



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**IDENTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN TEJIDO-
ESPECÍFICO DE HEPCIDINA Y PISCIDINA EN LA
GUASETA DEL PACÍFICO *Alphestes immaculatus*
(Breder, 1936).**

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

Jorge Adrián Massó Silva

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

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del 12 día del Mes de Mayo del 2010, 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:

"IDENTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN TEJIDO-ESPECIFICO DE HEPCIDINA Y PISCIDINA EN LA GUASETA DEL PACÍFICO *Alphestes immaculatus* (Breder, 1936)"


Presentada por el alumno:

Jorge Adrián Massó Silva

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.

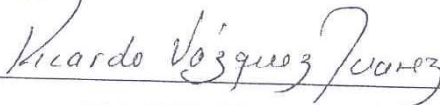
LA COMISION REVISORA


Felipe

DR. FELIPE DE J. ASCENCIO VALLE
DIRECTOR DE TESIS



DRA. GRACIA A. GÓMEZ ANDURO
CO-TUTOR


Ricardo Vázquez Juárez

DR. RICARDO VAZQUEZ JUAREZ
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

Comienzo expresando mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que se me otorgo, la cual fue mi soporte económico durante mi proceso en la obtención del grado de maestro en ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), al cual le tengo gran aprecio puesto que aquí es donde desarrolle además mi tesis de licenciatura. También quiero agradecer al personal docente que formo parte en mi desarrollo académico, al personal de posgrado por todo su apoyo y atención, y al personal administrativo por todos los servicios prestados.

Al laboratorio de patogénesis microbiana (CIBNOR, La Paz, B.C.S.), al laboratorio de biología molecular de plantas (CIBNOR, La Paz, B.C.S.) y al laboratorio de inmunología y biología estructural (UMDNJ, New Jersey, USA).

A la empresa Perlas del Cortéz S. de R. L. Mi, en particular a Jorge Iván (alias Bonjii) y Javier (alias Javier Amargo) quienes me proporcionaron los organismos para realizar este trabajo.

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Felipe Ascencio, el cual me dio la libertad y la confianza de llevar a cabo un trabajo que me reto y me permitió aprender muchas cosas en el desarrollo del mismo. Además la tolerancia de mis errores, los cuales

pues son parte del aprendizaje también. También quiero agradecer a mis co-tutores, la Dra. Gracia Gómez, quien siempre tuvo tiempo para escucharme y me ayudo a resolver muchos de los problemas a los que me enfrente; también al Dr. Ricardo Vázquez quien me alentó y me apoyo a tomar decisiones para el desarrollo de este trabajo.

De manera especial quiero agradecer a la que si bien no está en mi comité de tesis, fue como si lo estuviera. Hablo de mi güru del laboratorio, la Dra. Estercita, la cual me ayudo en enumeradas ocasiones, además de que sus valiosos consejos me ayudaron a terminar mi tesis, apoyado también en sus comentarios de aliento y positivismo. También quiero agradecer a mi lab partner y más que nada “amiga” Tanisha López, la cual también sacrificaba de su tiempo de trabajo para ayudarme con mis bioensayos. Y no quiero dejar de agradecer a Patita Lee McCoy, que nunca me dejo de apoyar, en todos los sentidos, la que me ayudo a lograr cosas que sin sus palabras de aliento no hubiera logrado, a mi motivadora personal, gracias Pati.

A todos mis compañeros de laboratorio Edwin, Eka, Estercita, Gaspar, Irasema, Kalin, Luis Felipe, Mario, Martita, Mitzuko, Norberto, Normichis, Rosario, Selene y Tanisha. También a los técnicos del laboratorio que también me ayudaron en gran medida, al Julio, Hever, Delia, La “Chula” y Arturo.

A mis amigos del salón Adán, Ana María, Cote, Cremas, Faustinho, Gina, LuzMa, Marge, Obet, Oswaldo, Pati McCoy, Quina, Rafita y Tripp. Además, a Angélica, Arleth, Bonjii, Carol, Chino, Cris, Daniela, Jehú, José, Liz, Mau, Morita, Sergio, Reno y Ulisses. Y si te olvide y te diste cuenta, no te awuites, a cualquiera le puede pasar.

Y finalmente quiero agradecer a mis soportes en todos los sentidos, mis ejemplos de vida, “mi familia”. A mi amá, mi apá y mi sista solo les quiero decir GRACIAS. Los amo.

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.

Dr. Ricardo Vázquez Juárez 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. Ma. Esther Macías Rodríguez Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Suplente

Dra. Martha C. Reyes Becerril Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

RESUMEN

Todos los organismos multicelulares son susceptibles a enfermedades, por lo que estos han desarrollado sistemas de defensa contra los organismos patógenos, y los peces no han sido la excepción. Su sistema inmune al igual que el resto de los vertebrados puede dividirse en dos tipos: el sistema inmune adaptativo y el sistema inmune innato. Ambos poseen componentes celulares y humorales. Dentro de los componentes humorales del sistema inmune innato se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMPs), los cuales son típicamente de 12-50 aminoácidos con una carga neta positiva de +2 a +7. Debido a que los AMPs pueden desplegar una actividad de amplio espectro contra una gran variedad de patógenos y algunas células cancerosas, el interés de estos ha aumentado considerablemente por sus potenciales terapéuticos. Dentro de la variedad de AMPs conocidos se encuentran hepcidina y piscidina, los cuales han mostrado gran actividad antibacteriana. Hecpidina es un AMP ampliamente distribuido en vertebrados. En cambio piscidina es un AMP exclusivo de peces. *Alphestes immaculatus* es un serránido del cual existe escasa información, además, no existe ningún registro de la identificación de estos AMPs en esta especie ni en ningún serránido del Pacífico americano. Por esto, el propósito de este trabajo fue el identificar, evaluar la expresión basal y estimulada con LPS de hepcidina y piscidina, y además caracterizar la región del péptido maduro de hepcidina. Este trabajo identificó hepcidina y piscidina en *A. immaculatus* empleando oligonucleótidos degenerados. La mayor expresión basal de hepcidina fue en hígado, al igual que en la mayoría de los organismos, sin embargo, la expresión inducida por LPS mostró las mayores expresiones en intestino y riñón cefálico.

Sabemos que el tejido intestinal suele estar expuesto a organismos patógenos, por otro lado, el riñón cefálico junto con el bazo son los principales tejidos linfoides formadores de las células del sistema inmune. Para piscidina la mayor expresión basal se dio en riñón cefálico y bazo, los principales órganos linfoides. En la expresión inducida con LPS, músculo y riñón cefálico fueron los tejidos con mayor expresión. Este es el primer reporte que evalúa músculo en una expresión inducida. El análisis de RACE 3' nos permitió identificar 4 secuencias de ADNc diferentes, las cuales después de ser analizadas a detalle, pudimos observar que tres de estas poseen 8 cisteínas y una posee solo 7 cisteínas. Debido, a que existen varios reportes de duplicación de genes hepcidina, estas secuencias podrían provenir de cuatro diferentes genes de hepcidina. No obstante, esto solo podrá ser confirmado por la caracterización genómica completa y las regiones flanqueantes a estas.

Palabras clave: *Alphestes immaculatus*, hepcidina, piscidina, identificación, expresión.

Vo. Bo.

Dr. Felipe de J. Ascencio Valle

ABSTRACT

All the multicellular organisms are susceptible to diseases, so the organisms have developed defense systems against the pathogens organisms, and fish had not the exception. The fish immune systems as the rest of the vertebrates can be divided in two types: the adaptive and innate immune system. Both possess cellular and humoral components. In the humoral components we can find the antimicrobial peptides (AMPs), which typically are around 12-50 aminoacids with a positive net charge of +2 a +7. Because the AMPs can display a broad spectrum activity against great variety of pathogens and some cancer cells, the interest on the AMPs have seen increased considerably due to their therapeutic potential. Within the broad variety of known AMPs are hepcidin and piscidina, which have shown great antibacterial activity. Hepcidin is an AMP broadly distributed in vertebrates. On the other hand, piscidin is an AMP exclusive in fish. *Alphesthes immaculatus* is a serranid fish and the amount of information for this species is scarce. Besides, there is not any identification report of these AMPs in this specie and even in any serránido of the American Pacific. Then, the purpose of this work was to identify, evaluate both basal and LPS-stimulated expression of hepcidin and piscidina, and characterize the mature peptide region of hepcidin. This work identified hepcidin and piscidina in *A. immaculatus* using degenerated primers. The major basal expression of hepcidin was in liver as in the most of the organisms. Nevertheless, the LPS-stimulated expression shown the major expressions in intestine and head kidney. It know that the intestinal tissue often is exposed to the pathogens organisms, on the other hand, the both head kidney and spleen are the main lymphoid tissues where the immune cells are created.

The major basal expression for piscidina was in head kidney and spleen, the main lymphoid tissues. The LPS-stimulated expression, muscle and head kidney was the tissues with the major expression of piscidina. This is the first report that evaluate muscle in an induced expression. The RACE 3' analysis identified 4 different cDNA sequences, which after been analyzed their shown that three of this sequences had 8 cysteines and one just 7 cysteines. Because several reports about hepcidin genes duplication exists, these sequences could come from four different hepcidin genes. However, this just can be confirmed by the complete genomic characterization and their flanking regions.

Key words: *Alphestes immaculatus*, hepcidin, piscidin, identification, expression

INDICE

LISTA DE TABLAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistema inmune en peces.....	1
1.2. Péptidos antimicrobianos.....	3
1.2.1. Hecpidina.....	5
1.2.2. Piscidina.....	6
1.3. Mecanismos de acción de los AMPs.....	7
1.4. Estrategias para identificar nuevos AMPs.....	9
1.5. Porque estudiar los AMPs?.....	11
1.6. <i>Alphestes immaculatus</i>.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1. Hecpidina.....	17
2.1.1. Descubrimiento de hepcidina.....	17
2.1.2. Hecpidina en peces.....	18
2.1.2.1. Identificación y organización de hepcidina en peces.....	18
2.1.2.2. Expresión de hepcidina.....	20
2.2. Piscidina.....	22
2.2.1. Identificación y organización de piscidina.....	22
2.2.2 Expresión de piscidina.....	24
2.3. <i>Alphestes immaculatus</i>.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPOTESIS.....	27

5. OBJETIVOS.....	28
5.1. General.....	28
5.2. Particulares.....	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1. Diseño de oligonucleótidos degenerados.....	29
6.2. Bioensayo.....	29
6.3. Identificación de hepcidina y piscidina.....	30
6.3.1. Extracción de ARN.....	30
6.3.2. Preparación de ADNc.....	30
6.3.3. Amplificación del 18s.....	31
6.3.4. Amplificación de fragmento de hepcidina y piscidina.....	33
6.3.5. Clonación y Secuenciación.....	34
6.3.5.1. Ligación.....	34
6.3.5.2. Transformación.....	35
6.3.5.3. Confirmación por PCR de colonia y extracción de plásmido.....	35
6.3.5.4. Secuenciación y análisis de secuencia.....	36
6.3.5.5. Determinación del sitio de corte del péptido señal de hepcidina.....	36
6.4. Expresión de hepcidina y piscidina mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	37
6.4.1. Retrotranscripción.....	38
6.4.2. qPCR.....	39
6.4.3. Análisis de datos.....	40
6.5. RACE.....	41
6.5.1. Preparación de ADNc para RACE 3'.....	41
6.5.2. PCR.....	42
6.5.3. Clonación y Secuenciación.....	43

6.5.3.1. Ligación.....	43
6.5.3.2. Transformación por electroporación.....	43
6.5.3.3. Confirmación por PCR de colonia.....	44
6.5.3.4. Secuenciación y análisis.....	45
7. RESULTADOS.....	47
7.1. Alineamientos múltiples de hepcidina y piscidina.....	47
7.1.1. Hepcidina.....	47
7.1.2. Piscidina.....	50
7.2. Extracción de ARN total.....	52
7.3. Amplificación de hepcidina y piscidina usando oligonucleótidos degenerados...	52
7.3.1. Amplificación de hepcidina y piscidina de colonias transformadas.....	53
7.4. Secuencia parcial de hepcidina y piscidina.....	54
7.4.1. Hepcidina.....	54
7.4.1.1. Determinación del sitio de corte del péptido señal.....	56
7.4.2 Piscidina.....	57
7.5. Expresión de hepcidina y piscidina mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	59
7.5.1. Hepcidina.....	60
7.5.2. Piscidina.....	61
7.6. RACE.....	63
7.6.1. Secuencias.....	64
7.6.2. Alineamiento múltiple de secuencias del RACE 3'.....	68
7.6.3. Determinación del peso molecular, PI y Carga estimada a pH 7.0 del péptido maduro.....	70
7.6.4. Alineamiento múltiple de hepcidinas de peces incluyendo las secuencias obtenidas del RACE 3'.....	70

7.6.5. Análisis filogenético.....	72
8. DISCUSIÓN.....	74
8.1. Identificación de hepcidina y piscidina.....	74
8.2. Análisis de expresión por qPCR.....	76
8.2.1. Expresión basal de hepcidina.....	79
8.2.2. Expresión diferencial control-tratamiento de hepcidina.....	80
8.2.3. Expresión basal de piscidina.....	81
8.2.4. Expresión diferencial control-tratamiento de piscidina.....	82
8.3. Análisis de las secuencias de hepcidina del RACE 3'.....	83
9. CONCLUSIONES.....	88
10. BIBLIOGRAFÍA.....	90
11. ANEXOS.....	111

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Distintos AMPs aislados de peces.....	17
Tabla II. Distintas hepcidinas identificadas en peces.....	19
Tabla III. Distintas piscidinas identificadas.....	23
Tabla IV. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar una región de una proteína ribosomal del 18s.....	32
Tabla V. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados empleados para hepcidina y piscidina.....	34
Tabla VI. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para evaluar expresión por qPCR.....	37
Tabla VII. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la técnica de RACE 3'.....	42
Tabla VIII. Secuencia de los oligonucleótidos pUC/M13.....	45
Tabla IX. Peso molecular, punto isoeléctrico y carga estimada a pH 7.0 de los péptidos maduros deducidos de las secuencias del RACE 3'.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Membranas objetivo de los AMPs y su especificidad.....	8
Figura 2. Mecanismo de acción según el modelo Shai-Matsuzaki-Huang.....	9
Figura 3. <i>Alphestes immaculatus</i>	15
Figura 4. Distribución de <i>A. immaculatus</i>	15
Figura 5. Alineamiento de aminoácidos de hepcidinas de peces.....	48
Figura 6. Alineamiento de ADNc de hepcidinas de peces.....	49
Figura 7. Alineamiento de aminoácidos de piscidinas.....	50
Figura 8. Alineamiento de ADNc de piscidinas.....	51
Figura 9. Extracción de RNA total de los organismos control y tratamiento de nueve tejidos muestreados.....	52
Figura 10. Amplificación de hepcidina usando oligonucleótidos degenerados.....	53
Figura 11. Amplificación de piscidina usando oligonucleótidos degenerados.....	53
Figura 12. Amplificación de hepcidina a partir de colonia usando los oligonucleótidos degenerados.....	54
Figura 13. Amplificación de piscidina a partir de colonia usando los oligonucleótidos degenerados.....	54
Figura 14. Secuencia parcial de hepcidina obtenida con oligonucleótidos degenerados.....	55
Figura 15. Alineamientos en BLASTn de la secuencia parcial de hepcidina.....	56

Figura 16. Predicción del sitio de corte del péptido señal usando redes neuronales.....	57
Figura 17. Predicción del sitio de corte del péptido señal usando Modelos Markovianos Ocultos.....	57
Figura 18. Secuencia parcial de piscidina obtenida con oligonucleótidos degenerados...	58
Figura 19. Alineamientos en BLASTn de la secuencia parcial de piscidina.....	58
Figura 20. Amplificación del 18s de los cDNA de todos los tejidos muestreados.....	59
Figura 21. Gráfica de expresión relativa basal de hepcidina en distintos tejidos.....	60
Figura 22. Grafica del cambio en el nivel de expresión relativa de hepcidina en distintos tejidos.....	61
Figura 23. Gráfica de expresión relativa basal de piscidina en distintos tejidos.....	62
Figura 24. Gráfica del cambio en el nivel de expresión relativa de piscidina en distintos tejidos.....	62
Figura 25. RACE 3' de hepcidina.....	63
Figura 26a. Amplificación con los oligonucleótidos pUC/M13 de 4 colonias de la transformación de la clonación de la banda de ~280pb.....	64
Figura 26b. Amplificación con los oligonucleótidos pUC/M13 de 5, 2 y 8 colonias de la transformación de la clonación de la banda de ~350pb, ~500 y ~600, respectivamente.....	64
Figura 27. Secuencia de AiHep1.....	65
Figura 28. Secuencia de AiHep2.....	66
Figura 29. Secuencia de AiHep3.....	66

Figura 30. Secuencia de AiHep4.....	67
Figura 31. Alineamiento múltiple de nucleótidos de AiHep1, AiHep2, AiHep3 y AIHep4.....	69
Figura 32. Alineamiento de hepcidinas de peces incluyendo las secuencias de <i>A.</i> <i>immaculatus</i>	71
Figura 33. Árbol filogenético de secuencia de hepcidinas de peces y mamíferos basados en secuencia de aminoácidos.....	73

1. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos multicelulares son susceptibles a enfermedades debido a que desde la perspectiva de un microbio sus tejidos son fuente rica de nutrientes. Por lo tanto, los organismos han desarrollado sistemas de defensa para reconocer microorganismos invasivos y eliminarlos (Bernstein *et al.*, 1997). Los organismos están expuestos a millones de patógenos potenciales diariamente a través del contacto, ingestión, e inhalación. Su capacidad de evitar infecciones dependerá de sus mecanismos de inmunidad innata (Hancock y Scott, 2000). Sin embargo, el desarrollo de la respuesta inmune se verá afectado por numerosos procesos que dependen del propio hospedador, del agente patógeno o del medio externo (Ruiz *et al.*, 2000).

1.1. Sistema inmune en peces.

El sistema inmune de los peces en términos generales es muy similar al de los vertebrados superiores, aunque presentan algunas diferencias importantes. Este, puede dividirse en dos tipos. El primero, el sistema inmune adaptativo, el cual es inducible y requiere la presencia de una serie de células, que son los linfocitos que reaccionan específicamente con el antígeno inductor. La denominación de respuesta combinada se debe a que en ella intervienen dos elementos: la respuesta humoral, mediada por anticuerpos y la respuesta celular, mediada principalmente por linfocitos T. El segundo lo constituye el sistema inmune innato, el cual consiste en una serie de mecanismos filogenéticamente muy antiguos que pueden eliminar los patógenos del organismo o bloquear su entrada de forma

inespecífica (Bernstein y Cols, 1998; Fernández *et al.*, 2002a; Kuby, 1994). Este sistema inmune innato es la única arma de defensa en los invertebrados y es un mecanismo de defensa fundamental de los peces. El sistema innato también juega un rol instructivo en la respuesta inmune adquirida y la homeostasis, por lo que es igual de importante en vertebrados mayores. Debido a que la respuesta inmune innata es la primera en responder ante un patógeno, juega un rol clave en la habilidad del hospedero para evitar la progresión de un patógeno potencial de una simple amenaza a una infección (Scott y Hancock, 2000).

El reconocimiento del sistema innato a señales no propias y dañinas es llevado a cabo por un número limitado de proteínas receptoras con patrones de reconocimientos determinados, los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos como glicoproteínas, lipopolisacáridos y componentes intracelulares liberados a través de una herida o infección. El sistema innato, al igual que el adaptativo, está dividido en componentes celulares y humorales. Los componentes humorales incluyen inhibidores de crecimiento, varias enzimas líticas, componentes del complemento, aglutininas, precipitinas, citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (AMPs, de sus siglas en inglés: antimicrobial peptides). Por otro lado, los componentes celulares incluyen, células fagocíticas (como neutrófilos y macrófagos monocíticos) y células citotóxicas no específicas. Además células epiteliales (como mastocitos) y dendríticas puede también participar en la defensa innata en peces (Scott y Hancock, 2000; Fernández *et al.*, 2002a; Magnadóttir, 2005).

La inmunidad adaptativa, a través de su plasticidad les permite a los organismos de una especie explorar ambientes y aprovechar nuevas fuentes de alimento. Sin embargo, comparado con el equipamiento del sistema inmune innato (como los AMPs), los efectores de la inmunidad adaptativa son más costosos para mantener y más lentos para responder a una amenaza (Boman, 2000). Particularmente los AMPs, liberados de células circulantes o inducidos por el epitelio, pueden alertar al sistema inmune adaptativo (Zasloff, 2002).

Los peces son organismos poiquiloterms los cuales dependen de la temperatura del medio. Por esto, el sistema inmune adaptativo es dependiente de la temperatura y se suprime si la temperatura disminuye. Por otro lado, el sistema inmune innato es relativamente independiente de la temperatura. Por ende, la inmunidad innata es especialmente importante en los peces (Ruiz *et al.*, 2003).

1.2. Péptidos antimicrobianos

Los AMPs son armas evolutivamente antiguas. Su amplia distribución a través de animales y plantas sugiere que han tenido un rol fundamental en la evolución exitosa de los organismos multicelulares complejos. A pesar de su antiguo linaje, los AMPs han permanecido como armas defensivas exitosas, contradiciendo la creencia general de que las bacterias, hongos y virus pueden y desarrollaran resistencia a cualquier sustancia concebible. Además, la mayoría de los organismos multicelulares expresan un coctel de múltiples péptidos de varias de estas clases estructurales dentro de sus “tejidos defensivos” (Zasloff, 2002).

Los AMPs son típicamente de 12-50 aminoácidos con una carga neta positiva de +2 a +7; son catiónicos debido a su alto porcentaje de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) (Hancock y Diamond, 2000 y Boman, 2003). Todos son derivados de precursores más grandes, incluyendo una secuencia señal, y pueden incluir modificaciones post-traduccionales como procesamientos proteolíticos, y en algunos casos glicosilación, amidación carboxilo terminal, isomerización de aminoácidos y halogenación (Bulet *et al.*, 1993; Simmaco *et al.*, 1998).

La diversidad de los AMPs descubiertos es tan grande que es difícil de categorizarlos excepto en base a su estructura secundaria. El principio estructural fundamental donde subyacen todas las clases, es la capacidad de la molécula para adoptar una forma en cuyos grupos de aminoácidos hidrofobicos y catiónicos estén espacialmente organizados en sectores discretos de la molécula (diseño “anfipático”) (Maloy y Kari, 1995 y Zasloff, 2002). Entonces basados en su estructura, aunque con algunas excepciones, pueden dividirse en tres clases principales: 1) Péptidos lineales libres de cisteínas y frecuentemente con un α -hélice y estructura anfipática; 2) Péptidos con tres uniones disulfúro creando péptidos con una estructura plana, dimérica y con β -laminas; y 3) los péptidos con un alto porcentaje de ciertos aminoácidos (ej. prolina, arginina, glicina, triptófano, o histidina) (Boman, 2003). Típicamente, la mitad o más de los aminoácidos de un AMP son hidrofobicos (Hancock y Scott, 2000). Por otro lado, se sabe que una sola mutación puede alterar drásticamente la actividad biológica de cada péptido, esta diversidad probablemente refleja la adaptación de las especies al ambiente microbiano único que caracteriza el nicho que ocupan, incluyendo

los microbios asociados con las fuentes de alimento (Simmaco *et al.*, 1998 y Boman, 2000). Por lo tanto, es posible que un individuo al encontrarse así mismo en medio de microbios contra los cuales los péptidos de sus especies fueron ineficientes, las mismas especies podrían sobrevivir a través de la aparición de individuos que expresen mutaciones benéficas (Boman, 2000).

En la última década muchos péptidos antimicrobianos que son especie-específicos han sido aislados de peces, y algunos han mostrado un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Cole *et al.*, 1997; Lauth *et al.*, 2002; Patrzykat *et al.*, 2003). Los AMPs de peces están principalmente localizados en las capas de mucus, indicando que eliminan las bacterias patógenas antes de que pasen la barrera de piel. (Fouz *et al.*, 1990; Austin y McIntosh, 1988).

1.2.1. Hecidina

Más del 40 % de los péptidos antimicrobianos naturales conocidos, incluyendo hecidina, son péptidos anfipático ricos en cisteínas que contienen múltiples enlaces disulfuro, forman laminas β estables, y actúan con sus efectos letales en patógenos celulares por el incremento de la permeabilidad de la membrana (Brogden, 2005). Hecidina también es conocida como HAMP (por sus siglas en inglés, “hepcidin antimicrobial peptide”), LEAP-1 (por sus siglas en inglés, “liver expressed antimicrobial peptide”), y HEPC (Hilton y Lambert, 2008). Entre los cientos de péptidos antimicrobianos reportados en los últimos 20 años, hecidina y defensina comprenden dos de las familias más estudiadas. Los genes y

péptidos de hepcidina han sido identificados en mamíferos, aves, así como en anfibios y peces (Shi y Camus, 2006; Fu *et al.*, 2007). Los mamíferos solamente poseen una sola copia del gen de hepcidina (con excepción del ratón), no obstante, en peces se ha encontrado que poseen dos o más copias de hepcidina, mostrando elevadas expresiones en hígado, y variables en otros tejidos (Shike *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Hilton y Lamber, 2008).

