174(1):331-6.
- Jorgensen, J. B., A. Johansen, B. Stenersen, A. I. Sommer. 2001. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Dev. Comp. Immunol*. 25(4):313-321.
- Karunasagar, I. 2015. Bacterial Pathogens Associated with Aquaculture Products. En: Sing, A. (eds.). *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals*. Springer Science+Business Media Dordrecht. Italia, Roma pp125-158.
- Kaul, N., H. J. Forman. 1996. Activation of NF- $\kappa$ B by the respiratory burst of macrophages. *Free Radic. Biol. Med*. 21:401-405.
- Kawai, T., S. Akira. 2007. Review TLR signaling. *Sem. Immunol*. 19:24-32.
- Keestra, A. M., M. R. de Zoete, L. I. Bouwman, J. P. van Putten. 2010. Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *J. Immunol*. 185(1):460-467.

- Khouadja, S., F. Lamari, A. Bakhrouf. 2013. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. *Int. Aquat. Res.* 5:1-13.
- Kim, D. H., J. H. Sohn, H. J. Park, J. H. Lee, J. W. Park, J. M. Choi. 2016. CpG oligodeoxynucleotide inhibits cockroach-induced asthma via induction of IFN- $\gamma$ + Th1 cells or FOXP3+ regulatory t cells in the lung. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 8(3):264-275.
- Kim, Y. S., S. B. Ho. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12:319-330.
- Klinman, D. M. 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* 4:249-259.
- Knudsen, G., H. Sorum, C. M. Press, J. A. Olafsen. 1999. In situ adherence of *Vibrio* spp. to cryosections of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., tissue. *J. Fish Dis.* 22:409-418.
- Kongchum, P., E. M. Hallerman, G. Hulata, L. David, Y. Palti. 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of TLR9, MyD88 and TRAF6 genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol.* 30:361-371.
- Kornbluth R. S., G. W. Stone. 2006. Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. *J. of Leukoc. Biol.* 80(5):1084-1102.
- Krieg, A. M., L. L. Homan, A. E. Yi, J. T. Harty. 1998. CpG DNA Induces Sustained IL-12 Expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J. Immunol.* 161:2428-2434
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Korerzky, D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
- Krieg, A. M. 1995. CpG DNA - A pathogenic factor in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* 15:284-92.
- Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20:709-760.
- Kum, C., S. Sekkin. 2011. The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs. En: Faruk A. (Ed.). *Recent Advances in Fish Farms*. InTech. Primera Edición. Croacia, Rijeka. pp170–216.
- Labh, S. N., S. R. Shakya. 2014. Application of immunoestimulant as an alternative to vaccines for health management in aquaculture. *IJFAS.* 2(1):153-156

- Lafferty, K. D., C. D. Harvell, J. M. Conrad, C. S. Friedman, M. L. Kent, A. M. Kuris, E. R. Powell, D. Rondeau, S. M. Saksida. 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7:11.1-11.26.
- Lagos, I. J., J. A. Vargas. 2003. Sistema de familias de distribuciones de Johnson, una alternativa para el manejo de datos no normales en cartas de control. *Rev. Colomb. Estad.* 26(1):25-40.
- Lee, C. H., H. D. Jeong, J. K. Chung, H. H. Lee, K. H. Kim. 2003. CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda*. *Dis. Aquat. Organ.* 56(1):43-48.
- Lee, E. H., K. H. Kim. 2009. CpG-ODN increases resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatia) infection. *Fish Shellfish Immunol.* 26(1):29-32.
- Lee, J., J. -H. Mo, K. Katakura, I. Alkalay, A. N. Rucker, Y. -T. Liu, H. -K. Lee, C. Shen, G. Cojocaru, S. Shenouda, M. Kagnoff, L. Eckmann, Y. Ben-Neriah, E. Raz. 2006. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8(12):1327-1336.
- Lee, K. K., P. C. Liu, C. Y. Huang. 2003. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes Infec.* 5(6):481-485.
- Leknes, I. L. 2011. Histochemical studies on mucin-rich cells in the digestive tract of a teleost, the Buenos Aires tetra (*Hyphessobrycon anisitsi*). *Acta Histochem.* 113(3):353-357.
- Li, Y. W., X. C. Luo, X. M. Dan, W. Qiao, X. Z. Huang, A. X. Li. 2012. Molecular cloning of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) TLR21 and expression analysis post *Cryptocaryon irritans* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 32(3):476-481.
- Lin, H. F., J. Z. Shao, L. X. Xiang, H. J. Wang. 2006. Molecular cloning, characterization and expression analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) NF45 (ILF2) cDNA, a subunit of the nuclear factor of activated T-cells (NF-AT). *Fish Shellfish Immunol.* 21(4):385-392.
- Liu, C. S., Y. Sun, Y. H. Hu, L. Sun. 2010. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine.* 28(25):4153-4161.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . *Methods.* 25:402-408.
- Lodemel, J. B., T. M. Mayhew, R. Myklebust, R. E. Olsen, S. Espelid, E. Ringø. 2001. Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*

