



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS  
BLANCAS DE CABRILLA SARDINERA *Mycteroperca  
rosacea* ANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL  
CON *Aeromonas hydrophila*.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

p r e s e n t a

**Tania Libertad López Medina**

La Paz, B.C.S. Enero de 2010

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 15 del Mes de Diciembre del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN LEUCOCITOS DE CABRILLA SARDINERA *Mycteroperca rosacea* ANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Aeromonas hydrophila*"**




Presentada por el alumno:

**Tania Libertad López Medina**

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

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

LA COMISION REVISORA

 _____ DR. FELIPE DE J. ASCENCIO-VALLE DIRECTOR DE TESIS	 _____ DRA. GRACIA A. GÓMEZ ANDURO CO-TUTOR
 _____ DRA. MARTHA C. REYES-BECERRIL CO-TUTOR	
 _____ DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA, DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO	

### **Comité Tutorial**

Dr. Felipe de J. Ascencio Valle      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Dra. Gracia A. Gómez-Anduro      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Dra. Martha C. Reyes-Becerril      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

### **Jurado de Examen**

Dr. Felipe de J. Ascencio Valle      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Dra. Gracia A. Gómez-Anduro      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Dra. Martha C. Reyes-Becerril      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

### **Suplente**

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova      Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

## RESUMEN.

La acuicultura se ve fuertemente afectada por patologías bacterianas que provocan mortalidades en la producción e importantes pérdidas económicas; por ello, uno de los principales retos del sector, es su prevención y eliminación. El estudio del sistema inmune como mecanismo de defensa ante enfermedades nos permite conocer la respuesta de los peces cuando se ven expuestos a una diversidad de agentes patógenos. Una de las estrategias para el estudio del sistema inmune, es la evaluación de la expresión génica bajo cierto estímulo, por ejemplo, la infección experimental. A pesar de que la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* es considerada un candidato potencial de cultivo, no se tienen antecedentes de su capacidad de respuesta ante agentes patógenos comunes en granjas de producción. El propósito de éste trabajo fue investigar la respuesta, con énfasis en la respuesta inmune a nivel transcripcional, de la cabrilla sardinera experimentalmente infectada con la bacteria *Aeromonas hydrophila*, un importante patógeno secundario capaz de ocasionar severas enfermedades en peces marinos y de agua dulce. Con el fin de obtener una perspectiva más amplia de la respuesta, en el presente trabajo se utilizó la técnica de hibridación sustractiva por supresión para generar una colección de genes expresados por efecto de la infección experimental. Se seleccionaron y secuenciaron aleatoriamente un total de 329 clonas y después de su análisis bioinformático, se obtuvieron un total de 108 secuencias que mostraron identidad con otras especies de teleósteos. La cuantificación del nivel de expresión de cinco transcritos mostró que los cinco se ven expresados por efecto de la infección experimental y dado que tres de las secuencias analizadas están involucradas directamente en rutas de señalización, se sugiere que los mecanismos de transducción de señales tienen un rol importante en la respuesta transcripcional tardía de *M. rosacea* ante la infección con *A. hydrophila*.

Palabras clave: *Mycteroperca rosacea*, *Aeromonas hydrophila*, leucocitos, sistema inmune, hibridación sustractiva por supresión.

Vo. Bo.



Dr. Felipe de J. Ascencio-Valle

## **ABSTRACT.**

The most significant factor affecting aquaculture is the incidence of microbial pathologies, mainly bacterial in origin. Nowadays, the main challenges of fish farming industry are prevention and eradication of these diseases that provoke severe mortalities which in turn, cause economic losses. The assessment of immune system as an integrative defense upon bacterial infection enables us to elucidate the mechanisms that regulate this protection and one of the commonly used strategies for its assessment is the evaluation of immune gene expression upon certain stimulus (*e.g.* experimental bacterial infection). In BCS, leopard grouper *Mycteroperca rosacea* is considered a potential candidate species for aquafarming, however there are no previous reports of its response capacity when facing farm-common bacterial pathogens. The aim of this work was to investigate the response at a transcriptional level, emphasizing the immune response of leopard grouper experimentally challenged with *Aeromonas hydrophila*, an important opportunistic bacterial pathogen for several marine and fresh water farmed fish species. In order to obtain a wider perspective of the response displayed, it was employed the suppressive subtractive approach to generate a cDNA library of overexpressed genes after a bacterial experimental infection. Random clones (329) were selected and sequenced. After assembling, 108 singlets were finally obtained, some of which were immune-related genes. A real time reverse transcription-PCR analysis of the expression patterns of five transcripts showed that all of them were up-regulated after 72 h of double bacterial challenge stimulation. Since three of the analyzed sequences are involved in signaling pathways, it is proposed that these mechanisms are specially activated in late gene response of leopard groupers experimentally infected with *A. hydrophila*.

Keywords: *Mycteroperca rosacea*, *Aeromonas hydrophila*, leukocytes, immune system, suppressive subtractive hybridization.

*A mi madre... hoy, mañana y siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco en extenso al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la obtención de mi grado de Maestra en Ciencias. El presente trabajo se realizó con los recursos económicos del proyecto CONACyT clave 48444 y el proyecto de adscripción del CIBNOR AC-4.1.

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

Al Departamento de Posgrado en especial, por las atenciones recibidas, y facilitarnos trámites y gestiones.

A los Laboratorios de Patogénesis Microbiana, Biología Reproductiva de Peces (La Paz BCS), Biología Molecular de Plantas (San Luis Potosí SLP), Microarreglos (Hermosillo Son.), Sistema Inmunitario Innato de Teleósteos (Murcia España), donde se realizó la fase experimental del presente trabajo.

Al Dr. Felipe Ascencio, por el apoyo y motivación constante, las enseñanzas personales y valiosa guía académica, gracias por la confianza que depositó en mí. :)

A mis contrastantes Doctoras Gracia Gómez y Martha Reyes, integrantes incondicionales de mi genial equipo. Gracia, mi terapeuta, mi profesora, mi hostess, mi mamá en La Paz (jiji)! Marthita, gracias por enseñarme que ningún sueño académico es inalcanzable... Hara-kiris aquí, en Japón y en Murcia, cómo no!

A Esthercita, Dr. Vicente Gracia, Gerardo, Ana, Roberto, Toño, Marcos, Pancho... mis guías en acción!

A mi madre, la luz en mi camino, mi compañera y guía de viaje. El impulso/apoyo constante, la paciencia y el amor... si tu, si yo, son desmedidos.

A mis amigas Heidy ('iri hija..) y Lucyfer (shikita mamá), mis hermanitas a las que no sólo me une la sangre, sino el perfecto nexo de complicidad, las amo monkis.

A mi Familia completota, desde el abuelo hasta Natalia y la promesa de los venideros... mi núcleo y línea motriz.

A todos los compañeros del Laboratorio de Patogénesis Microbiana. La incansable Patobanda que me recibió como una digna integrante más.

A Adán, Anita, Coté, Cremas, Faush, Gina, LuzMa, Massó, Marcheline, Obet, Oswald, PatiLee, Quina, Rafa y Tripp. Una mezcla de personajes que resultó en la mejor experiencia... Todos eran ya unos maestros desde que los conocí! =P

A Angie, la gema que Dios convirtiera en mujer para bien de mi vida! mi roommate, partymate, studymate, cookingmate, play&glamourmate... definitiva soulmate. Te adoro zonza! con o sin tus pills jajaja =P

A Adrianita, Ale, Arlette, Aurorinski, Calin, Dani, Dianiwis, Esthercita, Fridita 'la Paws' Herrera, Getz, Jehú, Julious, Luis Felipe, Mareeeo, Marthita, Mitz, Normichis, Reno, Ros, Sergio MaxSteel, Ulises e Yssel... fraternos amigos con actitud en todo momento y en todo lugar! (...y que no se nos acabe la fiesta!)

A PatiLee, Angie, Ale, Gracia&Grecia, mis compañeras de casaS, las hadas en mi cuento.

A mis amigos que jamás pusieron distancia, a pesar de los irrefutables kilómetros: Adriana, Benru, Cris, Fer, Mendra, Pau, Pity, Piti (ese mi Junior!) y Roy.

A mis amigos en España, la Dra. Marian que me dejó ver que los rockstars también son mortales; Fran, Lidia, María, Noe y Rebe, que hicieron inolvidable mi estancia en la madre patria!

A Baja California Sur, que mostrando sólo belleza y majestuosidad a mis ojos en cada nuevo rincón, se robó mi corazón =P. Desde Santa Rosalía, las tortillas de harina de Mulegé, pasando la barra de arena de El Requesón, los kayaks de Bahía Nopoló, el malecón de La Paz de punta a punta, el Manglar de Balandra, el lunes en El Tecolote (y el mangle del centenario jaja), *ese* atardecer en Cerritos, las inesperadas cabañas de Mar Azul, y hasta los últimos peñascos de la península, I luv BCS.

A Plata, Plata in my blues... que me enseñó la nobleza de los pequeñitos, la fortaleza de los grandes, este documento no se hubiera terminado en Enero 2010 si no es por ella. Nos encontraremos de nuevo Platinga!! =P

A *mi* Dios, fuente personalizada de estímulo, introspección y actitud.

Y tú... que me conoces y me quieres entera. Gracias Pepe por el apoyo a cada momento, la paciencia y todísimo el amor durante estos años de sacrificio (*all u need is love... and love is all u need*), mi personita que guardo celosamente en la cajita de mi corazón.

GRACIAS INFINITAS, TODOS!



## **CONTENIDO.**

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
2.1 Expresión génica diferencial. ....	5
2.2 Hibridación sustractiva por supresión. ....	6
2.3 Expresión diferencial durante la infección experimental de peces .....	7
2.4 Sistema inmune de peces .....	10
2.4.1 Sistema inmune no específico. ....	11
2.4.2. Sistema inmune específico. ....	15
2.4.3. Órganos implicados en la respuesta inmune de teleósteos. ....	16
2.5 <i>Mycteroperca rosacea</i> . ....	18
2.6 <i>Aeromonas spp.</i> .....	19
2.7 <i>Aeromonas hydrophila</i> . ....	20
2.7.1 Factores de virulencia de <i>A. hydrophila</i> . ....	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>23</b>
<b>7. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>24</b>
7.1 Organismos. ....	24

7.2	Estanquería.....	24
7.3	Bacteria e inóculos bacterianos.....	24
7.4	Infeción experimental.....	26
7.5	Aislamiento de leucocitos, extracción de ARN total y síntesis de ADNc.....	28
7.6	Construcción de la biblioteca de ADNc sustractiva.....	28
7.7	Clonación de EST's, purificación de ADN plasmídico y secuenciación.....	29
7.8	Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.....	31
7.9	Diseño y síntesis de oligonucleótidos para RT-PCR en tiempo real.....	32
7.10	Cuantificación mediante RT-PCR en tiempo real.....	32
7.11	Análisis Estadístico.....	33
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
8.1	Bioensayo de infección experimental.....	34
8.2	Aislamiento de leucocitos y extracción de ARN total.....	34
8.3	Genoteca de ADNc sustractiva.....	34
8.4	Clonación y secuenciación de los fragmentos nucleotídicos generados.....	35
8.5	Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.....	36
8.6	Selección de secuencias.....	37
8.7	Análisis bioinformático de secuencias en la Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas.....	40
8.8	Validación de la genoteca generada mediante PCR en tiempo real.....	47
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>11.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>61</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>71</b>

## **LISTA DE TABLAS.**

<b>Tabla No.</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
I	Ventajas y desventajas de las técnicas analíticas para la caracterización del perfil de expresión génica.	9
II	Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación por RT-PCR en tiempo real.	33
III	Cambio en el nivel de expresión de los genes analizados.	47

## LISTA DE FIGURAS.

<b>Figura No.</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Pesca y producción acuícola mundial.	1
2	Fundamento general de la hibridación sustractiva por supresión.	8
3	Células implicadas en el sistema inmune innato.	15
4	Principales órganos involucrados en el sistema inmune de peces teleósteos.	17
5	Estanquería empleada para el ensayo de infección experimental de <i>M. rosacea</i> con <i>A. hydrophila</i> .	26
6	Inyección intraperitoneal.	28
7	Diseño de la infección experimental.	28
8	Descripción general de la metodología SSH.	30
9	Mapa circular del vector plasmídico de clonación pGem-T Easy.	31
10	Gel de electroforesis de muestras sustraída y sin sustraer.	36
11	Electroforesis de PCR de colonia de clonas aleatorias.	37
12	Distribución de tamaños de EST's en pb.	37
13	Distribución de identidades de secuencias analizadas.	38
14	Ruta de señalización de calcio.	41
15	Cascadas de señalización de coagulación y complemento	42
16	Metabolismo de clorofila y porfirina	43
17	Ruta de señalización de calcio.	44
18	Adhesiones focales.	45
19	Uniones de adherencia	46
20	Apoptosis	47
21	Nivel de expresión de genes seleccionados.	49

## **ABREVIATURAS.**

°C: Grados Celsius.

µg: Microgramo.

µL: Microlitro.

µm: Micrómetro.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

ATCC: Colección Norteamericana de Cultivos Tipificados, por sus siglas en inglés.

BLAST: Herramienta de Búsqueda de Alineaciones Locales Básicas, por sus siglas en inglés.

cél.: Células.

cm: Centímetros.

EST: Etiqueta de Secuencia Expresada, por sus siglas en inglés.

g: Gramos.

h: Horas.

IUCN: Unidad Internacional para la Conservación de la Naturaleza, por sus siglas en inglés.

L: Litros.

LB: Medio de cultivo Luria Bertani.

LITR: Extremos Largos Invertidos y Repetidos, por sus siglas en inglés.

M13: Par de oligonucleótidos universales M13.

mL: Mililitro.

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica, por sus siglas en inglés.

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa-activador de células B.

NK: Células naturalmente asesinas, por sus siglas en inglés.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés.

pH: Potencial de hidrógeno.

PVC: Cloruro de polivinilo, por sus siglas en inglés.

sp.: Especie.

spp.: Especies.

SSH: Hibridación sustractiva por supresión, por sus siglas en inglés.

Tc: Célula o linfocito T citotóxico.

TGF- $\beta$ : Subunidad  $\beta$  del factor de crecimiento tumoral.

U: Unidades.

## **GLOSARIO.**

**Anticuerpo:** Una tipo de glicoproteína, también llamada inmunoglobulina, producida por los linfocitos B y que se une generalmente con demasiada afinidad a un antígeno.

**Antígeno:** molécula que se une a un anticuerpo o TCR y puede inducir una respuesta inmunitaria

**Apoptosis:** Proceso de muerte celular que se caracteriza por la condensación nuclear, rompimiento de ADN, fragmentación y liberación del citoplasma.

**Caspasa:** Proteasa intracelular que es componente de las cascadas enzimáticas que causan la muerte apoptótica de las células.

**Citocina:** Proteína producida por muchos tipos celulares que median las reacciones inmunitarias e inflamatorias.

**Estímulo:** (*fisiología*) Factor externo que tiene influencia sobre alguna actividad.

**Etiqueta de secuencia expresada (EST):** (Expressed sequence tag, por sus siglas en inglés) la secuencia (usualmente parcial) de una transcripción en biología

**Factor de transcripción:** Proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa.

**Factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B):** Una familia de factores de transcripción para muchos genes de respuesta inmune innata y adaptativa.

**Fagocitosis:** Proceso del sistema inmune innato, en el cual macrófagos y neutrófilos engullen partículas grandes como microorganismo completos.

**Hematopoyesis:** La diferenciación y desarrollo de células sanguíneas maduras.

**Homeostasis:** Propiedad de un organismo para regular el ambiente interno y así mantener una condición estable y constante.

**Inflamación:** Reacción compleja del sistema inmune innato que se lleva a cabo en tejidos vascularizados, que involucra la acumulación de una gran cantidad de proteínas plasmáticas y leucocitos en el sitio de infección.

**Interferon  $\gamma$ :** Una citocina producida por los linfocitos T y las células NK, cuya función principal es la activación de macrófagos.

**Interleucina:** Sinónimo de citocinas producidas por leucocitos y que actúan sobre leucocitos.

**KEGG:** Kyoto enciclopedia de genes y genomas. Es una base de datos de sistemas biológicos, compuesta por elementos de genes y proteínas (KEGG GENES), rutas e interacciones moleculares (KEGG PATHWAY), así como jerarquías y relaciones entre elementos biológicos (KEGG BRITE). Permite relacionar genomas completos con otros sistemas biológicos a través de mapeo.

**Linfocinas:** Familia de moléculas del tipo de las citocinas o mensajeros químicos, que son producidas y liberadas por los linfocitos T.

**Linfocito B:** El único tipo celular capaz de producir anticuerpos.

**Linfocito T:** El tipo celular que regula la respuesta inmune adaptativa mediada por células.

**Lipopolisacárido (LPS):** Ppolímeros complejos con restos de ácidos grasos y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas.

**Opsonización:** Proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito. La opsonización implica la unión de una opsonina a un receptor en la membrana celular del patógeno. Tras la unión de la opsonina a la membrana, los fagocitos son atraídos hacia el patógeno.

**Poiquilothermia:** estrategia que usan algunos organismos para optimizar su temperatura corporal, arcaicamente conocido como poiquilothermia y aplicado a ciertos animales con temperatura corporal variable.

**Potenciador (enhancer):** Una secuencia nucleotídica regulatoria que puede encontrarse río arriba o río abajo del promotor, se une a los factores de transcripción e incrementa la actividad del promotor.

**Promotor:** Una secuencia nucleotídica adyacente al extremo 5' del sitio de inicio y a la que se unen las proteínas que originan la transcripción de un gen.

**Proteín- cinasa activada por mitógenos (MAPKs):** La vía MAPK (de las siglas en inglés Mitogen-activated protein kinases) es una ruta de transducción de señal de células de eucariotas con el fin de modulando la expresión de distintos genes.

**Puntaje (score del análisis BLAST):** Es un valor de referencia para estimar la similitud de la búsqueda con otras secuencias previamente reportadas.



**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo del mínimo de muestra.

**Teleósteo:** Peces de esqueleto óseo, cola homocerca, escamas cicloideas o ctenoideas, y vejiga natatoria habitualmente presente. En este grupo se integran la mayoría de peces comunes y formas más evolucionadas.

**Ubiquitinación:** Unión covalente de varias moléculas de ubiquitina a una proteína y así marcarla para su degradación proteolítica y posterior presentación de antígenos.

**Valor esperado (e-value):** Medida de la confiabilidad del puntaje o score.

**Virulencia:** La capacidad de un microorganismo de causar daño en su hospedero.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), la acuicultura es considerada una actividad de gran relevancia, al aportar cerca del 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación y ser el sector de producción de alimentos de origen animal de mayor y más rápido crecimiento (Fig.1). Particularmente, en México la acuicultura participa con poco más de 12% en la producción pesquera nacional, sin embargo, tiene aún un amplio potencial de desarrollo acuícola, ya que cuenta con amplias extensiones con posibilidades de uso (Magallón *et al.*, 2007). De acuerdo con las perspectivas, la acuicultura podría representar en nuestro país más de 40% de la producción pesquera total en un plazo de entre diez y quince años.

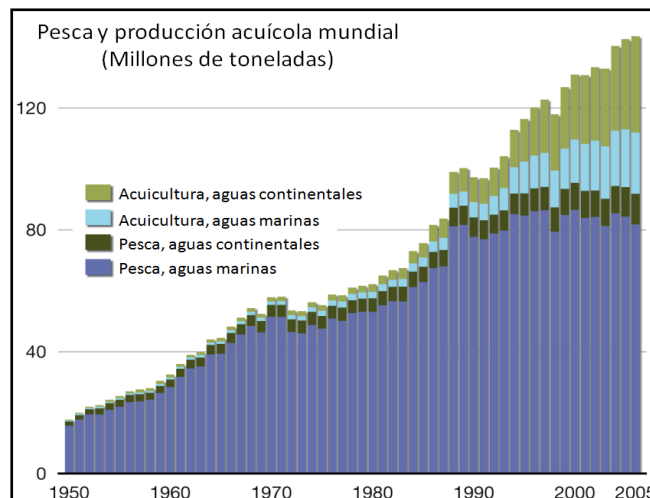


Figura 1. Pesca y producción acuícola mundial. El declive de la captura pesquera en las últimas décadas, ha sido compensado en gran parte por la acuicultura.

Sin embargo, la industria acuícola enfrenta algunos problemas que limitan su máximo desarrollo. Uno de ellos, es la presencia de patologías microbianas, principalmente de

origen bacteriano que ocasionan mortalidades masivas y cuantiosas pérdidas económicas (Zorrilla *et al.*, 2003). La aparición y desarrollo de enfermedades en cultivos acuícolas es resultado de la interacción entre patógenos, hospederos y su ambiente, y por ello, sólo a través de un enfoque multidisciplinario se aplicarán medidas adecuadas para la prevención y control de las principales enfermedades (Toranzo *et al.*, 2005).