1.2.2. Piscidina

Piscidina es un péptido de aproximadamente 22 aminoácidos, los cuales son altamente conservados en el extremo amino terminal, que por lo regular es rico en histidina y fenilalanina. Este es exclusivo de peces, y más específicamente de peces teleósteos, en los cuales se encuentra ampliamente distribuido. Piscidina probablemente adopta una conformación hélice α cuando se da la interacción con la membrana celular. En esta conformación, los residuos cargados y polares se alinean en una porción del cilindro helicoidal, mientras los residuos hidrofobicos ocupan la superficie remanente. Esta orientación es típica de la mayoría de los AMPs lineales. (Silphaduang y Noga, 2001; Noga y Silphaduang, 2003; Silphaduang *et al.*, 2006).

Piscidina posee un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos y algunos parásitos. Por lo que piscidina al igual que hepcidina poseen un numero de características que las hacen atractivas como nuevos terapéuticos, inclusive a ser usados como templados para el

mejoramiento de su eficiencia terapéutica, basados en la posibilidad de diseñar y producir nuevos AMPs no existentes de forma natural (Noga y Silphaduang, 2003).

1.3. Mecanismos de acción de los AMPs.

A la fecha, el mecanismo mediante el cual los AMPs actúan no ha sido completamente resuelto. Sin embargo, existe una diversidad de estudios principalmente en membranas bacterianas, que han ayudado a aclarar como estos AMPs actúan. Estos estudios han permitido la formulación de muchas hipótesis, entre estas se incluyen: 1) la depolarización fatal de las membranas bacterianas; 2) la creación de agujeros físicos que causan liberación del contenido celular por choque osmótico; 3) la activación de procesos letales tales como la inducción de hidrolasas que degradan la pared celular; 4) la alteración de la distribución usual de lípidos entre las capas de la bicapa, resultando en una alteración de las funciones de la membrana; y 5) el daño de objetivos intracelulares críticos después de la internalización del péptido (Sarmasik, 2002 y Zasloff, 2002).

Los AMPs producen daño en la membrana bacteriana, pues solo tienen afinidad con esta debido a que la superficie de las bacterias posee muchos fosfolípidos con carga negativa. En contraste, la membrana externa de las células de plantas y animales está compuesta principalmente por lípidos no muy cargados ya que los lípidos con abundante carga eléctrica solo se encuentran en la cara interna de la membrana (ver figura 1) (Matsuzaki, 1999). Por lo tanto, la composición de lípidos de la membrana determina la especificidad del AMP (Zasloff, 2002). Debido a esto, el primer paso de la interacción entre el AMP y la membrana

aniónica de un microorganismo se lleva a cabo por la atracción electrostática, la cual puede ser inhibida por grandes concentraciones de sal en la solución en la que se lleve a cabo esta interacción. (Rivas-Santiago *et al.*, 2006). Un modelo que explica la actividad de la mayoría de los péptidos antimicrobianos es el modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Shai, 1999). Este modelo propone la interacción de los péptidos con la membrana, seguido por el desplazamiento de lípidos, alteraciones de la estructura de la membrana, y en ciertos casos entra el péptido al interior de la célula objetivo (Matsuzaki, 1999).

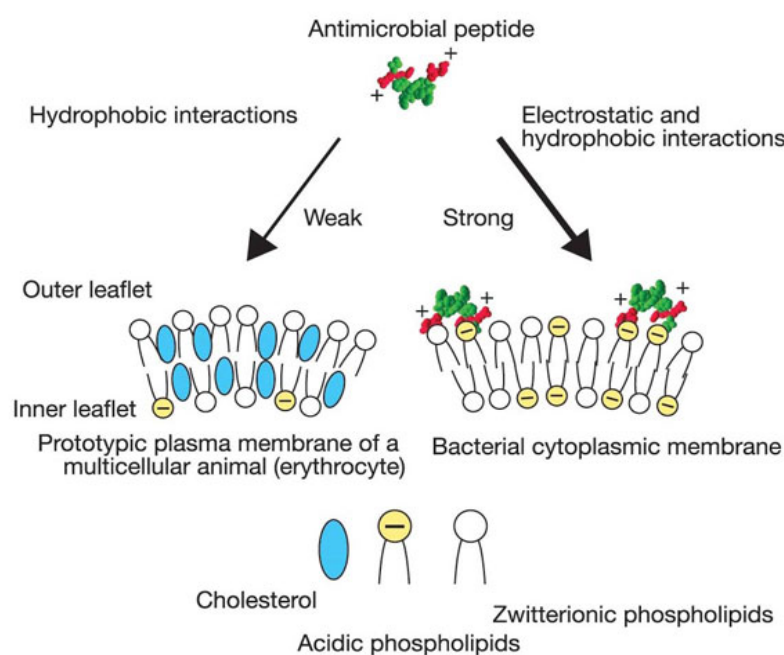


Figura 1. Membranas objetivo de los AMPs y su especificidad (imagen obtenida de Zasloff, 2002)

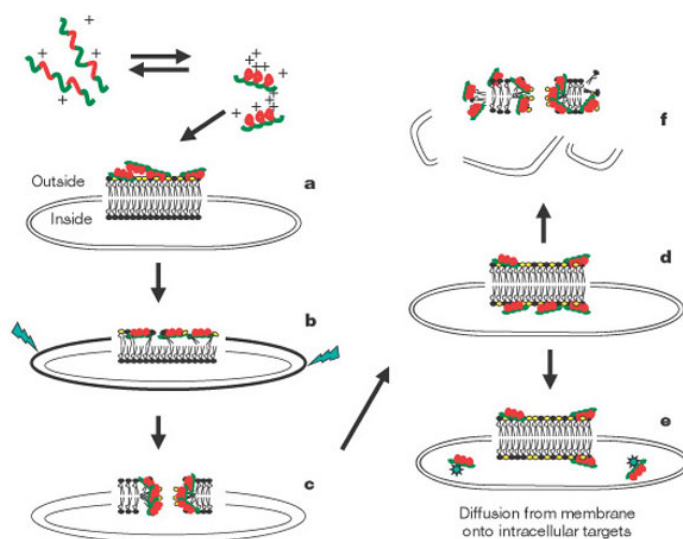


Figura 2. Mecanismo de acción según el modelo Shai-Matsuzaki-Huang. Aquí se representa un péptido α -helicoidal. a) los péptidos se acomodan a manera de tapete en la parte externa de membrana. b) Integración de el péptido dentro de la membrana y adelgazamiento de la parte externa de la membrana. Aquí el area de la superficie de la parte externa de la membrana se expande hacia la parte interna resultando en una deformación dentro de la bicapa (flechas irregulares). c) fase de transición y formación del “agujero de gusano”. Poros transitorios son formados en esta etapa. d) transporte de lípidos y péptidos a la parte interna. e) difusión de péptido a objetivos intracelulares (en algunos casos). f) Colapso de la membrana en fragmentos y disrupción física de la membrana de la célula blanco (imagen obtenida de Zasloff, 2002).

1.4. Estrategias para identificar nuevos AMPs

Los métodos tradicionales de screening requieren de muestreos costosos y tardados debido a que la mayoría involucran la purificación bioquímica del péptido en cuestión, incluyendo protocolos de prueba extensivos. Sin embargo, con el poder de la biología molecular, no es necesario. Ahora los acercamientos genómicos son capaces de construir esta información y revelar familias de secuencias relacionadas a otros AMPs. La primera técnica biológica molecular usada para aislar secuencias codificantes para AMPs de organismos marinos fue el screening de librerías de ADNc y genómicas usando oligonucleótidos como

sondas basadas en secuencias aminoacídicas. El screening genómico ofrece un acercamiento eficiente, proveyendo oportunidades para que los compuestos de origen marino reciban una mayor atención y un mejor progreso al estado de relevancia clínica (Patrzykat y Douglas, 2003).

Por lo anterior mencionado, podemos decir que la tecnología molecular moderna ofrece el beneficio agregado de aislar familias enteras de péptidos mediante los ácidos nucleicos que las codifican. Los acercamientos por PCR han sido empleados también en peces óseos y otros organismos marinos, mediante el uso de oligonucleótidos basados en secuencias conservadas en el N-terminal del péptido señal y la porción aniónica conservada en el carboxilo terminal del pre-propéptido. Otro acercamiento útil en la identificación de secuencias de AMPs es la secuenciación genómica (Patrzykat y Douglas, 2003). No obstante, el acercamiento más empleado para aislar genes de hepcidina y piscidina, en los cuales se enfoca este trabajo, ha sido sin duda el screening de librerías de ADNc, ESTs o genómicas (Chen *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2006; Cuesta *et al.*, 2008). Últimamente, se han podido emplear oligonucleótidos degenerados basados en las secuencias ya existentes, sin embargo, los trabajos que han utilizado esta estrategia son muy pocos (Lauth *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2007).

1.5. Porque estudiar los AMPs?

Los AMPs pueden exhibir numerosas actividades que los hacen candidatos prometedores como terapéuticos. Pueden desplegar actividad de amplio espectro contra una variedad de patógenos, como bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, hongos, virus con envoltura, protozoarios y también para algunas células cancerosas (Oren y Shai, 1996; Chinchar *et al.*, 2004; Colomi *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2008; Sung y Lee, 2008; Chen *et al.*, 2009). Poseen varias propiedades deseables sobre muchos de los antibióticos que frecuentemente están en uso: 1) la mayoría de los AMPs matan rápidamente (99.9% dentro de 20 minutos) y exhiben sinergia con antibióticos convencionales (adyuvantes), lisozima y entre ellos mismos (Hancock y Scott, 2000; Patrzykat *et al.*, 2001; Yan y Hancock, 2001; Rivas-Santiago *et al.*, 2005); 2) son activos contra cepas de la misma especie susceptibles a antibióticos y resistentes a antibióticos; neutralizan lipopolisacáridos (Hirata *et al.*, 1994); y 3) no seleccionan fácilmente mutantes resistentes, debido a que el objetivo de estos es la membrana, por lo que un microbio tendría que rediseñar su membrana, cambiando la composición y/o organización de sus lípidos, probablemente una solución muy costosa para la mayoría de las especies microbianas. La mayoría de los péptidos son creados de secuencias no determinadas de aminoácidos carentes de epitopes únicos que pudieran servir como sitio de reconocimiento de una proteasa requerida para la destrucción selectiva del antibiótico en la presencia de proteínas celulares. Además, los organismos multicelulares atacan microbios con múltiples péptidos de diferentes clases estructurales, por ende, la destrucción de un péptido puede no ser suficiente para evitar el asalto letal. Quizás los genes

de virulencia que expresa una bacteria, los cuales afectan la susceptibilidad hacia los AMPs representa la mejor defensa que la mayoría de los microbios pueden llevar a cabo sin sufrir una pérdida de viabilidad (Zasloff, 2002).

Se sabe que muchos antibióticos pueden indirectamente causar sepsis debido a la liberación de endotoxinas de las células bacterianas muertas, en cambio, algunos AMPs se pueden unir a estas endotoxinas y reducen el shock causado por la sepsis. El gran repertorio natural de AMPs marinos no descubiertos por acercamientos genómicos provee una línea deseable para la búsqueda de terapéuticos potenciales. A este punto de la investigación, con los conocimientos limitados de modo de acción de los péptidos, parece ser más realista este enfoque que tratar de diseñar una “bala mágica” que haya sido alterada sistemáticamente de un péptido ya existente (Patrzykat y Douglas, 2003).

Una especie dada puede producir múltiples AMPs, donde cada uno de las cuales puede tener propiedades únicas tales como espectro de actividad, inducibilidad en la respuesta a la enfermedad, expresión en el desarrollo y expresión tejido-específico. Teniendo la secuencia de ADN que codifica para los AMPs, nos permite diseñar sondas para estudios detallados de expresión temporal y tejido-específico de estos péptidos. Tales estudios están en la frontera de la investigación de péptidos proveyendo información de cuales péptido actúan juntos y cuáles no. Esta información puede ser beneficiosa en el diseño de péptidos terapéuticos o mezclas terapéuticas de péptidos (Patrzykat y Douglas, 2003).

En agricultura y especialmente en acuicultura (en los cuales pocos antibióticos y químicos son aprobados y disponibles, además que las vacunas son limitadas), organismos

genéticamente modificados que sobre expresen AMPs pueden resultar en una especie resistente a enfermedades con un importante valor agregado. Esto se ha demostrado para una variedad de plantas y animales (Yarus *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997). Pero en el caso muy particular de peces existen ejemplos como el pez medaka transgénico que expresa cecropina y pleurocidina (siendo esta última una piscidina) y una especie de bagre que expresa cecropina (Dunham *et al.*, 2002; Sarmasik *et al.*, 2002). Por otro lado, también se ha probado el uso de inyecciones intraperitoneales de AMPs en peces con resultados prometedores (Jia *et al.*, 2000).

En el contexto de producir organismos transgénicos para AMPs, hay una gran ventaja el conocer la secuencia genómica y del ADNc, ya que así se puede identificar la secuencia de pre-propéptido, junto con los promotores naturales. Sin embargo, es importante tener precauciones especiales para prevenir efectos tóxicos de los péptidos recombinantes en las células huésped. Una opción es la inclusión de los elementos aniónicos neutralizantes los cuales existen de manera natural en el pre-propéptido. Tales secuencias pueden ser fácilmente identificadas conociendo la secuencia del ADNc que la codifica pero no pueden ser identificadas en el aislado del péptido mediante purificación debido a que el pre-propéptido ya habría sido cortado (Patrzykat y Douglas, 2003). El conocer esta secuencia también permite producir ya sea por síntesis química o por ADN recombinante los AMPs para un screening inicial de su actividad antimicrobiana.

Por último, cabe mencionar que del total de AMPs descritos actualmente, aproximadamente solo el 5% han sido descritos en organismos marinos, y de este solo una

pequeña parte corresponde a AMPs identificados de peces, y si consideramos que el 80% de la vida se encuentra en el océano, la diversidad en todos los aspectos es mayor que la vida en la tierra (Patrzykat y Douglas, 2003). Dentro de las especies que se ha identificado hepcidina y piscidina solo se encuentra tres especies de Serranidos (*Epinephelus awoara* para hepcidina; y *E. coioides* y *E. akaara* para piscidina). *Alphestes immaculatus* es un serranido del cual se sabe muy poco a pesar de su amplia distribución. En el contexto de este trabajo sería el único serránido del Pacífico Americano del que se hayan identificado hepcidina y piscidina.

1.6. *Alphestes immaculatus*

Alphestes immaculatus, es un serránido comúnmente llamado guaseta del Pacífico. Se distribuye por el sur de Baja California, el Golfo de California hasta Perú central, las Galápagos, Isla Malpelo e Isla del Coco (ver figura 3 y 4). Habita en profundidades que van desde los 3-32m. Está muy relacionado, y algunas veces se confunde, con *A. afer* del Oeste del Atlántico. Alcanza una longitud de hasta 30cm (Fao, 1993).

Taxonomía:

Clase: Actinopterygii

Subclase: Neopterygii

Infraclase: Teleostei

Superorden: Acanthopterygii

Orden: Perciformes

Suborden: Percoidei

Familia: Serranidae

Subfamilia: Epinephelinae

Género: *Alphestes*

Especie: *Alphestes immaculatus* (Breder, 1936).



Figura 3. *Alphestes immaculatus*
Imagen obtenida de <http://eol.org/pages/214841>

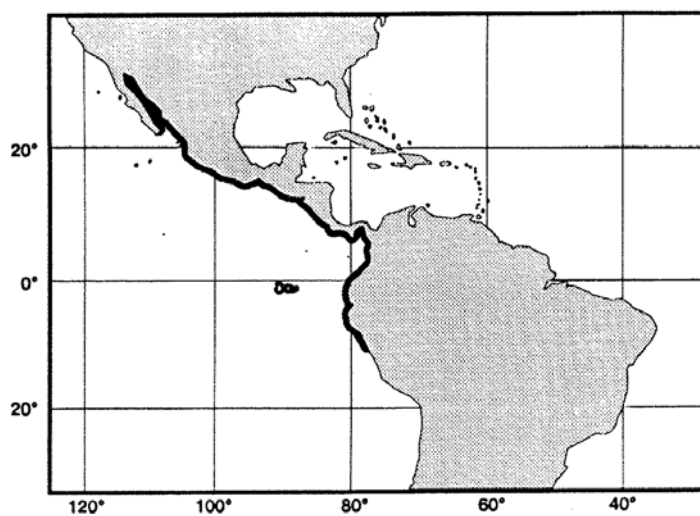


Figura 4. Distribución de *A. immaculatus*
(Imagen obtenida del libro de la Fao, 1993)

2. ANTECEDENTES

En 1966 varios péptidos que son ricos en arginina fueron encontrados en los gránulos de leucocitos polimorfonucleares de humano, dichos péptidos poseían actividad antibacteriana (Zeya y Spitznagel, 1967). A finales de los 60's Fisher *et al.* (1968), caracterizaron un nuevo AMP del trigo, y posteriormente Fernández de Caleyá *et al.* (1972) probaron su actividad bactericida. Por otro lado, Ganz *et al.* (1985), encontraron tres péptidos antibióticos en un extracto de sedimento rico en gránulos de neutrófilos de humano, a los cuales se refirieron como “defensinas”, las cuales hasta la fecha son uno de los grupos de AMPs mas estudiados. Para 1981 Steiner *et al.* (1981), descubrieron la cecropina, un AMP aislado de pupas de la palomilla de seda *Hyalophora cecropia*, la cual encontraron poseía actividad antibacterial contra *E. coli* y una variedad de bacterias Gram-negativas. A la fecha alrededor de 900 AMPs han sido identificados en organismos eucariotas (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag5.htm>).

En el caso de AMPs descubiertos en peces, los esfuerzos han sido menores que los aplicados con AMPs de mamíferos, insectos o plantas. No obstante, en los últimos años se ha dado un aumento en el interés y las publicaciones enfocadas a AMPs de peces. La tabla I engloba los principales AMP descubiertos en peces en orden cronológico.

Tabla I. Distintos AMPs aislados de peces.

Nombre del AMP	Organismo donde se aislo	Referencia
Pardaxina	<i>Pardachirus marmoratus</i>	Lazarovici <i>et al.</i> 1986
Pleurocidina (Piscidina)	<i>Pleuronectes americanus</i>	Cole <i>et al.</i> 1997
Misgurina	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Park <i>et al.</i> 1997
Péptidos derivados de histonas	<i>Parasilurus asotus</i>	Park <i>et al.</i> 1998
Hepcidina	Hibrido de <i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	Shike <i>et al.</i> 2002
Cathelicidinas	<i>Mixine glutinosa</i>	Uzzel <i>et al.</i> 2003
Mixidina	<i>Myxine glutinosa</i>	Subramanian <i>et al.</i> 2009

En el caso de piscidina y hepcidina, en los cuales se enfoca este trabajo, estudios de hibridación southern indican que ambos están organizados en clusters de genes. Donde los genes y pseudogenes que han sido investigados tienen características exón-intron similares y el screening cuidadoso de las secuencias flanqueantes conservadas ha permitido la identificación de promotores y sitios de unión a factores de transcripción (Douglas *et al.*, 2001; Douglas *et al.*, 2003a).

2.1. Hepcidina

2.1.1 Descubrimiento de hepcidina

Hepcidina fue descubierta por dos grupos independientes mientras buscaban AMPs en fluidos humanos. Krause *et al.* (2000) en la búsqueda de AMPs ricos en cisteínas en ultra filtrados de sangre humana, lograron aislar un péptido de 25 residuos que contenía cuatro enlaces disulfuro, al cual denominaron como LEAP-1. El análisis por qRT-PCR reveló que el péptido se expresaba predominantemente en el hígado, y usando un péptido sintético, se

demostró que la hormona natural tenía actividad antibiótica contra bacterias y levaduras. Al mismo tiempo Park *et al.* (2001) en la búsqueda de péptidos antimicrobianos en orina de humano logro aislar péptidos ricos en cisteínas con tres formas diferentes por la truncación del amino terminal, y fue este grupo de trabajo el que la llamó hepcidina por su origen hepático. Usando un análisis Northern Blot se demostró que el ARNm de hepcidina es expresado en hígado de fetos y adultos. Su actividad bactericida ha sido retada contra una variedad de bacterias Gram-negativas (Krause *et al.*, 2000). Por otro lado, estudios realizados en ratón, en los cuales se noqueó el gen de hepcidina mostraron una sobrecarga importante de hierro, mostrando que hepcidina está estrechamente relacionado en el metabolismo de hierro (Nicolas *et al.*, 2001). Y desde que se identificó por primera vez hepcidina, los genes de este péptido han sido identificados en varios vertebrados. En mamíferos dentro de las funciones biológicas de hepcidina se sabe que está involucrada en actividad antimicrobiana y metabolismo de hierro.

2.1.2. Hepcidina en peces.

2.1.2.1. Identificación y organización de hepcidina en peces.

En peces, hepcidina fue identificada por primera vez en *Morone saxatilis* (Shike *et al.*, 2002), esta secuencia ha sido la base para poder identificar genes de hepcidina en otras especies como *Lateolabrax japonicus*, *Acanthopagrus schlegelii* y *Pseudosciaena crocea*. Sin embargo, la principal fuente de identificación de genes de hepcidina han sido las librerías

de ADNc. La mayoría de las hepcidinas identificadas han sido mediante estrategias genéticas, y muy pocas han sido aisladas a nivel proteico. (ver tabla II).

Tabla II. Distintas hepcidinas identificadas en peces.

ESPECIE	FAMILIA	IDENTIFICACION		REFERENCIA
		Gen	Proteína	
<i>Morone saxatilis</i>	Moronidae	PCR con oligos degenerados	RP-HPLC de extracto de branquias	Shike <i>et al.</i> 2002
<i>Salmo salar</i>	Salmonidae	Librería ADNc (SSH) de hígado, riñón cefálico y bazo		Douglas <i>et al.</i> 2003a
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Pleuronectidae	Librería de ADNc de riñón e hígado.		Douglas <i>et al.</i> 2003a
<i>Danio rerio</i>	Cyprinidae	PCR con oligos específicos diseñados a partir de la base de datos genómicas del Pez Zebra		Shike <i>et al.</i> 2004
<i>Pagrus major</i> (<i>Chrysophrys major</i>)	Sparidae	Librería de ADNc de bazo		Chen <i>et al.</i> 2005
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Paralichthyidae	Librería de EST de riñón cefálico e hígado		Kim <i>et al.</i> 2005
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Moronidae	PCR con oligos de UTRs diseñados de alineamientos múltiples		Rodrigues <i>et al.</i> 2006
<i>Lateolabrax japonicus</i>	Lateolabracidae	PCR con oligos basados en el ADNc de <i>M. saxatilis</i>		Ren <i>et al.</i> 2006
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Sparidae	PCR con oligos basados en el ADNc de <i>M. saxatilis</i>		Yang <i>et al.</i> 2007
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Cichlidae	Librería de ADNc de hígado		Huang <i>et al.</i> 2007
<i>Sparus aurata</i>	Sparidae	Librería de EST's de hígado		Cuesta <i>et al.</i> 2007
<i>Scophthalmus maximus</i>	Scophthalmidae	PCR con oligos degenerados diseñados a partir de un alineamiento múltiple		Chen <i>et al.</i> 2007
<i>Sebastes schlegelii</i>	Scorpaenidae	Librería de ADNc de hígado		Kim <i>et al.</i> 2008
<i>Gadus morhua</i>	Gadidae	Librería de ADNc de riñón cefálico		Solstad <i>et al.</i> 2008

<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Oplegnathidae	Librería de ADNc de hígado		Cho <i>et al.</i> 2009
<i>Pseudosciaena crocea</i>	Sciaenidae	PCR con oligos basados en el ADNc de <i>M-saxatilis</i> .	RP.HPLC de extracto de riñón cefálico	Wang <i>et al.</i> 2009 Zhang <i>et al.</i> 2009
<i>Epinephelus akaara</i>	Serranidae	Publicado en GenBank		No publicado
<i>Epinephelus coioides</i>	Serranidae	Publicado en GenBank		No publicado

La organización genómica de hepcidina es altamente conservada, consistiendo de tres exones y dos intrones en todos los organismos estudiados hasta ahora. Los exones codifican un pre-propéptido que contiene un péptido líder en el N-terminal, una pro-región y un péptido maduro que contiene los residuos importantes de cisteína en el C-terminal (Douglas *et al.*, 2003a). Los números de copias genómicas varía, en el caso de humanos solo una copia ha sido encontrada, en ratón dos copias han sido reportadas (Pigeon *et al.*, 2001), dos son conocidas en el pez zebra y en la paloma doméstica (Shike *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2007), tres en tilapia (Huang *et al.*, 2006) y hasta cinco han sido clonados en solla roja (lenguado) (Douglas *et al.*, 2003a).

2.1.2.2. Expresión de hepcidina.

A pesar de que varios ARNm de hepcidina han sido detectados en varios tejidos (Krause *et al.*, 2000), el hígado ha sido el tejido que ha reportado la mayor expresión de hepcidina en casi todos los organismos estudiados (Park *et al.*, 2001; Shike *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003; Pigeon *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). Inesperadamente, un estudio en ratón realizado por Pigeon *et al.* (2001), mostró una sobre expresión de

hepcidina bajo condiciones de exceso de hierro, aunado a esto, la estimulación con lipopolisacáridos también mostró una sobre expresión de hepcidina, sugiriendo que hepcidina tiene un rol específico en el metabolismo del hierro, además de su actividad antimicrobiana previamente identificada. La participación de hepcidina en una sobrecarga de hierro fue posteriormente confirmada en ratón por Nicolas *et al.* (2001). En contraste, un estudio realizado por Nicolas *et al.* (2002) demostraron que ratones con una sobre expresión inducida de hepcidina dirige a una severa anemia e hipoxia. En peces esta actividad dual de péptido antimicrobiano y su rol en el metabolismo de hierro ha sido evaluada en *Dicentrarchus labrax* (Rodrigues *et al.*, 2006). No obstante, debido a que este trabajo no se enfoca en la capacidad de hepcidina de controlar los niveles de hierro, no se profundizara al respecto.