- L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Aquac. Res.* 32:935-945.
- Lowe, J. S., P. G. Anderson. 2015. *Histología humana*. Elsevier. Cuarta Edición. España, Barcelona. 448pp.
- Lucano-Ramírez, G., S. Ruiz-Ramírez, G. González-Sansón, B. P. Ceballos-Vázquez. 2014. Biología reproductiva del pargo alazán, *Lutjanus argentiventris* (Pisces, Lutjanidae), en el Pacífico central mexicano. *Ciencias Mar.* 40(1):33-44.
- Machado, C., T. Zaleski, E. Rodrigues, C. dos S. Carvalho, S. M. S. C. Cadena, G. J. Gozzi, P. Krebsbach, S. A. R. Flávia, L. Donatti. 2014. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B: Biochem. Mol. Biol.* 172-173(1):21-28.
- Maldonado-García, M., J. Rodríguez-Romero, M. Reyes-Becerril, C. A. Álvarez-González, R. Civera-Cerecedo, M. Spanopoulos. 2012. Effect of varying dietary protein levels on growth, feeding efficiency, and proximate composition of yellow snapper *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 40(4):1017-1025.
- Manning, M. J. 1998. Immune defence systems. En: Black, K. D., A. D. Pickering (eds.). *Biology of farmed fish*. Sheffield Academic Press. Inglaterra, Sheffield., pp180-221.
- Marston, C. K., A. R. Hoffmaster, K. E. Wilson, S. L. Bragg, B. Plikaytis, P. Brachman, S. Johnson, A. F. Kaufmann, T. Popovic. 2005. Effects of long-term storage on plasmid stability in *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12):7778-7780.
- Mendoza-Alfaro, R. E., P. Koleff-Osorio, C. Ramírez-Martínez, P. Álvarez-Torres, M. Arroyo-Damián, C. Escalera-Gallardo, A. Orbe-Mendoza. 2011. La evaluación de riesgos por especies acuáticas exóticas invasoras: una visión compartida para Norteamérica. *Cienc. Pesq.* 19(2):65-75.
- Meng, Z., J. Shao, L. Xiang. 2003. CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 27:313-321.
- Mommens, M., J. M. O. Fernandes, K. E. Tollefsen, I. A. Johnston, I. Babiak. 2014. Profiling of the embryonic Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) transcriptome reveals maternal transcripts as potential markers of embryo quality. *BMC Genomics.* 15(1):829.
- Muhlia-Melo, A., D. A. Guerrero-Tortolero, J. C. Perez-Urbiola, R. Campos-Ramos. 2003. Results of spontaneous spawning of yellow snapper (*Lutjanus argentiventris* peters, 1869) reared in inland ponds in La Paz, Baja California Sur, México. *Fish Physiol. Biochem.* 28:511-512.

Müller, U., U. Steinhoff, L. F. L. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, M. Aguet. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918-1921.

Mutwiri, G., R. Pontarollo, S. Babiuk, P. Griebel, L. H. S. van Drunen, A. Mena, C. Tsang, V. Alcon, A. Nichani, X. Ioannou, S. Gomis, H. Townsend, R. Hecker, A. Potter, L. A. Babiuk. 2003. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91:89-103.

Namba, A., N. Mano, H. Hirose. 2007. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. *J. Appl. Microbiol.* 102:1307-1317.