El uso de agentes terapéuticos (desinfectantes, antibióticos, *etc.*) en estos sistemas, es una práctica común para la eliminación de patógenos, no obstante son generalmente poco efectivos, costosos y dañinos para el ambiente. En el caso de antibióticos, los microorganismos tienden además a desarrollar mecanismos de resistencia y por ello, su uso es restringido en muchos países. La tendencia actual es la prevención de enfermedades, más que el desarrollo de medidas terapéuticas.

El cultivo de nuevas especies de peces, requiere investigación de sus patógenos potenciales, así como del desarrollo de nuevas vacunas (Grøntvedt *et al.*, 2004), como medidas preventivas contra las enfermedades y alternativas al uso de antibióticos. Se han desarrollado vacunas experimentales efectivas contra patógenos bacterianos como *Aeromonas salmonicida* atípica (Ellis, 1999; Ingilæ *et al.*, 2000; Lund *et al.*, 2002), *Vibrio* (Toranzo *et al.*, 1997), *Pasteurella* (Romalde y Magariños, 1997) y *Aeromonas* móviles (Karunasagar, 1997, Vázquez-Juarez *et al.*, 2005). Actualmente, se están generando algunas vacunas contra *A. hydrophila*, sin embargo aún no están disponibles de forma comercial. *A. hydrophila* es una especie heterogénea, ya que posee antígenos variables, por lo cual el desarrollo de vacunas es extremadamente complejo (Yin *et al.*, 2009).

El conocimiento de los mecanismos de respuesta ante la exposición a patógenos y la estimulación con diferentes antígenos nos proporciona información para el manejo de

enfermedades en cultivos acuícolas. La respuesta de un organismo ante determinado estímulo, se puede describir mediante la caracterización de su transcriptoma. Comparado con el genoma, relativamente estable, el transcriptoma es altamente variable dependiendo de la expresión génica diferencial dentro de los diversos tejidos, estados de desarrollo o bajo las condiciones variables del medio. Esta variación no se refleja sólo por el tipo de genes expresados, sino también por sus niveles de expresión (Kocabas *et al.*, 2002). Desde hace poco más de una década, se ha usado el enfoque de clonación sustractiva para el aislamiento de genes que se reprimen o sobreexpresan bajo cierta condición. Éste enfoque, ha establecido las bases para una diversidad de estudios subsecuentes de genómica funcional, regulación génica y como tal, representa una valiosa herramienta para muchos campos de la Biología (Goetz, 2003). Como resultado de las técnicas de clonación sustractiva, es posible obtener una colección de etiquetas de secuencias expresadas (EST's, por sus siglas en inglés), que sirve para caracterizar de forma global la respuesta de los organismos estudiados ante cierto estímulo. En peces, el análisis de EST's ha sido empleado para caracterizar la respuesta inmune a nivel transcripcional de especies con importancia económica como el flatán (Teleostei: Pleuronectidae, *Hippoglossus hippoglossus*), lenguado japonés (Paralichthyidae, *Paralichthys olivaceus*), bagre de canal (Ictaluridae, *Ictalurus punctatus*), anguila japonesa (Anguillidae, *Anguilla japonica*), trucha arcoiris (Salmonidae, *Oncorhynchus mykiss*), salmón del Atlántico (Salmonidae *Salmo salar*), carpa común (Cyprinidae *Cyprinus carpio*) y dorada (Sparidae *Sparus aurata*). Hasta este momento, nuestro conocimiento acerca de la respuesta inmune a nivel transcripcional de la cabrilla sardinera (Serranidae *Mycteroperca rosacea*) es muy limitado.

En bases de datos públicas, sólo existen seis secuencias nucleotídicas disponibles para esta especie, y de éstas, ninguna de ellas pertenece a genes de respuesta inmune.

Con el fin de comprender mejor la respuesta inmune de la cabrilla sardinera, un pez con alta demanda regional y potencial de cultivo, en este trabajo se generó la primera colección de EST's de la especie. Mediante técnicas de clonación sustractiva, se lograron identificar genes relevantes en su respuesta ante la infección experimental con *Aeromonas hydrophila* un importante patógeno secundario ubicuo de los sistemas acuáticos.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 *Expresión génica diferencial.*

Los procesos biológicos en los organismos, tales como el desarrollo celular, la organogénesis o bien, la progresión de una enfermedad, se ven regidos por programas de expresión génica diferencial. Aproximadamente 15% del repertorio de genes presentes en eucariotas superiores, se expresan selectivamente en una determinada etapa fisiológica (Revisado en Huang *et al.*, 2007). Una alteración de los patrones de expresión basal puede determinar un destino totalmente diferente para la célula, por efecto del proceso biológico o patológico en cuestión; es por ello, que mediante la identificación de genes que se expresan en forma diferencial, podríamos obtener una perspectiva global de los mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad y otros procesos biológicos (Liang y Pardee, 1992).

En el estudio de la activación y subsecuente expresión de un gen, primero debe realizarse su detección, que es únicamente posible una vez que pasa de transcrito a su correspondiente ácido ribonucleico mensajero (ARNm). La identificación de la diversidad de genes que se activan bajo cierta condición, es un aspecto ampliamente estudiado, ya que nos provee información básica para el análisis de los procesos biológicos que rigen nuestras vidas (Liang y Pardee, 1992). Los métodos desarrollados para el análisis de la expresión génica diferencial, tienen su fundamento en un enfoque comparativo; es decir, una muestra problema que contiene los genes activos se compara contra una muestra control, en la cual estos genes no se han activado. Mediante esta estrategia, es posible aislar los genes activos, discriminando de manera selectiva la multitud de genes inactivos. Generalmente, la transcripción del ARNm es el primer paso que determina la actividad de un gen y posterior

síntesis de la proteína correspondiente. Estos genes se encuentran inactivos en las muestras control y no producen ningún ARNm. En la mayoría de los métodos, el ARNm se extrae a partir de las muestras problema y control, se realiza el proceso de transcripción reversa para sintetizar su correspondiente ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) y posteriormente, el material por analizar se enriquece sustancialmente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dado que la mayoría de estos métodos no operan con transcritos de ARNm completos sino con secuencias cortas, éstas deben relacionarse con el gen previamente descrito (o no descrito) mediante programas bioinformáticos avanzados o en bases de datos de nucleótidos.

## 2.2 Hibridación sustractiva por supresión.

La hibridación sustractiva por supresión; o SSH por sus siglas en inglés, es una técnica desarrollada en los laboratorios de Clontech E.U.A. para lograr el aislamiento de genes que se expresan diferencialmente en dos muestras de células eucariotas (Diatchenko *et al.*, 1996). Comparada con la técnica de microarreglos, la SSH se puede desarrollar en ausencia de información acerca de las secuencias estudiadas, además cubre los requerimientos para encontrar genes nuevos en organismos que no han sido estudiados en forma exhaustiva. El principio de la SSH se basa en la PCR supresora, la cual hace uso de las secuencias terminales repetidas e invertidas (LITR: *Long Inverted Terminal Repeats*) para unir los extremos de una muestra problema y formar estructuras 'loop' en cada ciclo de desnaturalización-alineamiento (Fig. 2). Bajo este efecto, las secuencias que no son objetivos no se amplificarán exponencialmente. Además, dado que la SSH combina ambos pasos de normalización y supresión en uno solo, hace que la abundancia sea relativamente

igual para cada uno de los transcritos en la muestra estudiada, pues permite la amplificación de los transcritos escasos expresados en forma diferencial, hasta 1000-5000 veces (Diatchenko *et al.*, 1996), esta amplificación reduce al máximo la generación de falsos-positivos (background) en el análisis.

Durante la década pasada, la técnica de SSH se ha empleado para identificar genes expresados en forma diferencial, permitiendo la elucidación de la regulación génica en los procesos biológicos y/o patológicos de diversos organismos (Huang *et al.*, 2007). En la actualidad, algunas compañías (e. g. Clontech, Evrogen) comercializan los sistemas completos para la construcción de bibliotecas genómicas y de ADNc mediante la aplicación de la técnica SSH.

### 2.3 Expresión diferencial durante la infección experimental de peces

La respuesta que muestran los teleósteos ante la infección, ha sido ampliamente estudiada mediante enfoques biológicos clásicos y moleculares. Sin embargo, recientemente se han realizado importantes contribuciones a la elucidación de la respuesta inmune de peces a través de múltiples estudios de expresión génica (Tsoi *et al.*, 2004). Se ha reportado que la identificación de genes funcionales con relevancia inmunitaria es muy importante en la investigación de mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a la enfermedad (Wang *et al.*, 2008), por ello, la técnica de SSH ha sido empleada con éxito para el aislamiento de genes que se expresan en forma diferencial durante la estimulación con un mitógeno (Darawiroj *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) o el curso de la infección experimental con un patógeno (Tsoi *et al.*, 2004; Dios *et al.*, 2006; He *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).



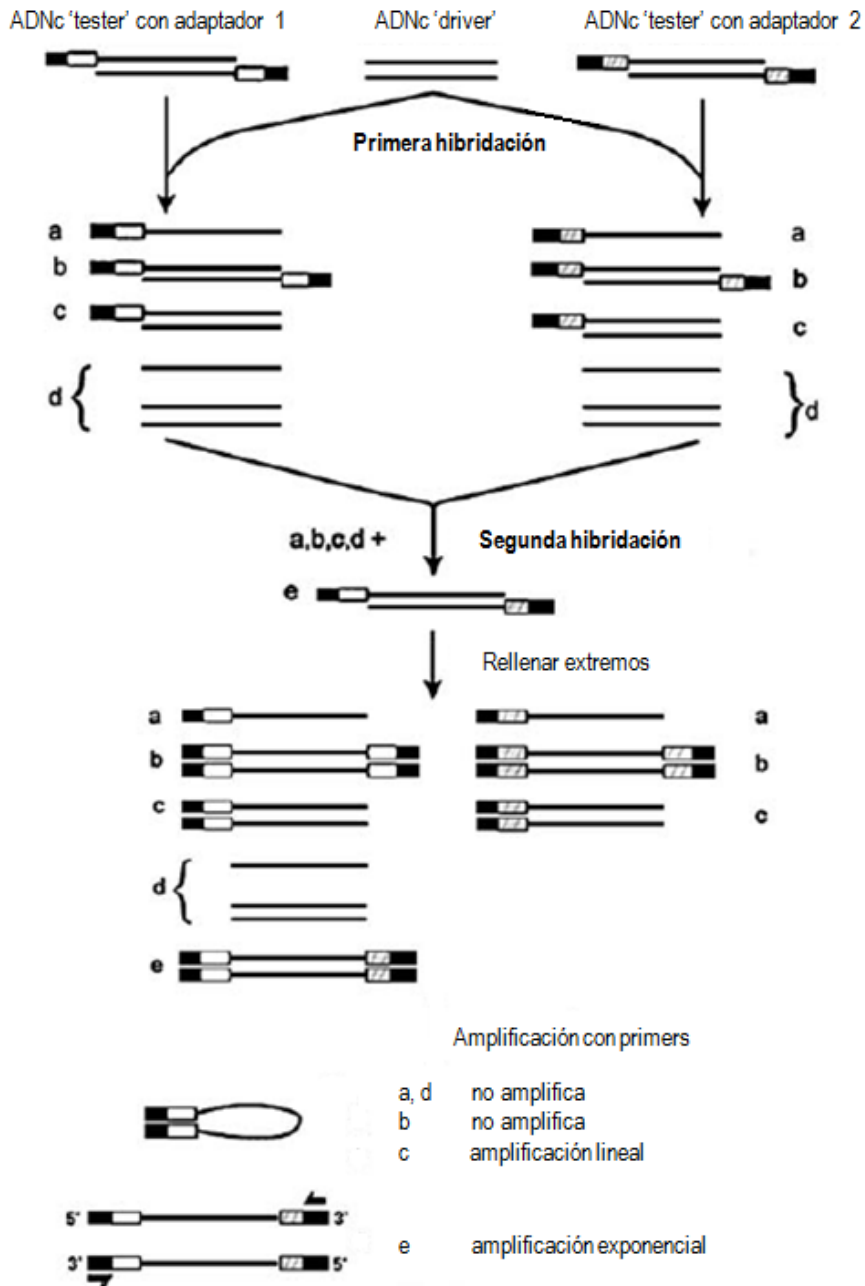


Figura 2. Fundamento de la Hibridación Sustractiva por Supresión (SSH).

El objetivo es comparar la expresión génica de peces infectados contra la expresión de peces sanos y, una vez que se han descartado de la muestra los transcritos comunes, se amplifican los transcritos remanentes mediante PCR supresora (Diatchenko *et al.*, 1996;

Winstanley *et al.*, 2002). Como resultado de la técnica, se obtendrá una colección de genes expresados de forma diferencial que serán entonces clasificados como genes candidatos a estar involucrados en la patogénesis bacteriana (Goetz, 2003).

Tabla I. Comparación de Ventajas y desventajas de las técnicas analíticas para la caracterización del perfil de expresión génica. Modificado de Huang *et al.* (2007).

<b>Técnica</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
<b>Hibridación sustractiva por supresión (SSH)</b>	<b>Mínima cantidad de material biológico inicial, alta eficiencia, especialmente para obtener genes de expresión ‘escasa’, alta especificidad.</b>	<b>Generalmente, se pueden comparar sólo 2 muestras en una SSH, los resultados dependen mucho en la eficiencia de ligación de adaptadores.</b>
Microarreglos	Mínima cantidad de muestra, máxima eficiencia, alta especificidad, se pueden analizar más de dos muestras en un solo experimento.	Se requiere de información previa de las secuencias estudiadas, baja detección de genes de expresión ‘escasa’.
Análisis de diferencias representativas (RDA)	Alta especificidad y baja proporción de falsos positivos, el cDNA de RDA puede ser usado en mRNA sin poliA terminal.	Baja detección de genes de expresión ‘escasa’, procedimientos repetidos de corte y ligación enzimática.
Despliegue diferencial (DD PCR)	Poca cantidad de muestra, alta eficiencia y generalmente se pueden obtener genes de expresión ‘escasa’, se pueden analizar más de dos muestras en un solo experimento.	Alto porcentaje de falsos-positivos, los productos amplificados generalmente se encuentran en el extremo 3’.
Hibridación supresora (SH)	Bajo costo, se pueden obtener secuencias más grandes en la biblioteca generada.	Baja sensibilidad, gran cantidad de muestra, proceso laborioso.

El objetivo es comparar la expresión génica de peces infectados contra la expresión de peces sanos y, una vez que se han descartado de la muestra los transcritos comunes, se amplifican los transcritos remanentes mediante PCR supresora (Diatchenko *et al.*, 1996; Winstanley *et al.*, 2002). Como resultado de la técnica, se obtendrá una colección de genes

expresados de forma diferencial que serán entonces clasificados como genes candidatos a estar involucrados en la patogénesis bacteriana (Goetz, 2003).

#### 2.4 Sistema inmune de peces

Los peces son un grupo altamente divergente, representado aproximadamente por 28,000 especies, ocupando distintos hábitats; poseen la capacidad de responder a un desafío inmunológico, al tener un sistema inmune completo que incluye reacciones fisiológicas y de comportamiento, que lo ayudan a adaptarse a una nueva situación (Ribas, 2006). Como en todos los organismos, la función esencial del sistema inmune de peces es la defensa contra infecciones, este sistema permite la supervivencia del individuo y el aseguramiento de la integridad de sus funciones corporales en un medio que le es hostil por naturaleza. El sistema de defensa incluye dos grandes sub-sistemas: el sistema inmune innato, no específico o natural y el sistema inmune adquirido, específico o adaptativo. Cada subsistema contiene su componente humoral y su componente celular (Abbas y Lichtman, 2005).

El componente humoral hace referencia a la producción de anticuerpos y los procesos que la acompañan, incluyendo: la activación de células T helper, producción de citocinas, la generación de células de memoria, entre otros. También se refiere a las funciones efectoras de los anticuerpos, que incluyen la neutralización de toxinas y patógenos, activación del sistema de complemento, que al inducir la opsonización de patógenos, amplifica el proceso fagocítico y con ello, su eliminación (Abbas y Lichtman, 2005).

El componente celular se integra con subpoblaciones de leucocitos como linfocitos B y T, granulocitos, macrófagos y células NK. Las células troncales hematopoyéticas en el riñón

cefálico pueden autorenovarse o bien, dar lugar a células progenitoras (pluripotenciales) que a su vez, generan las líneas celulares eritroide, mieloide y linfoide. El progenitor eritroide es productor de células rojas, el mieloide es precursor de granulocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos; y el progenitor linfoide es el precursor de los linfocitos B y T. En peces, no ha sido caracterizada e identificada la totalidad de los tipos celulares del sistema inmune en contraste con los descritos en mamíferos (Zapata *et al.*, 2006).

#### 2.4.1 Sistema inmune no específico.

##### a) Componentes humorales.

El epitelio intacto y su secreción - el mucus - , forman la barrera de defensa primaria entre el pez y su ambiente. El mucus dérmico proporciona protección y prevención contra la colonización de parásitos, hongos y bacterias en su superficie, a través de un sistema de continua pérdida y reemplazo (Ribas, 2006). Está constituido por proteínas y carbohidratos, entre ellos, mucina, precipitinas inespecíficas, aglutininas, proteína C-reactiva (CRP) y lisozima, entre otros componentes secretorios (Tort L. *et al.*, 2003).

En el suero sanguíneo, existe una diversidad de proteínas que juegan un papel fundamental en la defensa contra agentes que han superado las barreras físicas de un hospedero, entre ellas se encuentra la proteína C reactiva (CRP), que representa un grupo muy primitivo de moléculas de reconocimiento de antígenos; tiene la capacidad de aglutinar bacterias y de interactuar con un gran número de moléculas del sistema inmune, como el complemento y los receptores Fc linfocitarios. La CRP no sólo se produce en respuesta a la exposición a antígenos, sino también ante el estrés y la manipulación.

La lisozima ha sido detectada en el suero, el mucus y en otros tejidos ricos en leucocitos, como el riñón, el bazo y el intestino, tanto en peces de agua de mar como de agua dulce (Ribas, 2006). Tiene propiedades antimicrobianas ya que es capaz de degradar mucopolisacáridos de la pared celular de bacterias, particularmente las Gram positivas, causando su lisis (Ellis, 1990). Se encuentra también en neutrófilos, monocitos y en menor cantidad en macrófagos. Las citocinas son glicoproteínas que actúan como moduladores del sistema inmune y su presencia se ha reportado en varias especies de peces al igual que en los vertebrados superiores, entre ellas, las interleucinas 1 y 2 (IL-1, IL-2), el interferon (IFN), el factor de activación de los macrófagos (MAF) (Secombes *et al.* 2001), la IL-3, la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el receptor soluble para IL-2 en el suero de animales infectados con virus o parásitos. Los IFNs constituyen una serie de moléculas importantes como agentes antivirales, son producidas por macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células NK (células asesinas naturales, por sus siglas en inglés) en respuesta a una infección viral o bien, mediante estimulación química.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y sobrevivencia de la mayoría de los organismos, ya que es imprescindible para muchas rutas metabólicas celulares y reacciones enzimáticas, sin embargo, cuando se encuentra en exceso, puede llegar a ser tóxico para las células. La regulación del metabolismo de hierro implica la interacción de varios genes, de los cuales la mayoría están también implicados en la respuesta ante la infección, como la transferrina, una proteína transportadora de hierro y la ferritina, una proteína de reserva (Neves *et al.*, 2009). La transferrina es una glicoproteína globular que se ha encontrado en el suero la mayoría de vertebrados, carece del grupo heme, sin embargo puede unirse al hierro. Cuando no está totalmente saturada presenta propiedades antimicrobianas y por lo

tanto juega un rol importante en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas, limitando la cantidad de hierro endógeno disponible para los patógenos invasores y por ende, su capacidad de reproducción.

El sistema del complemento está constituido por al menos unas veinte proteínas plasmáticas sintetizadas principalmente como precursores inactivos (zimógenos) que se activan por la introducción y/o presencia de ciertas sustancias en el plasma de sangre normal. La mayoría de estas proteínas son sintetizadas en el hígado y en menor proporción en el epitelio intestinal, y la producción por macrófagos. La activación del sistema de complemento induce múltiples reacciones bioquímicas, generando numerosos intermediarios del proceso inflamatorio. Actúan secuencialmente para lograr la lisis de células blanco, usualmente bacterias y también en la activación de respuestas de defensa no específicas, asociadas a la inflamación.

#### b) Componentes celulares.

La fagocitosis es un mecanismo celular de ingestión y digestión del material extraño, es probablemente la acción de defensa mayormente distribuida tanto en vertebrados como invertebrados. En teleósteos al igual que en mamíferos, se han descrito diferentes células con capacidad fagocítica, entre ellas, los granulocitos y los fagocitos mononucleares o agranulocitos, estos últimos, con mayor importancia. Los granulocitos, incluyen los neutrófilos, eosinófilos y basófilos y los monocitos, que en su estado maduro y activo son llamados macrófagos (Ellis, 1990).