En mamíferos, las infecciones actúan en los macrófagos, los cuales empiezan a producir interleucina-6 (IL-6), la cual induce la producción de ARNm de hepcidina por los hepatocitos (Nemeth *et al.*, 2003). En peces infecciones experimentales con distintos patógenos han resultado en un incremento en la expresión de hepcidina en hígado. No obstante, otros tejidos como riñón cefálico, bazo e intestino han mostrado niveles significativos de expresión de este AMP (Shike *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003a; Huang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007).

Como ya se ha mencionado anteriormente se han detectado múltiples copias de hepcidina en peces, las cuales se pueden ver expresadas de manera diferencial bajo distintos estímulos. Huang *et al.*, (2006), identificaron tres ARNm de hepcidina (TH1-5, TH2-2 y TH2-3) en tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Donde de manera basal TH1-5 y TH2-3 se

expresaban en mayor medida en hígado, sin embargo, los transcritos de TH2-2 fueron significativamente más abundantes en riñón que en hígado. Por otro lado, cuando se inyectaron con LPS, solo TH1-5 tuvo una expresión significativa en hígado y riñón comparado con TH2-2 y TH2.3. En el falso halibut de Japón (*Paralichthys olivaceus*), la expresión de dos genes de hepcidina (Hep-JF1 y HepJF2) se sobre expresaron en hígado después de un tratamiento experimental con LPS (Hirono *et al.*, 2005). De igual manera, en la solla roja (*Pseudopleuronectes americanus*) de los tres genes de hepcidina encontrado, solo dos de ellos presentaban una expresión abundante en hígado (Douglas *et al.*, 2003a). Estos patrones de expresión sugieren que la regulación de la expresión de hepcidina es conservada a través de las diferentes especies cuando se confrontan con una estimulación con LPS (Rodrigues *et al.*, 2006).

2.2. Piscidina

2.2.1. Identificación y organización de piscidina

Al igual que los genes de hepcidina, la mayoría de los trabajos donde se han identificado genes de piscidina han sido a partir de librerías de ADNc. Desde el descubrimiento de pleurocidina en *Pleuronectes americanus* (Cole *et al.*, 1997), se han identificado distintos AMPs similares a este. No obstante debido a que se trataba de un nuevo AMP, las subsecuentes identificaciones proporcionaban nombres diferentes de este AMP, al cual se denominó “piscidina” (Noga y Silphaduang, 2003). El segundo AMP fue moronecidina, aislado del híbrido de *Morone chrysops* y *M. saxatilis*, la secuencia obtenida

de esta piscidina ha sido la base para identificar este gen en otras especies como *Dicentrarchus labrax* y *Siniperca chuatsii* (ver tabla III). Cabe destacar, que los nombres que se le han dado a este AMP han sido varios, donde las primeras secuencias identificadas eran nombradas en base a la especie de la cual fueron identificadas, por ejemplo: epinecidina de *Epinephelus coioides*; dicentracina de *Dicentrarchus labrax*; chrysopsina de *Chrysophrys major*; etc).

Tabla III. Distintas piscidinas identificadas.

ESPECIE	FAMILIA	PISCIDINA	IDENTIFICACIÓN		REFERENCIA
			Gen	Proteína	
<i>Pleuronectes americanus</i>	Pleuronectidae	Pleurocidina	Librería de ADNc de Piel	Secreciones mucosas de piel	Cole <i>et al.</i> 1997 Cole <i>et al.</i> 2000
<i>M. chrysops x M. saxatilis</i>	Moronidae	Moronecidina	RT-PCR de branquias con oligos degenerados	Extracto de piel y branquias	Lauth <i>et al.</i> 2002
<i>Pagrus major (Chrysophrys major)</i>	Sparidae	chrysopsina		Extracto de branquias	Lijima <i>et al.</i> 2003
<i>Epinephelus coioides</i>	Serranidae	Epinecidina	Librería de ADNc de leucocitos		Yin <i>et al.</i> 2006.
<i>Hippocampus kuda</i>	Syngnathidae	Piscidina	Publicado en GenBank		No publicado
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Moronidae	Dicentracina	RT-PCR de leucocitos de riñón cefálico con oligos diseñados de moronecidina		Salerno <i>et al.</i> 2007
<i>Siniperca chuatsi</i>	<u>Percichthyidae</u>	Piscidina	RT-PCR de pronefros con oligos degenerados basados en moronecidina		Sun <i>et al.</i> 2007.
<i>Larimichthys crocea</i>	Sciaenidae	Piscidina	Publicado en GenBank		No publicado
<i>Epinephelus akaara</i>	Serranidae	Piscidina	Publicado en GenBank		No publicado

Un estudio realizado por Silphaduang *et al.*, (2006), mostró que piscidina es un AMP ampliamente distribuido en los perciformes. Para demostrar esto, produjeron un anticuerpo para piscidina 1 (FFHHIFRGIVH) para probarlo en 38 especies, representando 7 diferentes ordenes, de estas especies solo 9 fueron inmunopositivos con el anticuerpo anti-piscidina. Estas 9 especies pertenecían al orden de los perciformes, el cual es el orden más grande de vertebrados vivientes.

La organización genómica de piscidina está conformada por cuatro exones y tres intrones, esto se ha visto en *Pleuronectes americanus* (Cole *et al.*, 2000), el híbrido de *M. chrysops* x *M. saxatilis* (Lauth *et al.*, 2002), *E. coioides* (Yin *et al.*, 2005), *Siniperca chuatsi* (Sun *et al.*, 2007), entre otros. Por otro lado, también se han encontrado distintas isoformas de piscidinas en varias especies de peces (Lauth *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003b; Lijima *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008).

2.2.2 Expresión de piscidina

Muchos de los trabajos de expresión de piscidinas se han llevado a cabo a nivel proteico mediante la producción y uso de anticuerpos específicos para dichas piscidinas (Cole *et al.*, 1997; Lijima *et al.*, 2003; Mulero *et al.*, 2008). Otros han realizado hibridación *in situ* para detectar transcritos de piscidina en distintas células. Un ejemplo de esto es el realizado por Murray *et al.*, (2003), los cuales identificaron la localización de piscidinas en la branquias de *Pseudopleuronectes americanus*, encontrando que este AMP se localiza principalmente en la porción no lamelar de los filamentos branquiales.

Pocos trabajos han tratado de identificar los perfiles de expresión diferencial tejido-específico a nivel de ARNm de piscidinas, ya sea de manera basal o mediante una estimulación. Esto se ha evaluado por PCR en tiempo real en organismos del híbrido de *M. chrysops* x *M. saxatilis* retados con *Streptococcus iniae*, la expresión de piscidina fue relativamente alta en branquias, intestino, riñón anterior, bazo y sangre; bajos niveles en piel, y casi indetectables en hígado (Lauth *et al.*, 2002). Por otro lado, Douglas *et al.* (2003b), evaluó la expresión basal de tres genes de pleurocidina en *Pseudopleuronectes americanus* (WFX, WFYT y WF2), encontrando que WFX se expresó solo en piel, mientras que los transcritos de WFYT fueron expresados mayormente en bazo y WF2 en hígado. Uno de los últimos estudios realizado fue el de Sun *et al.* (2007) en *Siniperca chuatsi*, donde evaluaron la expresión basal de piscidina mediante PCR en tiempo real, encontrando que a pesar de que la expresión se dio en todos los tejidos muestreados, piel, hígado y riñón fueron los de mayor abundancia de transcritos de piscidina, y después de la estimulación con LPS, todos los tejidos mostraron un aumento significativo en la expresión de piscidina, excepto en hígado.

2.3. *Alphestes immaculatus*

No existe ningún reporte de algún AMP para *A. immaculatus*. A la fecha solo existen seis secuencias nucleotídicas parciales reportadas para esta especie en la base de datos de GenBank del NCBI.

3. JUSTIFICACIÓN


En la última década algunos AMPs que son especie-específicos han sido aislados de peces, no obstante, aproximadamente solo el 5% de los AMPs descritos han sido de organismos marinos. El conocer la secuencia de estos genes ha permitido estudios de regulación génica, actividad antimicrobiana, rol inmunológico, etc. Por esto, este trabajo pretende identificar y analizar la expresión de piscidina y hepcidina, dado que no se cuenta con ningún registro de estos en esta especie, ni en ningún serránido del Pacífico Americano. Además este trabajo contribuirá a la escasa información genética de esta especie y permitirá así el desarrollo de futuros trabajos con esta u otras especies.

4. HIPOTESIS





Piscidina y hepcidina son AMPs que han sido identificados en diferentes especies peces, y se ha visto que poseen una expresión diferencial entre tejidos, entonces *Alphestes immaculatus* también poseerá genes para dichos AMPs, aunado al hecho de que la expresión tejido-específico será diferente tanto de manera basal como al ser estimulado con LPS.

5. OBJETIVOS

5.1. General.

-  Identificar y determinar la expresión de genes de hepcidina y piscidina en *Alphestes immaculatus*.

5.2. Particulares.

-  Diseñar oligonucleótidos degenerados para Piscidina y Hepcidina.
-  Amplificar y confirmar la homología de los ADNc's obtenidos con los registros de péptidos antimicrobianos.
-  Determinar la expresión de hepcidina y piscidina en diferentes tejidos
-  Obtener la región del péptido maduro de hepcidina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño de oligonucleótidos degenerados.

La base para el diseño de los oligonucleótidos degenerados usados en este trabajo fue la realización de alineamientos múltiples basados en secuencias de hepcidina y piscidina en peces. Dichos alineamientos fueron realizados tanto de secuencias aminoacídicas como nucleotídicas usando el software en línea *TCoffee* (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>) del “Swiss Institute of Bioinformatics”. Se intento llevar al mínimo el número de degeneraciones posibles, dando preferencia a los nucleótidos de las especies filogenéticamente mas relacionadas.

6.2. Bioensayo.

Se tuvieron dos grupos de trabajo, cada uno conformado con 2 peces de $25\text{g} \pm 5$. Ambos grupos se dejaron aclimatando durante un periodo de 15 días en jabas plásticas rectangulares de 60 L. Las condiciones físico-químicas del agua fueron: temperatura de 27 ± 1.5 °C, salinidad de 36 ± 1 ppm, oxígeno disuelto de 5.3 – 6.3 % y fueron alimentados una vez al día con alimento fresco. Un día antes de finalizada la aclimatación se cesó la alimentación, y una vez finalizada se comenzó el bioensayo, donde a un grupo tratamiento se le inyectó 200µL de un stock de 5mg/mL de LPS de *E. coli* (es decir, un total de 1 mg de LPS) a cada pez, y al grupo control se le inyectó 200 µL de PBS estéril. El experimento tuvo una duración de cuatro horas, y los tejidos muestreados fueron los siguientes: hígado, bazo,

branquias, ojo, cerebro, músculo, piel, intestino y riñón cefálico. Posteriormente los tejidos fueron almacenados inmediatamente en nitrógeno líquido para después extraer el ARN total.

6.3. Identificación de hepcidina y piscidina

6.3.1. Extracción de ARN.

La extracción de ARN total se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del kit FastRNA® Pro (anexo 1). Dicha extracción se llevó a cabo en todos los tejidos muestreados en el paso 6.2.; donde algunas muestras como ojo, cerebro, piel e intestino fueron previamente pulverizadas y homogenizadas usando nitrógeno líquido y un mortero. Los ARN's obtenidos fueron corridos en un gel desnaturizante de agarosa al 1.5%.

6.3.2. Preparación de ADNc

Utilizando la muestra de ARN total obtenido de hígado y bazo de un solo organismo del grupo de tratamiento, se procedió a realizar una primer mezcla de reacción de transcripción reversa utilizando oligo dT :

Mezcla para RNA de hígado

Mezcla para RNA de bazo

RNA total (5µg) ----- 1.1µL

RNA total (5µg) ----- 3.2µL

Oligo dt ----- 1.0µL

Oligo dt ----- 1.0µL

Agua ----- 3.9µL

Agua ----- 1.8µL

Total ----- 6.0µL

Total ----- 6.0µL

Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5 minutos, y una vez finalizado se pasaron las muestras a hielo. En este punto se preparó una segunda mezcla de reacción de la siguiente manera:

Buffer IMPROM II-----	4.0μL
MgCl (25mM)-----	2.4μL
dNTP's (2.5mM)-----	4.0μL
RNAsin (40U/μL) -----	0.5μL
IMPROM II-----	1.0μL
Agua DEPC -----	<u>2.1μL</u>
Total -----	14.0μL

Se agregaron los 14μL de la segunda mezcla con la primera mezcla de reacción y se llevo a cabo el siguiente programa de incubación: 25°C/10 min.; 45°C/60 min.; 70°C/15 min. Posteriormente las muestras fueron almacenadas a 4°C.

6.3.3. Amplificación del 18s

Para verificar que el ADNc obtenido del paso 6.3.2 era optimo para realizar las pruebas de amplificación con los oligonucleótidos degenerados, primero se probaron un par oligonucleótidos de una proteína ribosomal de la subunidad 18s.

Las condiciones empleadas para la amplificación de piscidina fueron las siguientes: buffer de PCR al 1x; 1.6 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.8 μM de c/ oligonucleótidos (ver tabla IV), 1 U de Taq Polimerasa y ~ 20 ng de templado. El programa de amplificación empleado es el que se muestra abajo:

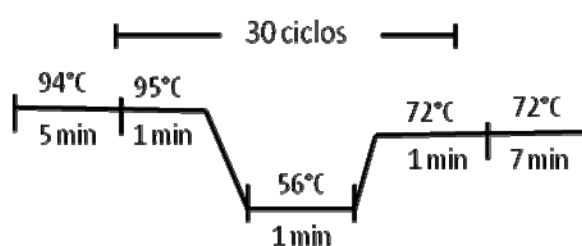


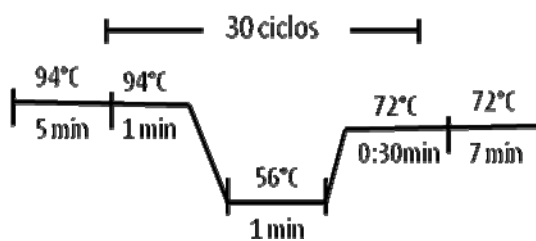
Tabla IV. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar una región de una proteína ribosomal del 18s.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
P18s F	GTTAATTCCAGCTCCAATAGCGTA	~ 440
P18s R	GAACTACGACGGTGTCTGATCGTC	

Las amplificaciones se confirmaron en un gel de electroforesis con agarosa al 1% (en TAE al 1%) teñido con SYBR safe.

6.3.4. Amplificación de fragmento de hepcidina y piscidina

Las condiciones empleadas para la amplificación de hepcidina fueron las siguientes: 1.6 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1.9 μM de c/ oligonucleótido, 1 U de Taq Polimerasa y ~ 20 ng de templado (ADNc de hígado). En el caso de piscidina las condiciones empleadas para fueron: 1.6 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1.9 μM de c/ oligonucleótido, 1 U de Taq Polimerasa y ~ 20 ng de templado (ADNc de bazo). El programa empleado tanto para hepcidina como para piscidina fue el mismo. Este se muestra abajo:



Las amplificaciones se confirmaron en un gel de electroforesis con agarosa al 1% (en TAE al 1%) teñido con SYBR safe, y los fragmentos esperados fueron cortados del gel utilizando un transiluminador de rayos UV y una hoja de bisturí, minimizando lo más posible la exposición del gel a los rayos UV para evitar la degradación del ADN. Una vez cortadas las bandas, estas fueron purificadas con el *QIAquick gel extraction kit* siguiendo las indicaciones del proveedor (ver anexo 2).

Tabla V. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados empleados para hepcidina y piscidina.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
Hep F1	ATGAAGVCATTCAGYRTTGC	144
Hep R1	CYTSMTGWKCMGCARCTGG	
Pis F1	GARGTGCA YCGCSCTCTTYC	115
Pis R1	GGATGRWCYTGCCRRCRTG	

6.3.5. Clonación y Secuenciación

6.3.5.1. Ligación

Los fragmentos cortados en el paso 6.3.4. fueron clonados en el vector pGEM®-T Easy (PROMEGA™) utilizando las indicaciones dadas por el proveedor. La mezcla de reacción de ligación se realizó de la siguiente manera:

Mezcla para hepcidina	Mezcla para piscidina
2x Rapid Ligation Buffer ----- 5.0µL	2x Rapid Ligation Buffer ----- 5.0µL
pGEM T-easy vector ----- 1.0µL	pGEM T-easy vector ----- 1.0µL
Producto de PCR (20ng)----- 0.4µL	Producto de PCR (20ng)----- 0.2µL
T4 ligase -----1.0µL	T4 ligase -----1.0µL
Agua ----- <u>2.6µL</u>	Agua ----- <u>2.8µL</u>
Total -----10.0µL	Total -----10.0µL

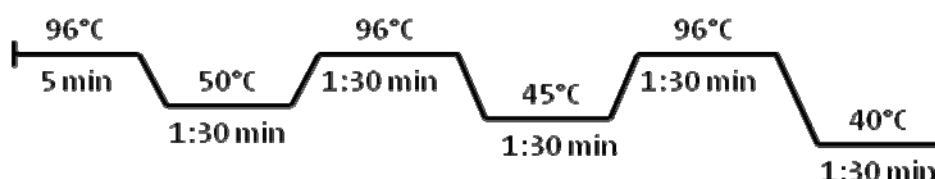
Una vez realizada la reacción de ligación, esta fue incubada a 4°C durante toda la noche.

6.3.5.2 Transformación.

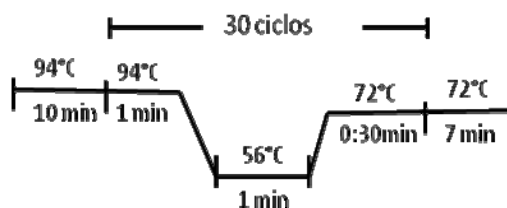
La transformación se realizó con células químicamente competentes *DH5α One Shot* (Invitrogen™) según las especificaciones del proveedor (anexo 3).

6.3.5.3. Confirmación por PCR de colonia y extracción de plásmido

De las colonias positivas obtenidas producto de la transformación se seleccionaron 6 colonias para la transformación de hepcidina y 3 colonias para piscidina. A estas, se les realizó un PCR con los oligonucleótidos degenerados empleados en el paso 6.3.4. Para esto las colonias fueron picadas con palillos estériles y agregadas a 10µL de agua milli Q. Posteriormente las células fueron lisadas en un termociclador con el siguiente programa:



Una vez lisadas las células se emplearon las siguientes condiciones para la amplificación: Buffer de PCR al 1x, 1.6 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1.9 µM de c/ oligonucleótido, 1 U de Taq Polimerasa



Las amplificaciones se confirmaron en un gel de electroforesis con agarosa al 1% (en TAE al 1%) teñido con SYBR safe. De los amplicones obtenidos se seleccionaron las colonias que contenían los fragmentos esperados (~145 pb para hepcidina y ~115pb para piscidina) y se extrajo el plásmido con el “*QIAquik plasmid Mini kit*” de QIAGEN® (ver anexo 4).

6.3.5.4. Secuenciación y análisis de secuencia

Los plásmidos purificados fueron secuenciados en la compañía MACROGEN Inc. (Corea). Los oligonucleótidos empleados fueron los promotores T7 (forward) y SP6 (reverse). Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron limpiadas eliminando las secuencias del plásmido y se obtuvo la secuencia consenso. Para confirmar la homología las secuencias con genes de hepcidina y piscidina, estas fueron sometidas al algoritmo de alineamiento de BLAST usando la base de datos de GenBank del NCBI (por sus siglas en inglés, “National Center for Biotechnology Information”). Estas secuencias sirvieron de molde para el diseño de los oligonucleótidos para qPCR y RACE 3’.

6.3.5.5. Determinación del sitio de corte del péptido señal de hepcidina

Sabiendo de antemano que la secuencia parcial de hepcidina contendría la secuencia del péptido señal, se procedió a determinar el sitio de corte de este utilizando el software Signal P versión 3.0, lo cual facilitaría su ubicación posterior en el análisis de secuencias del RACE 3’.

6.4 Expresión de hepcidina y piscidina mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Para el análisis de expresión se utilizó el RNA de todos los tejidos muestreados: branquias, bazo, riñón, hígado, piel, intestino, ojo, cerebro, músculo. Estos ARN's fueron cuantificados y se mezclaron los ARN's de cada tejido por condición en concentraciones iguales. Posteriormente estas mezclas de ARN fueron tratadas con DNasa I (Invitrogen®) para evitar contaminación con ADN.

Se realizó un primer paso de retro-transcripción donde todos los ADNc obtenidos fueron usados como templado para amplificar una región de la subunidad proteica 18s (ver tabla VI) para evaluar si el ADNc era óptimo para el análisis; y un segundo paso donde se analizó la expresión mediante qPCR usando el “iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System” de BIO-RAD®. Para la normalización de la expresión de los ARNm se utilizaron unos oligonucleótidos de la proteína de la subunidad 18S ribosomal. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para evaluar expresión por qPCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
AiHepq F	TATGAAGGCATTCAGTGTTGC	126
AiHepq R	GGAGTGTCATTGCTCGCTG	
AiPisq F	CTTGCCGGCGTGAAAGAG	86
AiPisq R	CTTGTGTTGTCGCTGGTGG	
Ai18sq F	CGAAAGCATTGCCAAGAAT	~ 102
Ai18sq R	AGTTGGCACCGTTTATGGTC	

6.4.1. Retrotranscripción

Se prepararon dos mezclas maestras (RT-1 y RT-2) para realizar la retrotranscripción, conteniendo las siguientes cantidades:

RT-1	RT-2
Oligo dt ----- 1.0 μ L	5X first-strand buffer ----- 4.0 μ L
dNTP (10mM) ----- 1.0 μ L	DTT (0.1M) ----- 2.0 μ L
Agua ----- <u>6.0μL</u>	RNaseOUT ----- <u>1.0μL</u>
Total ----- 8.0 μ L	Total ----- 7.0 μ L

Una vez preparadas las mezclas maestras se procedió a realizar lo siguiente:

1. Se agregaron 8 μ L de la mezcla RT-1 por tubo.
2. Se agregaron 4 μ L de RNA por tubo y se les dio un pulso para bajar la muestra.
3. Se incubó a 65° por 5 min. (en un termociclador “iCycler® Cycler” de BIO-RAD®).
4. Se pasaron los tubos a hielo.
5. Se agregaron 7 μ L de la mezcla RT-2 por tubo y se les dio un pulso para bajar la muestra.
6. Se incubó a 42°C por 2 min.
7. Se agregó 1 μ L de de RT (SuperScript II) a cada tubo, realizando un respectivo control negativo de cada muestra a la cual no se le agregó la enzima SuperScript II.

8. Las muestras se incubaron a 42°C/ 50 min. y después a 70°C/15 min. (en un termociclador).
9. Las muestras se almacenaron a 4°C.

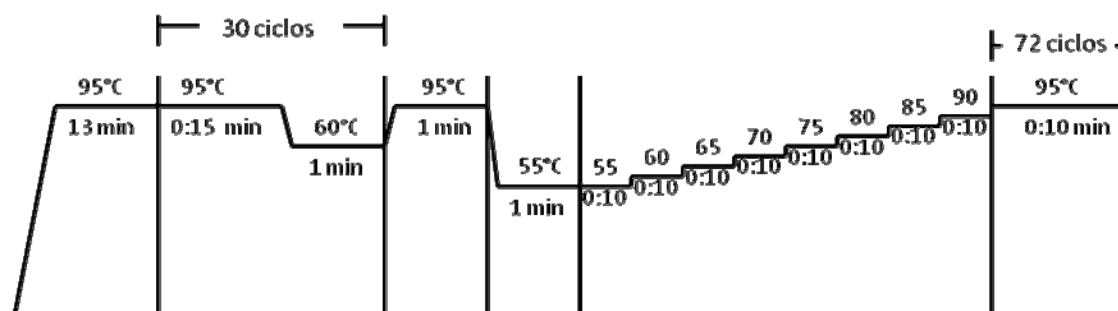
6.4.2. qPCR

Para realizar el qPCR se realizó una mezcla maestra, considerando todas las muestras por triplicado, y la mezcla de reacción preparada se llevó a cabo de la siguiente manera:

iQ™ SYBR® Green Supermix ----	10.0μL
Primer F (10μM) -----	2.0μL
Primer R (10μM) -----	2.0μL
Agua -----	<u>5.0μL</u>
Total -----	19.0μL

1. Se agregaron 19μL de la mezcla anterior y 1μL de ADNc por tubo, para un volumen total de 20μL.
2. Se colocó una cinta óptica cubriendo la placa, y se centrifugó brevemente.

Una vez preparadas las muestras, estas fueron colocadas en el “iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System”, donde se llevó a cabo el siguiente programa de amplificación:



6.4.3. Análisis de datos

Una vez obtenido los valores del Ct para cada uno de los tejidos, se procedió a evaluar tanto la expresión basal así como el cambio en el nivel de expresión relativa (control-tratamiento). Para determinar la expresión basal se obtuvo el exponente del promedio de los ΔCt de cada tejido, y se consideró el valor más bajo como 1. Este tejido fue usado como valor de referencia para observar las tendencias de expresión por los aumentos en órdenes de magnitud basados en este tejido. Para el análisis del cambio en el nivel de expresión relativa (control-tratamiento) se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, basado en las diferencias de los ΔCt del control contra el tratamiento.

Utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS versión Centurion XV se analizaron los valores obtenidos del análisis del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estos fueron comparados mediante una ANDEVA de una vía con una $P \leq 0.05$ para determinar si existía una diferencia significativa en las expresiones de hepcidina y piscidina en todos los tejidos muestreados. Por otro, para determinar la diferencia por medias del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada tejido, se realizaron pruebas pareadas *t-student* con una $P \leq 0.05$.

6.5. RACE

6.5.1. Preparación de ADNc para RACE 3'

La muestra empleada para la preparación del ADNc fue RNA de riñón y el oligonucleótido usado fue el RACE 3' (ver tabla VI). La mezcla de reacción se realizó de la siguiente manera:

ADNc para RACE 3'	
RNA total (1µg)-----	6.0µL
RACE 3' (20µM) -----	1.0µL
Agua -----	<u>1.0µL</u>
Total -----	8.0µL

Posteriormente la mezcla se incubó a 70°C por 2 minutos, luego se enfrió en hielo por 2 minutos y se agregó la siguiente mezcla:

5x first-strand buffer -----	4.0µL
DTT -----	2.0µL
dNTP Mix (2.5mM) -----	4.0µL
SuperScript II -----	<u>2.0µL</u>
Total -----	12.0µL

Una vez agregado la segunda mezcla se incubó a 42°C por 1:30 hrs., seguido de otra incubación a 72°C por 10 minutos. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20°C.

6.5.2. PCR

Las condiciones empleadas para la amplificación de piscidina fueron las siguientes: 1.6 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1.6 μM de c/ oligonucleótido (ver tabla VI), 1 U de Taq Polimerasa y ~ 20 ng de templado (ADNc de Bazo).

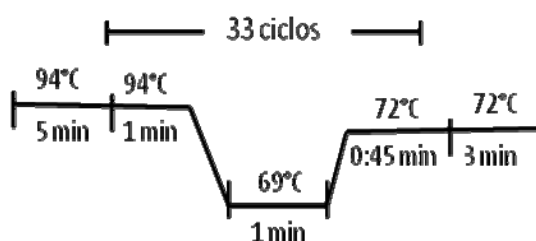


Tabla VII. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la técnica de RACE 3'

Oligonucleótido	Secuencia
RACE 3'	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30V
AiHeprace 3'	TATTTGCATTCTGGAGAGCTCTGCCGTC

Las amplificaciones se confirmaron en un gel de electroforesis con agarosa al 1% (en TAE al 1%) teñido con SYBR safe, y las bandas obtenidas fueron cortadas del gel utilizando un transiluminador de rayos UV y una hoja de bisturí, minimizando lo más posible la exposición del gel a los rayos UV para evitar la degradación del ADN. Una vez cortadas las bandas, estas fueron purificadas con el *QIAquick gel extraction kit* siguiendo las indicaciones del proveedor (ver anexo 2).

6.5.3. Clonación y Secuenciación

6.5.3.1. Ligación

Los fragmentos cortados en el paso 6.5.2. fueron clonados en el vector pGEM®-T Easy (PROMEGA™) utilizando las indicaciones dadas por el proveedor. La mezcla de reacción de ligación se realizó de la siguiente manera:

2x Rapid Ligation Buffer -----	5.0μL
pGEM T-easy vector -----	1.0μL
Producto de PCR (20 ng)-----	0.5μL
T4 ligase -----	1.0μL
Agua -----	<u>2.5μL</u>
Total -----	10.0μL

Una vez realizada la reacción de ligación, esta fue incubada a 4°C durante toda la noche.

6.5.3.2. Transformación por electroporación

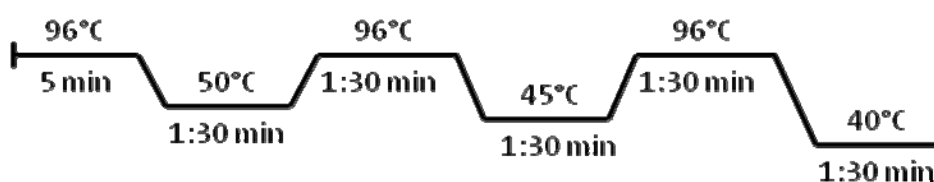
Los pasos seguidos para la transformación fueron los siguientes:

1. Se agregaron 3μL de la reacción de ligación a una alícuota de 50μL de células electrocompetentes y estas fueron incubadas en hielo por 8 minutos.
2. La mezcla de células y ligación fue transferida a una celda de electroporación de 1mm previamente enfriada y estéril.

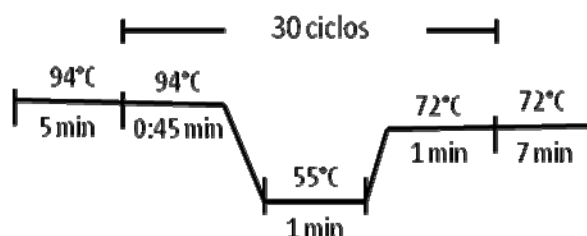
3. Se seleccionaron los siguientes parámetros en el aparato de electroporación: 2.5kV, 25 μ F y 200 Ω . Una vez puestos los parámetros se dio el pulso.
4. Se agregaron 950 μ L de medio S.O.C. a la celda y este mismo fue pasado a un tubo estéril.
5. Se incubó a 37°C y 200 rpm durante 1:00 hrs.
6. Se plaquearon 150 μ L por transformación en placas con 50 μ g/ μ l de ampicilina, 0.5mM de IPTG y 80 μ g/mL de X-Gal.
8. Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche.

6.5.3.3. Confirmación por PCR de colonia.

A partir de las transformaciones se seleccionaron colonias positivas al azar. A estas, se les realizó un PCR con los oligonucleótidos pUC/M13 del vector (ver tabla VII). Para esto las colonias fueron picadas con palillos estériles y agregadas a 10 μ L de agua milli Q. Posteriormente las células fueron lisadas en un termociclador con el siguiente programa:



Una vez lisadas las células se emplearon las siguientes condiciones para la amplificación: Buffer de PCR al 1x, 1.6 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1.9 μ M de c/ oligonucleótido, 1 U de Taq Polimerasa.



Las amplificaciones se confirmaron en un gel de electroforesis con agarosa al 1% (en TAE al 1%) teñido con SYBR safe. De los amplicones obtenidos se seleccionaron las colonias que contenían los fragmentos esperados y se extrajo el plásmido con el “*QIAquick plasmid Mini kit*” de QIAGEN® (ver anexo 4).

Tabla VIII. Secuencia de los oligonucleótidos pUC/M13.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto esperado del vector cerrado
pUC/M13 F	GTTTTCCAGTCACGAC	236
pUC/M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	

6.5.3.4. Secuenciación y análisis.

Los plásmidos purificados fueron secuenciados en la compañía MACROGEN Inc. (Corea). Se secuenció en ambos sentidos empleando los oligonucleótidos de los promotores T7 (forward) y SP6 (reverse). Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron limpiadas eliminando las secuencias del plásmido. Para confirmar la homología las secuencias con genes de hepcidina, estas fueron sometidas al algoritmo de alineamiento de BLAST usando la base de datos de GenBank del NCBI. Se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos

junto con la secuencia nucleotídica utilizando un software en línea (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate/>) y se ubicaron el sitio de corte del péptido señal, el prodominio, la región del péptido maduro, el UTR3' y la cola de poli A. Aunado a esto, se realizó un alineamiento múltiple de nucleótidos de estas secuencias con el software en línea *TCoffee* para ver a detalle las diferencias entre estas. Además, se calculó el peso molecular, el punto isoeléctrico y la carga estimada a pH 7.0 del péptido maduro de las secuencias del RACE 3' con el software PROTEIN CALCULATOR versión 3.3. Por otro lado, un alineamiento múltiple de hepcidinas de peces (incluyendo las secuencias obtenidas del RACE 3') y mamíferos fue realizado con el software en MEGA 4.0, donde dicho alineamiento fue editado manualmente con el software CINEMA versión 2.1. Y finalmente se construyó un árbol filogenético utilizando el software MEGA 4.0.

7. RESULTADOS.

7.1. Alineamientos múltiples de hepcidina y piscidina.

En los alineamientos de aminoácidos de hepcidina y piscidina pudimos constatar que la región más conservada fue la del péptido señal (ver figuras 5 y 7), por lo que esta región fue usada para diseñar los oligonucleótidos degenerados tanto de hepcidinas como de piscidina.

7.1.1. Hepcidina.

En el alineamiento de aminoácidos, se ubicaron las regiones correspondientes para el péptido señal, el prodominio y el comienzo del péptido maduro de hepcidina, basándonos en las secuencias caracterizadas ya publicadas en revistas científicas. La figura 5 muestra con una doble flecha verde la región de la cual se diseñaron los oligonucleótidos degenerados. Además en la parte inferior de las secuencias correspondientes al péptido maduro se ubican las 8 cisteínas típicas de hepcidina (estrellas verdes), las cuales dan lugar a la formación de los 4 enlaces disulfuro de la proteína madura.

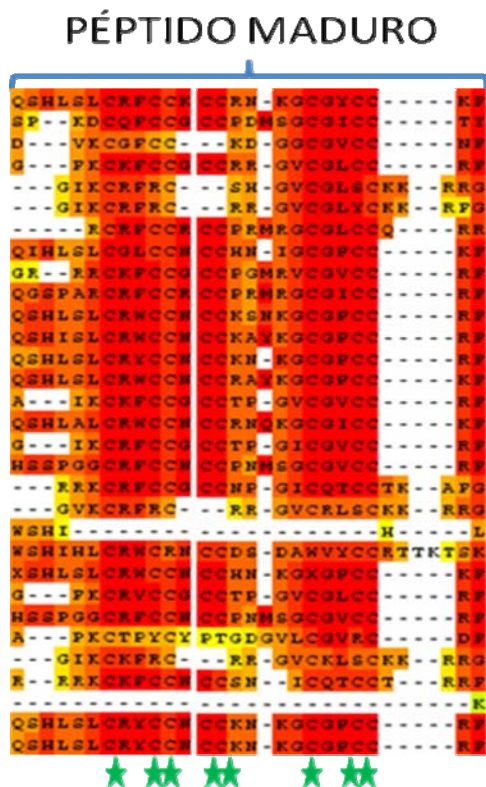
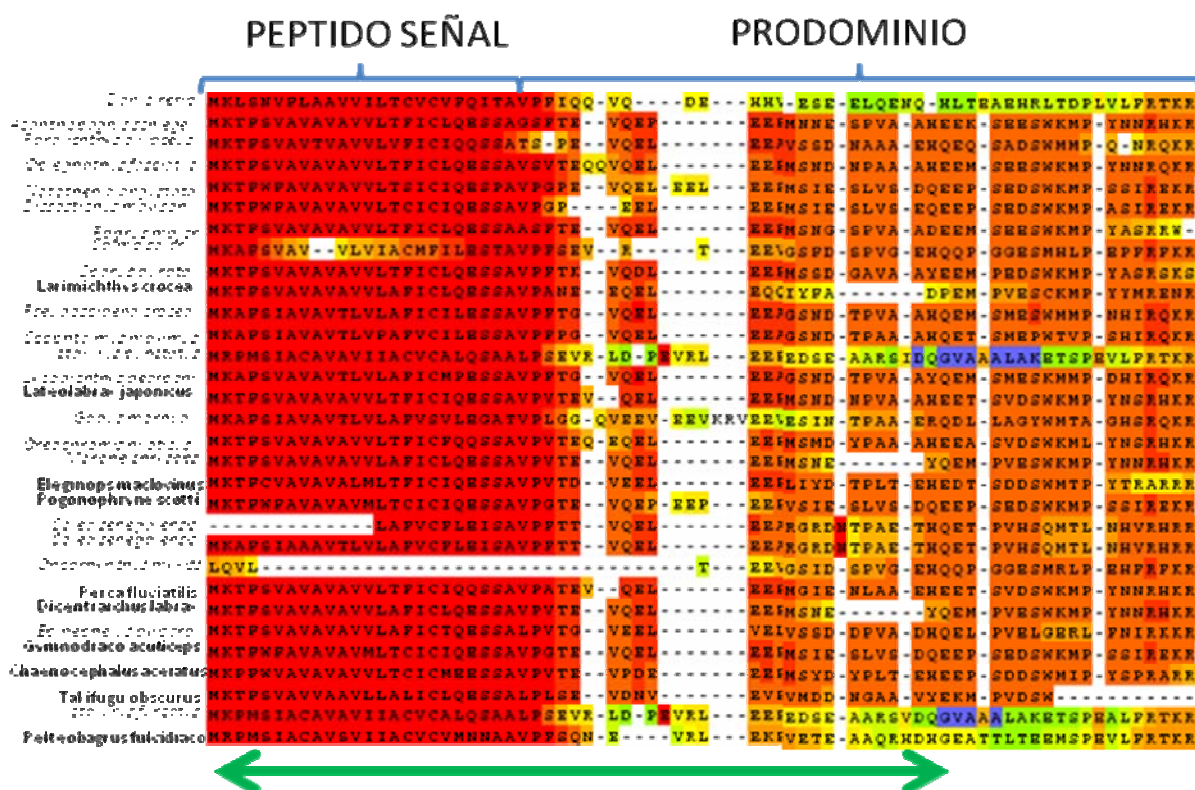


Figura 5. Alineamiento de aminoácidos de hepcidinas de peces,

En el alineamiento nucleotídico se encontró el marco de lectura que coincidiera con las secuencias utilizadas en el alineamiento aminoacídico ubicando la región del péptido señal. La figura 6, muestra las regiones del alineamiento usadas para el diseño de los oligonucleótidos degenerados (flechas negras).

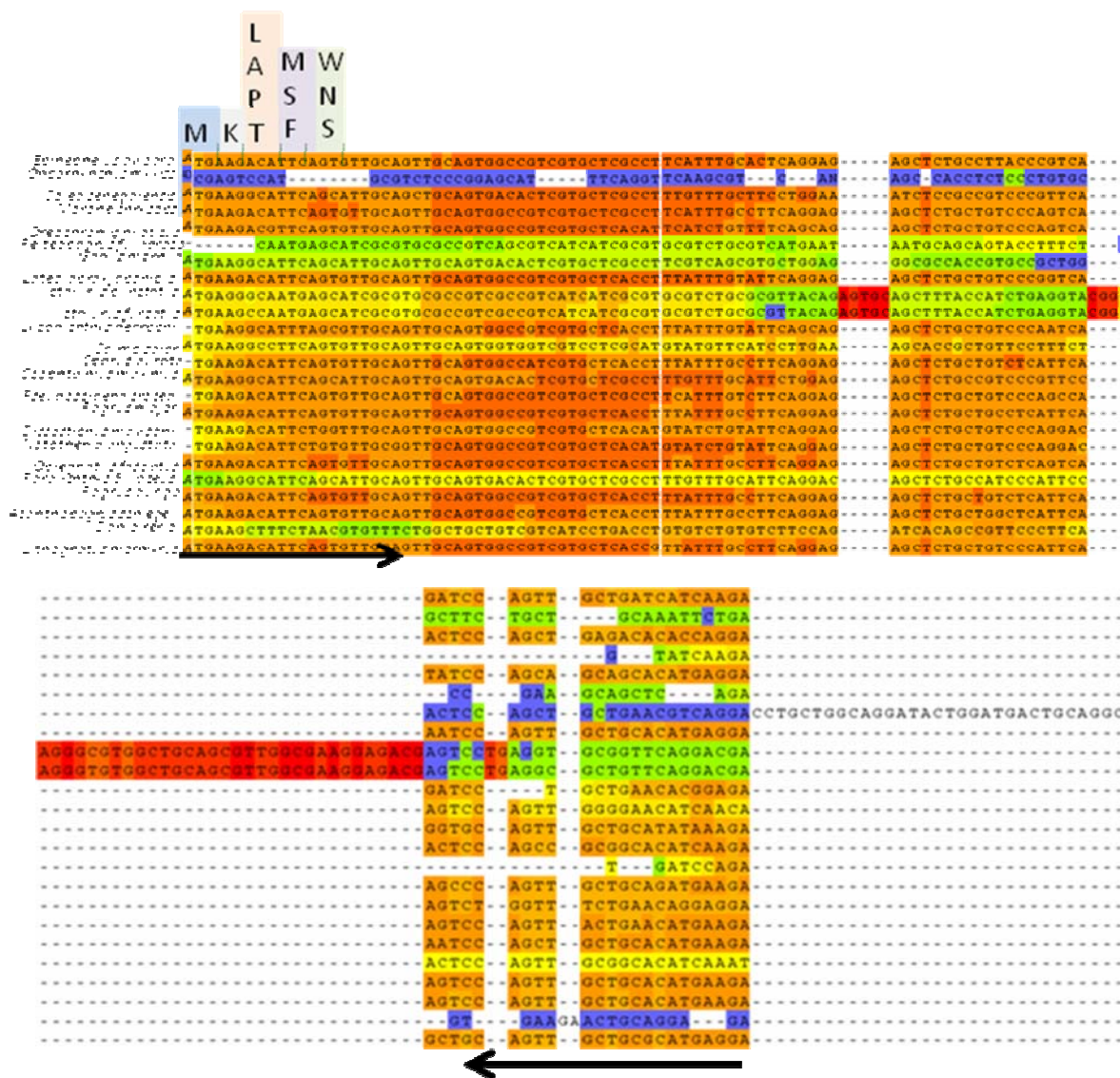


Figura 6. Alineamiento de ADNc de hepcidinas de peces.

7.1.2. Piscidina.

En el alineamiento múltiple de aminoácidos, también se ubicaron las regiones correspondientes al péptido señal, el péptido maduro y el prodominio. La figura 7 muestra con una doble flecha verde la región de la cual se diseñaron los oligonucleótidos degenerados. Además, el alineamiento agrupa los diversos ordenes representados, donde la mayor parte la conforman los pleuronectiformes (lenguados), seguido de los perciformes, y con un solo representante los syngnathiformes (caballitos de mar).

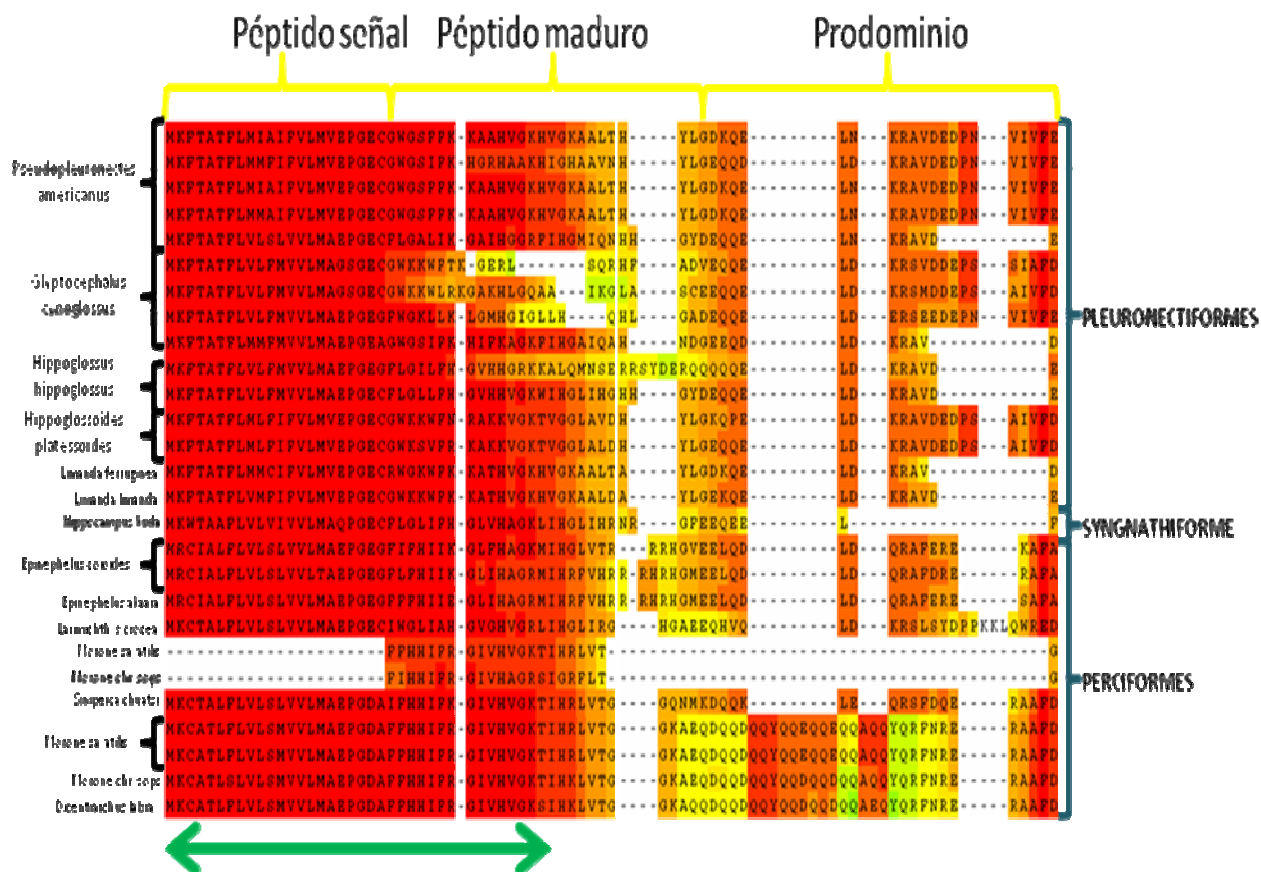


Figura 7. Alineamiento de aminoácidos de piscidina

Por otro lado, en el alineamiento nucleotídico se encontró el marco de lectura que coincidiera con las secuencias utilizadas en el alineamiento aminoacídico. Así se logró encontrar la región correspondiente al péptido señal y al péptido maduro, regiones de las cual fueron diseñados los oligonucleótidos degenerados. El alineamiento esta representando por 11 especies agrupadas en 6 familias diferentes, a su vez agrupadas en 3 ordenes: Perciformes (Serranidae, Scianidae, Percichthyidae y Moronidae) Syngnathiformes (Syngnathidae) y pleuronectiformes (Pleuronectidae) (ver figura 8).

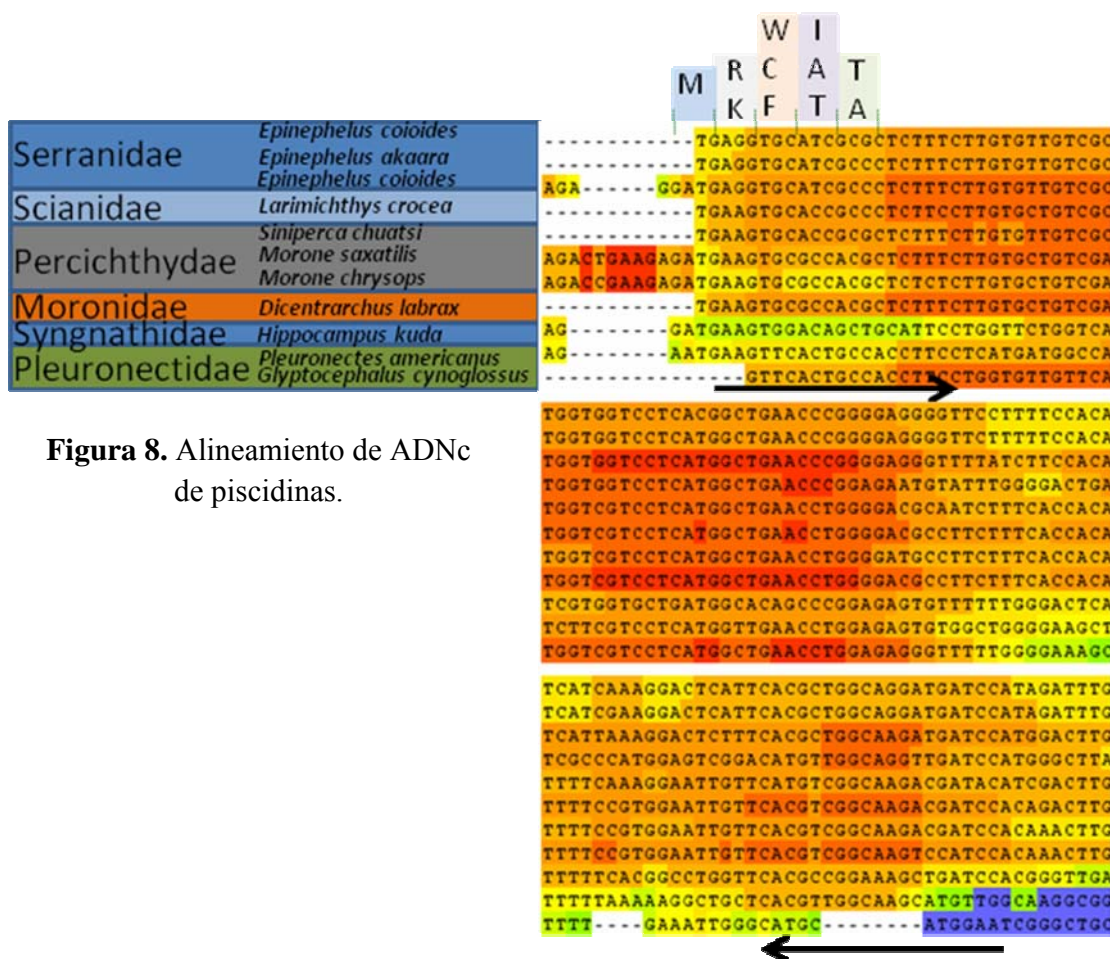


Figura 8. Alineamiento de ADNc de piscidinas.

7.2. Extracción de ARN total

La figura 9, muestra los distintos ARNs extraídos de los organismos control (C1 y C2) y tratamiento (T1 y T2), en esta se puede apreciar la subunidades de RNA ribosomal.