Neuhaus, H., M. Van der Marel, N. Caspari, M. Meyer, M. L. Enss, D. Steinhagen. 2007. Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L. with special consideration of mucin glycoproteins. *J. Fish Biol.* 70:1523-1534.

Ning, S., J. S. Pagano, G. N. Barber. 2011. IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* 12(6):399-414.

Obermeier, F., N. Dunger, U. G. Strauch, A. B. Hofmann, N. Grunwald, H. J. Hedrich, E. Aschenbrenner, B. Schlegelberger, G. Rogler, J. Schölmerich, W. Falk. 2005. CpG motifs bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 129:913-927.

Ohto, U., T. Shibata, H. Tanji, H. Ishida, E. Krayukhina, S. Uchiyama, K. Miyake, T. Shimizu. 2015. Structural basis of CpG and inhibitory DNA by Toll-like receptor 9. *Nature.* 520:702-705

Okolodkov, Y. B., R. Bastida-Zavala, A. L. Ibáñez, W. John, E. Suárez-Morales, F. Pedroche, F. J. Gutiérrez-Mendieta. 2007. Especies acuáticas no indígenas en México. *Ciencia y Mar.* 11(32):29-67.

Olivera, A. 2010. La lista roja de pescados y mariscos. Greenpace [http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/report/2010/2/lista\\_especies\\_pesque\\_ras.pdf](http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/report/2010/2/lista_especies_pesque_ras.pdf)

Oxenius, A., M. M. Martinic, H. Hengartner, P. Klenerman. 1999. CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J. Virol.* 73(5):4120-4126.

Palti, Y. 2011. Review Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function. *Dev. Comp. Immunol.* 35:1263-1272.

- Pang, J., F. Gao, M. Wang, J. Zhao, M. Lu. 2016. Isolation and characterization of Toll-like receptor 21 and 22 genes from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Aquac. Res.* 1:1-17.
- Park, M. S., H. S. Shin, C. Y. Choi, N. N. Kim, D. -W. Park, G. -S. Kil, J. Lee. 2011. Effect of hypoosmotic and thermal stress on gene expression and the activity of antioxidant enzymes in the cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*. *Animal Cells Syst.* (Seoul). 15(3):219-225.
- Parker, G. A., C.A. Picut. 2012. Immune functioning in non lymphoid organs: The liver. *Toxicol. Pathol.* 40(2):237-247.
- Pavan, T. R., J. Di Domenico, K. S. Kirsten, C. O. Nied, R. Frandoloso, L. C. Kreutz. 2016. Antibody response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) immunized with a model antigen associated with different adjuvants. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 49(8):1-5.
- Pérez-Cordón, G., I. Estensoro, L. Benedito-Palos, J. A. Calduch-Giner, A. Sitjà-Bobadilla, J. Pérez-Sánchez. 2014. Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish-parasite model. *Fish Shellfish Immunol.* 37(2):201-208.
- Peskin, A. V., C. C. Winterbourn. 2000. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin. Chim. Acta.* 293(1-2):157-166.
- Petersen, T. S. 2015. Overview of mucosal structure and function in teleost fishes. En: Beck, B. H., E. Peatman (eds.). *Mucosal Health in Aquaculture*. Academic Press. Primera Edición. Londres, Reino Unido. pp55-65.
- Petrunov, B., P. Nenkov, R. Shekerdjiisky. 2007. The role of immunostimulants in immunotherapy and immunoprophylaxis. *Biotechnol. Equip.* 21(4):454-462.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):2002-2007.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26(6):509-515.
- Phelan, P. E., M. T. Mellon, C. H. Kim. 2005. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol. Immunol.* 42:1057-1071.
- Picchietti, S., A.M. Fausto, E. Randelli, O. Carnevali, A. R. Taddei, F. Buonocore, G. Scapigliati, L. Abelli. 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 26(3):368-376.