- a) Granulocitos: En el citoplasma contienen numerosos gránulos (Fig. 3), son pobremente fagocíticos, pero producen la mayoría de las enzimas líticas y por tanto,

su rol primario es la lisis extracelular por secreción enzimática y de otras sustancias antimicrobianas (Abbas y Lichtman, 2005).

b) Monocitos-macrófagos: Los macrófagos son células fagocíticamente activas derivadas de los monocitos que se encuentran en tejidos y en la cavidad peritoneal y pericárdica, son móviles, y normalmente de mayor tamaño que otros leucocitos, por esta razón pueden fagocitar partículas más grandes. En teleósteos, los macrófagos son especialmente abundantes en bazo. Durante el proceso de ingestión, el antígeno es capturado inicialmente por los macrófagos presentes en las branquias y los tejidos conectivos de la piel e intestino (Zapata *et al.*, 2006). Los macrófagos que contienen material fagocitado se agregan en áreas linfoideas, pueden ejercer su acción inmune mediante dos vías: la directa por fagocitosis y la indirecta, mediante la secreción de factores humorales (e.g. citocinas) marcando al antígeno como una molécula blanco para ser destruida y amplificando los efectos citotóxicos de los mismos macrófagos y de toda la maquinaria reclutada y asignada para destrucción de ese antígeno en particular.

La ferritina es una proteína intracelular de 450kDa que posee una función doble, de almacenamiento y de desintoxicación del hierro, se encuentra principalmente en los monocitos-macrófagos del sistema retículoendotelial del hígado, del bazo y del riñón cefálico, sin embargo está también presente en el citosol de eritrocitos y leucocitos. Está compuesta por 24 subunidades H (Heavy: Subunidad pesada) y L (Light: Subunidad ligera) cuando no se encuentra unida a ninguna molécula de hierro; a la subunidad H se le atribuye el proceso de desintoxicación de cantidades excesivas de hierro (Neves *et al.*, 2009). La

síntesis de ferritina se induce cuando el hierro está en forma disponible, mientras que en condiciones limitantes, la síntesis de ferritina se reprime.

Las células NK ejercen una citotoxicidad inespecífica sobre células blanco, han sido identificadas en riñón cefálico, bazo, sangre periférica y timo de distintas especies de teleósteos; la lisis celular mediada por las células NK requiere obligatoriamente el contacto célula-célula, sólo representan menos del 1% de los leucocitos de sangre periférica (Fänge, 1994).

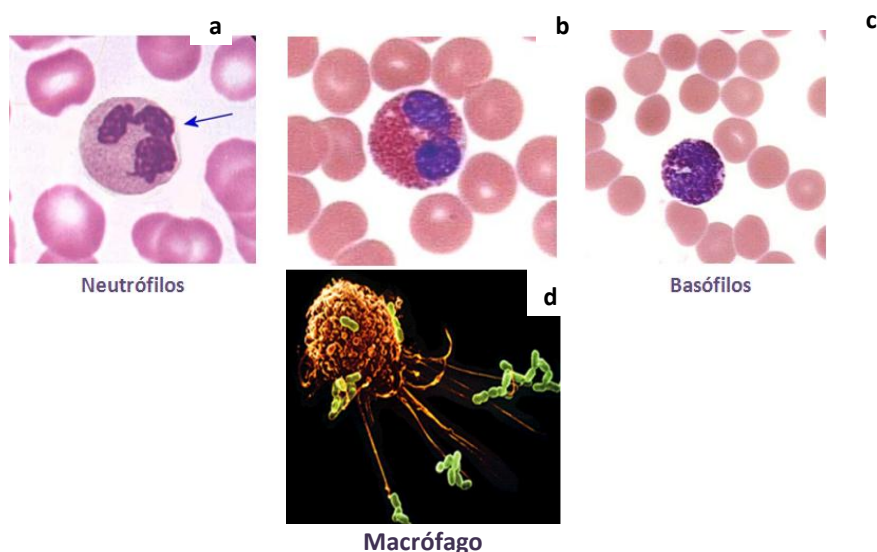


Figura 3. Células implicadas en el sistema inmune no específico mediado por células. Células polimorfonucleares, neutrófilos (a), eosinófilos (b) y basófilos (c); célula mononuclear, macrófago (d).

#### 2.4.2. Sistema inmune específico.

##### a) Componentes humorales.

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Igs), de naturaleza glicoprotéica, constituyen el 40-50% de la proteína total en el suero. La única Ig presente en los peces teleósteos y cartilagosos corresponde al isotipo IgM; en teleósteos se presenta en forma de tetrámero con dos cadenas pesadas y dos ligeras (peso molecular de 700 Da aproximadamente), sin



embargo también existen formas monoméricas (Ribas, 2006). Los vasos sanguíneos son permeables por las Igs de suero, por ello se les encuentra en la mayoría de los fluidos tisulares, en el plasma, linfa y mucus epitelial. Colaboran con los macrófagos en el proceso de presentación de antígenos.

#### b) Componente celular.

En este grupo se encuentran las células no granulocíticas que participan en los mecanismos de inmunidad específica, específicamente los linfocitos, células inmunocompetentes que constituyen la base de la respuesta inmunológica. Los linfocitos son células no fagocíticas que constituyen el 50-80% del total de leucocitos. La mayoría de ellos son producidos en el riñón cefálico y el timo. Los linfocitos T y sus clonas a su vez reclutan otros tipos celulares como los macrófagos, permitiendo un ensamble adecuado de la respuesta. En una estimulación antigénica primaria, las clonas se diferencian como tipos celulares con funciones específicas; entre ellos, los linfocitos T citotóxicos (Tc), capaces de lisar células por contacto físico directo; las células supresoras que regulan la producción de anticuerpos y citocinas proporcionando un cierre al proceso inmunitario una vez que se ha eliminado al antígeno; y los linfocitos T colaboradores (Th: Linfocitos T *helper*), que auxilian a las células plasmáticas y secretan además factores solubles y linfocinas (Zapata *et al.*, 2006). Las células productoras de anticuerpos o plasmáticas, derivan de linfocitos B, que se transforman por interacción con un antígeno específico, su citoplasma por lo común no es (Ribas, 2006). Al timo se le considera granular.

#### 2.4.3. Órganos implicados en la respuesta inmune de teleósteos.

Los principales órganos linfoides en peces teleósteos son el timo, el riñón y el hígado como un órgano linfoide primario donde se produce el grueso de linfocitos madre que migrarán

para unirse con los linfocitos de sangre periférica y otros órganos linfoides. No participa en la producción de anticuerpos o en la captura de antígenos. El riñón cefálico, es el principal órgano hematopoyético de los peces y el principal sitio de diferenciación de eritrocitos, granulocitos, monocitos y linfocitos B, por tanto, el principal órgano productor de anticuerpos. Es un análogo de la médula ósea, ganglios y en parte, de la glándula adrenal de los vertebrados superiores (Fig. 4).

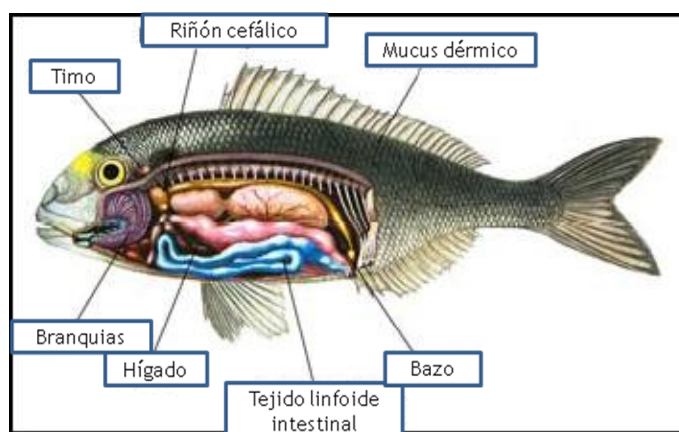


Figura 4. Principales órganos implicados en el sistema inmune de peces teleosteos.

Un rasgo particular del bazo de los teleosteos es la presencia de macrófagos que contienen pigmentos de color oscuro (principalmente melanina), y que se denominan melanomacrófagos; estos se agrupan y forman centros melanomacrófagos. Su número y tamaño es mayor en peces enfermos, cuando el catabolismo es excesivo. Sirven como depósito de los productos finales del metabolismo (e.g. fosfolípidos), de antígenos y material particulado (Ellis, 1990).

Tomando en cuenta las diferencias organizacionales de compartimientos corporales y celulares en el cuerpo, la mayoría de los órganos linfoides generativos y secundarios presentes en mamíferos también se encuentran en peces, con excepción de nódulos

linfáticos y médula espinal; en lugar de ellos, los peces tienen riñón cefálico y por ello, éste órgano es considerado un excelente modelo para estudiar los efectos regulatorios del estímulo inmunológico (Tort *et al.*, 2003). En el riñón cefálico se generan las células pluripotenciales a partir de células troncales y de ahí, 2 líneas principales: la linfóide y la mielóide. De ellas, la gran diversidad celular que tiene implicación directa e indirecta con el sistema inmune. En específico, los leucocitos o células blancas de la sangre periférica desempeñan un papel principal en la defensa del hospedero ante infecciones bacterianas, y su actividad y composición cambia drásticamente en respuesta a la infección (Secombes, 2001).

### 2.5 *Mycteroperca rosacea*.

La cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, es una de las cinco especies del género *Mycteroperca* en el Pacífico Oriental. Se distribuye en la costa sur oriental de la Península de Baja California hasta Jalisco, México. Es una especie relacionada directamente con el grupo de los meros y como las demás especies que integran este grupo de peces, la calidad de su carne, así como el elevado precio y demanda, la colocan como una especie potencial de cultivo (Gracia *et al.*, 2004). Particularmente, su introducción en el libro rojo de la Unidad Internacional de Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) y subsecuente clasificación como ‘vulnerable a la extinción’, representa otro factor de importancia para la producción de esta especie en cautiverio. La vulnerabilidad poblacional de una especie señala la disminución de stocks naturales, y aunque no lleva consigo la extinción inmediata, sí puede promover una situación poblacional delicada en los próximos años.

Una vez que se establecen las condiciones de cultivo, la manipulación de organismos, así como las condiciones físicas y químicas de los sistemas de acuicultura, ocasionan estrés fisiológico, biológico y físico a los peces (Myhr *et al.*, 2005). El estrés durante el cultivo es intermitente y sinérgico, amplificando su efecto negativo e incrementando el riesgo de mortalidades ocasionadas por microorganismos oportunistas o agentes patógenos (Wang *et al.*, 2007), es por ello que la acuicultura de nuevas especies requiere investigación en torno a los agentes que podrían afectar los cultivos, y en forma simultánea, investigación relacionada al desarrollo de medidas profilácticas y terapéuticas efectivas contra la frecuente exposición a dichos patógenos.

La aplicación de algunas estrategias de ingeniería genética (e.g. peces transgénicos, vacunas de ADN, etc.), representa una estrategia tecnológica contra las enfermedades que afectan fuertemente a la acuicultura (Myhr *et al.*, 2005). Para el análisis global de cierto efecto sobre el transcriptoma de peces, se ha hecho uso de una diversidad de herramientas moleculares. En particular, el análisis del sistema inmune a nivel transcripcional durante la infección experimental, podría conducir a un mejor entendimiento sobre la fisiología de los peces, así como su respuesta ante el reto inmunológico (Yong *et al.*, 2005). Es importante remarcar que las enfermedades que eran consideradas típicas de la acuicultura de peces de agua dulce, ahora son problemas también en cultivos marinos.

## 2.6 *Aeromonas spp.*

El género *Aeromonas spp.* está representado por un conjunto de bacterias ubicuas de ambientes acuáticos. Estas bacterias han sido aisladas a partir de muestras alimenticias, clínicas y ambientales (Ashdown y Koehler, 1993; Janda y Abbot, 1998), sin embargo, son

mayormente asociadas a su capacidad patogénica primaria en una gran cantidad de organismos poiquilotermos, particularmente en peces (Austin y Adams, 1996). Las *Aeromonas spp.* son bacilos Gram negativos, cuyo tamaño aproximado es de 0.3-1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.0-3.5 $\mu\text{m}$  de longitud. Pueden presentarse como células aisladas o asociadas en pequeñas cadenas. Son anaerobios facultativos y generalmente móviles por la presencia de un flagelo polar, a pesar de que, una de las especies del género es no-móvil. Presentan metabolismo de glucosa tanto fermentativo como respiratorio, son oxidasa y catalasa positivas, su temperatura de crecimiento va desde los 4-41°C, y óptima de 22-28°C.

### 2.7 *Aeromonas hydrophila*.

Aunque *Aeromonas hydrophila* ha sido descrita como patógeno primario y como patógeno oportunista para una variedad de animales acuáticos y terrestres, incluyendo humanos (Merino *et al.*, 1992), la especie se encuentra ampliamente distribuida en ambientes acuáticos, tanto dulces, estuarinos y marinos. Esta asociación al agua se refleja en el nombre de la especie, *hydrophila*, ‘afín al agua’. Algunas cepas de *A. hydrophila* son capaces de inducir septicemia hemorrágica en peces y tener un rol importante en el síndrome de la enfermedad ulcerativa, una patología epizoótica que se caracteriza por la presencia de úlceras dérmicas expuestas en la cabeza, cuerpo y regiones dorsales del pez (Gosling, 1999).

#### 2.7.1 Factores de virulencia de *A. hydrophila*.

En general, los integrantes del género *Aeromonas* tienen la capacidad de producir varios elementos de virulencia bacteriana que facilitan el contagio. A pesar de que la patogénesis de *A. hydrophila* no ha sido totalmente caracterizada, se considera que ésta es multifactorial

(Chopra *et al.*, 2000). Los factores de virulencia de esta bacteria incluyen la producción y secreción de productos extracelulares (PEC), como toxinas (e.g. hemolisinas, enterotoxinas, y endotoxinas), enzimas líticas (e.g. lipasas, proteasas y amilasas) y adhesinas (Vazquez-Juarez *et al.*, 2003; Galindo *et al.*, 2004), todos ellos, contribuyen en mayor o menor proporción a la expresión de enfermedad en peces (Revisado en Majumdar *et al.*, 2007). La hemolisina se regula por la disponibilidad de hierro en el ambiente y, cuando el metal se encuentra en cantidades limitantes, la cepa puede perder su capacidad para lisar células del hospedero mediante el proceso hemolítico (Revisado en Austin y Adams, 1996).

Las características de superficie de *A. hydrophila* incluyen la capacidad de adhesión y aglutinación, además de hidrofobicidad, éstas a su vez, facilitan la unión a células eucariotas (Ascencio *et al.*, 1990; Austin y Adams, 1996). La capa S es un arreglo de proteínas superficiales que tiene influencia sobre la interacción entre la célula bacteriana y su ambiente (Dooley y Trust, 1988; Dooley *et al.*, 1988a); ésta capa le confiere protección física a la bacteria contra la lisis mediada por factores humorales del suero y bacteriófagos del hospedero.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Uno de los principales retos de la acuicultura es la prevención y eliminación de enfermedades que provocan mortalidades en la producción, y por tanto, importantes pérdidas económicas. El estudio del sistema inmune como mecanismo de defensa ante enfermedades nos permite conocer la respuesta de los peces cuando se ven expuestos a una diversidad de agentes patógenos. Una de las estrategias para el estudio del sistema inmune, es la evaluación de la expresión génica bajo cierto estímulo, por ejemplo, la infección experimental. A pesar de que la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* es considerada un candidato potencial de cultivo, no se tienen antecedentes de su capacidad de respuesta ante agentes comunes de la producción en cautiverio. El propósito de éste trabajo fue investigar la respuesta, con énfasis en la respuesta inmune a nivel transcripcional, de cabrillas sardineras infectadas experimentalmente con la bacteria *Aeromonas hydrophila*, un importante patógeno secundario capaz de ocasionar severas enfermedades en muchas especies de teleósteos. Con el fin de obtener una perspectiva más amplia de la respuesta, se utilizó la técnica de hibridación sustractiva por supresión para generar una colección de genes expresados por efecto de la infección experimental.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La infección experimental con *Aeromonas hydrophila* inducirá una expresión génica diferencial en leucocitos de cabrilla sardinera.

#### **5. OBJETIVO GENERAL.**

Analizar la expresión génica diferencial en leucocitos de juveniles de cabrilla sardinera ante la infección por *Aeromonas hydrophila*.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- a) Retar peces juveniles de *Mycteroperca rosacea* con *Aeromonas hydrophila*, como modelo de infección experimental.
- b) Construcción de una genoteca sustractiva de genes expresados diferencialmente durante la infección experimental.
- c) Secuenciación y análisis bioinformático de los genes expresados diferencialmente durante la infección experimental.
- d) Validación de la genoteca generada mediante la selección y cuantificación de la expresión de cinco genes por PCR en tiempo real.



## 7. MATERIALES Y METODOS.

### 7.1 Organismos.

Se emplearon 10 organismos juveniles de *M. rosacea* ( $100\pm 15.3$  g y talla promedio de 17.5 cm) que fueron obtenidos por métodos de reproducción artificial en cautiverio, en el Laboratorio de Biología Reproductiva del CIBNOR Unidad La Paz durante el verano de 2006.

### 7.2 Estanquería.

Se utilizaron dos tanques cilíndricos de 5000 L con entrada independiente y continua de agua de mar filtrada (Fig. 5). En cada tanque se colocaron dos difusores de aire y una resistencia sumergible para mantener el agua con una concentración de oxígeno disuelto (OD) de 5.5 - 6.2 mg/mL y la temperatura en  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente. Se trabajó con un tanque para peces del grupo control y otro para el grupo de tratamiento, en cada uno de ellos, se instaló una jaula construida con tubos de PVC y malla de nylon (luz de malla:  $\frac{1}{2}$  pulgada) y en ella, se colocaron 5 peces aparentemente sanos. El agua de descarga de ambos tanques se colectó en un reservorio común, con el fin de ser tratada antes de ser desechada. Para el tratamiento de la descarga, se añadió directamente hipoclorito de sodio al 0.01%, que posteriormente fue neutralizado con tiosulfato de sodio al 0.001% para eliminar las posibles cloraminas formadas durante la cloración.

### 7.3 Bacteria e inóculos bacterianos.

Se empleó la bacteria *Aeromonas hydrophila* cepa *Ah-315* para realizar la infección experimental. La bacteria, que pertenece a la colección del Laboratorio de Patogénesis

Microbiana del CIBNOR Unidad La Paz, fue originalmente aislada en 2007 por Gómez-Rojo, a partir del riñón de una cabrilla sardinera infectada experimentalmente con la cepa *Ah-315* (Departamento de Microbiología Médica - University of Lund, Suecia).

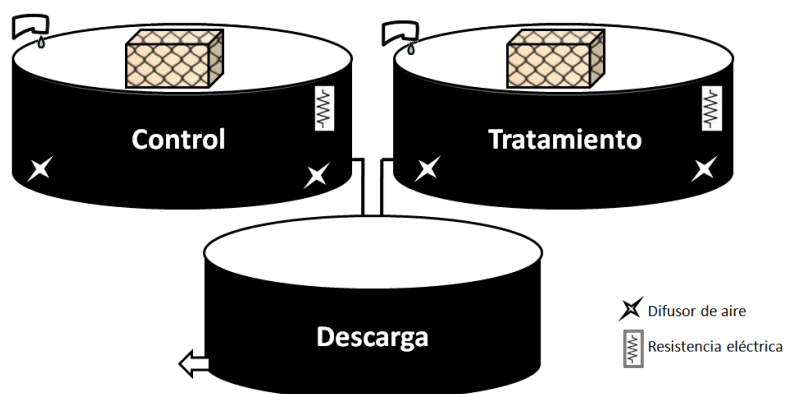


Figura 5. Estanquería empleada para el ensayo de infección experimental.

Al momento del bioensayo, la cepa de trabajo se encontraba preservada en stock de glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por lo que fue necesaria su reactivación. Bajo condiciones de esterilidad, se tomó una asada del cultivo axénico y se sembró por estría cruzada en placas con agar LB, por duplicado. Se reactivó también la cepa de referencia (ATCC 7966) como control positivo y se reservó una placa de LB sin sembrar como control negativo. Todas las placas fueron incubadas durante 48 h a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posterior a este tiempo de incubación, se tomó una colonia aislada de la caja con la cepa de interés y se resembró en una placa fresca de LB (por duplicado); se incubó durante 24 h a  $30^{\circ}\text{C}$ , con lo que se consideró reactivada. Se les realizaron las pruebas de catalasa, citocromo oxidasa y tinción de Gram como pruebas presuntivas de identificación de la cepa y como prueba confirmatoria, se amplificóm

mediante PCR de colonia, una proteína de membrana con capacidad antigénica, la omp28 específica del género *Aeromonas*.