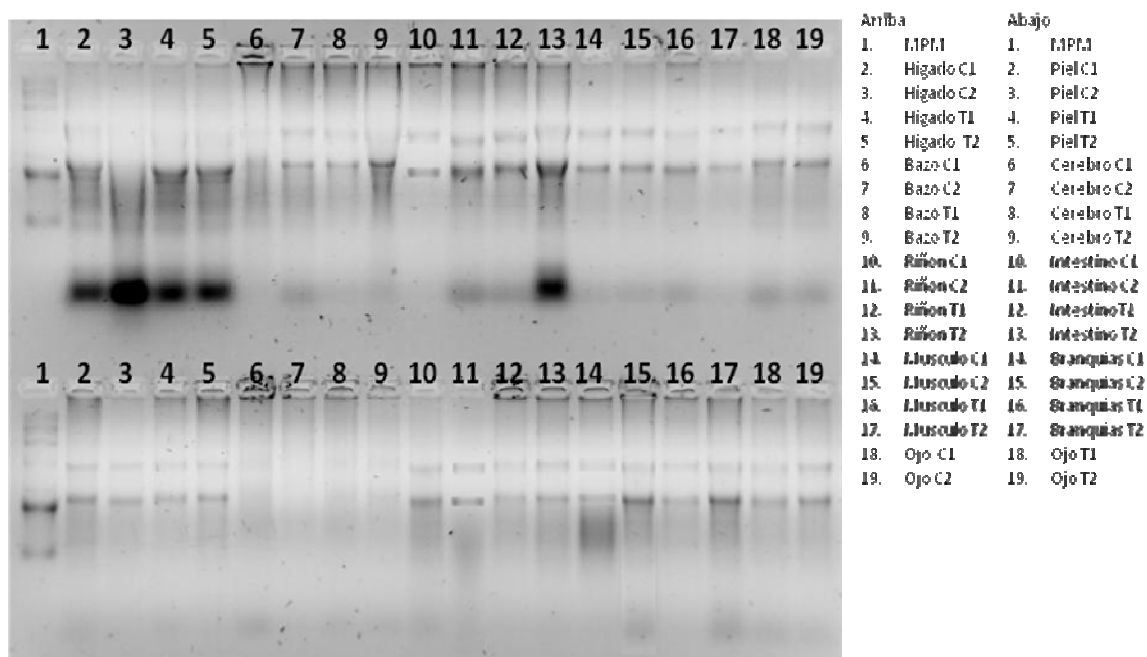


Figura 9. Extracción de RNA total de los organismos control y tratamiento de nueve tejidos muestreados

7.3. Amplificación de hepcidina y piscidina usando oligonucleótidos degenerados.

Las amplificaciones usando los oligonucleótidos degenerados fueron exitosas tanto para hepcidina como para piscidina, debido a que los amplicones obtenidos eran los esperados dado los alineamientos múltiples. Para hepcidina el amplicon obtenido fue de 143pb (ver figura 10) y para piscidina de 113pb (ver figura 11).

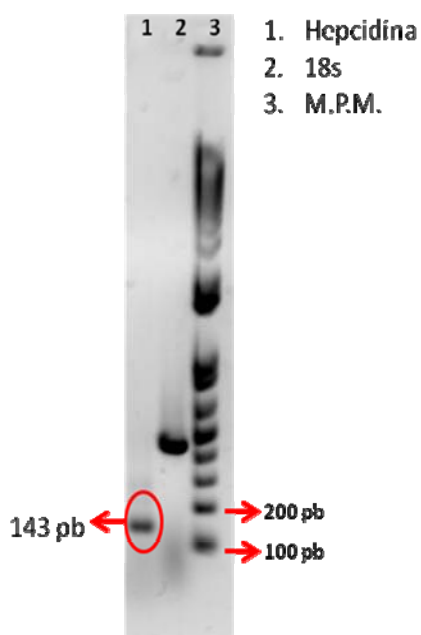


Figura 10. Amplificación de hepcidina usando oligonucleótidos degenerados.

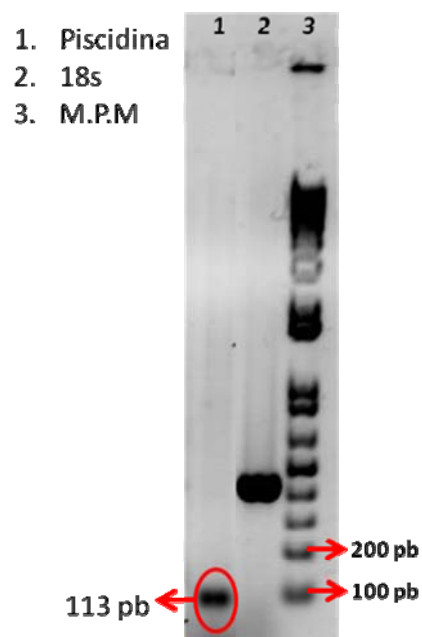


Figura 11. Amplificación de piscidina usando oligonucleótidos degenerados.

7.3.1. Amplificación de hepcidina y piscidina de colonias transformadas.

De las colonias que amplificaron el fragmento esperado de hepcidina de 143pb y piscidina de 115pb, se seleccionó solo una colonia de cada transformación para extraer plásmido y mandar secuenciar a partir de este. La figura 12 y 13 muestran las amplificaciones de hepcidina y piscidina respectivamente (círculos rojos), marcando en rojo la colonia seleccionada de la cual se amplificó y a su vez fue utilizada para secuenciar.

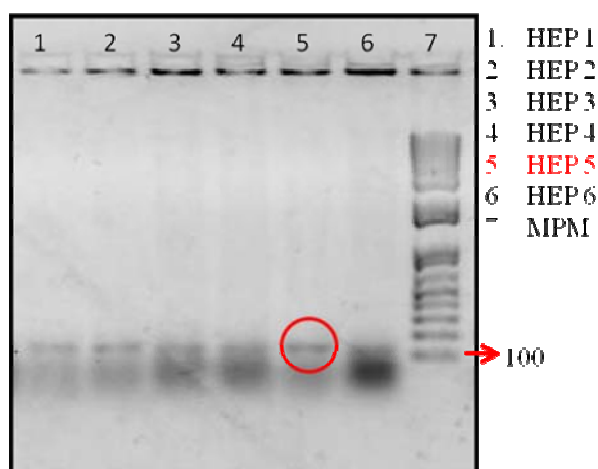


Figura 12. Amplificación de hepcidina a partir de colonia usando los oligonucleótidos degenerados.

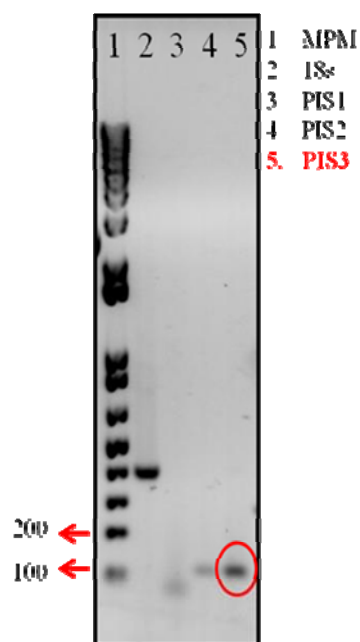


Figura 13. Amplificación de piscidina a partir de colonia usando los oligonucleótidos degenerados.

7.4. Secuencia parcial de hepcidina y piscidina

7.4.1. Hepcidina

La secuencia parcial de hepcidina obtenida con el uso de los oligonucleótidos degenerados produjo una secuencia de 143pb. La figura 14, muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia deducida de aminoácidos, además, flechas negras ubican las regiones seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos específicos para qPCR y con una flecha naranja la secuencia del oligonucleótido para realizar el RACE 3', con el cual se obtuvieron las cuatro secuencias mostradas adelante en el punto 7.6.

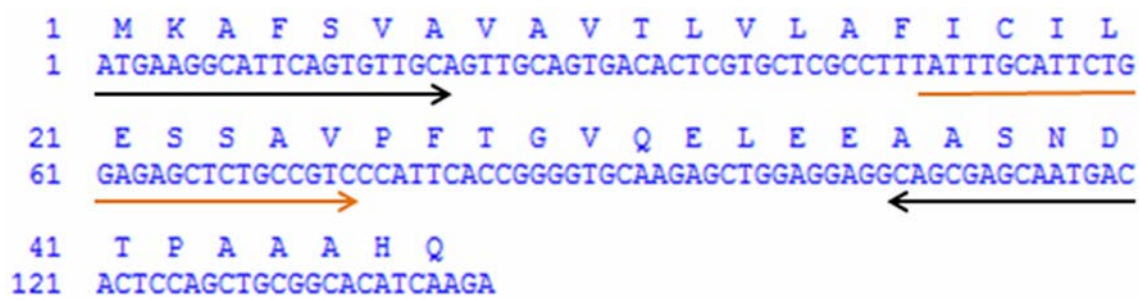


Figura 14. Secuencia parcial de hepcidina obtenida con oligonucleótidos degenerados.

Al someter la secuencia a la base de datos de GenBank utilizando el algoritmo de BLAST de NCBI (por sus siglas en inglés, "*National Center of Biotechnology Information*"), el resultado fueron identidades del 93-96% con un 100% de cobertura de la secuencia para genes de hepcidina de distintos peces. De hecho todas las secuencias mostradas en el resultado del alineamiento de BLAST fueron de genes de hepcidina de peces, y no de algún otro vertebrado (ver figura 15).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU502754.1	Micropterus salmoides hepcidin-1 (hep-1) mRNA, complete cds	237	237	100%	1e-59	96%
AM748024.1	Pseudosciaena crocea mRNA for hepcidin (hep gene)	237	237	100%	1e-59	96%
DQ307050.1	Pseudosciaena crocea hepcidin mRNA, partial cds	237	237	100%	1e-59	96%
EU502756.1	Micropterus dolomieu hepcidin-1 (hep-1) mRNA, complete cds	231	231	100%	5e-58	95%
AB440775.1	Pagrus auriga HAMP1 mRNA for hepcidin antimicrobial peptide 1, complete cds	231	231	100%	5e-58	95%
EU221608.1	Lycodichthys dearborni isolate LD_c8cysHep hepcidin mRNA, complete cds	215	215	100%	5e-53	93%
AY994074.1	Scophthalmus maximus hepcidin precursor, mRNA, complete cds	215	215	100%	5e-53	93%
DQ850585.1	Lithognathus mormyrus clone lithmor955 mRNA sequence	211	211	100%	7e-52	93%
AM113708.1	Scophthalmus maximus mRNA for hepcidin 1 precursor (hepc1 gene)	209	209	100%	2e-51	93%
AY533022.1	Paralichthys olivaceus hepcidin precursor type I mRNA, complete cds	195	195	98%	7e-47	91%
AB198061.1	Paralichthys olivaceus JF-hep 2 mRNA for hepcidin 2, complete cds	189	189	98%	3e-45	90%
CR727018.2	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	183	183	98%	1e-43	90%
CR642615.2	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	183	183	98%	1e-43	90%
EU221589.1	Notothenia angustata isolate Na_c8cysHep_v1 hepcidin mRNA, complete cds	182	182	100%	5e-43	89%
EU502749.1	Micropterus salmoides hepcidin-1 (hep-1) gene, complete cds	148	148	62%	5e-33	96%
EU502751.1	Micropterus dolomieu hepcidin-1 (hep-1) gene, complete cds	143	143	62%	2e-31	95%
AB440779.1	Pagrus auriga HAMP1 gene for hepcidin antimicrobial peptide 1, complete cds	143	143	62%	2e-31	95%
EU221588.1	Eleginops maclovinus isolate Em_g8cysHep_v1 hepcidin gene, complete cds	143	143	62%	2e-31	95%
EU221609.1	Lycodichthys dearborni isolate LD_g8cysHep hepcidin gene, complete cds	137	137	62%	1e-29	94%
EU221590.1	Dissostichus mawsoni isolate Dm_g8cysHep_v1 hepcidin gene, complete cds	132	132	62%	5e-28	93%
AY994075.1	Scophthalmus maximus hepcidin precursor, gene, complete cds	132	132	62%	5e-28	93%
AY623817.1	Paralichthys olivaceus hepcidin type I gene, complete cds	124	124	66%	9e-26	90%
EU221591.1	Notothenia angustata isolate Na_g8cysHep_v1 hepcidin gene, complete cds	121	121	62%	1e-24	91%
EU221587.1	Pogonophryne scotti isolate Ps_g8cysHep_v1 hepcidin gene, complete cds	121	121	62%	1e-24	91%
DQ129693.1	Paralichthys olivaceus hepcidin precursor, gene, complete cds	119	119	66%	4e-24	89%
EU334515.1	Gadus morhua hepcidin precursor, gene, complete cds	76.8	76.8	32%	3e-11	95%
EU334514.1	Gadus morhua hepcidin precursor, mRNA, complete cds	76.8	76.8	32%	3e-11	95%

Figura 15. Alineamientos en BLASTn de la secuencia parcial de hepcidina

7.4.1.1. Determinación del sitio de corte del péptido señal de hepcidina

La figura 16 y 17, mediante redes neuronales y Modelos Markovianos Ocultos, respectivamente, muestran la predicción del corte del péptido señal más probable entre el residuo 24-25 del pre-propéptido (es decir: SSA – VP) de la secuencia deducida de aminoácidos obtenida de la secuencia parcial de hepcidina (ver figura 14).

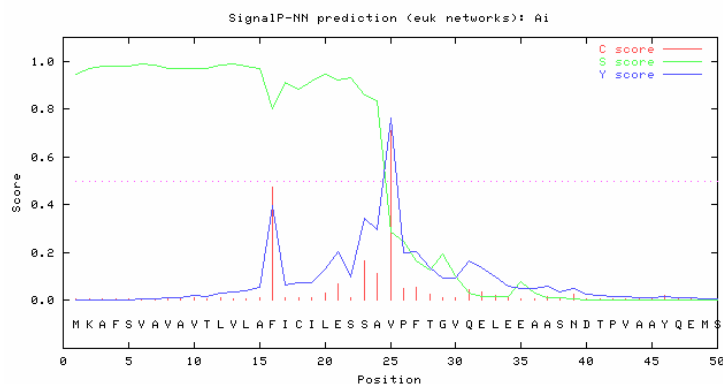


Figura 16. Predicción del sitio de corte del péptido señal usando Redes Neuronales

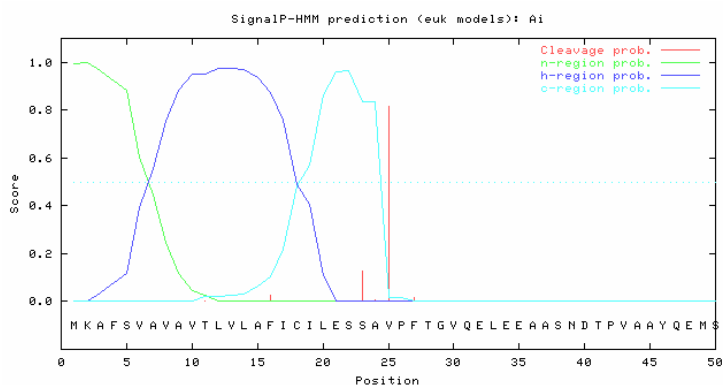


Figura 17. Predicción del sitio de corte del péptido señal usando Modelos Markovianos Ocultos.

7.4.2 Piscidina.

Para el caso de piscidina se obtuvo una secuencia de 113 pb. La figura 18 muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia deducida de aminoácidos, además, flechas negras ubican las regiones seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos específicos para qPCR.

```

1  R C I A L F L V L S L V V L M A E P G E
2  AGGTGCATCGCGCTCTTTCTTGTGTTGTCGCTGGTGGTCCCTCATGGCTGAACCCGGGGAG
    ────────────────────────────────────────────────────────────────────────────▶
21 G F I F G I I K G L F H A G K T I
62 GGTTTTATTTTCGGCATCATCAAAGGACTCTTTCACGCCGGCAAGACCATCC
    ◀───────────────────────────────────────────────────────────────────────────

```

Figura 18. Secuencia parcial de piscidina obtenida con oligonucleótidos degenerados.

Al someter la secuencia parcial de piscidina a la base de datos de GenBank utilizando el algoritmo de BLAST del NCBI, el resultado fueron identidades del 85-95% con un 50-100% de cobertura de la secuencia para genes de piscidina. Cabe resaltar que las secuencias con mayor identidad corresponden a *E. coioides*, el cual es un serránido de la misma subfamilia (Epinephelinae) que *A. immaculatus* (ver figura 19).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY294407.1	Epinephelus coioides epinecidin-1 prepropeptide mRNA, complete cds	<u>165</u>	165	94%	4e-38	94%
GU592793.1	Epinephelus fuscoguttatus piscidin-like peptide mRNA, complete cds	<u>159</u>	159	94%	2e-36	93%
AY705494.1	Epinephelus coioides epinecidin-1 prepropeptide gene, complete cds	<u>154</u>	154	86%	8e-35	94%
EU741829.1	Epinephelus coioides piscidin-like peptide mRNA, complete cds	<u>148</u>	148	92%	4e-33	92%
EU741828.1	Epinephelus akaara piscidin-like peptide mRNA, complete cds	<u>143</u>	143	92%	2e-31	91%
EU741827.1	Larimichthys crocea piscidin-like peptide mRNA, complete cds	<u>78.7</u>	78.7	47%	5e-12	92%

Figura 19. Alineamientos en BLASTn de la secuencia parcial de piscidina

7.5. Expresión de hepcidina y piscidina mediante PCR en tiempo real (qPCR).

Antes de realizar el qPCR, todas las muestras de cDNA fueron usadas como templado para amplificar con los oligonucleótidos Ai18sq (ver tabla VI). La figura 20, muestra estas amplificaciones, lo cual nos indico que el cDNA era óptimo para ser usado como templado para la cuantificación de la expresión por qPCR. Además, también se amplificó con los oligonucleótidos AiHepq (imagen no mostrada)

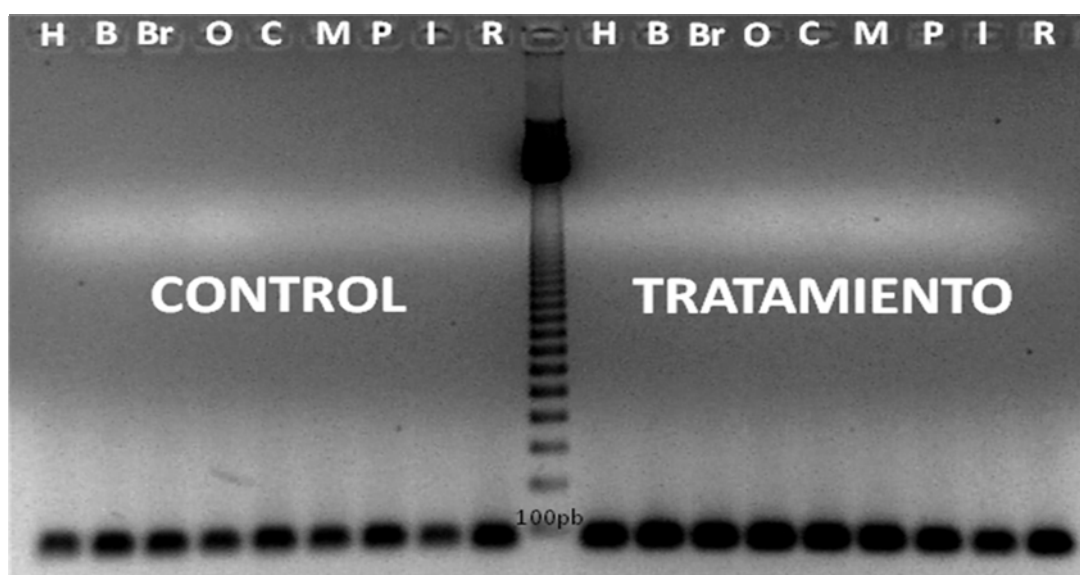


Figura 20. Amplificación del 18s de los ADNc de todos los tejidos muestreados. Donde hígado (H), bazo (B), branquias (Br), Ojo (O), músculo (M), piel (P), intestino (I) y riñon cefálico (R).

7.5.1. Hecpidina

Para la expresión basal de hepcidina el tejido que mostró menor expresión fue intestino, siendo por lo tanto el valor de referencia tomado para los valores de expresión relativa. La figura 21 muestra una tendencia de expresión de 2498, 1248 y 135 veces mayor en hígado, musculo y bazo, respectivamente, con respecto a intestino. En el caso de la expresión diferencial control-tratamiento el ANDEVA de una vía mostró que si existe una diferencia significativa ($P < 0.001$) entre todos los tejidos muestreados. El anexo 5 muestra la tabla de datos estadísticos obtenidos de la ANDEVA. Las pruebas pareadas *t-student* mostraron tres grupos con expresiones significativamente diferentes (*a*, *b* y *c*), Donde *a* es el grupo de mayor expresión representado por intestino y riñón cefálico; *b* representado por bazo, cerebro, piel e hígado; y finalmente *c*, los tejidos de menor expresión representados por músculo, branquias y ojo (figura 22).

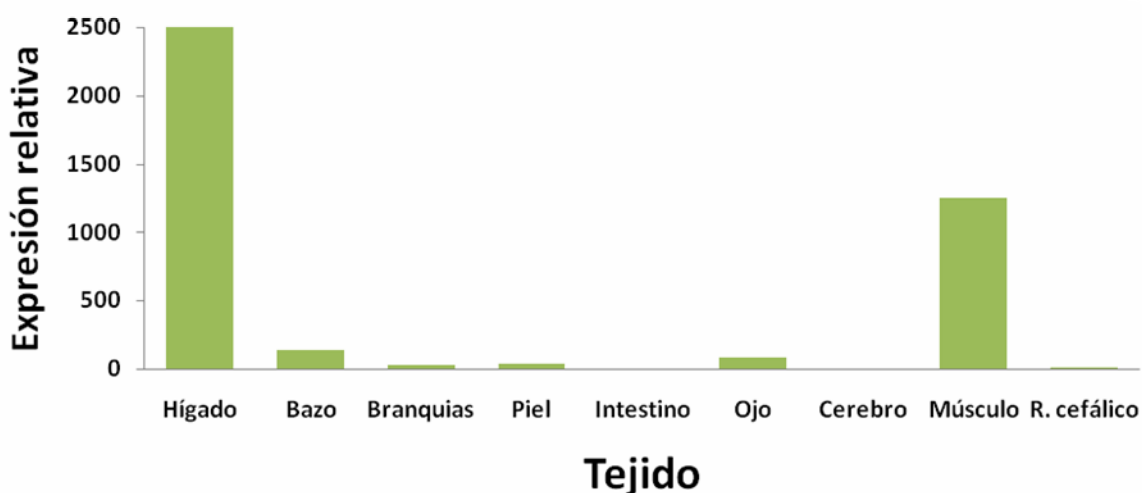


Figura 21. Gráfica de expresión relativa basal de hepcidina en distintos tejidos

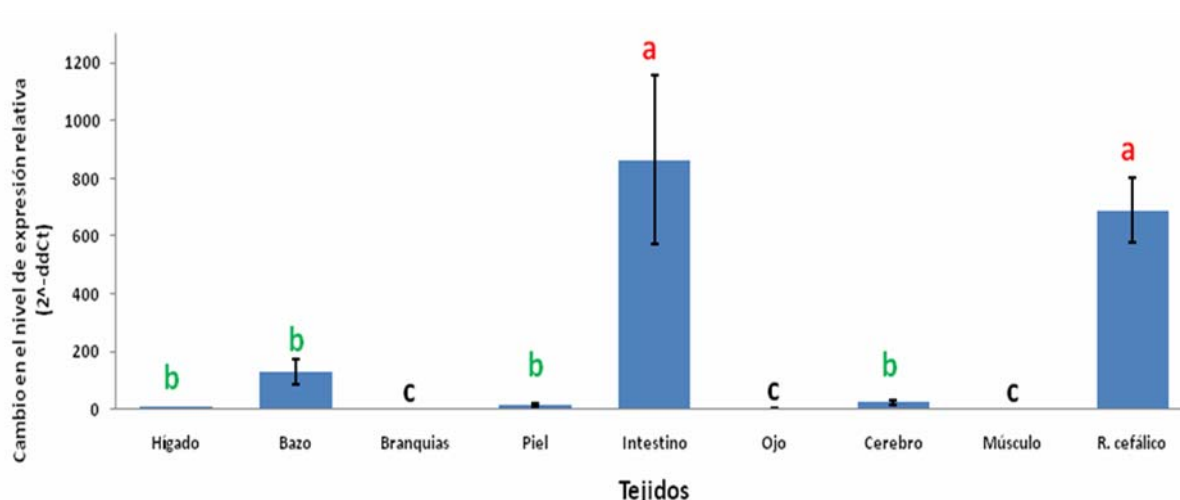


Figura 22. Grafica del cambio en el nivel de expresión relativa de hepcidina en distintos tejidos.

7.5.2. Piscidina

Para la expresión basal de piscidina el tejido que fue usado como referencia dada su baja expresión fue músculo. Esto mostró que basalmente los tejidos con mayor expresión son riñón cefálico y bazo con expresiones 938 y 277 veces mayor, respectivamente, con respecto a la expresión de músculo (ver figura 23). En el caso de la expresión diferencial control-tratamiento el ANDEVA de una vía mostró que si existe una diferencia significativa ($P < 0.001$) entre todos los tejidos muestreados. El anexo 6 muestra la tabla de datos estadísticos obtenidos de la ANDEVA. Las pruebas pareadas *t-student* mostraron tres grupos con expresiones significativamente diferentes (*a*, *b* y *c*), Donde *a* es el grupo de mayor expresión representado solamente por músculo; *b* representado por riñón

cefálico, cerebro, branquias, bazo, hígado e intestino; y finalmente *c*, los tejidos de menor expresión representados por ojo y piel (figura 24).