- Pietretti, D., G. F. Wiegertjes. 2014. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: Indications from infection studies. *Dev. Comp. Immunol.* 43:205-222.
- Piñón, A., F. Amezcua, N. Duncan. 2009. Reproductive cycle of female yellow snapper *Lutjanus argentiventris* (Pisces, Actinopterygii, Lutjanidae) in the SW Gulf of California: gonadic stages, spawning seasonality and length at sexual maturity. *J. Appl. Ichthyol.* 25: 18-25.
- Priyathilaka, T. T., D. A. S. Elvitigala, I. Whang, B. S. Lim, H. B. Jeong, S. Y. Yeo, C. Y. Choi, J. Lee. 2014. Molecular characterization and transcriptional analysis of non-mammalian type Toll like receptor (TLR21) from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Gene* 553(2):105-116.
- Quintarelli, G., J. E. Scott, M. C. Dellovo. 1964. The chemical and histochemical properties of alcian blue II. Dye binding of tissue polyanions. *Histochemie.* 4: 86-98.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler instrument. En: Meuer, S., C. Wittwer, K. Nakagawara (eds.). *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications.* Heidelberg: Springer-Verlag Press. pp21-34.
- Rauta, P. R., B. Nayak, S. Das. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol. Lett.* 148:23-33.
- Rauta, P. R., M. Samanta, H. R. Dash, B. Nayak, S. Das. 2014. Review Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunol. Lett.* 158:14-24.
- Ray, P. D., B. Huang, Y. Tsuji. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24(5):981-990.
- Rebl, A., T. Goldammer, H. M. Seyfert. 2009. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134(3-4):139-50.
- 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.
- Rhodes, L. D., C. K. Rathbone, S. C. Corbett, L. W. Harrell, M. S. Strom. 2004. Efficacy of cellular vaccines and genetic adjuvants against bacterial kidney disease in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Shellfish Immunol.* 16:461-474.
- Rodger, H. D. 2016. Fish disease causing economic impact in Global Aquaculture. En: A. Adams (ed.). *Fish Vaccines.* Springer Basel. Primera Edición. Stirling, United Kingdom. pp1-34.



- Romagnani, S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 5(4):285-294.
- Rombout, J. H. W. M., L. Abelli, S. Picchiatti, G. Scapigliati, V. Kiron. 2011. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 31:616-626.
- Rombout, J. H. W. M., A. J. Taverne-Thiele, M. I. Villena. 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 17:55-66.
- Romero-Geraldo, R. N. García-Lagunas. 2013. Guía para análisis de expresión relativa en qPCR. Manuscrito del autor.
- Rumio, C., D. Besusso, M. Palazzo, S. Selleri, L. Sfondrini, F. Dubini, S. Ménard, A. Balsari. 2004. Degranulation of Paneth Cells via Toll-Like Receptor 9. *Am. J. Pathol.* 165(2):373-381.
- SAGARPA. 2013. Carta Nacional Acuícola. México, D.F.
- Salinas, I. 2015. The mucosal immune system of Teleost Fish. *Biology* 4:525-539.
- Sanchez-Campillo, M., A. Chicano, A. Torío, E. Martín-Orozco, P. Gámiz, T. Hernández-Caselles, P. García-Peñarrubia. 2004. Implication of CpG-ODN and reactive oxygen species in the inhibition of intracellular growth of *Salmonella typhimurium* in hepatocytes. *Microbes Infec.* 6(9):813-820.
- Sanlioglu, S., C. M. Williams, L. Samavati, N. S. Butler, G. Wang, P. B. Jr. McCray, T. C. Ritchie, G. W. Hunninghake, E. Zandi, J. F. Engelhardt. 2001. Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion through IKK regulation of NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 276:30188-30198.
- Sarasquete, C., E. Gisbert, L. Ribeiro, L. Vieira, M. T. Dinis. 2001. Glyconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, *Senegal sole*, *Solea senegalensis* and *Siberian sturgeon*, *Acipenser baeri*. *Eur. J. Histochem.* 45:267-278.
- Savan, R., A. Aman, K. Sato, R. Yamaguchi, M. Sakai. 2005. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur. J. Immunol.* 35:3320-3331.
- Savan, R., M. Sakai. 2006. Genomics of fish cytokines. *Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genom. Proteom.* 1:89-101.
- Schoggins, J. W., S. J. Wilson, M. Panis, M. Y. Murphy, C. T. Jones, P. Bieniasz, C. M. Rice. 2011. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472(7344):481-5.