Se prepararon los inóculos bacterianos un día antes de realizar la infección experimental en los peces. Bajo condiciones de esterilidad, se recuperó la biomasa de las placas recién incubadas y se resuspendió en 10 mL de solución salina estéril (SSE: cloruro de sodio al 0.85%). La suspensión bacteriana se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 10°C, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió gentilmente en 10 mL de SSE fresca, este lavado se realizó en dos ocasiones más, con el fin de retirar la mayoría de los productos extracelulares (PEC) presentes en la biomasa. Una vez lavada, la suspensión celular se ajustó a una densidad óptica (DO)= 1 ( $\lambda= 450$  nm), que corresponde a una densidad poblacional de  $1 \times 10^9$  células/mL (Gómez-Rojo, 2007) (Colorímetro Linson 3, Internacional Científica S.A.). Se realizaron las diluciones seriadas necesarias para obtener inóculos de  $1 \times 10^7$  cél/mL para la primera inyección, y  $1 \times 10^8$  cél/mL para la segunda.

#### 7.4 Infección experimental.

Durante siete días previos a la infección experimental, los peces se mantuvieron bajo régimen de aclimatación a las condiciones; durante este periodo se administró alimento fresco *ad libitum* en 3 ocasiones por día. Una vez aclimatados, los peces se anestesiaron con metanosulfonato de triclaína (MS 222; Argent Laboratories, EUA) a una concentración de 50mg/L. Los peces del grupo de tratamiento fueron inoculados con 200  $\mu$ L de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^7$  cél/mL) mediante inyección intraperitoneal (Fig. 6), mientras que los peces del grupo control con 200  $\mu$ L de SSE. Durante los siguientes catorce días, los peces se

mantuvieron bajo las condiciones medioambientales y nutricionales anteriormente descritas y se llevó además, un registro de cualquier signo mostrado por los mismos.



Figura 6. Los peces se inocularon intraperitonealmente (izquierda). La sangre periférica se extrajo de la vena caudal del los peces (derecha).

Los peces del grupo de tratamiento fueron inoculados nuevamente con 200  $\mu$ L de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^8$  cél/mL) y los peces del grupo control con 200  $\mu$ L de SSE (Fig.7). Cuatro días después de esta segunda inyección, los peces se anestesiaron y a cada uno de ellos, se le extrajo aproximadamente 0.5 mL de sangre periférica (Fig. 6), usando jeringas de 3 mL impregnadas con heparina (heparina sódica 100U/mg; Laboratorios Hycel, México) como anticoagulante. Se combinó la sangre de los cinco peces infectados y en forma independiente la sangre de los cinco peces control, de forma que se obtuvo una sola muestra de ‘tratamiento’ y una de ‘control’.

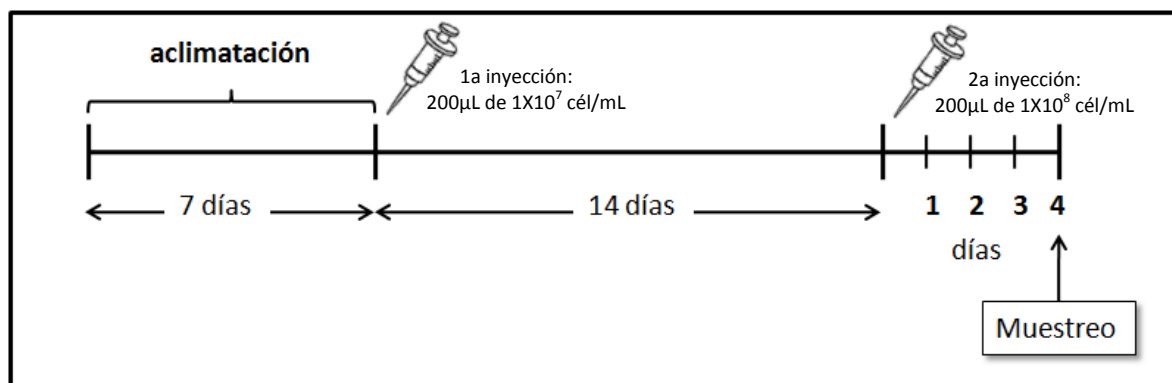


Figura 7. Diseño de la infección experimental.

### 7.5 Aislamiento de leucocitos, extracción de ARN total y síntesis de ADNc.

Las muestras se diluyeron con dos volúmenes de amortiguador salino de fosfatos pH=7.2 (PBS, por sus siglas en inglés) y mediante centrifugación, se aisló la fracción leucocitaria haciendo pasar la sangre diluida a través de un gradiente continuo de Histopaque 1077 (Sigma) que permite el aislamiento celular mediante exclusión por tamaño (Anexo A.I). Se extrajo y purificó el ARN total de leucocitos mediante el uso del reactivo TRIzol (Invitrogen EUA) (Anexo A.II), cuya integridad y calidad se evaluó mediante la visualización de su patrón electroforético en un gel desnaturizante de agarosa al 1.5% (Fig. 8b) y la lectura de su absorbancia ( $\lambda=260$  y  $\lambda=280$  nm) en espectrofotómetro (Nanodrop N-1000 Spectrophotometer).

### 7.6 Construcción de la biblioteca de ADNc sustractiva.

Se utilizó la metodología de hibridación sustractiva por supresión (SSH) para la construcción de la biblioteca (Fig. 8a); empleando el kit PCR-select© cDNA Subtraction (Clontech, Palo Alto, CA). Dado que la biblioteca se generó en sentido ‘forward’, es decir, se generó una colección de genes sobre-expresados por efecto del tratamiento, el ARNm de leucocitos de peces infectados fue usado como el ‘tester’ (o minuendo) y el ARNm de los leucocitos de peces control fue el ‘driver’ (o sustraendo), que es el conjunto de transcritos de referencia con el que se realizará la sustracción. Se sintetizó el ADNc de las muestras y se digirió con la enzima de restricción *RsaI*. El ADNc de la muestra de tratamiento se subdividió en dos fracciones; cada una de ellas fue ligada a un adaptador diferente, que a su vez servirán como sitios de unión de oligonucleótidos en la amplificación por PCR en pasos subsecuentes. Las muestras de ADN tester y ADN driver se sometieron a una doble

hibridación y finalmente, se realizó una amplificación anidada de los EST's expresados diferencialmente en leucocitos de cabrillas infectadas con *A. hydrophila* (Anexo A.III).

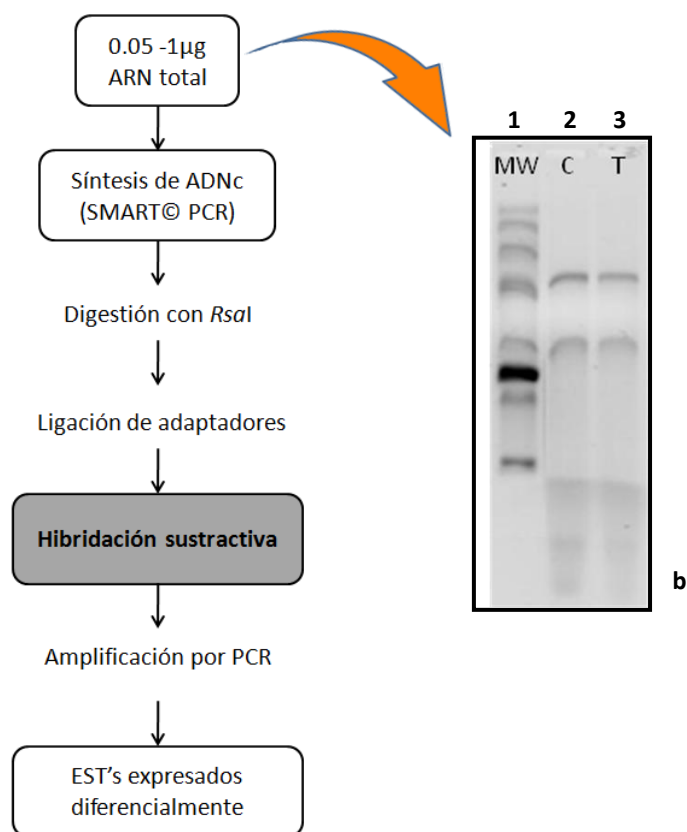


Figura 8. a) Descripción general de la metodología de SSH. Adaptado de Rebrikov *et al.*, 2003; b) gel desnaturalizante de agarosa al 1.5% donde se visualiza la calidad del ARN con el que se construyó la biblioteca; en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular RNA ladder (Invitrogen, EUA), en el carril 2 el ARN de leucocitos de peces control y el carril 3 ARN de peces infectados experimentalmente.

### 7.7 Clonación de EST's, purificación de ADN plasmídico y secuenciación.

Los fragmentos de ADN (EST's) obtenidos por hibridación sustractiva por supresión, fueron ligados al vector plasmídico pGEM T-easy (Promega, EUA. Fig. 9) de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Anexo A.IV). Posteriormente, los plásmidos se insertaron en células *E. coli* DH5α mediante electroporación (Anexo A.V). Las bacterias transformantes

se sembraron por aspersión en placas de agar LB (DIFCO BD Diagnostics) suplementadas con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), IPTG (500  $\mu\text{M}$ ) y X-Gal (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron toda la noche a 37°C.

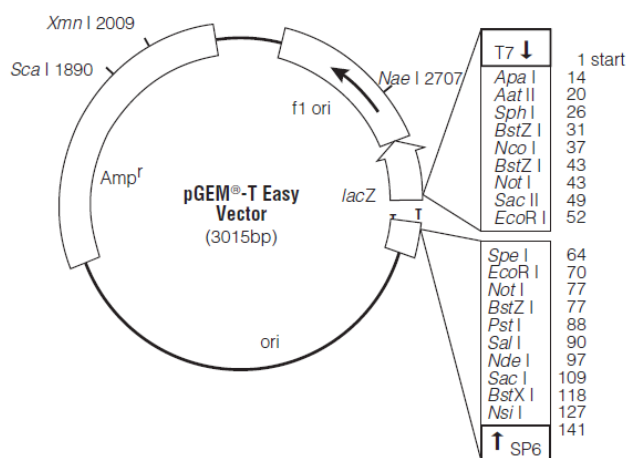


Figura 9. Mapa circular del vector plasmídico de clonación pGEM- T Easy (Promega, EUA).

Se seleccionaron las clonas que presuntivamente contenían un inserto, mediante monitoreo de la producción de pigmento azul/blanco y se les realizó PCR de colonia amplificando su inserto con los oligonucleótidos M13F/M13R. Las clonas que presentaron un inserto único mayor a 300 pares de bases, fueron propagadas en caldo LB suplementado con ampicilina y se purificó su de ADN plasmídico (ADNp), mediante el kit PureLink Quick Plasmid MiniPrep (Invitrogen, EUA). Simultáneamente se reservaron stocks de LB inoculado con cada una de las clonas obtenidas y se preservaron en glicerol al 35% a -80°C. El ADNp de cada clona fue colocado en placas de 96 pozos y se liofilizaron. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en el CINVESTAV (Irapuato, México). Ambas hebras del ADN clonado fueron secuenciadas por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en un secuenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando los oligonucleótidos universales M13F/M13R.

## 7.8 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

Para la edición de las secuencias obtenidas se eliminaron los siguientes fragmentos que flanqueaban a la secuencia en cuestión:

- a. Los nucleótidos correspondientes al vector pGEM T-Easy Vector. Se empleó el software en línea VecScreen© (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information* por sus siglas en inglés).
- b. Los adaptadores que habían sido ligados a los ADNc tester (de la muestra de tratamiento), mediante edición manual. La información de la secuencia de adaptadores fue obtenida del manual de procedimientos del kit Clontech© PCR-Select cDNA Subtraction.

Con las secuencias editadas se realizó la búsqueda de su identidad con otras secuencias reportadas en la base de datos de GenBank, usando el programa BLAST de NCBI (Altschul *et al.*, 1997) y mediante los algoritmos *blastn*, *blastx* y *tblastx*. Para la asignación de una probable relación de identidad entre las secuencias obtenidas y las secuencias disponibles en la base de datos, se consideraron los porcentajes de identidad, de cobertura así como el valor esperado (e-value) para cada una de ellas.

Posterior a la evaluación de secuencias, se seleccionaron cinco de ellas ponderando primordialmente su relevancia para el sistema inmune, un alto puntaje y el mínimo valor esperado mostrado, con el fin de cuantificar su nivel de expresión mediante PCR en tiempo real. Las secuencias seleccionadas fueron: Tirosin-fosfatasa tipo 4A-2 (TyrPh), subunidad H de la ferritina (FerrH), canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), cinasa



dependiente de RNA de doble cadena (Kinase) y una proteína plasmática regulatoria del sistema de complemento (Complement).

#### 7.9 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para RT-PCR en tiempo real.

Se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de las cinco secuencias seleccionadas, usando el software Lasergene y la herramienta PrimerSelect (DNASTAR Inc. EUA). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma Genosys (Sigma-Aldrich, EUA); para confirmar la especificidad de cada uno de ellos, se realizaron PCR's de punto final y se visualizaron los amplicones en un gel de agarosa al 2%. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en este trabajo, así como el tamaño del producto que amplifican, se presentan en la tabla II.

#### 7.10 Cuantificación mediante RT-PCR en tiempo real.

El ARN total de los leucocitos de peces infectados y peces control obtenido en el bioensayo se trató con DNasa I (Invitrogen, EUA) para eliminar cualquier contaminación de ADN. Se sintetizó el ADNc a partir de 1µg de cada muestra mediante el kit Super Script III First Strand Synthesis System for RT- PCR (Invitrogen, EUA) siguiendo las instrucciones del proveedor (Anexo A.VI). La cuantificación de la expresión de las secuencias (genes) seleccionadas se realizó mediante PCR en tiempo real en un equipo ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) usando el reactivo SYBR Green PCR (Applied Biosystems). Los componentes de la mezcla de reacción fueron: 10 µl de 2X SYBR Green supermix, 5 µl de oligonucleótidos (0.6 mM) y 5 µl de la muestra de ADN por cuantificar. La mezcla se incubó durante 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C, y

finalmente 15 s a 95°C, 1 min a 60°C y 15 s a 95°C. Para la normalización de la expresión de cada ARNm evaluado, se cuantificó también la expresión de una proteína de la subunidad 18S ribosomal en cada muestra. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla II.

Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos usados para RT-PCR en tiempo real

GEN		SECUENCIA DEL OLIGO (5'-3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
Tirosin-fosfatasa tipo 4A-2	F	CGC CCC GCT GCA GTA GAG ATT	84
	R	GAA CTT GTT GAG CGT GGC ATT GGT	
Subunidad H de la ferritina	F	ATG CCG AGA AGC TGA TGA AAC TGC	95
	R	ACC ACT GCC CCA CTC GTC CCT CTC	
Canal aniónico dependiente de voltaje	F	GAT GCC TCC GTC AGT GCT AAA GTG	100
	R	CCA GGC CAG ACA GGG TGA GTT	
Quinasa dependiente de RNA de doble cadena	F	ACC GGG CTG CAT TTT GTT TG	104
	R	AGC TCA TGG CCC TCA GTT TTT CTA	
Proteína plasmática regulatoria del complemento	F	GCA TCG CCA TCA ACA CC	147
	R	GAA ATG GGA GAC GAA GGA CA	
Proteína ribosomal de la subunidad 18S	F	CGA AAG CAT TTG CCA AGA AT	101
	R	AGT TGG CAC CGT TTA TGG TC	

### 7.11 Análisis Estadístico.

Para el presente trabajo, el bioensayo se realizó en dos ocasiones, con el fin de contar con material suficiente para cuantificar la expresión génica en las muestras del bioensayo original y las de su correspondiente réplica biológica.

En todos los casos, cada PCR se realizó por triplicado y se realizó en 2 ocasiones. Los resultados se expresaron usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, 2001), como el cambio en el nivel de expresión de la muestra de tratamiento con respecto a la muestra control.

## 8. RESULTADOS.

### 8.1 Bioensayo de infección experimental.

Una vez que fueron colocados en sus respectivas jaulas, los peces se aclimataron rápidamente a las condiciones de la estanquería. Los dos días en que se realizaron las inoculaciones mediante inyección intraperitoneal, los peces del grupo control y del grupo de tratamiento mostraron algunos signos de abatimiento como letargia y anorexia, sin embargo, al día siguiente, nadaban vigorosa y uniformemente, además aceptaban y digerían el alimento suministrado. No se registró ninguna mortalidad ni se observaron daños externos en los peces de ambos grupos durante el bioensayo.

### 8.2 Aislamiento de leucocitos y extracción de ARN total.

A pesar de que se partió de cantidades iguales de sangre periférica, se obtuvo una mayor fracción de leucocitos en la muestra del grupo control, y por ende, durante la extracción de ARN total se observó un mayor pellet en esta muestra. Al evaluar la calidad de los ARN obtenidos en el gel desnaturizante de agarosa al 1.5% (Fig. 8b) se observa que el ARN del grupo control tuvo mejor calidad e integridad, mientras que el ARN del grupo de tratamiento presentó una ligera contaminación de ADN genómico por lo que fue necesario tratarlo con DNasa I (Invitrogen, EUA), además se logró aislar una menor cantidad de ARN de esta muestra con una menor relación de absorbancias 260/280.

### 8.3 Genoteca de ADNc sustractiva.

Con el ARN que se obtuvo, se construyó la genoteca de ADNc. El efecto de sustracción en las muestras de ADNc se documentó en un gel de agarosa al 1.2% (Fig. 10). En la muestra

puede observarse el patrón de bandeo característico de la amplificación selectiva de los transcritos expresados de forma diferencial (Fig 10; carril 1). Junto a las muestras de *M. rosacea* se corrió el control de sustracción del kit utilizado (Fig 10; carriles 3 y 4), correspondiente a ADNc de músculo esquelético de humano.

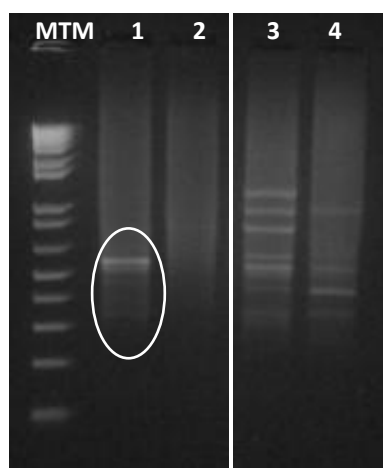


Figura 10. Gel de electroforesis de la muestra de ADNc de cabrilla sustraída (carril 1), sin sustraer (carril 2), el control positivo (carril 3) y negativo (carril 4) de sustracción del kit. En la extrema izquierda se muestra el marcador de talla molecular 1 kb plus (Invitrogen, USA). La zona de sustracción se observa en el rango que va desde las 300 hasta las 650 pares de bases aproximadamente.

#### 8.4 Clonación y secuenciación de los fragmentos nucleotídicos generados.

Previo a la clonación, los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2%. El patrón de barrido sugiere que el tamaño de los insertos oscila entre las 300 y 1100 pares de bases (pb); también es posible observar un patrón de bandeo característico del efecto sustractivo de la técnica, que nos indica el enriquecimiento de algunas secuencias expresadas diferencialmente por efecto de la infección experimental. En total, se obtuvieron 329 clonas con un inserto único (Fig.11) y del tamaño esperado (Fig. 12) a través de cuatro eventos de transformación.

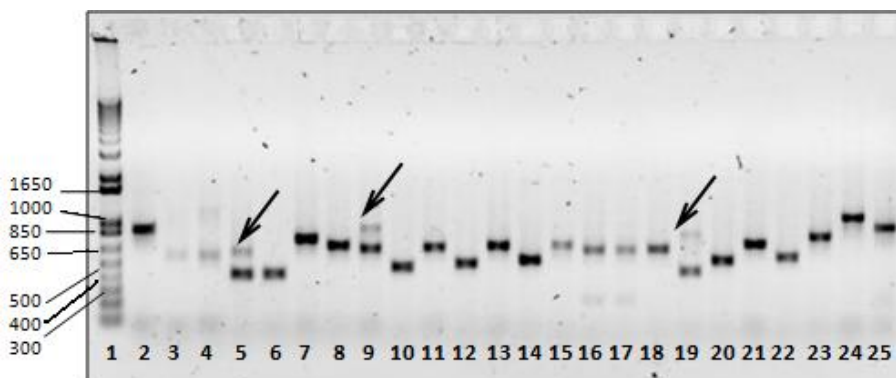


Figura 11. Gel de electroforesis de PCR de colonia de clonas aleatorias. Se purificó el ADNp de las clonas y se amplificó el inserto usando el juego de oligonucleótidos M13. Se descartaron las clonas donde no se identificó ninguno, o bien se identificaron dos o más amplicones (flechas). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb plus Invitrogen, EUA) y cada uno de los carriles 2-30 corresponde al (los) amplicón(es) por clona.