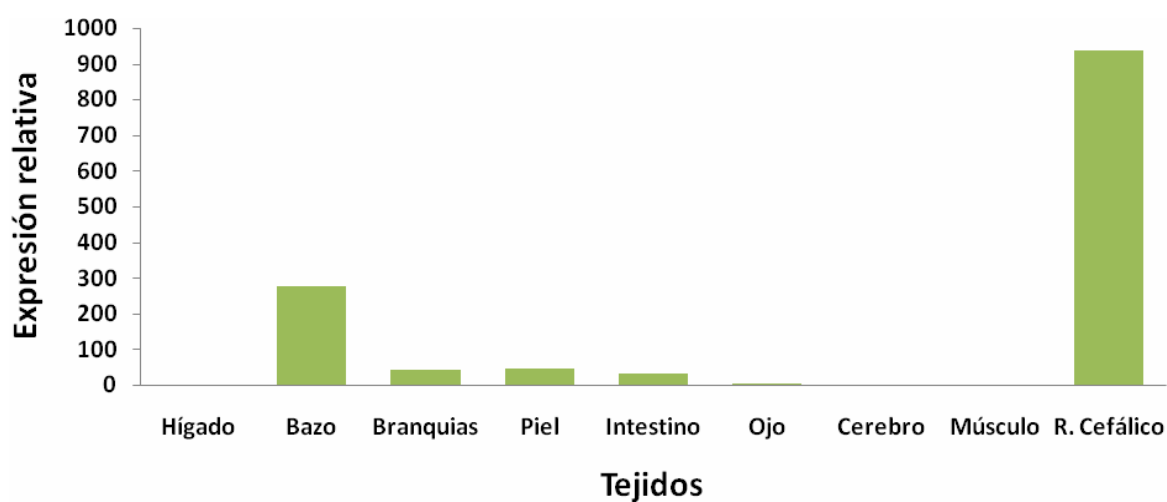


Figura 23. Gráfica de expresión relativa basal de piscidina en distintos tejidos

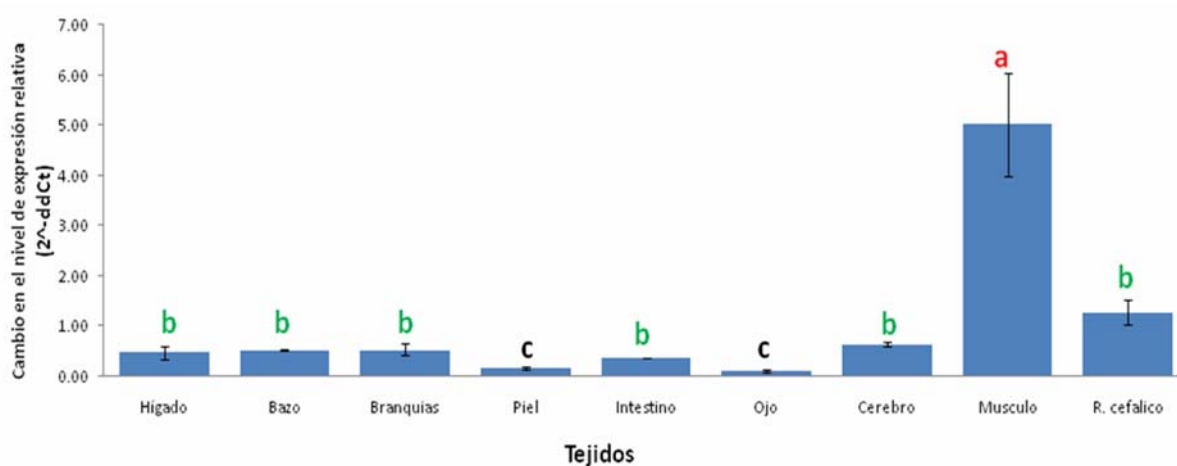


Figura 24. Gráfica del cambio en el nivel de expresión relativa de piscidina en distintos tejidos.

7.6. RACE

La técnica RACE en sentido 3' para hepcidina produjo alrededor de 7 bandas. No obstante, solo fueron purificadas las bandas de ~280, ~350, ~500 y ~600pb (ver figura 25), debido a que las bandas menores a 200pb y mayores a 1 Kb se consideraron inespecificidades, ya que no existe ningún reporte de ADNc's de hepcidina con esas características. Por otro lado, la clonación de las bandas purificadas se confirmó por la amplificación a partir de la colonia utilizando los oligonucleótidos pUC/M13, los cuales en caso de ser un plásmido cerrado amplificarían un fragmento de 236pb. La figura 26a y 26b muestran las clonaciones de los fragmentos de ~280, ~350, ~500 y ~600pb, produciendo bandas de ~450, ~500, ~800 y ~800pb, respectivamente.

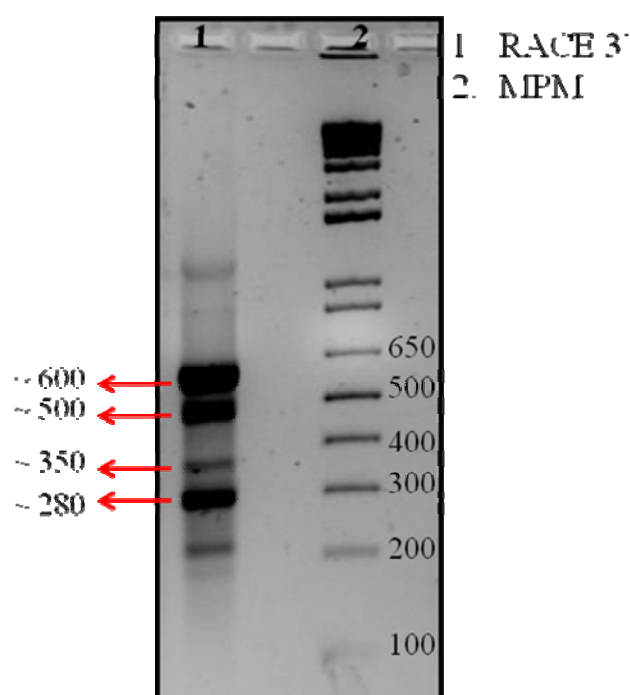


Figura 25. RACE 3' de hepcidina

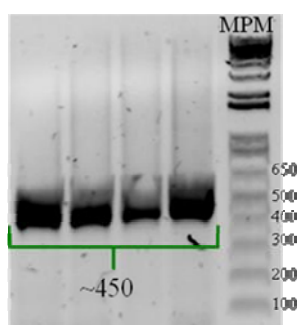


Figura 26a. Amplificación con los oligonucleótidos pUC/M13 de 4 colonias de la transformación de la clonación de la banda de ~280pb.

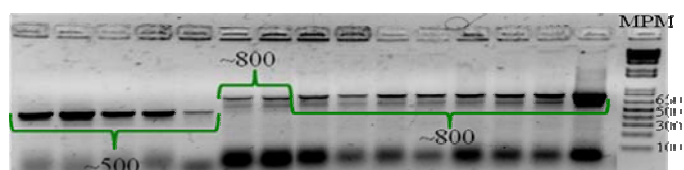


Figura 26b. Amplificación con los oligonucleótidos pUC/M13 de 5, 2 y 8 colonias de la transformación de la clonación de la banda de ~350pb, ~500 y ~600, respectivamente.

7.6.1. Secuencias

A partir del RACE 3' fueron obtenidas cuatro secuencias, estas fueron fragmentos de 278pb (AiHep1), 281pb (AiHep2), 604pb (AiHep3) y 606pb (AiHep4). Todas tuvieron identidades mayores al >81% con genes de hepcidina de peces.

AiHep1 y AiHep2 presentaron identidades del 92% con un 87% de cobertura con genes de hepcidina en *Lycodichthys dearborni*, *Pseudosciaena crocea*, *Micropterus salmoides* y *Micropterus dolomieu*. AiHep3 mostró identidades del 85, 81 y 81% con una cobertura de 96, 97 y 94% en *Micropterus dolomieu*, *Pagrus auriga* y *Pseudosciaena crocea*, respectivamente. Y AiHep4 mostró identidades del 85, 81 y 81% con una cobertura de 94, 98 y 94% en *Micropterus dolomieu*, *Pagrus auriga* y *Pseudosciaena crocea*, respectivamente.

Las figuras 27, 28, 29 y 30, muestran las secuencias de AiHep1, AiHep2, AiHep 3 y AiHep4, respectivamente. Dichas secuencias también contienen la secuencia deducida de

aminoácidos. Tienen marcadas en sombreado verde la región correspondiente al péptido señal, basandonos en el análisis realizado en el paso 7.4.1.1. La región no sombreada corresponde al prodominio del pre-propéptido. En sombreado azul podemos ubicar la región del péptido maduro, ubicando con asteriscos negros (*) las cisteínas (C), seguido de este subrayado en verde se encuentra el codón de paro (TGA), en sombreado rojo la región del UTR 3' y finalmente la cola de poli A. Cabe destacar que, además de la diferencia de tamaño de cada una de las secuencias (278, 281, 604 y 606pb), la secuencia AiHep2 posee solo 7 cisteínas en el péptido maduro y el resto posee 8, donde AiHep2 posee una tirosina (marcada con un asterisco rojo) en el lugar de la primer cisteína del péptido maduro del resto de las secuencias. Por otro lado, también resalta el hecho de los UTR 3' de AiHep1 y AiHep2 poseen un menor tamaño que los de AiHep3 y AiHep4.

```

1  X I C I L E S S A V P F T G V Q E L E E
1  ANTATTTGCATTTCTGGAGAGCTCTGCCGTCCCATTCACCGGGGTGCAAGAGCTGGAGGAG

21  A A S N D T P V A A Y Q E M S M E S R M
61  GCAGCGAGCAATGACACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCAATGGAATCGAGGATG

41  M P D H V R Q K R Q S H L S L C R W C C
121  ATGCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTGCCGCTGGTGCTGC

61  N C C R G N K G C G F C C K F -
181  AACTGCTGCAGAGGCAACAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTTCTGAAGAGATTTCCGC

241  AACAAACAACAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 27. Secuencia de AiHep1

```

1  X I C I L E S S A V P F T G V Q E L E E
1  ANTATTTGCATTCTGGAGAGCTCTGCCGTCCCATTCACCGGGTGCAAGAGCTGGAGGAG
21  A A S N D T P V A A Y Q E M S M E S R M
61  GCAGCGAGCAATGACACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCAATGGAATCGAGGATG
41  M P D H V R Q K R Q S H L S L Y R W C C
121  ATGCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTACCGCTGGTGCTGC
61  N C C R G N K G C G F C C K F -
181  AACTGCTGCAGAGGCAACAAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTCTGAAGAGATTCCGC

241  AACAACAACAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 28. Secuencia de AiHep2.

```

1  X I C I L E S S A V P F T G V Q E L E E
1  ANTATTTGCATTCTGGAGAGCTCTGCCGTCCCATTCACCGGGTGCAAGAGCTGGAGGAG
21  A A S N G T P V A A Y Q E M S M E S R M
61  GCAGCGAGCAATGGCACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCAATGGAATCGAGGATG
41  M P D H V R Q K R Q S H L S L C R W C C
121  ATGCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTGCCGCTGGTGCTGC
61  N C C R G N K G C G F C C K F -
181  AACTGCTGCAGAGGCAACAAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTCTGAAGAGTTTTTCTC

241  AACAACAACAACAACCAAAAAATATTAATTTATTACTCTTTTTTTTTTATCTTACCCCA
301  AGAAATGACCTTTTCTTGACCTTTTCTCCAATGCAGTCTTTGTTCTACACTGTTTTGTT
361  TTTATGATTCGTAGAGGAGCACTGGAAAAAATGAAGCCATTCTTATATTTATTTGTA
421  TGTTTTAATACTTTACCCTGTAAAGTCCTTTTTGTAAGCTCAATGATATGTAAATTAGT
481  TTCTAAAAATAATCCGGATGTGACCGTTTCTTCATCTAAATTGAGTCTAACAAGTTAATA
541  TTTGCTGCTGAATAAATAATGAACATTGAAGCAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
601  AAAAAA

```

Figura 29. Secuencia de AiHep3

```

1  X I C I L E S S A V P F T G V Q E L E E
1  ANTATTGGCAATCTGGAGAGCTCTGCCGTCCCAATCACCGGGGTGAAGAGCTGGAGGAG
21  A A S N D T P V A A Y Q E M S M E S R M
61  GCAGCGAGCAATGACACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCATGGAAATCGAGGATG
41  M P D H V R Q K R Q S H L S L C R W C C
121  ATGCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTGCCGCTGGTGCTGC
61  N C C R G N K G C G F C C K F -
181  AACTGCTGCAGAGGCAACAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTTCTGAAGAGATTCCGC

241  AACAAACAACAACAACCAAAAAAATAATTAATTTACTCTTTTTTTTTATCTTACCCCA
301  AGAAATGACCITTTCTTGACCTCTTCTCCAATGCAGTCTTTGTTCTACACTGTTTTGT
361  TTTATGATTTCGTAGAGGAGCACTGGAAAAAATGAAGCCATTCCTTATATTTATTTGTA
421  TGTITTAATACTTTACCCTGTAAAGTCCTTTTTGTAAGCTCAATGATATGTAATTAGT
481  TTCTAAAAATAATCCGGATGTGACCGTTTCTTCACTAAATGAGTCTAACAAGTTAATA
541  TTTGCTGCTGAATAAATAATGAACATTTGAAGCAACTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
601  AAAAAAA

```

Figura 30. Secuencia de AiHep4

7.6.2. Alineamiento múltiple de secuencias del RACE 3'

Cuando se alinearon estas cuatro secuencias, se pudo observar más a detalle diferencias entre estas. La figura 31, muestra en sombreado azul los nucleótidos o gaps que difieren con el resto de las secuencias. Como se puede observar existen diversos SNPs en las diferentes secuencias. El primer SNP muestra una SNP no-sinónimo que origina el cambio de glicina (G) por aspartato (D) en AiHep3 (ver figura 29). El segundo SNP no-sinónimo y sin duda el más relevante, fue el que ocasionó el posible cambio de citosina (C) a tirosina (Y) en la región del péptido maduro en la secuencia AiHep2 (ver figura 28). Los demás SNPs forman parte del UTR 3'. Por otro lado, el primer gap sombreado muestra una posible delección de tres nucleótidos (AAC) en la secuencia AiHep2 y los últimos gaps sombreado una posible inserción/delección de AiHep3 y AiHep 4.

```

AiHep1 TATTTGCATTCTGGAGAGCTCTGCCGTCCTCCATTACCCGGGGTGCAAGAGCTGGAGGAGGC 60
AiHep2 TATTTGCATTCTGGAGAGCTCTGCCGTCCTCCATTACCCGGGGTGCAAGAGCTGGAGGAGGC 60
AiHep3 TATTTGCATTCTGGAGAGCTCTGCCGTCCTCCATTACCCGGGGTGCAAGAGCTGGAGGAGGC 60
AiHep4 TATTTGCATTCTGGAGAGCTCTGCCGTCCTCCATTACCCGGGGTGCAAGAGCTGGAGGAGGC 60
*****

AiHep1 AGCGAGCAATGACACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCAATGGAATCGAGGATGAT 120
AiHep2 AGCGAGCAATGACACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCAATGGAATCGAGGATGAT 120
AiHep3 AGCGAGCAATGACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCAATGGAATCGAGGATGAT 120
AiHep4 AGCGAGCAATGACACTCCAGTTGCGGCATATCAAGAAATGTCAATGGAATCGAGGATGAT 120
*****

AiHep1 GCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTGCCGCTGGTGCTGCAA 180
AiHep2 GCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTGCCGCTGGTGCTGCAA 180
AiHep3 GCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTGCCGCTGGTGCTGCAA 180
AiHep4 GCCAGATCACGTCAGGCAGAAGCGCCAGAGCCACCTCTCGCTGTGCCGCTGGTGCTGCAA 180
*****

AiHep1 CTGCTGCAGAGGCAACAAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTTCTGAAGAGATTTCCGCAA 240
AiHep2 CTGCTGCAGAGGCAACAAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTTCTGAAGAGATTTCCGCAA 240
AiHep3 CTGCTGCAGAGGCAACAAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTTCTGAAGAGATTTCCGCAA 240
AiHep4 CTGCTGCAGAGGCAACAAAGGCTGCGGCTTCTGCTGCAAGTTCTGAAGAGATTTCCGCAA 240
*****

AiHep1 CAACAACAACAACCAA----- 256
AiHep2 CAACAACAACCAAAAA----- 256
AiHep3 CAACAACAACAACCAAAAAATATTAATTTATTACTCTTTTTTTTTTATCTTACCCCAAG 300
AiHep4 CAACAACAACAACCAAAAAATATTAATTTATTACTCTTTTTTTTTTATCTTACCCCAAG 300
*****

AiHep1 ----- 256
AiHep2 ----- 256
AiHep3 AAATGACCTTTTCTTGACCTCTTTCTCCAATGCAGTCTTTGTTCTACACTGTTTTGTTTT 360
AiHep4 AAATGACCTTTTCTTGACCTCTTTCTCCAATGCAGTCTTTGTTCTACACTGTTTTGTTTT 360

AiHep1 -----A----- 257
AiHep2 -----AA----- 258
AiHep3 TATGATTCTGATAGAGGAGCACTGGAAAAAATGAAGCCATTCTTATATTTATTTGTATG 420
AiHep4 TATGATTCTGATAGAGGAGCACTGGAAAAAATGAAGCCATTCTTATATTTATTTGTATG 420
*

AiHep1 ----- 257
AiHep2 ----- 258
AiHep3 TTTTAATACTTTCACCCGTGTAAGTCCTTTTGTAAGCTCAATGATATGTAAATTAGTTT 480
AiHep4 TTTTAATACTTTCACCCGTGTAAGTCCTTTTGTAAGCTCAATGATATGTAAATTAGTTT 480

AiHep1 ----- 257
AiHep2 ----- 258
AiHep3 CTAAAAATAATCCGGATGTGACCGTTTCTTCATCTAAATTGAGTCTAACAAGTTAATATT 540
AiHep4 CTAAAAATAATCCGGATGTGACCGTTTCTTCATCTAAATTGAGTCTAACAAGTTAATATT 540

AiHep1 -----AAAAAAAA--AA-A-AAAA-- 273
AiHep2 -----AAAAAAAAAAAA-A-AAAA-- 276
AiHep3 TGCTGCTGAATAAATAATGAACATTTGAAGCAA--CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 598
AiHep4 TGCTGCTGAATAAATAATGAACATTTGAAGCAACTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 600
*****

AiHep1 -AAAA 278
AiHep2 -AAAA 281
AiHep3 AAAAA 604
AiHep4 AAAAA 606
*****

```

Figura 31. Alineamiento múltiple de nucleótidos de AiHep1, AiHep2, AiHep3 y AiHep4.

7.6.3. Determinación del peso molecular, PI y Carga estimada a pH 7.0 de los péptidos maduros.

Las secuencias del péptido maduro de AiHep1, AiHep2, AiHep3 y AiHep4 fueron evaluadas también por algunas de sus características físico-químicas. La Tabla IX muestra los valores calculados de peso molecular, punto isoeléctrico y carga estimada a pH 7.0., donde AiHep1, AiHep3 y AiHep4 muestran los mismos valores en las tres características evaluadas, sin embargo, AiHep2 muestra un peso molecular y punto isoeléctrico diferente del resto.

Tabla IX. Peso molecular, punto isoeléctrico y carga estimada a pH 7.0 de los péptidos maduros deducidos de las secuencias del RACE 3'.

Hepcidina	Peso molecular	PI (punto isoeléctrico)	Carga estimada a pH 7.0
AiHep278	2957.5183	8.34	3.9
AiHep281	3017.5552	8.43	3.9
AiHep604	2957.5183	8.34	3.9
AiHep606	2957.5183	8.34	3.9

7.6.4. Alineamiento múltiple de hepcidinas de peces incluyendo las secuencias obtenidas del RACE 3'

Una vez analizadas a detalle las secuencias del RACE 3', un alineamiento múltiple de aminoácidos de hepcidinas de peces, nos dio un panorama más general. Para realizar dicho alineamiento se ajustaron las secuencias de las base de datos a las regiones obtenidas de las secuencias del RACE 3'. La figura 32 muestra el alineamiento, ubicando el sitio de corte del

péptido señal (A-V) y el sitio de corte del péptido maduro (R-Q). Pero principalmente este análisis nos permitió observar que la generalidad de las hepcidinas posee las 8 cisteínas (sombreadadas en rojo) en el péptido maduro que son características en hepcidina, sin embargo, como ya se había mencionado anteriormente AiHep2 solo posee 7 de estas cisteínas. Además, el alineamiento también muestra hepcidinas con 6 y 4 cisteínas. Cabe destacar que, un análisis a profundidad mostró que de las 6 secuencias que poseen solo 4 cisteínas, cuatro de estas correspondían a organismos que habitan en el océano antártico (*Notothenia angustata*, *Dissostichus mawsoni*, *Pogonophryne scotti* y *Gymnodraco acuticeps*).

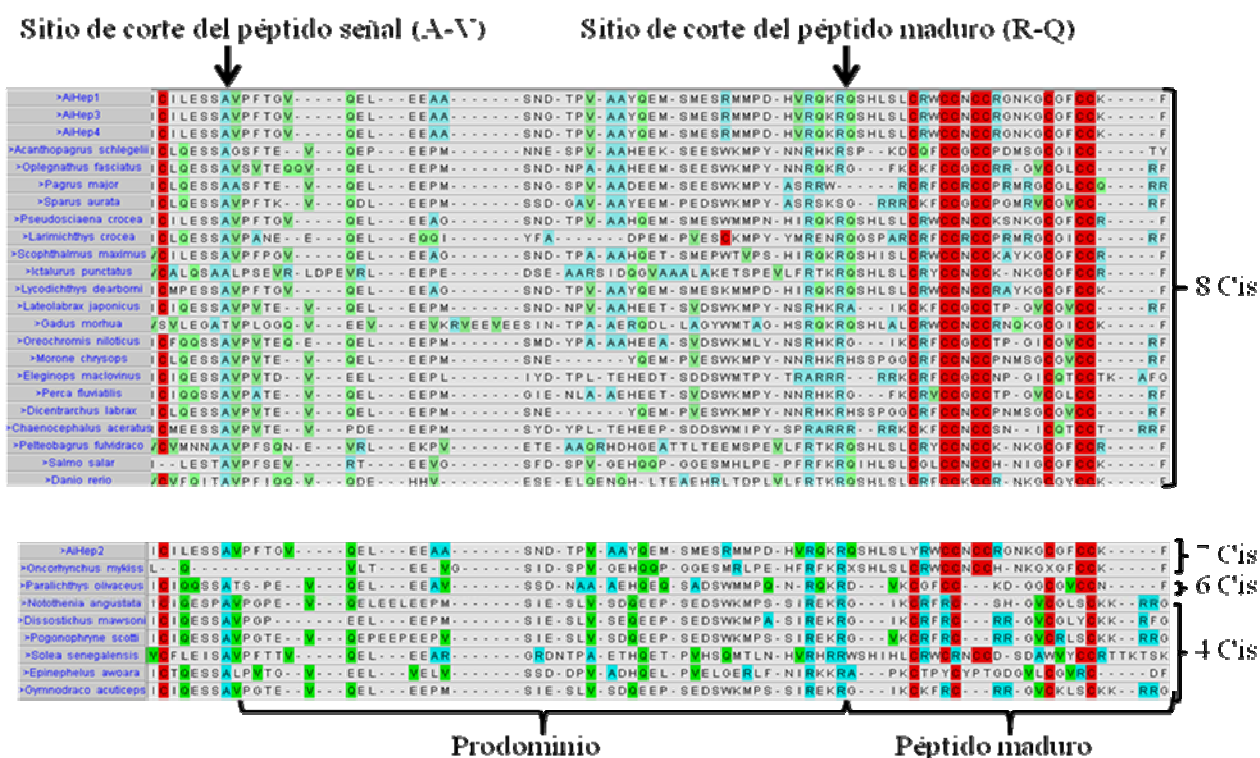


Figura 32. Alineamiento de hepcidinas de peces incluyendo las secuencias de *A. immaculatus*

7.6.5. Análisis filogenético.

Para el análisis filogenético también se usaron las secuencias de aminoácidos de hepcidina de peces ajustadas a las secuencias deducidas de aminoácidos de *A. immaculatus* obtenidas en el RACE 3'. La figura 33 muestra el árbol filogenético, el cual fue construido usando el método Neighbour-joining con deleciones por pares de Gaps (pairwise deletion of Gaps), usando secuencias de hepcidinas de mamíferos como outgroup. Los números en los nodos indican los valores del bootstrap obtenidos después de 1000 replicas. La escala del fondo hace referencia a los porcentajes de divergencias (p distance). Además, cada especie representada, adyacentemente tiene indicado el orden taxonómico al que pertenece (donde P=Perciformes, PL=Pleuronectiformes, SA=Salmoniformes, G=Gadiformes, C=Cypriniformes y SI=Siluriformes). También, se puede apreciar que el árbol muestra tres grandes clusters. El primero que agrupa a los Perciformes y Pleuronectiformes con un valor de bootstrap de 88, un segundo cluster que agrupa a los Salmoniformes, Gadiformes, Cypriniformes y Siluriformes con un valor de bootstrap de 82, y un tercer cluster que agrupa las secuencias de hepcidina de mamíferos con un valor de bootstrap de 100. Cabe destacar además, que las especies que poseen la descripción "P (ant)" hacen referencia a organismos Perciformes que habitan en el océano antártico, y el árbol filogenético muestra que estas especies son agrupadas en un mismo cluster con un valor del bootstrap de 100. Aunado a esto, en el análisis anterior se mencionó que estas 4 especies solo poseían 4 cisteínas en el péptido maduro.