- Schroers, V., M. V. D. Marel, H. Neuhaus, D. Steinhagen. 2009. Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 288(3-4):184-189.
- Secombes, C. J. 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses. En: Iwama, G., T. Nakanishi (eds.). *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press Ltd. Primera Edición. Inglaterra, Londres. pp63-103.
- Secombes, C. J., T. Wang. 2012. The innate and adaptive immune system of fish. En: Austin, B. *Infectious Disease in Aquaculture*. Woodhead Publishing Limited. Primera Edición. Inglaterra, Londres. pp3-68
- Shin, A., J. Pratoomyot, J. Bron, G. Paladini, E. Brooker, A. Brooker. 2015. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. *Global aquaculture advocate*. (October):58-61.
- Silva-Hernández, M. A. 2004. Efecto de la densidad de confinamiento sobre el crecimiento y la supervivencia del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peter 1869) (Percoidei: Lutjanidae) cultivado en jaulas flotantes. Tesis (Maestría en ciencias). La Paz, México. CICIMAR-IPN. 121pp.
- Silver, N., S. Best, J. Jiang, S. L. Thein. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7(1):1-33.
- Skjaeveland, I., D. B. Iliev, J. Zou, T. Jorgensen, J. B. Jorgensen. 2008. A TLR9 homolog that is up-regulated by IFN-gamma in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Comp. Immunol.* 32:603-607.
- Sommer, F., F. Bäckhed. 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiology* 11(4): 227-38.
- Standen, B.T., M. D. Rawling, S. J. Davies, M. Castex, A. Foey, G. Gioacchini, O. Carnevali, D. L. Merrifield. 2013. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 35(4):1097-1104.
- Sun, M., Y. Mu, Y. Ding, J. Ao, X. Chen. 2016. Molecular and functional characterization of Toll-like receptor 21 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish Shellfish Immunol.* 59:179-188.
- Sundaram, A. Y. M., S. Consuegra, V. Kiron, J. M. O. Fernandes. 2012. Positive selection pressure within teleost toll-like receptors tlr21 and tlr22 subfamilies and their response to temperature stress and microbial components in zebrafish. *Mol. Biol. Rep.* 39(9):8965-8975.

- Sunyer, J.O. 2013. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat. Immunol.* 14 (4):320-326.
- Takano, T., H. Kondo, I. Hirono, M. Endo, T. Saito-Taki, T. Aoki. 2011. Toll-like receptors in teleosts. En Bondad-Reantaso, M.G., J. B. Jones, F. Corsin, T. Aoki (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section.* Asian Fisheries Society. Malaysia, Selangor. pp197-208.
- Takano, T., H. Kondo, I. Hirono, M. Endo, T. Saito-Taki, T. Aoki. 2007. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Mol. Immunol.* 44:1845-1853.
- Tang, J. Y. H., N. H. Mohd-Noor, N. Mazlan, C. C. Yeo, C. A. Abu-Bakar, S. Radu. 2014. Survival of *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus* in fried and boiled Malaysian fish sausage. *Food Control.* 141(1):102-105.
- Tassakka, A. C. M. A. R., M. Sakai. 2003. The in vitro effect of CpG-ODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 220:27-36.
- Teixeira, M. M., I. C. Almeida, R. T. Gazzinelli. 2002. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Forum Immunol.* 4:883-886.
- Thermo Fisher Scientific. 2014. Real-time PCR handbook. pp. 6-8. <http://www.thermofisher.com/mx/es/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-lt.html>
- TinHan, T., B. Erisman, O. Aburto-Oropeza, A. Weaver, D. Vazquez-Arce, C. G. Lowe. 2014. Residency and seasonal movements in *Lutjanus argentiventris* and *Mycteroperca rosacea* at Los Islotes Reserve, Gulf of California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 501:191-206.
- Uma, A., G. Rebecca, K. Saravanabava. 2012. In vivo effect of CpG oligodeoxynucleotides (ODN CpGs) on the expression of toll-like receptor9 (TLR9) in *Catla catla*. *CIBTech J. Biotechnol.* 1(1):28-32.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):0034.1-0034.11.
- Vázquez, R.I., J. Rodríguez, L. A. Abitia, F. Galván. 2008. Food habits of the yellow snapper *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) (Percoidei: Lutjanidae) in La Paz Bay, Mexico. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43(2):295-302.
- Velazquez-Roman, J., N. León-Sicairos, L. de J. Hernández-Díaz, A. Canizalez-Roman. 2013. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3(110):1-14.