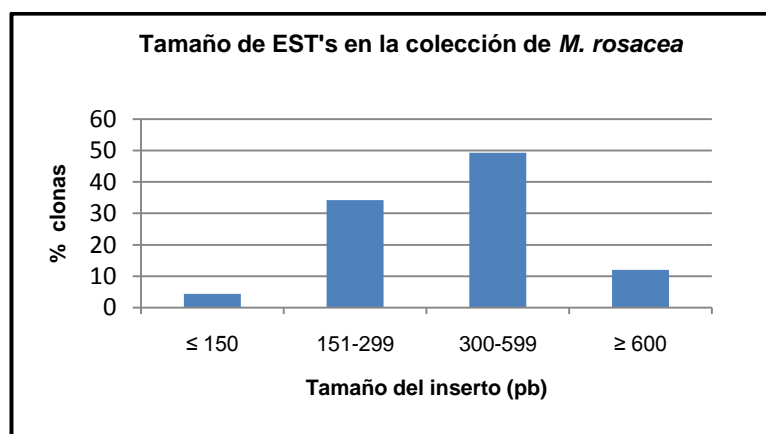


Figura 12. Distribución del tamaño de EST's en pares de bases (pb), de las clonas que contienen los fragmentos de la biblioteca sustractiva de *M. rosacea*.

### 8.5 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

En la búsqueda de homología en las bases de datos públicas de un total de 329 clonas, 254 (77.2%) resultaron ser unigenes, mientras que las 75 (22.8%) restantes correspondieron a secuencias redundantes de varios fragmentos del mismo ADNc. De entre los unigenes, sólo el 4.33% no mostraron identidad con secuencias previamente reportadas en la base de datos

del GenBank; el 42.52% mostraron identidad con secuencias de teleósteos el 42.91% con secuencias de otros organismos eucariontes y finalmente 10.24% con organismos procariontes (Fig 13).

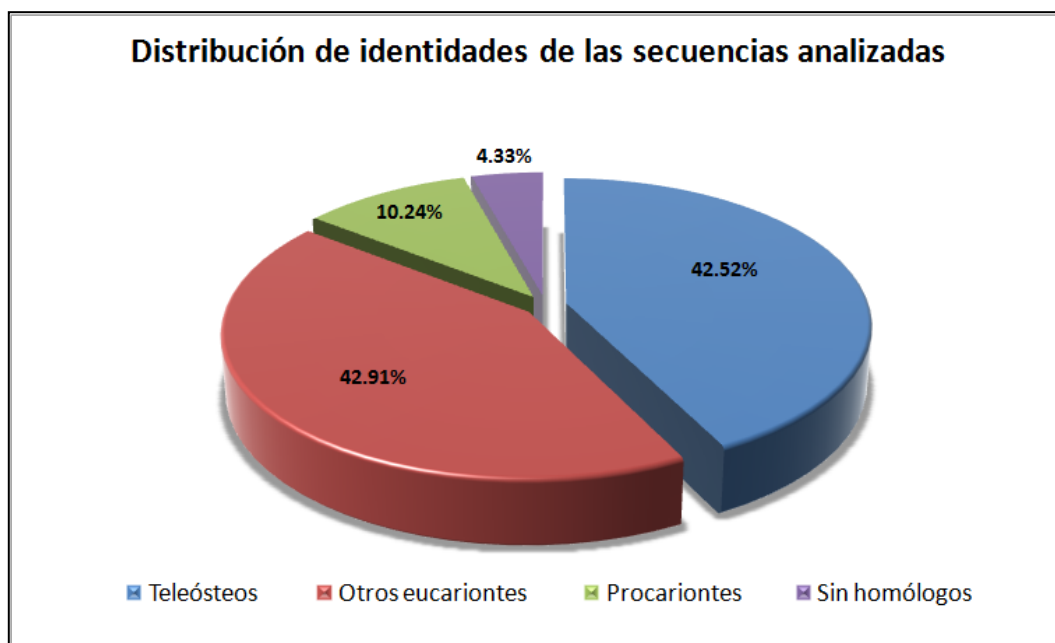


Figura 13. Distribución de identidades de las secuencias analizadas.

### 8.6 Selección de secuencias.

Una vez que se realizó el alineamiento de las secuencias, se seleccionaron 5 secuencias para ser cuantificadas mediante PCR en tiempo real, con el fin de validar la colección de EST's construída en este trabajo. La selección se basó en a su alto porcentaje de identidad, mínimo valor esperado (e-value), y un importante rol putativo en la respuesta de los peces ante la infección bacteriana:

- **Tirosin-Fosfatasa tipo 4A-2 (PTP-4A: Tyrosine phosphatase type 4A-2):**  
Participa como mediador en la transducción de señales y regulación de un amplio

repertorio de procesos fisiológicos característicos de organismos multicelulares, por ejemplo: la proliferación, diferenciación o muerte celular y el transporte de moléculas hacia dentro y fuera de las células. En la respuesta inmune, el proceso de fosforilación mediado por las PTP determina la coordinación entre células vecinas, a través de mediadores solubles (humorales) y contacto directo célula-célula. Los cambios en el nivel de expresión de los genes PTP regulan la activación linfocitaria mediada por un antígeno-receptor, la diferenciación celular mediada por citocinas y otras respuestas a una gran diversidad de estímulos (Mustelin *et al.*, 2005)

- **Subunidad H de la Ferritina (Ferritin H subunit):** La ferritina es una proteína ubicua en todas las células eucariotas y funciona como almacén de hierro, mantiene los niveles de hierro intracelular en forma disponible y desplazable hacia los requerimientos de procesos metabólicos. También evita la producción de especies reactivas de oxígeno catalizada por hierro, al suministrar hierro en su forma no tóxica (Geetha *et al.*, 1999).
- **Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC: Voltage dependent anion channel):** Proteína formadora de canales con un peso aproximado de 30 a 32 KDa. Se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial exterior de todas las células eucariotas; ésta proteína se encarga de perforar la membrana mitocondrial exterior para crear vías para la difusión de iones y metabolitos, hacia la

mitocondria. En 2007, se reportó por primera vez la clonación, secuenciación y caracterización del gen VDAC en un teleósteo *Paralichthys olivaceus*; y como respuesta a la infección viral se observó que su expresión se ve inducida (Lü *et al.* 2008).

- **Cinasa dependiente de RNA de doble cadena (ARNdc-PKR: Cinasa dependiente del ARN de doble cadena):** La expresión de genes de los interferones (IFN) requiere del ensamblaje de un grupo complejo de factores de transcripción. Uno de estos factores es el NF- $\kappa$ B, cuya activación es mediada por el RNA de doble cadena. Se ha sugerido que la proteína quinasa p-68 (PKR) puede actuar como un inductor-receptor de NF- $\kappa$ B, llevando la señal del ARNdc hacia NF- $\kappa$ B, fosforilando al inhibidor I $\kappa$ B (Kumar *et al.* 1994). También se ha demostrado que en ratones, la quinasa dependiente de ARNdc es esencial en la termotolerancia y la acumulación de la proteína HSP70 (Zhao *et al.*, 2002).
- **Proteína plasmática regulatoria del Complemento (Complement regulatory plasma protein).** En peces, se ha identificado la presencia del sistema complemento principalmente en el mucus dérmico, actuando así como primera barrera de defensa. Está constituido por al menos unas veinte proteínas plasmáticas sintetizadas principalmente como precursores inactivos que se activan secuencialmente en respuesta a células o sustancias extrañas al organismo. Esta proteína fue reportada por primera vez en 1994 para una especie de teleósteo (*Parablax neblifer*) (Dahmen *et al.*, 1994).



## 8.7 Análisis bioinformático de secuencias en la Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas.

Se localizaron las secuencias seleccionadas en este trabajo en las secuencias similares disponibles en pez cebra y los números de acceso correspondientes (Genbank) fueron colocados en la base de datos de la KEGG (Kanehisa y Goto, 2000) para inferir el proceso biológico en el que participa cada una de las secuencia obtenidas en este trabajo. Los resultados obtenidos en este análisis se presentan completos en las figuras 14-20.

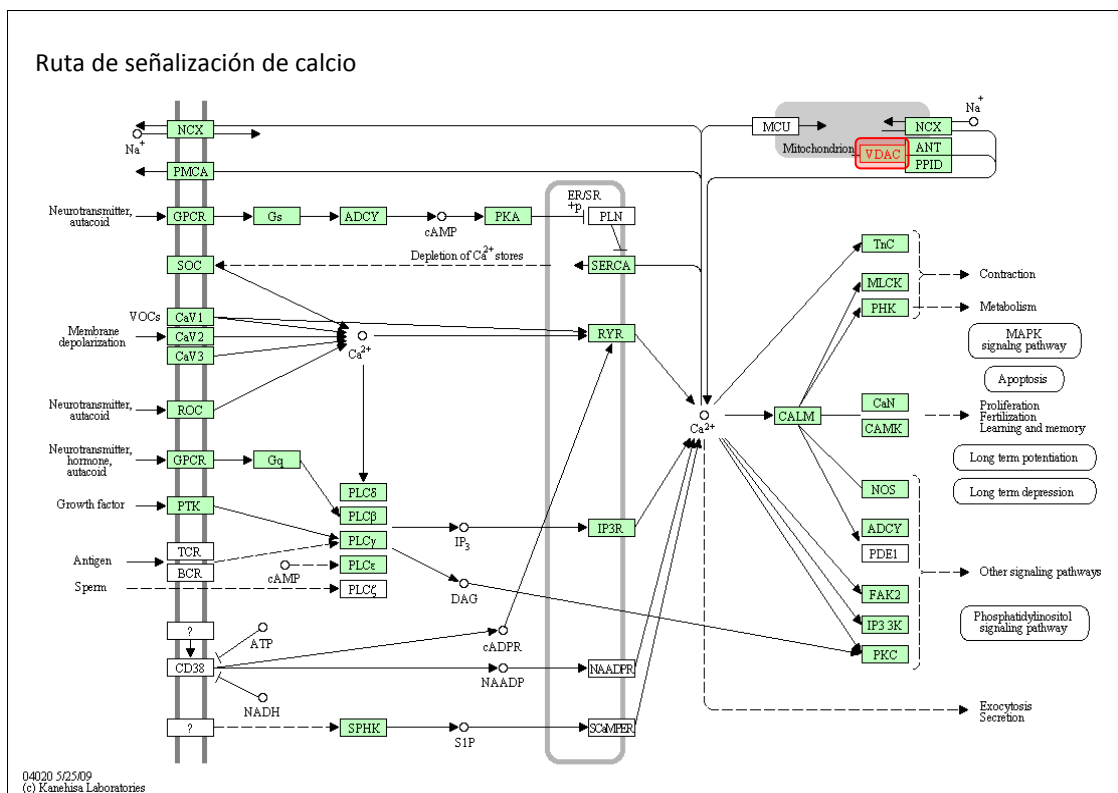


Figura 14. Ruta de señalización de calcio. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  que entran a la célula de manera externa, son principal señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se lleva a cabo por la presencia de un gradiente electroquímico que atraviesa la membrana plasmática. Las células usan este suministro externo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la activación de una diversidad de canales con propiedades totalmente diferentes. Los canales operados por voltaje se encuentran en células inducibles y generan rápidamente el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  que controla los procesos celulares instantáneos. Existen muchos canales de entrada para los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , como por ejemplo el ROC (canal operado por el receptor), el SMO (canal operado por el segundo mensajero) y el SOC (canal operado por el almacén).

## Cascada de señalización de sistema de complemento

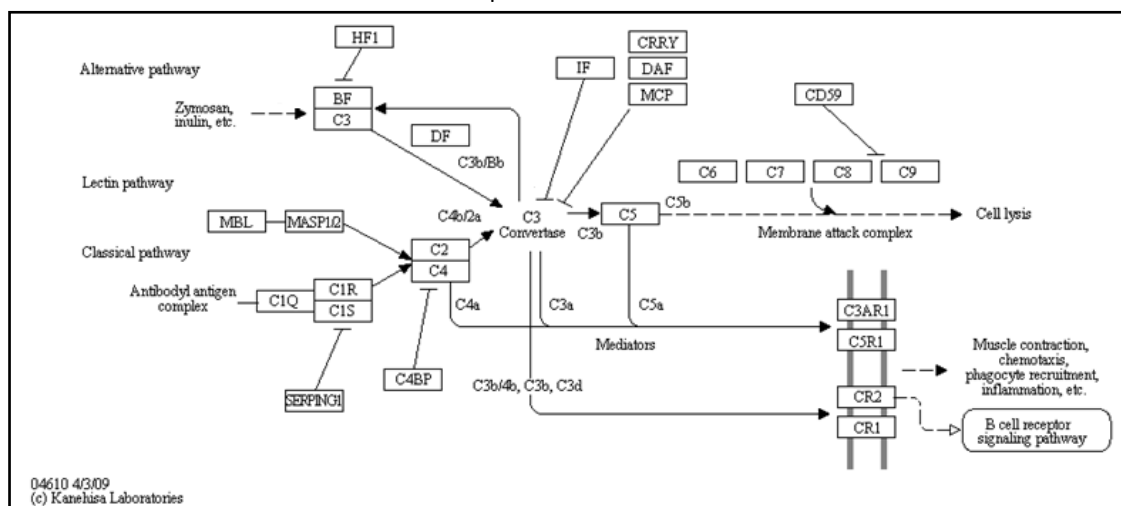


Figura 15. Cascadas de señalización de sistema de complemento. El sistema de complemento es una cascada de proteínas plasmáticas que se activa ante la presencia de patógenos. Existen tres rutas de activación: la clásica, la vía de las lectinas y la alternativa. Estas tres rutas generan actividades enzimáticas cruciales que generan las moléculas efectoras del sistema de complemento. Las tres consecuencias principales de la activación del sistema son la opsonización de patógenos, el reclutamiento de células de repuesta inmune e inflamatoria, así como la eliminación directa de patógenos. En algunos casos, la actividad del sistema de complemento es mayor a la requerida por lo que existen factores de regulación que impiden el daño al propio organismo. En el presente trabajo se identificó una proteína regulatoria del sistema de complemento.

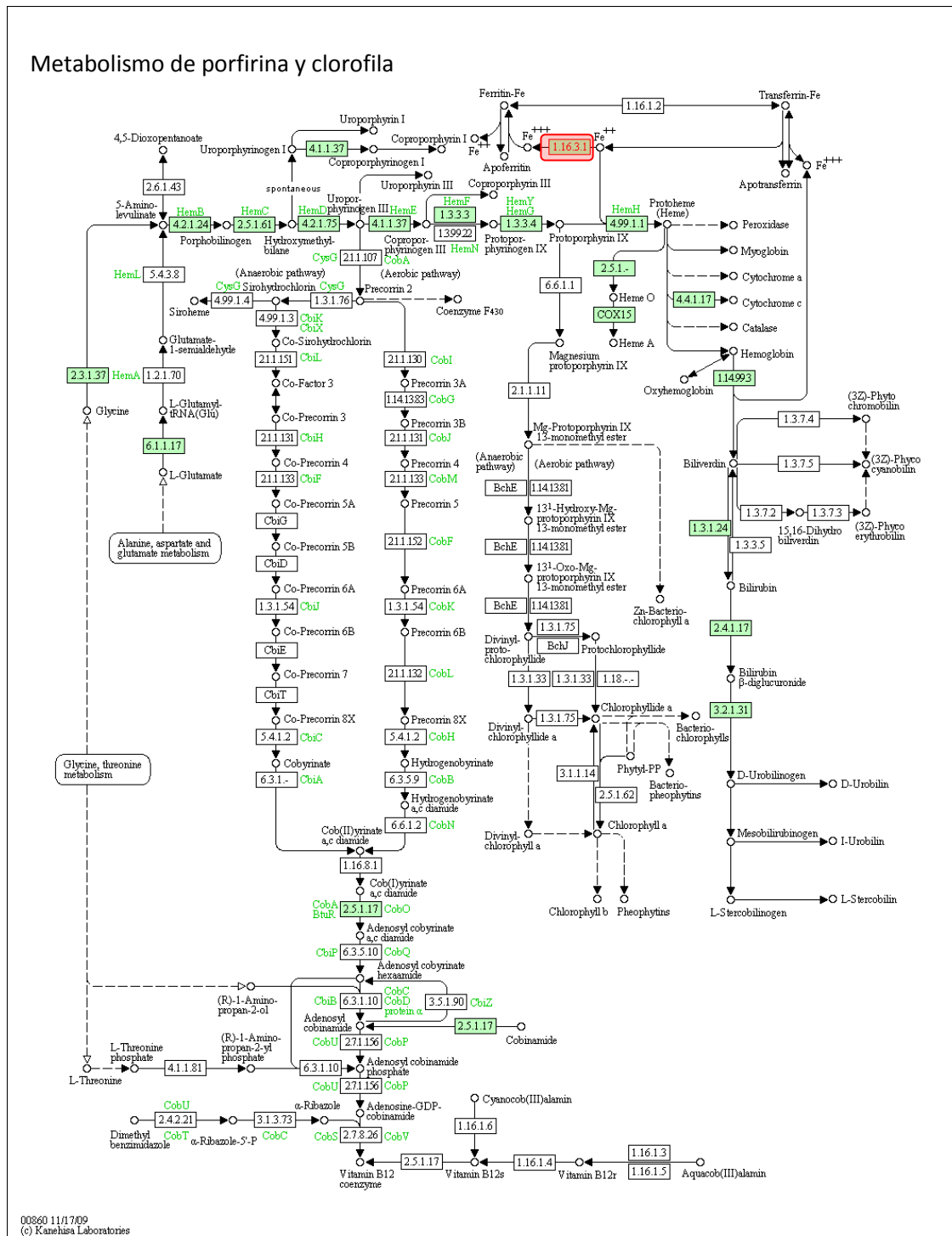


Figura 16. Metabolismo de porfirina y clorofila

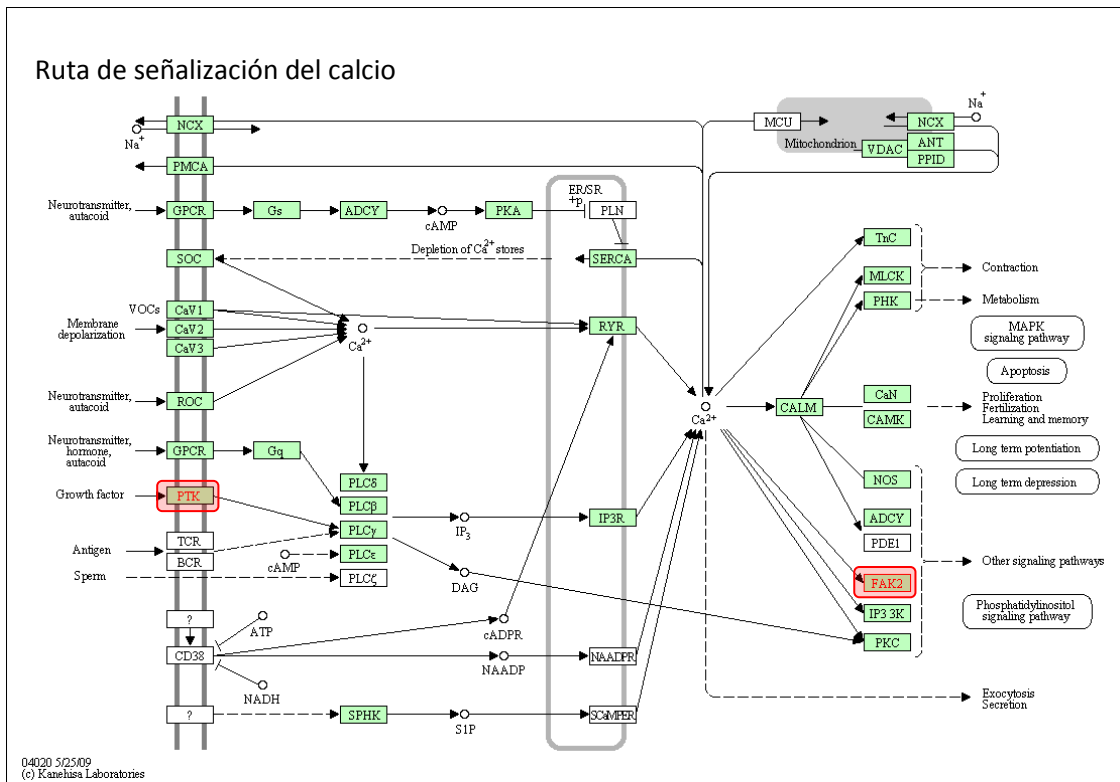


Figura 17. Ruta de señalización de calcio.