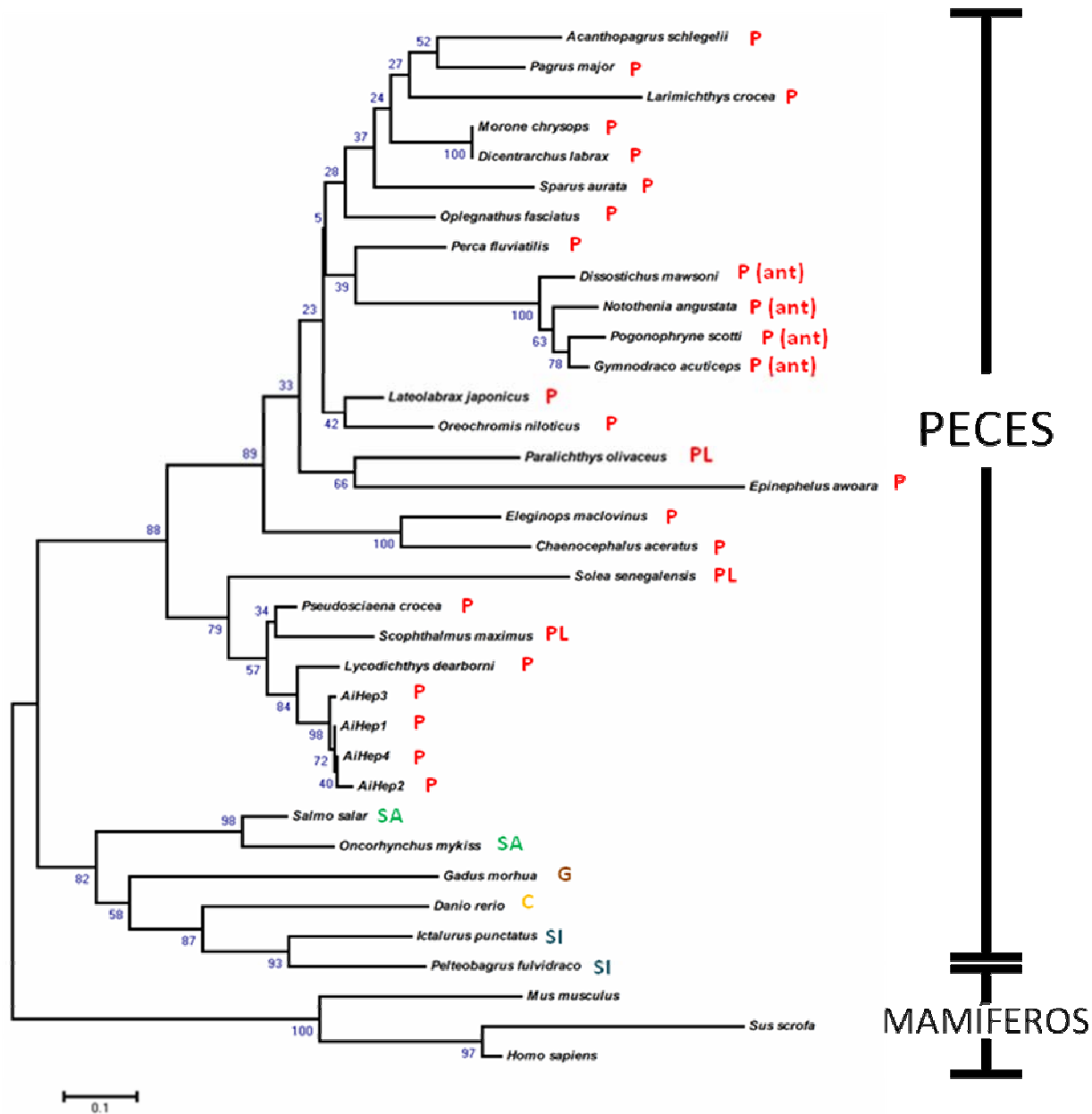


Figura 33. Árbol filogenético de secuencia de hepcidinas de peces y mamíferos basados en secuencia de aminoácidos.

8. DISCUSIÓN.

No cabe duda que ha existido un gran auge en la investigación de los AMPs, principalmente desde el descubrimiento de la cecropina el interés por este tipo de péptidos antibióticos a aumentado debido a su potencial terapéutico y a su importancia en el sistema inmune de los organismos. Hecpidina ha sido uno de los AMPs más estudiados en los últimos años, tal vez debido al hecho de que es un AMP ampliamente distribuido en los vertebrados. Por otro lado, piscidina es un AMP del cual existe relativamente poca información comparada con hepcidina. Desde que piscidina fue aislada en el lenguado *Pleuronectes americanus* y posteriormente en el híbrido de *M. chrysops* x *M. saxatilis*, estos han formado la base para la identificación de otros genes de piscidina (ver tabla III). Sin embargo, cabe resaltar que tanto para hepcidina como para piscidina la mayor fuente de identificación son las librerías de ADNc (Tabla II y III).

8.1. Identificación de hepcidina y piscidina.

Son pocos los trabajos que han empleado oligonucleótidos degenerados para identificar hepcidina y piscidina. Este trabajo logró identificar ambos AMPs con el uso de oligonucleótidos degenerados, por lo que dichos oligonucleótidos podrían ser empleados para identificar hepcidina y piscidina en otros peces. Para el diseño de estos oligonucleótidos fue muy importante el análisis a detalle de los alineamientos múltiples de aminoácidos y nucleótidos (ver figuras 5, 6, 7 y 8), lo cual nos permitió reconocer que regiones exactamente fueron tomadas para el diseño. En este caso fue la región del péptido señal la más conservada

en los alineamientos aminoacídicos y nucleotídicos de hepcidina y piscidina (ver figuras 5 y 6). Zanetti *et al.* (2000) y Patrzykat y Douglas (2003) y, mencionan que los AMPs son sintetizados como pre-pro-proteínas, con la región pre-pro generalmente conservada y con la porción antimicrobiana altamente diversa. Por esto, se considero adecuado diseñar los oligonucleótidos de la región del péptido señal para los oligonucleótidos en sentido forward y una región del prodominio para hepcidina y el comienzo del péptido maduro de piscidina para el sentido reverse. Cabe destacar que el orden del pre-pro-péptido de hepcidina es: péptido señal/prodominio/péptido maduro; en cambio para piscidina es péptido señal/péptido maduro/prodominio.

Si bien hepcidina es un AMP ampliamente distribuido en vertebrados, piscidina se consideraba como un AMP exclusivo de peces del orden Perciforme al considerar pleurocidina como un AMP diferente (Silphaduang *et al.*, 2006). No obstante, al recopilar secuencias relacionadas a piscidina para el alineamiento múltiple de aminoácidos pudimos observar que piscidina ha sido identificada también en organismos Pleuronectiformes y Syngnathiformes. Un estudio reciente realizó esta recopilación de piscidinas, y además identificó y caracterizó una nueva piscidina en *Gadus morhua*, un organismo perteneciente al orden de los Gadiformes, siendo este el cuarto orden de peces en los que se ha identificado piscidina (Fernandes *et al.*, 2010).

Como se puede observar en las figuras 11 y 12 los PCR's, los oligonucleótidos degenerados amplificaron los fragmentos esperados, y al secuenciar estos fragmentos se pudieron obtener los tamaños esperados de 143 y 113 pb para hepcidina y piscidina,

respectivamente (ver figura 15 y 19). Al alinear dichas secuencias con la base de datos de GenBank empleando el algoritmo de BLASTn del NCBI, hepcidina tuvo identidades exclusivamente con hepcidinas de peces (ver figura 16) y no con hepcidinas de algún otro vertebrado. Por su parte, la secuencia parcial de piscidina mostró identidades con piscidinas de tres especies del género *Epinephelus* (ver figura 20), el cual es un serránido de la misma subfamilia (Epinephelinae) a la que pertenece *A. immaculatus*.

En el análisis del sitio de corte del péptido señal en la secuencia parcial de hepcidina, ambos modelos empleados, redes neuronales (figura 17) y Modelos Markovianos Ocultos (figura 18) mostraron que el sitio más probable de corte era entre el residuo 24-25, es decir: SSA – VP. Esto concuerda con los sitios de corte encontrados en múltiples referencias de hepcidinas caracterizadas en peces (Lauth *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2006; Che *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009).

8.2. Análisis de expresión por qPCR.

Cuando se estudia la expresión de cualquier gen no cabe duda que es esencial conocer los perfiles basales que este pueda tener. No obstante, la mayoría de los estudios de expresión evalúan los efectos que distintas variables puedan tener sobre la expresión de estos genes, cambiando así sus perfiles basales de expresión. Los perfiles de expresión de los AMPs pueden ser modulados a diferentes tiempos bajo ciertos estímulos, ya sea durante el desarrollo larval o en organismos adultos. Elucidar los factores que controlan la expresión de los AMPs dirigirán a un mejor entendimiento de los varios roles que estos péptidos tienen en

los organismos hospederos, y generará una mejor evaluación de sus potenciales terapéuticos (Patrzykat y Douglas, 2003).

Este trabajo evaluó la expresión basal y la respuesta temprana (4 hrs post-inyección) de la expresión estimulada con LPS de hepcidina y piscidina en *A. immaculatus*. La estimulación con LPS ha sido ampliamente usada para emular infecciones bacterianas en peces (Pan *et al.*, 2008). Las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos (LPS) (Hancock *et al.*, 1995). Los AMPs pueden neutralizar los efectos estimulatorios de los LPS, disminuyendo así la capacidad de esta molécula de causar una sepsis dañina y un shock endotóxico (Gough *et al.*, 1996). De manera natural, cuando un AMP toma lugar en la membrana externa de una bacteria Gram-negativa inicialmente interactúa con los sitios de unión divalente en la superficie de los LPS, reemplazando estas uniones divalentes, y siendo más voluminosos que los cationes divalentes pudiendo causar deformaciones en la membrana externa de la bacteria, y en esta deformación los AMPs son capaces de pasar a través de la membrana (Patrzykat, 2001).

Los AMPs son considerados parte de la respuesta temprana contra infecciones e implica que estos pueden proveer protección antes de que la respuesta inmune especializada responda. Esto es debido a que no se requiere de una expansión clonal para la actividad y mecanismos sofisticados de reconocimiento de patógenos. De hecho, muchos factores, incluyendo varias bacterias o productos de bacterias como los LPS, y citokinas proinflamatorias pueden inducir la producción de AMPs (Patrzykat, 2001).

Debido a que el diseño de los oligonucleótidos para qPCR fue a partir de la secuencia obtenida con los oligonucleótidos degenerados (figura 14) y que de esta solo 78pb eran compartidos con las cuatro secuencias obtenidas del RACE 3' no pudimos adjudicar dichos valores de expresión a ninguna de estas de manera particular. Sin embargo al analizar las secuencias en la figura 31, tampoco podemos identificar regiones lo suficientemente grandes y variables como para diseñar oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes de hepcidina identificados en el RACE 3'. Por lo ya mencionado, es posible que los valores de expresión dados en este trabajo representen a los cuatro genes de hepcidina de *A. immaculatus* identificados aquí.

Al igual que en hepcidina, en piscidina se empleó la región parcial obtenida con oligonucleótidos degenerados para la evaluación de expresión por qPCR. Existen reportes de múltiples copias genómicas de pleurocidina en *Pseudopleuronectes americanus* (Douglas *et al.*, 2003b). Por esto, si fuera el caso, al igual que en hepcidina estaríamos evaluando posiblemente la expresión de distintos genes de piscidina en el mismo análisis.

8.2.1. Expresión basal de hepcidina

En el análisis de expresión basal de hepcidina el tejido con menor expresión y a su vez empleado como referencia fue intestino. Como se puede observar en la figura 21 la expresión basal mostró altos valores en hígado, lo cual coincide con la generalidad en la mayoría de los vertebrados (Park *et al.*, 2001; Pigeon *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008). En peces esta abundante expresión de hepcidina en hígado ha sido observada en

Chrysophrys major, *Pseudopleuronectes americanus*, *Ictalurus punctatus*, *Acanthopagrus schlegelii*, *Scophthalmus maximus*, *Gadus morhua*, *Sebastes schlegelii*, entre otros (Douglas *et al.*, 2003a; Bao *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Solstad *et al.*, 2008). Sin embargo, se han encontrado variantes de hepcidina que no siguen este patrón de expresión abundante en hígado. Un caso particular de esta, es la hepcidinas tipo II encontrada en *P. americanus*, la cual no presentó expresión basal detectable de hepcidina en hígado (Douglas *et al.*, 2003a).

Otro tejido que mostró una alta expresión basal de hepcidina fue músculo, el cual ha sido evaluado en pocos estudios. Dentro de las especies que se ha evaluado esta, se encuentran *S. schlegelii*, *I. punctatus*, *C. major*, *S. salar*, entre otros (Douglas *et al.*, 2003a; Bao *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Por otro lado, un estudio realizado en *S. maximus* por Chen *et al.* (2007) mostró expresiones basales indetectables de hepcidina en músculo.

Por su parte, el bazo, el tercer tejido de mayor expresión, es un tejido que ha mostrado expresiones basales medias comparadas con la abundante expresión en hígado (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007). En *I. punctatus* el bazo presentó las expresiones de hepcidina más elevadas junto con hígado (Bao *et al.*, 2005). Sin embargo, *P. americanus* no mostró expresiones basales en ninguno de los tres transcritos evaluados (Hepcidina tipo I, II y III) en bazo (Douglas *et al.*, 2003a).

8.2.2. Expresión diferencial control-tratamiento de hepcidina

Si bien hepcidina fue nombrada así por su origen hepático, se ha visto que esta expresión como en muchos otros genes puede verse modulada ante distintos estímulos en los tejidos que la expresan.

Al observar la figura 22, lo primero que resalta es el hecho que las mayores expresiones se dieron en intestino y bazo. Contrariamente, la expresión basal de intestino fue la más baja de todos los tejidos muestreados (figura 21). Esto hace resaltar el hecho de que hepcidina juega un rol importante en infecciones en intestino. Sabemos que las principales fuentes de entrada de microorganismos son los tejidos con epitelio, como el intestino, el cual además de encargarse de la absorción de nutrientes, actúa como barrera de superficie mediante una serie de mecanismos que limitan la entrada de agentes patógenos (Schröder, 1999; Fernández *et al.* 2002b).

Esta sobre expresión de hepcidina en intestino y bazo inducida por LPS se ha visto reportada en *O. mossambicus*, alcanzando su mayor expresión a las 6 hrs. post-inyección de LPS en ambos tejidos (Huang *et al.*, 2006). En *P. olivaceus* una de las dos hepcidinas caracterizadas (HepJF1) se vio fuertemente sobre expresada en riñón cefálico, alcanzando su mayor expresión a las 24hrs (Hirono *et al.* 2005).

La expresión de hepcidina en hígado permaneció constante tanto en el control como en el tratamiento, debido a que no existió un cambio significativo en el nivel de expresión relativa. No obstante, en organismos de *P. olivaceus* estimulados con LPS, la expresión en

hígado de dos tipos de hepcidina, Hep.JF1 y Hep.JF2, se incrementó en 10^4 y 10 veces, respectivamente, a las 6 hrs. post-inyección (Hirono *et al.*, 2005).

En cuanto a la estimulación con LPS de la expresión de hepcidina en bazo (el tercer tejido con mayor expresión), esta ya ha sido reportada en *P. olivaceus* y *P. crocea* alcanzando su mayor expresión a las 24 hrs. post-inyección (Kim *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009).

8.2.3. Expresión basal de piscidina

Existen relativamente escasos estudios donde se evalúa la expresión basal de piscidina, la mayoría de los pocos trabajos de expresión existentes se han enfocado en evaluar la expresión en organismos retados con LPS u organismos patógenos (Douglas *et al.*, 2003b; Sun *et al.*, 2007).

En el análisis de expresión basal piscidina el tejido que fue usado como referencia dada su baja expresión fue músculo, y comparada con este, los tejidos con mayor expresión fueron riñón cefálico y bazo con expresiones (figura 23). Estos tejidos son los principales tejidos linfoides, ya que los peces carecen de médula ósea y nódulos linfáticos (Patrzykat *et al.* 2001). Un estudio en *D. labrax* realizado con hibridación *in situ* por Salerno *et al.* (2007), mostró que dicentrina se expresó en un 68-71% de células sanguíneas separadas de riñón cefálico y cavidad peritoneal.

Solo dos trabajos han evaluado la expresión basal de piscidina. El primero fue realizado por Douglas *et al.* (2003b) en *P. americanus*, evaluando la expresión tejido-

específico de cuatro diferentes genes de pleurocidinas (WFYT, WFX, WF1-like y WF2), donde solo WFYT mostró expresiones en bazo, ya que riñón cefálico no fue evaluado. Las cuatro pleurocidinas mostraron la mayor expresión en piel. Por su parte, en *A. immaculatus* piel fue el cuarto tejido con mayor expresión basal de piscidina. El segundo trabajo fue el realizado por Sun *et al.* (2007), los cuales en *S. chuatsi* mostraron que al igual que en *A. immaculatus* el tejido con mayor expresión de piscidina fue riñón cefálico, y bazo como el cuarto tejido con mayor expresión de los nueve tejidos muestreados en *S. chuatsi*.

8.2.4. Expresión diferencial control-tratamiento de piscidina

De manera similar que en hepcidina, piscidina mostró que la expresión más alta se dio en el tejido que basalmente mostró menos expresión, este tejido fue músculo (figura 24). No existe ningún reporte que haya evaluado la expresión de piscidina en musculo estimulado con LPS u algún organismo patógeno. El único reporte existente es el Douglas *et al.* (2003b), quienes evaluaron la expresión basal de pleurocidina, donde esta se vio expresada en músculo en tres de los cuatro genes de pleurocidina evaluados.

Por otro lado, el segundo tejido con mayor expresión fue riñón cefálico. Este ha sido evaluado en *S. chuatsi* por Sun *et al.* (2007), observando que piscidina se sobre expresa significativamente en riñón cefálico en organismos inyectados con LPS muestreados 48 hrs. post-inyección.

8.3. Análisis de las secuencias de hepcidina del RACE 3'

De las cuatro secuencias obtenidas del RACE 3' (AiHep1, AiHep2, AiHep3 y AiHep4), todas obtuvieron altos porcentajes de identidad y cobertura para genes de hepcidina de peces. La primera característica que las diferenció fue el tamaño de cada una de estas, donde las AiHep1 y AiHep2 solo tenían una diferencia de 3pb, con 278 y 281pb, respectivamente; de manera similar, AiHep3 y AiHep4 tenían una diferencia de 2pb, con 604 y 606p, respectivamente.

Previamente ya se había identificado la región del sitio de corte del péptido señal (ver figura 17 y 18), lo cual nos ayudó junto con los alineamientos múltiples de aminoácidos de hepcidinas (figura 5) a ubicar cada una de las regiones del pre-pro-péptido (péptido señal-prodominio-péptido maduro) de estas cuatro secuencias (ver figuras 27, 28, 29 y 30).

Analizando más a detalle cada una de las secuencias se encontraron diferencias que nos hace suponer que estas cuatro secuencias podrían provenir de cuatro diferentes genes de hepcidina. Analizando el alineamiento nucleotídico de estas cuatro secuencias (ver figura 31) y las secuencias deducidas de las mismas podemos observar una diferencia de AiHep3 (ver figura 29) con el resto de las secuencias, donde un posible SNP no sinónimo produjo un cambio de una glicina por un aspartato en la región del prodominio. Al comparar AiHep1 y AiHep2 (de tamaño similar), en la figura 31 podemos observar una posible inserción/delección (AAC) en la parte final del UTR 3' mostrada por un triple gap. Pero sin duda, la característica más relevante es el posible SNP no sinónimo de AiHep2, el cual ocasionó la sustitución de la primera citosina por una tirosina en el péptido maduro (ver figura

28). Este cambio es relevante ya que si bien existen reportes de hepcidinas con menos de 8 cisteínas en el péptido maduro (los cuales dan origen a cuatro enlaces disulfuro) la generalidad de estas, es poseer ocho cisteínas (Krause *et al.*, 2000; Bayne *et al.*, 2001; Hirono *et al.*, 2005). La figura 32, muestra distintas hepcidinas de peces, donde la gran mayoría de estas poseen ocho cisteínas en el péptido maduro, no obstante, en GenBank hay registro de hepcidinas de 7, 6 y 4 cisteínas. Por su parte, AiHep3 y AiHep4 muestran dos gaps (posible inserción/delección) en medio de dos posibles SNP's justo en la parte final del UTR 3' (ver figura 31).

Un punto importante que cabe destacar, es que en todas la hepcidinas caracterizadas en peces, la región completa del péptido maduro y del UTR 3' se ubican en el tercer y último exón del gen (Shike *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003; Shike *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Solstad *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), por lo que considerando que las cuatro secuencias obtenidas provenían de ARN de un solo individuo, cualquier diferencia en estas regiones podrían indicar que dichos ADNc provienen de diferentes genes, en caso de no existir un splicing alternativo para este exón en particular. Solo existe un reporte de un posible splicing alternativo para hepcidina en peces realizado por Cho *et al.* (2009) en *Oplegnathus fasciatus* basados en una suposición por la delección de dos residuos (Glicina-Glicina), no obstante, dicho splicing nunca fue confirmado. Por otro lado, existen evidencias de splicing alternativo en LEAP-2 (de sus siglas en inglés, "liver expressed antimicrobial peptide"), el cual es el segundo AMP encontrado que se expresa predominantemente en el hígado. Este fue aislado al igual que hepcidina de ultrafiltrados de

sangre de humano (Krause *et al.*, 2003). Cabe recordar que hepcidina también es llamada LEAP-1, por haber sido primeramente descubierta. LEAP-2 al igual que hepcidina está organizado de tres exones y dos intrones, no obstante, en LEAP-2 la región del péptido maduro se encuentra compartida entre el segundo y tercer exón. Además, LEAP-2 no exhibe similitud en su secuencia primaria y patrones de enlaces disulfuro con cualquier péptido conocido. En peces LEAP-2 solo ha sido reportado en tres especies de peces dulceacuícolas: *O. mykiss*, *I. punctatus* y *C. idella* (Krause *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010).

Por todo lo ya mencionado podemos suponer que las cuatro secuencias obtenidas del RACE 3' podrían provenir de copias distintas de hepcidina, ya que no existe evidencia fehaciente de splicing alternativo en hepcidina de peces. En cambio existe abundante evidencia de duplicación génica de hepcidina en peces, como por ejemplo: en *P. olivaceus* con dos copias (Hirono *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005); en *S. schlegelii* con dos copias (Kim *et al.*, 2008); en *A. schlegelii* con cuatro copias (Yang *et al.*, 2007); en *O. fasciatus* con cuatro copias (Cho *et al.*, 2009); entre otros. En este contexto, Padhi y Verghese (2007), mencionan que debido a la interacción directa de los AMPs con patógenos, estos péptidos han tenido que evolucionar adaptativamente a través de una acelerada tasa de sustitución de aminoácidos para combatir patógenos nuevos o alterados. También se ha sugerido que múltiples copias de secuencias de AMPs estructuralmente relacionados han evolucionado por duplicación de genes, y que su rápida divergencia funcional entre estas múltiples copias podría estar asociada con una acelerada tasa de sustitución de aminoácidos entre la

duplicación de genes. Por su parte Xu *et al.* (2008), mencionan que la expansión taxonómica específica de variantes de hepcidina, indica que la duplicación y diversificación de los genes de hepcidina juega un rol importante en la respuesta evolutiva a diversas condiciones ecológicas.

Al final, el hecho de que las cuatro secuencias obtenidas para *A. immaculatus* provengan de cuatro genes de hepcidina diferentes solo podrá ser confirmado con la caracterización genómica completa de cada uno de los genes y el análisis de sus regiones genómicas flanqueantes. Un análisis de hibridación southern nos podría dar una aproximación de cuantas copias de hepcidina existen en *A. immaculatus*.





A nivel proteico, el análisis de las características fisicoquímicas estimadas muestran que AiHep2 difiere del resto (AiHep1, AiHep3 y AiHep4), ya que posee un peso molecular y un punto isoeléctrico diferente (ver tabla IX), debido a la sustitución de cisteína por tirosina, la cual es la única diferencia en el péptido maduro de las cuatro secuencias.



Un panorama más general nos ha mostrado que las cuatro secuencias de hepcidinas de *A. immaculatus*, se encuentra agrupadas en un mismo cluster dentro del cluster de hepcidinas de perciformes y pleuronectiformes (ver figura 33).

Al analizar más detalladamente cada una de las especies involucradas en el árbol filogenético (ver figura 33) se observó que las cuatro especies Antárticas, *N. angustata*, *D. mawsoni*, *P. scotti* y *G. acuticeps* se encontraban agrupadas en un mismo cluster con un valor de bootstrap de 100. Por otro lado, la figura 32 muestra que las cuatro secuencias del péptido maduro de hepcidina de estos organismos presentan solo cuatro cisteínas, lo cual, no las

agrupa dentro de la generalidad de las hepcidinas de peces. Xu *et al.*, (2008) caracterizaron la diversidad de genes de hepcidina de peces notothenioideos del Antártico, los cuales son organismos endémicos de las aguas marinas más frías y ricas en oxígeno del mundo. Estos peces poseen al menos cuatro variantes de hepcidina en dos tipos estructuralmente distintivos. Un tipo I que comprende tres variantes de ocho cisteínas y un tipo II de cuatro cisteínas, siendo este último capaz de producir solo dos enlaces disulfuro. Se ha sugerido que estas variantes de cuatro cisteínas han tenido una evolución adaptativa en respuesta al ambiente polar.