Verthelyi, D., R. T. Kenney, R. A. Seder, A. A. Gam, B. Friedag, D. M. Klinman. 2002. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol.* 168(4):1659-1663.

Vinodhini, R., M. Narayanan. 2009. Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after heavy metal exposure. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 33(4):273-278.

Wang, W., Y. Shen, N. P. Pandit, J. Li. 2013. Molecular cloning, characterization and immunological response analysis of Toll-like receptor 21 (TLR21) gene in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Dev. Comp. Immunol.* 40(3-4):227-231.

WHO. 2016. Vaccines. [Consultado: 21/11/2016]  
<http://www.who.int/topics/vaccines/es/>

Wu, N., Y. -L. Song, B. Wang, X. -Y. Zhang, X. -J. Zhang, Y. -L. Wang, Y. -Y. Cheng, D. -D. Chen, X. -Q. Xia, Y. -S. Lu, Y. -A. Zhang. 2016. Fish gut-liver immunity during homeostasis or inflammation revealed by integrative transcriptome and proteome studies. *Sci. Rep.* 6(36048):1-17.

Xie, F., P. Xiao, D. Chen, L. Xu, B. Zhang. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80(1):75-84.

Yeh, D., Y. Liu, Y. Lo, C. Yuh, G. Yu, J. Lo, Y. Luo, R. Xiang, T. Chuang. 2013. Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish. *PNAS* 11(51):20711-20716.

Yi, A. -K., J. -G. Yoon, A. M. Krieg. 2003. Convergence of CpG DNA- and BCR-mediated signals at the c-Jun N-terminal kinase and NF-kappa $\beta$  activation pathways: regulation by mitogen-activated protein kinases. *Int. Immunol.* 15(5):577-591.

Yilmaz, H. R., Y. Turkoz, E. Yuksel, I. Orun. 2006. An investigation of antioxidant enzymes activities in liver of *Cyprinus carpio* taken from different stations in the Karakaya Dam lake. *Int. J.* 1(1):1-6.

Yu, Y., Q. Zhong, C. Li, L. Jiang, F. Yan, Z. Wang, Q. Zhang. 2009. Isolation and characterization of Toll-like receptor 9 in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26:492-499.

Zapata, A., B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutiérrez-De Frías, A. Cortés. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20(2):126-136.

Zhang, J., X. Kong, C. Zhou, L. Li, G. Nie, X. Li. 2014. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways. *Fish Shellfish Immunol.* 41:380-388.

- Zhang, Q., X. Dong, B. Chen, Y. Zhang, Y. Zu, W. Li. 2016. Zebra fish as a useful model for zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity in fish and human. *Dev. Comp. Immunol.* 55:159-168.
- Zhang, Y. A., I. Salinas, J. O. Sunyer. 2011. Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish Shellfish Immunol.* 31:627-623.
- Zhao, F., Y. Li, H. Pan, C. Shi, X. Luo, A. Li. 2013. Expression profiles of toll-like receptors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Ichthyophthirius multifilii*. *Fish Shellfish Immunol.* 35:993-997.
- Zhao, G., L. Shi, D. Qiu, H. Hu, P. N. Kao. 2005. NF45/ILF2 tissue expression, promoter analysis, and interleukin-2 transactivating function. *Exp. Cell Res.* 305(2):312-323.
- Zhou, Q. -C., J. A. Buentello, D. M. Gatlin. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309(1-4):253-257.
- Zhou, W., Y. Li, X. Pan, Y. Gao, B. Li, Z. Qiu, L. Liang, H. Zhou, J. Yue. 2013. Toll-like receptor 9 interaction with CpG ODN-an *in silico* analysis approach. *Theor. Biol. Med. Model.* 10(1):1-18.
- Zhu, L. Y., L. Nie, G. Zhu, L. X. Xiang, J. Z. Shao. 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* 39(1-2):39-62.