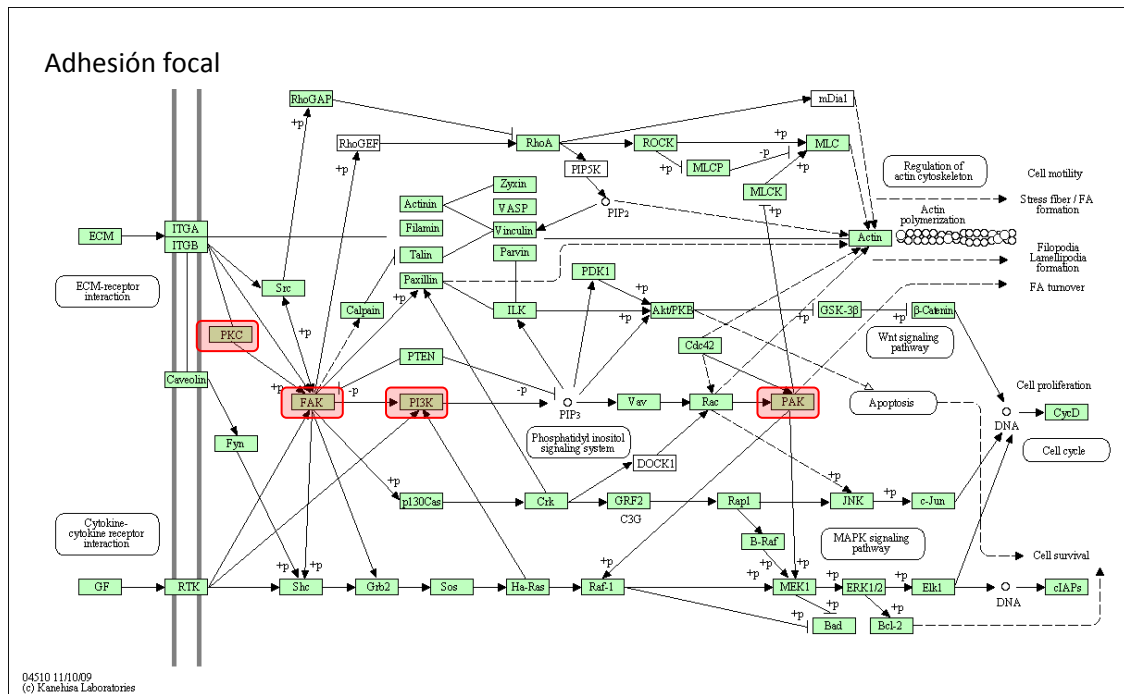


Figura 18. Adhesiones focales. Las adhesiones célula-matriz juegan importantes papeles en procesos biológicos como la motilidad, proliferación y diferenciación celular, la regulación y expresión génica, así como la supervivencia celular. En los puntos de contacto célula-matriz extracelular, existen estructuras especializadas llamadas adhesiones focales, donde los filamentos de actina se anclan en los receptores transmembranales a través de un complejo multi-molecular de proteínas de unión a placas. Algunos constituyentes de las adhesiones focales participan en las uniones estructurales entre los receptores de membrana y el citoesqueleto de actina, mientras otros son moléculas de señalización, incluyendo diferentes protein-quinasas y fosfatasas, sus sustratos y varias proteínas adaptadoras. Las señales de integrina son dependientes de las actividades de las tirosin-quinasas no-receptoras del FAK y las proteínas src, y de la misma forma, las proteínas adaptadoras del FAK, src y Shc promueven posteriores eventos de señalización. Estos eventos culminan en la reorganización del citoesqueleto de actina; un prerequisite para los cambios de forma y motilidad celular y de la expresión génica.

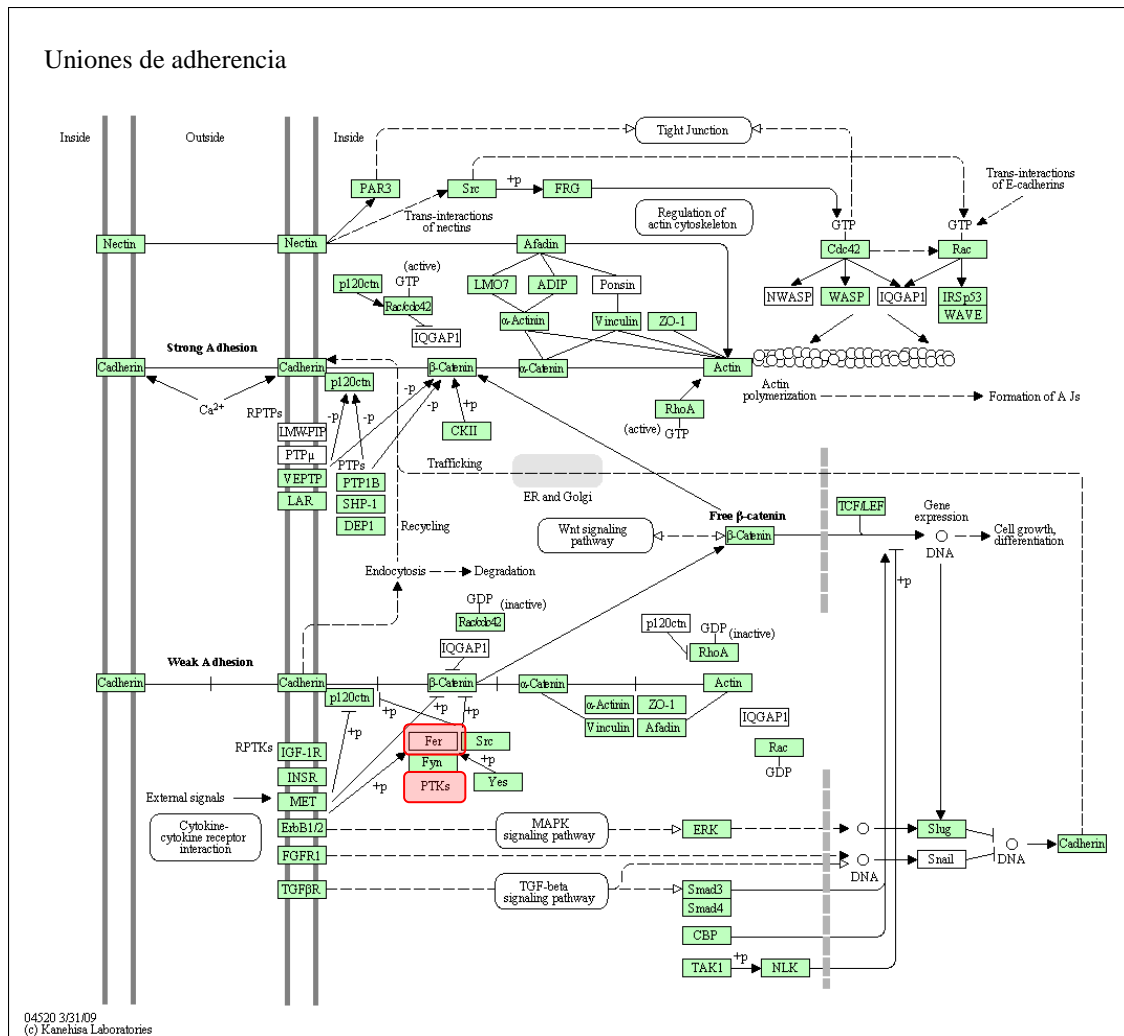


Figura 19. Uniones de adherencia. Las uniones de adherencia célula-célula son el tipo más común e importante de adhesiones intercelulares ya que mantienen la arquitectura tisular y polaridad celular, además pueden limitar el movimiento celular y su proliferación. En las uniones de adherencia, la cadherina E sirve como molécula esencial de adhesión. Los residuos citoplasmáticos unen a la beta-catenina, que su vez, se une a la alfa-catenina. La alfa-catenina se asocia con la F-actina directa e indirectamente. La integridad del complejo catenina-cadherina es regulada negativamente mediante la fosforilación de la beta catenina mediante el receptor de tirosin-cinasas (RTK) y las tirosin-cinasas (PTK) (Fer, Fyn, Yes y Scr), lo que lleva a la disociación del complejo catenina-cadherina. La integridad de este complejo es regulada positivamente por la fosforilación de la beta-catenina mediante la casein-cinasa III y su desfosforilación mediante las tirosin-fosfatasas. Los cambios en el estado de fosforilación de la beta-catenina afectan las adhesiones célula-célula, la migración celular y el nivel de señalización de la beta-catenina. La cadherina puede actuar como un regulador negativo de la señalización de la beta-catenina cuando se une a ella en la superficie celular, apartándola del núcleo.

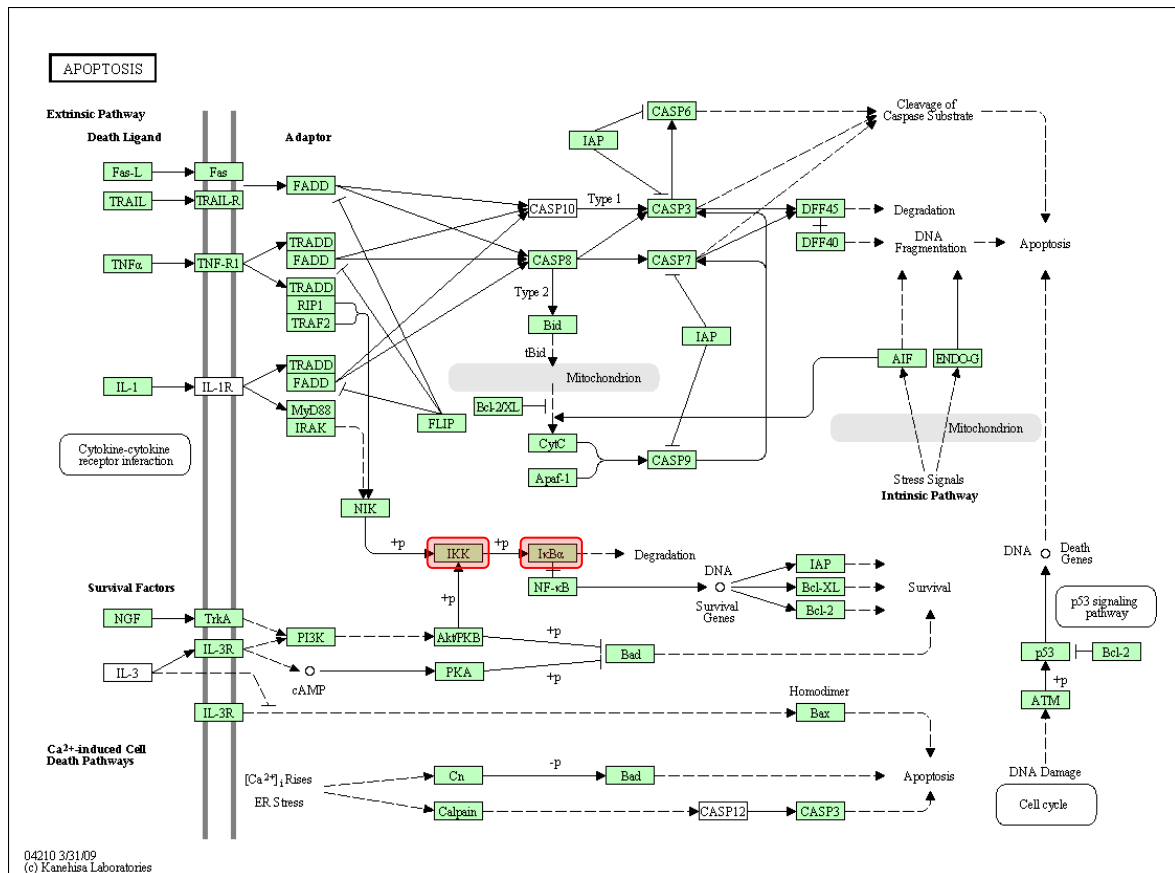


Figura 20. El proceso de Apoptosis es un mecanismo de muerte celular genéticamente controlado, y que está involucrado en la regulación de la homeostasis tisular. Las dos principales rutas de apoptosis son la extrínseca (FAS y otros miembros y ligandos de la superfamilia TNFR) y la intrínseca (asociada a la mitocondria); ambas se llevan a cabo en el citoplasma. La ruta extrínseca se induce cuando los receptores de muerte celular se ven comprometidos, éstos a su vez inician la cascada de señalización vía activación de la caspasa-8. La caspasa-8 se introduce directamente en la activación de la caspasa-3 y estimula la liberación del citocromo c de la mitocondria. La activación de la caspasa-3 lleva a la degradación de proteínas celulares que son necesarias para mantener la supervivencia e integridad celular. La ruta intrínseca ocurre cuando varios estímulos apoptóticos inducen la liberación del citocromo c de la mitocondria (independientemente de la activación de caspasa-8). El citocromo c interactúa con el Apaf-1 y la caspasa-9 para promover la activación de la caspasa-3. Estudios recientes señalan que el retículo endoplásmico (RE) es un tercer compartimento subcelular implicado en la ejecución apoptótica. Las alteraciones en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  y proteínas desnaturalizadas en el RE ocasionan estrés celular que cuando es prolongado, puede resultar en la activación del BAD y/o la caspasa-12, y finalmente inducir la apoptosis.

### 8.8 Validación de la genoteca generada mediante PCR en tiempo real.

La cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real se realizó como validación de la construcción de la genoteca sustractiva de cabrilla sardinera. Dado que la genoteca fue construida en sentido forward, los EST's generados representan genes que se ven sobre-expresados por efecto de un tratamiento, en nuestro caso la infección experimental con la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Para el análisis de resultados, se aplicó el enfoque  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ; cuando se usa este enfoque, los datos son presentados como el cambio en el nivel de expresión génica (*fold change*), normalizado contra un gen endógeno de referencia y relativo a la expresión génica en la muestra sin tratamiento o control (Livak *et al.*, 2001). Los resultados mayores a 1 en la relación tratamiento/control, se interpretan como una sobre-expresión del gen en la muestra de tratamiento. El cambio en los niveles de la expresión génica obtenidos para cada uno de los genes analizados se muestra en la Tabla III y la Fig. 21.

Tabla III. Cambio en el nivel de expresión de los genes seleccionados a partir de la colección de EST's de la genoteca de cabrilla sardinera aplicando el enfoque  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Se presenta además la desviación estándar para cada valor. \*Los niveles mayores a 1 indican sobre-expresión.

<b>Gen</b>	<b>Cambio en el nivel de expresión*</b>	<b>Desviación estándar</b>
Tirosin Fosfatasa	1.2200	0.0281
Ferritina sU-H	10.3621	0.1117
VDAC	4.0180	0.5530
Cinasa	6.2436	0.2882
Proteína de Complemento	3.1486	0.2600



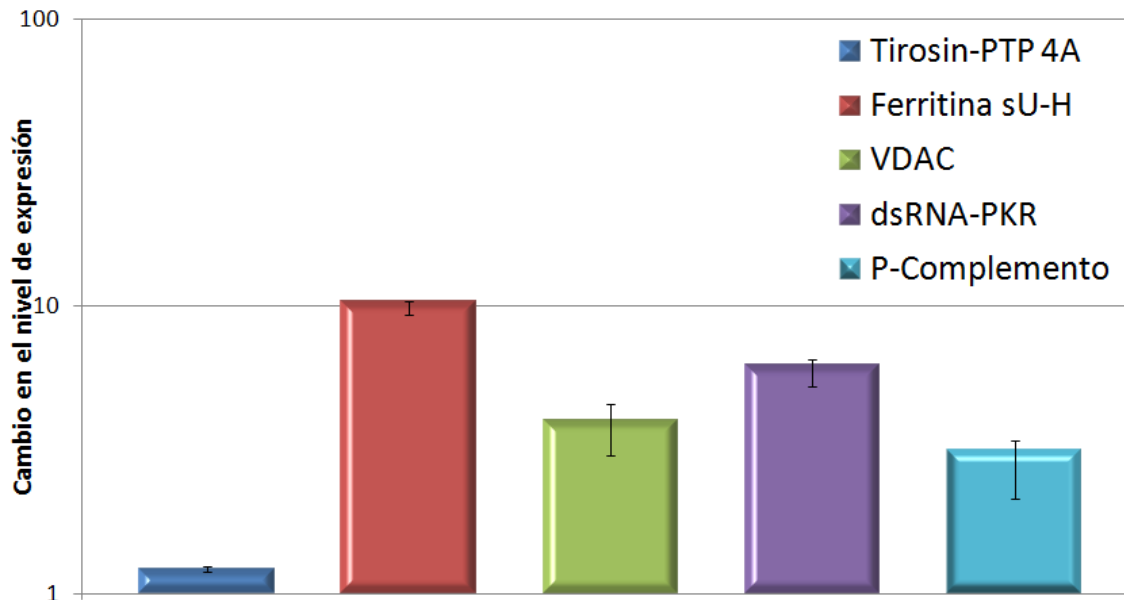


Figura 21. Cuantificación de la expresión de los genes que codifican para: Tirosin-fosfatasa tipo 4A-2(Tirosin-PTP 4A), subunidad H de la ferritina (Ferritina sU-H), canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), quinasa dependiente de RNA de doble cadena (ARNdc-PKR) y proteína plasmática del sistema de complemento (P-Complemento).

## 9. DISCUSIÓN.

En el presente estudio, se evaluaron las diferencias de expresión génica en leucocitos de cabrilla sardinera por efecto de la infección experimental con *Aeromonas hydrophila*, bajo un enfoque global. El estudio de los cambios de expresión génica en respuesta a un estímulo o condición particular, como por ejemplo una infección, nos permite obtener una perspectiva de los mecanismos de la interacción hospedero-patógeno, y así elucidar el fundamento molecular de patogénesis (Munir *et al.*, 2004).

Además de representar un modelo biológico para el estudio de teleósteos, la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* es una especie que ha sido propuesta como candidata para la acuicultura en el Noroeste de México (Gracia *et al.*, 2004; Reyes-Becerril, 2008), y en su momento, como toda especie que se somete a las condiciones de cultivo, será especialmente susceptible a una gran diversidad de enfermedades infecciosas, comunes en las instalaciones de producción acuícola. El género bacteriano *Aeromonas*, es ubicuo en los ecosistemas acuáticos; sin embargo, la especie *A. hydrophila* tiene la capacidad de ser un patógeno primario, secundario u oportunista para una gran variedad de animales acuáticos y terrestres, incluyendo humanos y peces (Galindo *et al.*, 2006). A nivel mundial, *A. hydrophila* es uno de los patógenos más importantes para peces de cultivo, resultando en pérdidas anuales millonarias para la acuicultura comercial (Poobalane *et al.*, 2008), ya que ocasiona una enfermedad llamada ‘septicemia hemorrágica bacteriana’ en sus formas septicémica; cutánea (con lesiones en piel y músculo); y latente, que es una forma sistémica sin manifestación de signos clínicos (Grizzle y Kiryu, 1993). ). Gómez-Rojo (2007) recientemente publicó sobre la susceptibilidad de *M. rosacea* a *A. hydrophila*, concluyendo que esta especie bacteriana es un patógeno oportunista para *M. rosacea*. En el presente

trabajo se estudió la respuesta a nivel transcripcional de cabrillas sardineras previamente infectadas de forma experimental, con el fin de obtener una perspectiva global de los mecanismos de defensa que *M. rosacea* despliega para hacer frente al reto bacteriano de *A. hydrophila*; para lograr éste objetivo, se generó una colección de EST's representativas del transcriptoma de *M. rosacea* durante el curso de la infección experimental.

Para la construcción de la colección o genoteca de EST's se utilizó la técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH), la cual ha sido empleada con éxito en muchos estudios con el fin de identificar nuevos genes de relevancia inmunitaria, tanto en las respuestas antibacterianas (Bayne *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2006; Tsoi *et al.*, 2004) como en la actividad antiviral (O'Farrell *et al.*, 2002). Éstos reportes, han mostrado que el método de SSH es altamente eficiente para la construcción de bibliotecas enriquecidas (Martin *et al.*, 2008), ya que provee una herramienta importante en la identificación de genes que se expresan en forma diferencial y dinámica, como respuesta a diferentes agresiones inmunitarias (Martin *et al.*, 2008); por ello, se aplicó esta metodología para construir la primera colección de EST's de *M. rosacea*.

Como resultado, se obtuvieron un total de 329 clonas, de las cuales 254 resultaron contener insertos representativos de unigenes; a su vez, 108 de los unigenes mostraron identidad con secuencias de teleósteos previamente reportadas; y es ésta cantidad de secuencias, la que actualmente se enlista en la colección, aunque aún es posible optimizar la purificación de ADNp de las clonas ya existentes y así obtener secuencias más limpias, que probablemente presentarán una mayor identidad con secuencias de teleósteos, o bien, las clonas completas pueden ser enviadas a secuenciar, permitiendo que el proveedor del servicio tenga pleno

control sobre el método de purificación de los plásmidos, además también pueden realizarse más transformaciones, para obtener un mayor número de clonas.