9. CONCLUSIONES

-  Basados en los porcentajes de similitud se han obtenido dos secuencias parciales de Hecpidina y Piscidina, utilizando oligonucleótidos degenerados.
-  Debido a que la región del péptido señal de ambos AMP es la mas conservada, es el sitio óptimo para tratar de obtener nuevas secuencias de otros organismos mediante el uso de oligonucleótidos degenerados.
-  Si existe una expresión diferencial entre tejidos tanto para hepcidina como para piscidina. Y ambos AMPs cambian sus perfiles de expresión al ser estimulado con LPS.
-  Aunque son muy pocos los estudios que han usado qPCR, no cabe duda, que se requieren estudios más detallados que nos digan mas de los perfiles de expresión de cada uno de estos genes, ya que cada uno se puede verse o no inducido por distintos estímulos a distintos tiempos.

-  Basados en los porcentajes de similitud se han obtenido cuatro secuencias de ADNc de hepcidina, las cuales podrían provenir de cuatro diferentes genes de hepcidina, no obstante, para confirmar esto la caracterización genómica de cada una debe ser llevada a cabo
-  Solo tres de las cuatro secuencias de hepcidina poseían las 8 cisteínas características de las hepcidinas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Austin, B. y McIntosh, D. 1988. Natural antimicrobial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 11: 275-277.

Bao, B., Peatman, E., Li, P., He, C. y Liu, Z. 2005. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection. *Developmental and Comparative Immunology.* 29: 939–950

Bao, B., Peatman, E., Xu, P., Li, P., Zeng, H., He, C., Liu, Z. 2006. The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated. *Molecular Immunology.* 43: 367–377.

Bayne, C., Gerwick, L., Fujiki, K., Nakao, M. y Yano, T. 2001. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology.* 25(3): 205-217.

Bernstein, R., Schluter, S., y Marchalonis, J. 1998. Immunity In The Physiology of Fishes. 2ª Ed. Evans D.H. CRC Press. E.U.A. 215-242pp.

Boman, H. 1995. Peptide Antibiotics and Their Role In Innate Immunity. *Annu. Rev. immunol.* 13:61-92pp.

Boman, H. 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunology. Review.* 173: 5-16.

Boman, H. 2003. Antibacterial Peptides: Basic Facts and Emerging Concepts. *Journal of internal Medicine.* 254: 197-215.

Brogden, K. 2005. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Methabolic Inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology.* 3: 238-250.

Bulet, P., Dimarcq, J., Hetru., C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorselaer, A. y Hoffman, J. 1993. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.* 268: 14893-14897.

Chen, J., Lin, W. y Lin, T. 2009. A fish antimicrobial peptide, tilapia hepcidin TH2-3, shows potent antitumor activity against human fibrosarcoma cells. *Peptides.* 30: 1636–1642.

Che, S., Li, W., Meng, L., Sha, Z., Wang, Z. y Ren, G. 2007. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 172-181.

Chen, S., Xu, M., Ji, X., Yu, G. y Liu, Y. 2005. Cloning, Characterization, and Expression Analysis of Hepcidin Gene from Red Sea Bream (*Chrysophrys major*). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 49(4): 1608–1612.

Chinchar, V., Bryan, L., Silphadaung, U., Noga, E., Wade, D. y Rollins-Smith, L. 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology*. 323: 268–275.

Cho, Y., Lee, S., Kim, K., Kim, S., Kim, D. y Nam, Y. 2009. Gene structure and differential modulation of multiple rockbream (*Oplegnathus fasciatus*) hepcidin isoforms resulting from different biological stimulations. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 46–58.

Cole, A., Darouiche, R., Legarda, D., Connell, N. y Diamond, G. 2000. Characterization of a Fish Antimicrobial Peptide: Gene Expression, Subcellular Localization, and Spectrum of Activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44(8): 2039–2045.

Cole, A., Weis, P. y Diamond. 1997. Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of the Winter Flounder. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(18): 12008-12013.

Colorni, A., Ullal, A., Heinisch, G. y Noga, E. 2008. Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. *Journal of Fish Diseases*. 31: 423-432.

Cuesta, A., Meseguer, J. y Esteban, M. 2008. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Molecular immunology*. 45: 2333-2342.

De Gray, G., Rajasekaran, K., Smith, F, Sanford, J y Daniell, H. 2001. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol*. 127: 852-862.

Dixon, B. y Stet, R. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev. & Comp. Immunol*. 25(8-9): 683-699.

Douglas, S., Gallant, J., Gong, Z. y Hew, C. 2001. Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Developmental and comparative immunology*. 25(2): 137-147.

Douglas, S., Gallant, J., Liebscher, R., Dacanay, A. y Tsoi, S. 2003a. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 589–601.

Douglas, S., Patrzykat, A., Pytyck, J. y Gallant, J. 2003b. Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Eur. J. Biochem*. 270: 3720–3730.

Dunham, R., Warr, G., Nichols, A., Duncan, P., Argue, B., Middleton, D. y Kucuktas, H. 2002. Enhanced Bacterial Disease Resistance of Transgenic Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Possessing Cecropin Genes. *Marine Biotechnology*. 4: 338-344.

Fao, 1993. *FAO Fisheries Synopsis*, GROUPERS OF THE WORLD. 125 (16): 21-22.

Fehlbaum, P., Rao, M., Zasloff, M. y Anderson, G. 2000. An essential amino acid induces epithelial β -defensin expression. *Proc. Natl Acad. Sci*. 97: 12723-12728.

Fernandes, J., Ruangsri, J. y Kiron, V. 2010. Atlantic Cod Piscidin and Its Diversification through Positive Selection. *PLoS ONE*. 5(3): 1-7.

Fernández, A., de Blas, I. y Ruiz, I. 2002a. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *AquaTIC*. 16.

Fernández, A., de Blas, I. y Ruiz, I. 2002b. El sistema inmune de los teleósteos (I): Respuesta inmune inespecífica. *AquaTIC*. 17.

Fernandez de Caleyá, R., Gonzalez, B., Garcia, F. y Carbonero, P. 1972. Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins In Vitro. *APPLIED MICROBIOLOGY*, 23(5): 998-1000.

Fisher, N., Redman, D. y Elton, G. 1968. Fractionation and characterization of purothionin. *Cereal chemistry*. 45: 48-57.

Fouz, B., Devesa, S., Gravningen, K., Barja, J. y Tranzo, A. 1990. Antibacterial Action of the Mucus of the Turbot. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 10:56-59pp.

Fu, Y., Li, S., Wu, Y. y Chang, Y. 2007. Identification and expression analysis of hepcidin-like cDNAs from pigeon (*Columba livia*). *Mol Cell Biochem.* 305: 191–197.

Ganz, T., Selsted, M., Szklarek, D., Harwing, S., Daher, K., Bainton, D. y Lehrer, R. 1985. Defensins, natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76: 1427-1435.

Gough, M., Hancock, R. y Kelly, N. 1996. Antiendotoxin Activity of Cationic Peptide Antimicrobial Agents. *Infection and immunity*. 64(12): 4922-4927.

Haynie, S., Crum, G. y Doele, B. 1995. Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39: 301-307.

Hancock, R. y Diamond, G. 2000. The role of the cationic antimicrobial peptide in innate host defences. *Trends in Microb*. 8(9): 402-410.

Hancock, R., Falla, T. y Brown, M. 1995. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microbial Phys*. 37: 135-175.

Hancock, R. y Scott, M. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS*. 97(16): 8856-8861.

Hilton, K. y Lambert, L. 2008. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates. *Gene*. 415: 40-48.

Hirata, M., Shimomura, Y., Yoshida, M., Morgan, J., Palings, I., Wilson, D., Yen, M., Wright, S. y Larry, J. 1994. Characterization of a Rabbit Cationic Protein (CAP18) with Lipopolysaccharide-Inhibitory Activity. *Infection and immunity*. 62(4):1421-1426.

Hirono, I., Hwang, J., Ono, Y., Kurobe, T., Ohira, T., Nozaki, R. y Aoki, T. 2005. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *FEBS Journal*. 272: 5257–5264.

Hu, X., Ward, C., Aono, S., Lan, L. Dykstra, C., Kemppainen, R., Morrison, E. y Shi, J. 2008. Comparative analysis of *Xenopus tropicalis* hepcidin I and hepcidin II genes. *Gene*. 426 (1-2): 91-97.

Huang, Y., Nordeen, R., Di, M., Owens, L. y McBeath, J. 1997. Expression of an Engineered Cecropin Gene Cassette in Transgenic Tobacco Plants Confers Disease Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*. *Molecular Plant Pathology*. 87(5): 494-499.

Huang, P., Chen, J. y Kuo, C. 2007. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. *Mol. Immunol.* 44: 1922–1934.

Jia, X., Patrzykat, A., Devlin, R., Ackerman, P., Iwama, G. y Hancock, R. 2000. Antimicrobial Peptides Protect Coho Salmon from *Vibrio anguillarum* Infections. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5): 1928–1932.

Kim, Y., Hong, S., Nam, B., Lee, J., Kim, K. y Lee, S. 2005. Molecular cloning and expression analysis of two hepcidin genes from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69(7): 1411-1414.

Kim, Y., Park, E., Nam, B., Kong, H., Kim, W. y Lee, S. 2008. Identification and molecular characterization of two hepcidin genes from black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Mol Cell Biochem.* 315: 131–136.

Krause, A., Neitz, S., Magert, H., Schulz, A., Forssmann, W., Shuz-Knappe, P. *et al.* 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded Human Peptide, Exhibits Antimicrobial Activity. *FEBS Lett.* 480: 147-150.

Krause, A., Sillard, R., Kleemeier, B., Klüver, E., Maronde, E., Conejo-García, J., Forssmann, W., Schulz-Knappe, P., Nehls, M., Wattler, F., Wattler, S. y Adermann, K. 2003. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. *Protein Science.* 12:143–152.

Kuby, J. 1994. *Immunology*. 2a Edición. H. Freeman and Company Press. E.U.A. 660.

Lauth, X., Babon, J., Stannard, J., Singh, S., Nizet, V., Carlberg, J., Ostland, V., Pennington, M., Norton, R. y Westerman, M. 2005. Bass Hepcidin Synthesis, Solution Structure, Antimicrobial Activities and Synergism, and *in Vivo* Hepatic Response to Bacterial Infections. *The journal of biological chemistry*. 280 (10): 9272-9282.

Lauth, X., Shike, H., Burns, J., Westerman, M., Ostland, V., Carlberg, J., Van Olst, J., Nizet, V., Taylor, S., Shimizu, C. y Bulet, P. 2002. Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass. *The Journal of the Biological Chemistry*. 277(7): 5030-5039.

Lazarovici, P., Primor, N. y Loew, L. 1986. Purification and Pore-forming Activity of Two Hydrophobic Polypeptides from the Secretion of the Red Sea Moses Sole (*Pardachirus marmoratus*). *The journal of biological chemistry*. 261(35): 16704-16713.

Lijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T. y Nakai, T. 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysophysin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Eur. J. Biochem*. 270: 675–686.

Liu, F., Li, J., Yue, G., Fu, J., Zhou, Z. 2010. Molecular cloning and expression analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in grass carp. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 133: 133–143.

Maloy, W. y Kari, U. 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*. 37: 105-122.

Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1462: 1-10.

Nemeth, E., Valore, E., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A. y Ganz, T. 2003. Heparin, a putative mediator of anaemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 101: 2461–2463.

Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, L., Beaumont, C., Grandchamp, B. Kahn, A. y Vaulont, S. 2001. Lack of Heparin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 8780-8785.

Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Dannan, J., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A. y Vaulont, S. 2002. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 110(7): 1037-1044.

Noga, E. y Silphaduang, U. 2003. Piscidins: A novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug news perspect*. 16(2): 87-92.

Oren, Z. y Shai, Y. 1996. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur. J. Biochem*. 237: 303-310.

Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R., Kay, W. y Misra, S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*. 18: 1162-1166.

Padhi, A., Verghese, E. 2007. Evidence for positive Darwinian selection on the hepcidin gene of Perciform and Pleuronectiform fishes. *Mol Divers*. 11: 119–130.

Pan, C., Chen, J., Ni, I., Wu, J., Kuo, C. 2008. Organization and promoter analysis of the grouper (*Epinephelus coioides*) epinecidin-1 gene. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 150: 358–367.

Park, C., Lee, J., Park, I., Kim, M. y Kim, S. 1997. A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS*. 411: 173-178.

Park, I., Park, C., Kim, M. y Kim, S. 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS*. 437: 258-262.

Park, C., Valore, E., Warning, A. y Ganz, T. 2001. Hepcidin, an urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 7806-7810.

Patrzykat, A. 2001. Isolation, design, and biological properties of fish-derived cationic antimicrobial peptides. Thesis for Doctorate of Philosophy. *The University of British Columbia*, Canada. 192.

Patrzykat, A., Zhang, L., Mendoza, V., Iwama, G. y Hancock, R. 2001. Synergy of Histone-Derived Peptides of Coho Salmon with Lysozyme and Flounder Pleurocidin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45(5): 1337–1342.

Patrzykat, A., Gallant, J., Seo, J., Pytyck, J. y Douglas, S. 2003. Novel Antimicrobial Peptides Derived from Flatfish Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(8): 2464-2470.

Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. y Loréal, O. 2001. A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Hepcidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *The journal of biological chemistry*. 276(11): 7811–7819.

Ren, H., Wang, K., Zhou, H. y Yang, M. 2006. Cloning and organisation analysis of a hepcidin-like gene and cDNA from Japan sea bass, *Lateolabrax japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 21(3): 221-227.

Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R. y Tsutsumi, V. 2006. Péptido Antimicrobianos en la Inmunidad Innata de Enfermedades Infecciosas. *Salud Publica de México*. 48 (1): 62-71.

Rodrigues, P., Vázquez, S., Neves, J. y Wilson, J. 2006. Dual function of fish hepcidin: Response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 1156-1167.

Ruiz, I., Fernández, A. y de Blas, I. 2003. El sistema inmune de los teleósteos (IV): Principales factores que afectan a la respuesta inmune. *AquaTIC*. 19:1-7.

Salerno, G., Parrinello, N., Roch, P. y Cammarata, M. 2007. cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146: 521–529.

Sarmasik, A. 2002. Antimicrobial Peptides: A Potential Therapeutic Alternative for the Treatment of Fish Diseases. *Turk J Biol*. 26: 201-207.

Sarmasik, A., Warr, J. y Chen, T. 2002. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol*. 4: 310-322.

Schröder, J. 1999. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell. Mol. Life Sci*. 56: 32–46.

Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1462: 55-70.

Shi, J y Camus, A. 2006. Hecidins in Amphibians and Fishes: Antimicrobial Peptides or Iron-Regulatory Hormones?. *Developmental and Comparative immunology*. 30: 746-755.

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

Shike, H., Lauth, X., Westerman, M., Ostland, V., Carlberg, J., Olst, J., Shimizu, C., Bulet, P. y Burns, J. 2002. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur. J. Biochem.* 269: 2232–2237.

Silphaduang, U., Colorni, A. y Noga, E. 2006. Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of aquatic organisms*. 72: 241–252.

Silphaduang, U. y Noga, E. 2001. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*. 414: 268-269.

Simmaco, M., Mignogna, G. y Barra, D. 1998. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?. *Biopolymers*. 47: 435-450.

Solstad, T., Larsen, A., Seppola, M. y Jorgensen, T. 2008. Identification, cloning and expression analysis of a hepcidin cDNA of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 298-310.

Srinivasulu, B., Syvitski, R., Seo, J., Mattatall, N., Knickle, L, y Douglas, S. 2008. Expression, purification and structural characterization of recombinant hepcidin, an antimicrobial peptide identified in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Protein expression and purification*. 61: 36–44.

Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. y Boman, H. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 292: 246-268.

Sun, B., Xie, H., Song, Y. y Nie, P. 2007. Gene structure of an antimicrobial peptide from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins. *Journal of fish diseases*. 30: 335-343.

Sung, W. y Lee, D. 2008. Pleurocidin-derived antifungal peptides with selective membrane-disruption effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 369: 858–861.

Sung, W., Lee, J. y Lee, D. 2008. Fungicidal effect and the mode of action of piscidin 2 derived from hybrid striped bass. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371: 551–555.

Thune, R., Stanley, L. y Cooper, R. 1993. Pathogenesis of Gram-Negative Bacterial Infections in Warmwater Fish. *Annual Rev. Fish Diseases*. 37-68.

Uzzell, T., Stolzenberg, E., Shinnar, A. y Zasloff, M. 2003. Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides*. 24(11): 1655-1667.

Wang, K., Cai, J., Cai, L., Qu, H., Yang, M. y Zhang, M. 2009. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. *Peptides*. 30: 638–646.

Wang, L. y Wu, X. 2006. Identification of Differentially Expressed Genes in Lipopolysaccharide-Stimulated Yellow Grouper *Epinephelus awoara* Spleen. *Fish & Shellfish Immunology*. 23: 354-363pp.

Welling, M., Paulusma-Annema, A., Balter, H., Pauwels, E. y Nibbering, P. 2000. Technetium-99m labeled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infections and sterile inflammations. *Eur. J. Nucl. Med*. 27: 292-301.

Xu, Q., Cheng, C., Hu, P., Ye, H., Chen, Z., Cao, L., Chen, L., Shen, Y. y Chen, L. 2008. Adaptive Evolution of Hepcidin Genes in Antarctic Notothenioid Fishes. *Mol. Biol. Evol.* 25(6): 1099–1112.

Yan, H. y Hancock, R. 2001. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1558–1560.

Yang, M., Wang, K., Chen, J., Qu, H. y Li, S. 2007. Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B.). *Fish and Shellfish Immunology.* 23: 1060-1071.

Yarus, S., Rosen, J., Cole, A. y Diamond, G. 1996. Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 14118–14121.

Yin, Z., He, W., Chen, W., Yan, J., Yang, J., Chan, S. y He, J. 2005. Cloning, Expression and Antimicrobial activity of an Antimicrobial Peptide, Epinecidin-1, From the Orange-Spotted Grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture.* 253: 204-211.

Zanetti, M., Gennaro, R., Scocchi, M. y Skerlavaj, B. 2000. Structure and biology of cathelicins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 479: 203-218.

Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl Acad. Sci.* 84: 5449-5453.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415: 389-395.

Zeya, H. y Spitznagel, K. 1967. Arginine-rich proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. *Antimicrobial specificity and biochemical heterogeneity.* 921-941.

Zhang, J., Yan, Q., Ji, R., Zou, W. y Guo, G. 2009. Isolation and characterization of a hepcidin peptide from the head kidney of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology.* 26: 864–870.

Zhang, Y.A., Zou, J., Chang, C.I., Secombes, C.J., 2004. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101, 259–269.

INTERNET

1. <http://eol.org/pages/214841>
2. <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag5.htm>

11. ANEXOS

Anexo 1

1. Los tejidos previamente homogenizados con nitrógeno líquido fueron colocados en tubos con perlas de lisado y se le agregó 1mL de solución RNApro™.
2. Se colocaron las muestras en el instrumento del FastPrep® por 40 seg. a una intensidad de 6.0.
3. Se centrifugó a $\geq 12,000$ x g durante 5 minutos a 4°C.
4. Se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga
5. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos
6. Se agregaron 300µL de cloroformo y se vortexeó por 10 seg.
7. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos
8. Se centrifugó a $\geq 12,000$ x g durante 5 minutos a 4°C.
9. Se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo.
10. Se agregaron 500µL de etanol al 100%, se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces y se almaceno a -20°C por ≥ 30 min.
11. Se centrifugó a $\geq 12,000$ x g durante 15 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante
12. Se lavó el pellet de ARN con 500µL de etanol al 75% (preparado con agua DEPC).
13. Se removió el etanol y se dejó secar por 5 minutos a temperatura ambiente
14. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos
15. Se determinó la concentración de ARN total y se almacenó a -80°C.

Anexo 2

1. Se pesaron las rebanadas de agarosa en tubos sin color y se agregaron 3 volúmenes del buffer QG a 1 volumen de la rebanada de agarosa (Ej. Agregar 300 μ l de buffer QG a 100 mg de agarosa)
2. Se incubó a 50 °C durante 10 minutos, vortexeando cada 2 minutos, o hasta que se disolvió por completo la agarosa en el buffer.
3. Se agregó un volumen de isopropanol a temperatura ambiente solo y se mezcló levemente.
4. Se colocó una columna QIAquick en tubos de 2ml, se les agregó la muestra y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 minuto.
5. Se descartó el producto filtrado y se volvió a colocar la columna en el mismo tubo.
6. Para lavar la columna, se agregaron 750 μ l del buffer PE y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto.
7. Se descartó el producto filtrado, se volvió a colocar la columna en el mismo tubo y se centrifugó de nuevo a 13,000 rpm durante 1 minuto para eliminar todo el etanol residual en la columna.
8. Se colocaron las columnas en tubos eppendorf de 1.5 ml limpios.
9. Se eluyó el ADN, agregando 35 μ l del buffer EB y dejando la columna verticalmente durante 1 minuto, para después centrifugar a 13,000 rpm durante 1 minuto. Al final se descartó la columna y se almacenó el ADN a – 20 °C..

Anexo 3

1. Se agregaron 2 μL de ligación a una alícuota de ONE SHOT de InvitrogenTM.
2. Se incubó en hielo por 30 min.
3. Se les dio un shock térmico a 42°C durante 48 seg.
4. Se regresó a hielo durante 2 minutos.
5. Se agregaron 800 μL de medio S.O.C.
6. Se incubó a 37°C y 180 rpm durante 1:30 hrs.
7. Se plaquearon 80 μL por transformación en placas con 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ampicilina, 0.5mM de IPTG y 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de X-Gal.
8. Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche.

Anexo 4

1. Se resuspendieron los pellets en 0.3 ml del buffer P1 preenfriado, y se pipetearon o vortexearon para facilitar la resuspensión
2. Se les agregó a las muestras 0.3 ml del buffer P2 y se agitaron gentilmente invirtiendo los tubos de 6-8 veces, y se incubaron de 4-5 minutos a temperatura ambiente (importante no incubar mas allá de los 5 minutos)
3. Se agregaron 0.3 ml del buffer P3 preenfriado y se agitaron gentilmente invirtiendo los tubos de 6-8 veces y se incubó en hielo durante 5 minutos
4. Se centrifugaron las muestras 10 minutos a 13,000 rpm

5. Se estabilizaron y rotularon 10 columnas (QIAgen tips 100) y se les agregó 1 ml del buffer QBT, y se espero que fluyera a través de la columna
6. Se agregó el sobrenadante del paso 4 a su columna correspondiente evitando lo mas posible el debris celular resultante del centrifugado, y se espero a que fluyera a través de la columna
7. Se agregaron 4 ml del buffer QC y se espero a que fluyera a través de la columna.
8. Se eluyeron las muestras agregando 0.8 ml del buffer QF.
9. Se precipito el ADN con 0.7 volúmenes (del producto eluido) de isopropanol a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos.
10. Se decanto cuidadosamente el sobrenadante evitando perder el pellet y se agregó 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente, y se centrifugó a 13,000 rpm durante 8 minutos
11. Se decanto cuidadosamente y se dejaron secar al aire los tubos para eliminar todo el alcohol restante.
12. Se resuspendieron los pellets en 50 µl de agua MilliQ

Anexo 5

	Hígado	Bazo	Branquias	Piel	Intestino	Ojo	Cerebro	Músculo	R Cefálico
Muestra	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	12,5667	131,783	5,85	14,8233	864,19	2,23333	25,5833	4,41667	689,277
Varianza	0,516133	6046,91	6,6213	141,321	256726,	0,501433	219,107	2,32243	36452,5
Desviación std.	0,718424	77,7619	2,57319	11,8878	506,682	0,70812	14,8022	1,52395	190,925
Error std.	0,414782	44,8958	1,48563	6,86345	292,533	0,408833	8,54608	0,879855	110,231
Mínimo	11,96	50,21	4,29	5,03	424,61	1,46	8,57	3,05	471,14
Máximo	13,36	205,07	8,82	28,05	1418,35	2,85	35,51	6,06	826,0
Rango	1,4	154,86	4,53	23,02	993,74	1,39	26,94	3,01	354,86

Anexo 6

	Hígado	Bazo	Branquias	Piel	Intestino	Ojo	Cerebro	Músculo	R Cefálico
Muestra	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	0,483333	0,53	0,536667	0,166667	0,373333	0,103333	0,636667	5,02333	1,28
Varianza	0,0486333	0,0019	0,0404333	0,00323333	0,000233333	0,00363333	0,00493333	3,13823	0,1651
Desviación std.	0,22053	0,043589	0,20108	0,0568624	0,0152753	0,0602771	0,0702377	1,77151	0,406325
Error std.	0,127323	0,0251661	0,116094	0,0328295	0,00881917	0,034801	0,0405518	1,02278	0,234592
Mínimo	0,24	0,5	0,37	0,12	0,36	0,04	0,57	3,84	0,83
Máximo	0,67	0,58	0,76	0,23	0,39	0,16	0,71	7,06	1,62
Rango	0,43	0,08	0,39	0,11	0,03	0,12	0,14	3,22	0,79