De los 108 unigenes con identidad a secuencias de teleósteos, se realizó la selección de cinco de ellas para cuantificar su nivel de expresión en los peces; la proteína tirosín-fosfatasa tipo IVA-4A, la subunidad pesada de la ferritina, el canal aniónico dependiente de voltaje, la cinasa dependiente de RNA de doble cadena y un componente del sistema de complemento y para ello, se empleó el PCR en tiempo real y para el análisis de resultados, el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Cuando se usa el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , los datos se presentan como el cambio en el nivel de expresión génica (fold change), normalizado contra un gen endógeno de referencia y relativo a la expresión génica en la muestra sin tratamiento o control (Livak *et al.*, 2001). Los resultados mayores a 1 en la relación tratamiento/control, se interpretan como una sobre-expresión del gen en la muestra de tratamiento. Nuestros resultados indican que para *M. rosacea* los cinco genes evaluados se sobre-expresan por efecto de la infección experimental con *A. hydrophila*, ya que se observó un cambio en el nivel de expresión por encima del valor = 1 en todos los genes, esto a su vez, confirma la eficiencia de la colección generada, al no obtener un solo falso positivo.

De acuerdo a lo observado, la respuesta a nivel transcripcional de *M. rosacea* sugiere que varios sistemas metabólicos se activan en respuesta a la infección experimental con *A. hydrophila* y que los elementos regulatorios juegan un papel fundamental en la patogénesis misma.

Todas las células del sistema inmune presentan una gran cantidad de procesos regulados mediante tirosin-fosforilación y en general, expresan más genes que codifican para las

proteínas tirosin-fostasas (PTP) y tirosin-cinasas (PTK) que cualquier otro tipo celular, con la posible excepción de las neuronas. La tirosin-fosforilación es un mecanismo clave en la transducción de señales y la regulación de una amplia diversidad de procesos biológicos, entre ellos, la proliferación, diferenciación o muerte celular; morfología y motilidad celular, transporte de moléculas hacia dentro y fuera de las células y la activación de programas complejos de transcripción. La tirosin-fosforilación en el sistema inmune está también involucrada en la duración de los procesos celulares, así como su coordinación entre células adyacentes y contactos célula-célula. Se ha mostrado su relevancia en ratones knock-out (KO) al observar un severo desequilibrio inmunitario como producto del silenciamiento de los genes PTP (Mustelin *et al.*, 2005). En leucocitos de *M. rosacea* infectados experimentalmente, el cambio en el nivel de expresión fue de 1.22, apenas por encima del mínimo para considerarse sobre-expresión, sin embargo, es posible que éste valor corresponda al nivel al momento del muestreo (cuatro días después de la segunda inoculación bacteriana) y la expresión haya disminuido en esta fase.

Los cambios en el nivel de expresión de la tirosin-fosforilación regulan (i) la activación linfocitaria mediada por el contacto antígeno-receptor, (ii) la diferenciación celular mediada por citocinas y (iii) la respuesta a muchos otros estímulos; por lo cual, es probable que el máximo valor de la expresión génica de la tirosin-fosfatasa tipo IVA-4A se hay registrado en fases tempranas de la infección experimental, cuando el hospedero entra en contacto con los antígenos bacterianos y por medio de su expresión, se activen y desplacen los linfocitos ya existentes, así como la inducción de su proliferación clonal.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de los organismos, ya que es requerido para muchas rutas metabólicas y reacciones enzimáticas

celulares. Sin embargo, cuando se encuentra en exceso, el hierro en forma libre es tóxico para las células generando ROS en cantidades dañinas (Ganz *et al.*, 2007). Los peces como muchos otros organismos, no tienen una ruta catabólica para el hierro y por ello, su disponibilidad se regula mediante la absorción en el intestino, respondiendo a la cantidad almacenada y a los requerimientos del organismo. Esta regulación mantiene un balance de los efectos benéficos y tóxicos del hierro, aunada con la interacción de varios genes, por ejemplo los que codifican a su transportador transferrina y la proteína de almacén ferritina. Ambos genes también se han identificado y descrito en respuesta a la infección (Neves *et al.*, 2009). La ferritina tiene un papel primordial en el metabolismo de hierro, es la principal proteína de almacenamiento en procariontes y eucariotes. En su forma libre se compone de 24 subunidades H (pesada) y L (ligera); la subunidad H es la encargada de la detoxificación de hierro mientras que, la subunidad L en su confinamiento y almacenamiento a largo plazo. En general, la transcripción de genes que codifican para la ferritina se incrementa cuando hay bastante hierro disponible, mientras que disminuye cuando hay deficiencia de hierro. Se ha observado que la ferritina también se sobre-expresa por efecto del estrés oxidativo, del proceso inflamatorio y de la exposición a LPS, lo cual sugiere su conexión con la respuesta inmune. En peces, el almacenamiento de hierro vía ferritina, representa un importante mecanismo de eliminación, ya que se desecha en conjunto con las células senescentes (Neves *et al.*, 2009). En general, los patógenos bacterianos usan sistemas hemolíticos como mecanismo de obtención de nutrientes a partir de las células del hospedero. Por ejemplo, el hierro puede ser un factor limitante para el crecimiento de muchos patógenos (Sritharan, 2006).

De los genes analizados en leucocitos de *M. rosacea* se observó el máximo cambio el nivel de expresión (10.36) para el gen de la subunidad H de la ferritina, lo cual sugiere que al haber grandes cantidades de hierro libre como un producto de la lisis celular ocasionada por las bacterias, los leucocitos activos incrementan la expresión de genes de ferritina en su intento (i) por contrarrestar el daño que les ocasiona y (ii) de privar a las bacterias del suministro de hierro, que requieren para su posterior proliferación y diseminación. Este resultado tiene concordancia con los resultados obtenidos para otros organismos (Torti y Torti, 2002; Li *et al.*, 2008) y específicamente, también para teleósteos (Neves *et al.*, 2009). La mitocondria, que juega un papel importante en la síntesis de ATP, señalización celular y homeostasis del calcio intracelular, en condiciones basales permite un intercambio efectivo de metabolitos, cationes e información con el citoplasma, a través de las membranas mitocondriales interna y externa (MMI y MME, respectivamente). Mientras que el tráfico de metabolitos a través de la MMI requiere de procesos complejos catalizados por más de 30 acarreadores, la difusión de metabolitos a través de la MME se lleva a cabo prácticamente solo a través del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés) (Abu-Hamad *et al.*, 2006) que permiten el paso de iones dependiendo del voltaje transmembranal. El VDAC funciona además como un sitio de unión de cinasas celulares (principalmente hexocinasa), y con ello proveerles acceso preferencial al ATP; y como un sitio de señalización apoptótica (Abu-Hamad *et al.*, 2006). Su rol trascendental se debe a la liberación de proteínas apoptóticas como el citocromo C hacia el citoplasma, activando a las enzimas proteolíticas llamadas caspasas, que a su vez cortan varias proteínas celulares que promueven la apoptosis (Tsujimoto y Shimizu, 2002). Por otro lado, el silenciamiento de los genes que codifican para VDAC de células embrionales humanas,

inhibe la producción de energía y la proliferación celular (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2008). En 2008, Lü y colaboradores reportaron la clonación y caracterización del primer y único gen que codifica al VDAC (PoVDAC) de teleósteos, a partir del lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*, Teleostei: Pleuronectoidei), que por efecto de la infección viral experimental, se observó la inducción del proceso de apoptosis. En este mismo estudio, se observó que nivel de expresión del VDAC en células infectadas era 6 veces mayor con respecto a las células control (Lü *et al.*, 2008); en los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que los leucocitos de cabrilla presentaron un nivel de expresión del VDAC 4 veces mayor por efecto de la infección bacteriana experimental con respecto a los leucocitos control. Probablemente este valor de sobre-expresión de VDAC nos indique que el proceso apoptótico se está llevando a cabo en los peces infectados y que su población leucocitaria sea menor con respecto a la de los peces que no fueron inyectados con inóculo bacteriano. Experimentalmente este hecho fue notorio incluso a simple vista, ya que se obtuvo un menor rendimiento al realizar el aislamiento de la fracción leucocitaria y posterior purificación de ARN total de las muestras provenientes de cabrillas infectadas. Aún deben realizarse algunos estudios para determinar bajo qué mecanismo se induce VDAC en respuesta a la infección, ya sea viral o de tipo bacteriano, como es el caso del presente trabajo.

Los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) son uno de los principales tipos de receptores involucrados en el reconocimiento de patógenos microbianos. Los TLRs se expresan y encuentran activos en los macrófagos, donde activan cascadas de señalización que culminan en la sobreproducción de citocinas inflamatorias, incluyendo a IL-6 y TNF $\alpha$ , protagonistas de la respuesta inflamatoria ante infecciones bacterianas. Además de las dos



rutas clásicas de señalización mediada por TLRs (MAPK y NF- $\kappa$ B), recientemente se ha reportado otra proteína que posiblemente esté involucrada en el proceso, la cinasa dependiente de ARN de doble cadena (ARNdc-PKR), un componente de la respuesta antiviral ampliamente caracterizado. La PKR se activa al contacto con el ARNdc, promoviendo la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de síntesis proteica eucariota (eIF-2 $\alpha$ ), resultando en una rápida inhibición general de la síntesis proteica, que efectivamente limita la producción de viriones (Cabanski *et al.*, 2008).

Dentro de la biblioteca de EST's de leucocitos de *M. rosacea* infectadas experimentalmente con *A. hydrophila*, asombrosamente encontramos una secuencia con identidad a la ARNdc-PKR, por lo cual su nivel de expresión se cuantificó, con el fin de esclarecer si la secuencia correspondía a un falso positivo o bien, su relevancia en la respuesta al reto bacteriano. En teoría, los genes que codifican la ARNdc-PKR se expresan en cantidades mínimas, pero de forma constitutiva en la mayoría de las células, y mediante inmunoestimulación con interferón o ARNdc el nivel de expresión original puede aumentar hasta 5 veces (Rothenberg *et al.*, 2008). El nivel de expresión de ARNdc-PKR en leucocitos de *M. rosacea* aumentó 6.24 veces en respuesta a un estímulo bacteriano, no viral. En varios estudios recientes, se ha reportado la potencial función de PKR en la transducción de señales en respuesta a LPS, donde se ha encontrado que la PKR está involucrada en la activación de la ruta MAPKs y de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B (Revisado en Cabanski *et al.*, 2008).

Estudios *in vitro* muestran la toxina Act de *A. hydrophila*, indujo la producción de señales antiapoptóticas en macrófagos murinos al activar los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y CREB (Chopra *et al.*, 2000), en concordancia con el antecedente de que las células que

expresan a NF- $\kappa$ B inducen la expresión de genes antiapoptóticos y se ven protegidas contra la muerte celular ocasionada por el TNF (Zhang *et al.*, 1999), además el factor de transcripción NF- $\kappa$ B es importante en un gran número de rutas relacionadas al proceso inflamatorio (Galindo *et al.*, 2006).

Aún así, algunas cepas de *A. hydrophila* resisten los mecanismos de defensa del hospedero, por ejemplo, tienen la capacidad de resistir la lisis mediada por el sistema de complemento y resultar en una bacteremia y otras enfermedades invasivas asociadas con las infecciones por *Aeromonas* (Chopra *et al.*, 2000). El sistema de complemento representa el nexo clave entre la inmunidad innata y adaptativa en vertebrados (Beutler, 2004), sin embargo, también tiene un papel importante al provocar daño tisular. Para contrarrestar esta situación, el hospedero cuenta con estrictos mecanismos regulatorio. El balance entre la activación y la inhibición del complemento es fundamental para determinar si el sistema lleva a la defensa o al daño tisular en el hospedero. Por ello, era factible identificar algún componente del sistema representado en la colección de EST's generada; se encontró una secuencia con identidad a un componente regulatorio del sistema de complemento en cabrilla común (*Paralabrax nebulifer*, Teleostei: Serranidae) y la cuantificación de su expresión en leucocitos de *M. rosacea* infectados experimentalmente resultó en una sobre-expresión de 3.14 veces más con respecto al control. Este valor se debe probablemente a que aún después de 3 días de la re-exposición al microorganismo, los peces aún tienen excesivamente activado el sistema de complemento, ya sea para (i) opsonizar las células dañadas por el proceso apoptótico en curso, (ii) opsonizar las bacterias que se encuentren a su paso, o (iii) mantener activo el proceso de lisis celular mediado por el complejo de ataque membranal (CAM).

El constante desarrollo de las herramientas genómicas relacionadas al análisis funcional del sistema inmune de peces nos ha permitido una perspectiva más amplia de su respuesta ante la infección o la vacunación. Las metas hacia el futuro incluyen una mayor anotación de secuencias, el desarrollo de nueva y mejor tecnología de secuenciación, así como el desarrollo de líneas celulares y protocolos de silenciamiento de genes y examinar aún más a detalle las vías de señalización celular, que se encuentra altamente involucrado en la respuesta al estímulo. Mediante la aplicación de novedosas técnicas analíticas altamente eficientes, la información generada tendrá en corto plazo, una mayor relevancia para el sector acuícola nacional e internacional, esperando colaborar en la conformación de una producción sustentable de peces marinos y de agua dulce.

## 10. CONCLUSIONES.

- a) La especie *Mycteroperca rosacea* sí muestra cambios a nivel transcripcional por efecto de la infección experimental con la bacteria *Aeromonas hydrophila*; se sugiere que estos cambios se integran como parte de una respuesta inmunitaria dirigida al ataque.
- b) La técnica de SSH representa una herramienta práctica para obtener información acerca de la respuesta transcripcional global por efecto de un estímulo en organismos eucariotas, incluso cuando la metodología demanda bastante tiempo en el laboratorio, es posible optimizarlo en pasos clave, por ejemplo la clonación y la secuenciación.
- c) La cuantificación relativa del nivel de expresión de cinco EST's en leucocitos de *M. rosacea*, demostró la eficiencia de la biblioteca generada, ya que de cinco EST's evaluados, cinco mostraron sobreexpresión con respecto a las muestras control.
- d) En base a los resultados de expresión génica, las rutas de señalización podrían tener un rol importante en la respuesta tardía ante la infección por *A. hydrophila*; de las cinco secuencias seleccionadas y analizadas, tres están involucradas directamente en la transducción de señales (cinasa, fosfatasa y VDAC); una en la protección de respuestas autoinmunes (proteína regulatoria del sistema de complemento) y la otra como almacén de hierro.
- e) De las cinco secuencias analizadas, dos se activan principalmente como respuesta a la infección viral. Aunque al momento de hacer el bioensayo los peces se encontraban aparentemente sanos, no se descarta que hayan estado previamente en contacto con algún agente viral.

- f) Los peces con los que se realizó el presente trabajo, recibieron dosis subletales de inóculo bacteriano, lo cual posiblemente generó en ellos anticuerpos contra la bacteria y para este momento aún estén inmunizados, ya que cuatro de los cinco peces utilizados en el presente trabajo aún permanecen en el laboratorio de Biología Reproductiva.

## 11. LITERATURA CITADA.

1. Abu-Hamad S, Sivan S, Shoshan Barmatz V. 2006. The expression of the voltage-dependant anion channel controls life and death of the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 103(15):5787-5792.
2. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool (BLAST). *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10.
3. Ascencio F, Aleljung P, Wadström T. 1990. Particle agglutination assays to identify fibronectin and collagen cell surface receptors and lectins in *Aeromonas* and *Vibrio* species. *Applied & Environmental Microbiology* 56:1926-1931.
4. Austin B. 1996. The genus *Aeromonas*. John Wiley & Sons. U.S.A. 350 pp
5. Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki K, Nakao K, and Yano T. 2001 Immunerelevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 205–217.
6. Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40:845-59.
7. Cabanski M, Steinmüller M, Marsh LM, Surdziel E, Seeger W, Lohmeyer J. 2008. PKR Regulates TLR2/TLR4-Dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38: 26–31.
8. Chopra AK, Xu X-H, Ribardo D, Gonzalez M, Kuhl K, Peterson JW & Houston CW. 2000. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infection and immunity*. 68(5): 2808-2818.

9. Chu WH, Lu CP. 2008. In vivo fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker. *Aquaculture* 277:152-155.
10. Crollius HG & Weissenbach J. 2005. Fish genomics and biology. *Genome research* 15:1675-1682.
11. Dahmen A, Kaidoh T, Zipfel PF, Gigli I. 1994. Cloning and characterization of a cDNA representing a putative complement-regulatory plasma protein from barred sand bass (*Parablax neblifer*). *Biochemistry* 301: 391-397.
12. Darawiroj D, Kondo H, Hirono I, Aoki T. 2008. Immune-related gene expression profiling of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) kidney cells stimulated with conA and LPS using microarray analysis. *Fish & Shellfish Immunology*. 24: 260-266.
13. Diatchenko L. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93(12): 6025-6030.
14. Dooley JS, Trust TJ. 1988. S-layer of high-virulence *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*. 6(2):120-3.
15. Dooley JS, McCubbin WD, Kay CM, Trust TJ. 1988a. Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain. *Journal of Bacteriology*. 170(6):2631-8.
16. Ellis AE. 1997. Immunization with bacterial antigens: Furunculosis. *Developments in Biological Standardization* 90: 107-116.
17. Ellis AE. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9:291-308

18. Fänge R. 1994. Blood cells, haemopoiesis and lymphomieloid tissues in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 4:405-411.
19. Galindo CL, Gutierrez C, Chopra AK. 2006. Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. *Microbial Pathogenesis* 40:56–68.
20. Ganz T. 2007. Molecular control of iron transport. *Journal of American Society of Nephrology*. 18(2):394-400.
21. Gomez-Rojo, ME. 2007. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, BCS, México. Susceptibilidad de las fases iniciales de vida de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* a la infección experimental por *Aeromonas hydrophila*. Agosto 29, 2007
22. Geetha C, Vijay D. 1999. Purification and characterization of fish liver ferritins. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)* 123: 285–294.
23. Goetz FW. 2003. The ‘ups’ and ‘downs’ in using subtractive cloning techniques to isolate regulated genes in fish. *Integrative & Comparative Biology* 43: 786-793.
24. Gracia-López V, Romero-Rodríguez J, Pérez-Ramírez JM 2004. Inducción al desove con HGC y desarrollo embrionario y de larvas de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877). *Ciencias Marinas* 30(2): 279-284.
25. Gosling, PJ. 1996. *Aeromonas* species in diseases of animals. En: The genus: *Aeromonas*. Editorial John Wiley & Sons, Ltd, Chichester. Primera edición. Austin, B, Altwegg, M, Gosling, PJ, Joseph, SW, 1996. p.175.



26. Grøntvedt RN, Lund V, Espelid S. 2004. Atypical furunculosis in spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) juveniles: bath vaccination and challenge. *Aquaculture* 232: 69–80
27. Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM. 1996. Real-Time quantitative PCR. *Genome Methods* 6:986-994.
28. Huang X, Li Y, Niu Q, Zhang K. 2007. Suppression subtractive hybridization (SSH) and its modifications in microbial research. *Applied Microbiology Biotechnology* 76: 753-760.
29. Janda, JM, Abbott SL. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*; an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered question. *Clinical Infectious Diseases* 27, 332-344.
30. Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 28(1):27-30.
31. Karunasagar I, Ali A, Otta SK, Karunasagar I. 1997. Immunization with bacterial antigens: Infections with motile aeromonads. *Developments in Biological Standardization* 90:135-141.
32. Kocabas AM, Li P, Cao D, Karsi A, He C, Patterson A. 2002. Expression profile of the channel catfish spleen: analysis of genes involved in immune functions. *Mar Biotechnology*. 4:526.
33. Kumar A, Haque J, Lacosteo J, Hisco TJ, Bryan R, Williams G. 1994. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF- $\kappa$ B by phosphorylating I $\kappa$ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 6288-6292.

34. Li M, Saren G, Zhang S. 2008. Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: evidence for its dual role in immune response and iron metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 150(3):263-70.
35. Liang P y Pardee AB. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
36. Livak KJ y Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25: 402-409.
37. Lü AJ, Dong CW, Du CS, Zhang QY. 2008. Characterization and expression analysis of *Paralichthys olivaceus* voltage-dependent anion channel (VDAC) gene in response to virus infection. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 601-613.
38. Magallón F, Villareal H. 2007. Desarrollo sustentable de la Acuicultura en México: Orientaciones estratégicas. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*.
39. Mahumdar T, Ghosh D, Datta S, Sahoo C, Pal J, Mazumder S. 2007. An attenuated plasmid-cured strain of *Aeromonas hydrophila* elicits protective immunity in *Clarias batrachus* L. *Fish & Shellfish Immunology*. 23(1):222-30.
40. Martin SAM, Blaney SC, Houlihan DF, Secombes CJ. Transcriptome response following administration of a live bacterial vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Immunology* 43: 1900–1911.
41. Martin SAM, Collet B, Mackenzie S, Evensen O, Secombes CJ. 2008. Genomic tools for examining immune gene function in salmonid fish. *Reviews in Fisheries Science* 16(1):110-116.

42. Merino S, Camprubí S, Tomás JM. 1992. Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Infection and Immunology*. 60(10):4343-9.
43. Munir S, Singh S, Kaur K & Kapur V. 2004. Suppression subtractive hybridization coupled with microarray analysis to examine differential expression of genes in virus infected cells. *Biological Procedures Online* 6(1)94-104.
44. Mustelin T, Vang T, Bottini N. 2005. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nature Reviews: Immunology* (5)43-57.
45. Myhr AI y Dalmo RA, 2005. Introduction of genetic engineering in aquaculture: Ecological and ethical implications for science and governance. *Aquaculture* 250: 542–554.
46. Neves JV, Wilson JM, Rodrigues PNS. 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. *Developmental and comparative immunology* 33: 848-857.
47. O’Farrell C, Vaghefi N, Cantonnet M, Buteau B, Boudinot P, Benmansour A. 2002. Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *Journal of Virology* 76:8040–8049.
48. O’Farrell CN, Cantonnet VC, Buteau B, Boudinot P, and Benmansour A. 2002. Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a r habdovirus infection. *Journal of Virology*. 76: 8040–8049.

49. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Departamento de Pesca y Acuicultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Roma, 2009.
50. Poobalane S, Thompson KD, Diab A, Ardó L, Jeney G, Adams A. 2008. Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo. *Microbial Pathogenesis*. 45(1):60-9.
51. Raff M. 1998. Cell suicide for begginers. *Nature* 396:119-122.
52. Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS & Lukyanov SA. 2000. Mirror Orientation Selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Research* 28(20)1-4.
53. Rebrikov DV. 2003. Identification of differential genes by suppression subtractive hybridization. En Dieffenbach CW y Dveksler GS. PCR Primer: A laboratory manual. 2ª edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EUA
54. Reyes-Becerril M, Salinas I, Cuesta A, Meseguer J, Tovar-Ramirez D, Ascencio-Valle F, Esteban MA. 2008. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 25:731-739.
55. Ribas L. 2006. Functional genomics in fish: towards understanding stress and immune responses at a molecular level. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
56. Rodriguez I, Novoa B, Figueras A. 2008. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 25(3):239-49.

57. Romalde JL, Magariños B. 1997. Immunization with bacterial antigens: Pasteurellosis. *Developments in Biological Standardization* 90:167-177.
58. Rothenburg S, Deigendesch N, Dey M, Dever TE, Tazi L. 2008. Double stranded RNA- activated protein kinase PKR of fishes and amphibians: Varying the number of double-stranded RNA binding domains and lineage-specific duplications. *BMC Biology* 6:12 doi: 10.1186/1741-7007-6-12.
59. Secombes CJ, Wang T, Hong S. 2001. Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25:713-723.
60. Shoshan-Barmatz V, Keinan N, Zaid H. 2008. Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40:183-191.
61. Sritharan M. Iron and bacterial virulence. 2006. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24(3):163-4.
62. Stevenson RM. 1997. Immunization with bacterial antigens: Yersiniosis. *Developments in Biological Standardization* 90:117:124.
63. Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61.
64. Toranzo AE, Santos Y, Barja JL. 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Developments in Biological Standardization* 90:93-105.
65. Tort L, Balasch JC, Mackenzie S. 2003. Fish immune system: a crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* 23: 277-286.
66. Torti FM, Torti SV. 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 15;99(10):3505-16.

67. Tsoi SCM, Ewart KW, Penny S, Melville K, Liebscher RS, Brown LL, y Douglas SE. 2004. Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. *Marine Biotechnology* 6: 199–214.
68. Tsujimoto Y & Shimizu S. 2002. The voltage-dependant anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochemie* 84:187-193.
69. Vázquez Juárez RC, Barrera-Saldaña HA, Hernández-Saavedra NY, Gómez-Chiarri M y Ascencio F. 2003. Molecular cloning, sequencing and characterization of omp48, the gene encoding for an antigenic outer membrane protein from *Aeromonas veronii*. *Journal of Applied Microbiology* 94: 908–918.
70. Vázquez-Juárez RC, Barrera-Saldaña HA, Gómez-Chiarri M, Hernández-Saavedra NY, Dumas S, y Ascencio F. 2005. Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with the major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii*. *Fish & Shellfish Immunology*. 19(2): 153-163.
71. Wang L y Cherayil BJ. 2008. Ironing out the wrinkles in host defense: interactions between iron homeostasis and innate immunity. *Journal of Innate Immunity* 1:455-464.
72. Wang L y Wu X. 2007. Identification of differentially expressed genes in lipopolysaccharide-stimulated yellow grouper *Epinephelus awora* spleen. *Fish & Shellfish Immunology* 23:354-363.
73. Winstanley, C. 2002. Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology* 51, 459–467.
74. Yin G, Ardó L, Thompson KD, Adams A, Jeney Z, Jeney G. 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp,

- Cyprinus carpio, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 26:140–145.
75. Yong BJ, 2005. Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 18 (2):135-147.
76. Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez- de Frías C, Cortés A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20:126-136.
77. Zhao M, Tang D, Lechpammer S, Hoffman A, Asea A, Stevenson MA, Stuart Calderwood SK. 2002. Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is essential for thermotolerance, accumulation of HSP70, and stabilization of ARE-containing HSP70 mRNA during stress. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 44539-44547.
78. Zhu R, Zhang YB, Zhang QY, Gui JF. 2008. Functional domains and the antiviral effect of the double stranded RNA- dependent protein kinase PKR from *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Virology* 82(14): 6889-6901.
79. Zorrilla I, Chabrilón M, Arijo S, Díaz-Rosales P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA. 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture* 218:11-20.

## 12. ANEXOS

### ANEXO A.I

Aislamiento de leucocitos de sangre periférica.

#### Materiales:

Tubos de centrifuga estériles de 1.6 mL  
Jeringas estériles de 3 mL con aguja removible  
Pipetas Pasteur de punta corta estériles  
Tubos de centrifuga estériles de 15 mL  
Puntas para micropipeta estériles de 1000 y 200 mL.

#### Reactivos y Soluciones:

Heparina sódica 10000 U.I.  
Histopaque 1077 (Sigma EUA, no. cat. 10771)  
PBS pH 7.2  
Cloruro de amonio al 0.83%.

1. La sangre se extrae con jeringas heparinizadas\* de 3 mL cuya aguja pueda ser removible, ya que las células sanguíneas se lisan si se hacen pasar nuevamente por el delgado orificio de la aguja, al coleccionar la sangre en los tubos eppendorf.
2. Obtener la sangre a partir de la vena caudal de los peces, retirar la aguja y coleccionarla en tubos de 1.7 mL con una pequeña gota de heparina en el fondo. En cuanto la sangre se encuentre en el tubo, invertir suavemente para homogenizar la sangre y la heparina. Una vez coleccionada, puede mantenerse a temperatura ambiente hasta ser transportada al laboratorio, donde se harán los posteriores análisis.
3. Atemperar el Histopaque 1077 y alicuotar en los tubos que se necesiten
4. Diluir la sangre en relación 1:2 con PBS. Se obtiene aproximadamente 4 mL de sangre por cada 5 peces, por lo que se diluye la sangre en 8 mL de PBS en tubos de centrifuga estériles (12 mL totales de sangre diluida).
5. Colocar la sangre diluida se con extrema precaución sobre los tubos con Histopaque previamente atemperado, la relación Histopaque –Sangre diluida es de 2:1.
6. Cubrir la boca de los tubos y centrifugar durante 1 hora a 1500 rpm a temperatura ambiente. Si después de que ha transcurrido el tiempo, no se observa una buena separación de fase, puede ampliarse el tiempo de centrifugación durante 2 intervalos más de 10 minutos y subirse las rpm hasta un máximo de 1750rpm.
7. Retirar el plasma con una pipeta Pasteur para dejar disponible la fase de leucocitos, que se verá como un algodoncillo blanco en medio de las fases

\*Heparinizada: Se hace pasar la heparina a través del volumen de la jeringa y sin sacar la aguja del contenedor se regresa la mayoría del volumen, solo se deja una gotita al final de la jeringa.



8. Con otra pipeta Pasteur separar la fase de leucocitos (de todos los tubos empleados para un pool) en un tubo de ensaye limpio y añadir PBS pH 7.2 (aproximadamente 5 mL) por las paredes del tubo para lavar en una sola ocasión. Agitar suavemente y centrifugar 10 min a 1500 rpm. De aquí en adelante se entenderá por lavado la adición de solución fresca, agitación suave y centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm.
9. Retirar y eliminar el PBS con una pipeta Pasteur y hacer 2 lavados con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) al 0.83% estéril para lisar los eritrocitos remanentes en la muestra (pueden hacerse más lavados, sin embargo puede alterar la cantidad de leucocitos obtenidos inicialmente). Es posible que después de los lavados aun se siga viendo un color rojo en la muestra, sin embargo el tratamiento con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ya lisó (en teoría) los eritrocitos.
10. Hacer un lavado final con PBS estéril.
11. Colectar los leucocitos en un tubo de 1.7 mL y la muestra está lista para la extracción de ARN.

## ANEXO A.II

### Aislamiento de RNA (células).

1. Centrifugar ligeramente para eliminar la mayor parte de PBS excedente y se pasa el paquetito celular a un tubo de Fast Prep para extracción de RNA. Agregar 1 mL de Trizol (Invitrogen EUA).
2. Dar un pulso de 20 seg en el Fast Prep a velocidad 6 y colocar INMEDIATAMENTE en hielo.
3. Centrifugar a 12,000 xg durante 10 minutos a 4°C para separar las perlas y detritos del Trizol que contiene el RNA, recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
4. Incubar el homogenizado 5 minutos a 15-30°C para que se disocien los complejos de nucleoproteínas.
5. Agregar 200 µL de cloroformo por cada mL de Trizol y agitar los tubos vigorosamente por 15 segundos e incubar de 2-3 minutos a 15-30°C
6. Centrifugar a 12,000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se observarán 3 fases, una inferior color rojo, una interfase de fenol-cloroformo y la fase acuosa incolora en la parte superior, es aquí donde se encuentra el RNA.
7. Separar la fase acuosa y pasarla a un tubo limpio y agregar 2 µL de RNA de transferencia (Yeast tRNA 10 mg/mL, Ambion Inc. EUA) para optimizar la recuperación de RNA.
8. Precipitar el RNA agregando 500 µL de Isopropanol por cada mL de Trizol empleado, agitar levemente por inversión del tubo hasta que la solución se vea homogénea.
9. Centrifugar 12,000 xg por 15 minutos para precipitar el RNA
10. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet de RNA con 1 mL de etanol al 75% (preparado con agua DEPC) por cada mL de Trizol empleado.
11. Centrifugar a 7500 xg durante 5 min, eliminar sobrenadante y dejar secar el pellet al aire (no usar el vacu-fuge).
12. Resuspender en 30 µL de agua DEPC y Almacenar a -20°C o -80°C.

### NOTAS:

- a) Se recomienda alicuotar las muestras de RNA para visualizarse en gel desnaturalizante de agarosa al 1.5% y/o para cuantificar, sin necesidad de descongelar toda la muestra.
- b) Si se desea almacenar por un periodo largo, se pueden almacenar las muestras agregando al volumen de RNA, 100 µL de Acetato de Amonio mas 1 mL de Etanol Absoluto, y guardar a -80 °C.

### ANEXO A.III

#### Hibridación sustractiva por supresión.

La genoteca fue construida mediante el procedimiento SSH (*Suppressive Subtractive Hybridization*, por sus siglas en inglés) (Diatchenko *et al.*, 1996) usando el PCR-select© cDNA subtraction kit (Clontech, Palo Alto, CA). Los genes que se expresan en forma diferencial se encontraban contenidos en las muestras ‘tester’ y ausentes o en muy bajos niveles en las muestras ‘driver’. Se usaron cantidades iguales de ARNm tester y driver, que fueron convertidos a ADNc de doble cadena mediante transcripción reversa, y posteriormente el ADNc fue digerido con la enzima de restricción *RsaI* para producir fragmentos pequeños con extremos romos. El ADNc tester fue subdividido en dos fracciones y cada una de ellas fue ligada a un adaptador diferente, incluidos en el kit. Posteriormente se realizaron dos hibridaciones consecutivas; primero, se hibridó cada fracción de ADNc tester con un exceso de ADNc driver desnaturalizado: las concentraciones de moléculas de alta y baja abundancia en el tester fueron normalizadas por efecto de la cinética de segundo orden en la hibridación y el efecto de supresión de la PCR. Las secuencias blanco en el tester también se vieron significativamente enriquecidas con genes expresados diferencialmente (Fig. A.1). En la segunda hibridación, se mezclaron los dos productos de la primera hibridación y se re-hibridaron con un exceso de ADNc driver desnaturalizado; en este proceso, las poblaciones de ADNc de cadena sencilla que han sido normalizadas y sustraídas se complementan, formando híbridos de doble cadena con diferentes adaptadores en sus extremos 5’; estas son las moléculas objetivo de la técnica. Los extremos de las cadenas que no contienen adaptador son entonces completados con la ADN polimerasa. Finalmente, se realizó una amplificación selectiva de las moléculas sustraídas mediante PCR anidada, usando los oligonucleótidos específicos (complementarios a las secuencias de los adaptadores).

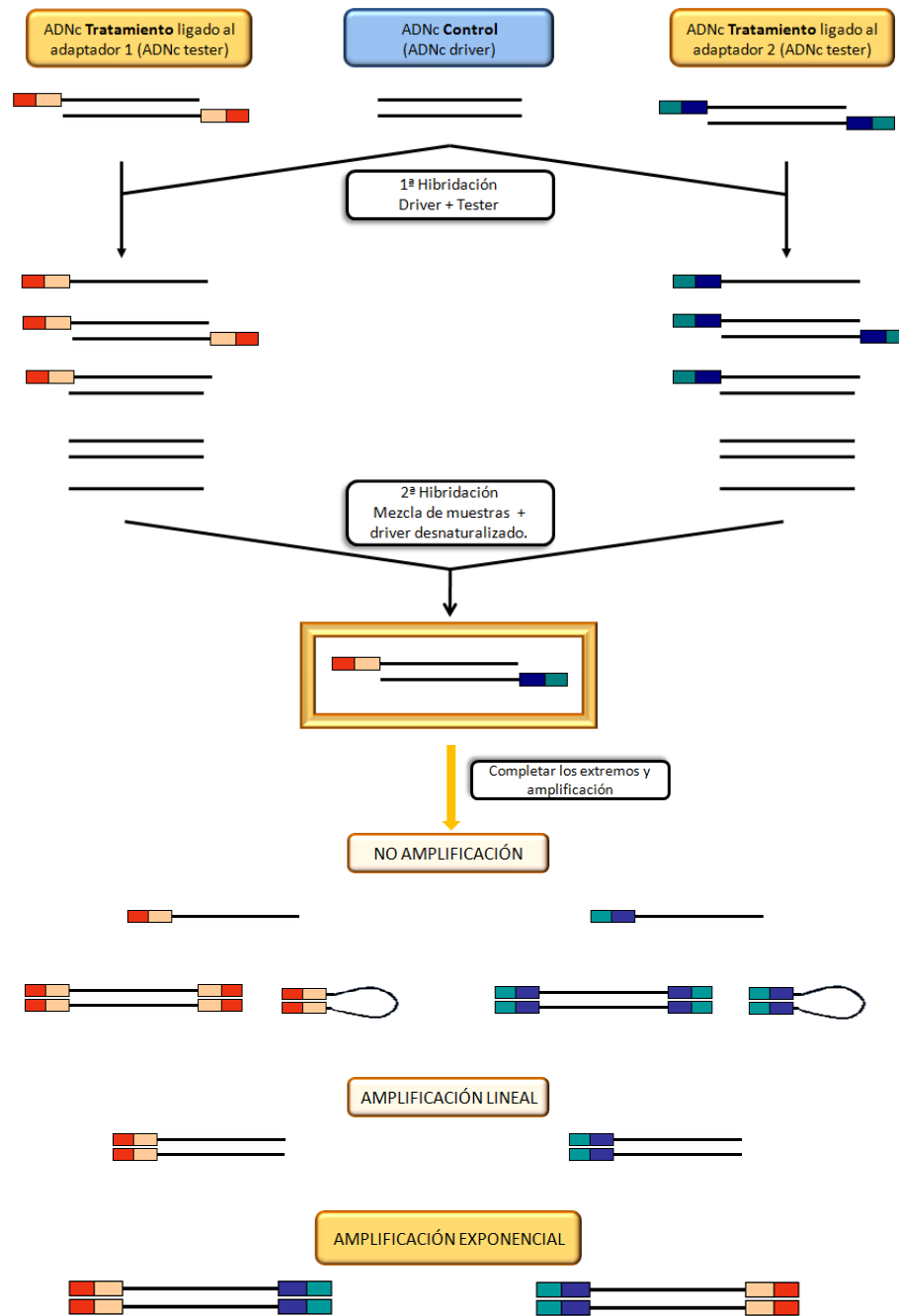


Figura A.1. Hibridación sustractiva por supresión. Doble hibridación y posterior amplificación selectiva (exponencial) de las secuencias que se sobreexpresan por efecto del tratamiento (Adaptado de Diatchenko, 1996).

## ANEXO A.IV

Protocolo de Ligación en el vector pGEM®-T Easy.

Los fragmentos de ADNc obtenidos en la genoteca fueron clonados en el vector comercial pGEM T-easy (Promega) y posteriormente transformados mediante electroporación en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

1. Centrifugar el tubo que contiene al vector pGEM®-T Easy brevemente (pulso), para colectar el material que se pega a las paredes del mismo.
2. Hacer la mezcla de reacción conforme la siguiente tabla:

<b>Reactivo</b>	<b>Control positivo</b>	<b>Reacción</b>
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Producto de PCR	-	X $\mu$ L
Control Insert DNA	2 $\mu$ L	-
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Agua desionizada para un volumen final	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

3. Mezclar mediante pipeteo. Incubar las reacciones durante 1 hora a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C para máxima eficiencia.

## ANEXO A.V

### Protocolo de transformación.

1. Descongelar las células competentes en hielo (cada alícuota de 50  $\mu$ L).
2. Pipetear 2  $\mu$ L de 0.5 M b-mercaptoetanol en cada vial. Mezclar gentilmente con la punta de la pipeta.
3. Pipetee 1- 2  $\mu$ L dl plásmido (o ligación) y mezcle gentilmente con la punta de la pipeta.
4. Incube los tubos en hielo durante 30 min.
5. Aplique un shock térmico al incubar los tubos a 42°C 30 segundos.
6. Inmediatamente pase los tubos a hielo e incúbelos así durante 2 minutos.
7. Adicione 250  $\mu$ L de SOC a cada vial e incube 1 hora en agitación a 225 r.p.m. a 37°C. Después de la incubación, regrese los tubos a hielo.
8. Plaquee de 50 - 200  $\mu$ L de cada transformación en placas de LB ampicilina.
9. Incube a 37°C durante al menos 18 horas.

Se seleccionaron aquellas bacterias que resultaron presuntamente positivas para contener un inserto, mediante monitoreo de la producción de pigmento azul/blanco. Se realizó PCR de colonia a cada una de las bacterias blancas recombinantes y aquellas que presentaron un inserto único mayor a 300 pares de bases se sembraron en caldo LB con ampicilina para la purificación de ADN plasmídico (ADNp) con el PureLink Quick Plasmid MiniPrep kit (Invitrogen EUA).

## ANEXO A.VI

## Protocolo de Reverso Transcripción (RT).

## Mezcla de alineamiento

1. Para cada muestra de ARN (para cada arreglo) combinar lo siguiente en un tubo para PCR estéril:

ARN total	0.5-5.0 mg
Buffer	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre ARNasa	Ajustar volumen final a 10 $\mu$ L

2. Mezclar suavemente con pipeta seguida de una centrifugación breve.
3. Poner la muestra en un termociclador 70°C por 3 min.
4. Enfriar a 37°C y mantener a esta temperatura por 10 min.

## Preparación de la mezcla de RT

5. La mezcla debe prepararse mientras la Mezcla de Alineamiento está incubándose a 37°C.

Buffer BN	4 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre ARNasa	4 $\mu$ L
Inhibidor ARNasa (RI)	1 $\mu$ L
Transcriptasa reversa (RE)	1 $\mu$ L
Volumen final	10 $\mu$ L

6. Mantener esta mezcla a 37°C antes de seguir el siguiente paso.

## Reacción RT

7. Añadir 10  $\mu$ L de mezcla RT a 10  $\mu$ L de mezcla de alineamiento
8. Mezclar bien pero suavemente con una pipeta y continuar la incubación a 37°C por 25 min.
9. Calentar a 85°C por 5 min para hidrolizar e inactivar la transcriptasa reversa.
10. Almacenar a -20°C o mantener en hielo hasta el siguiente paso.