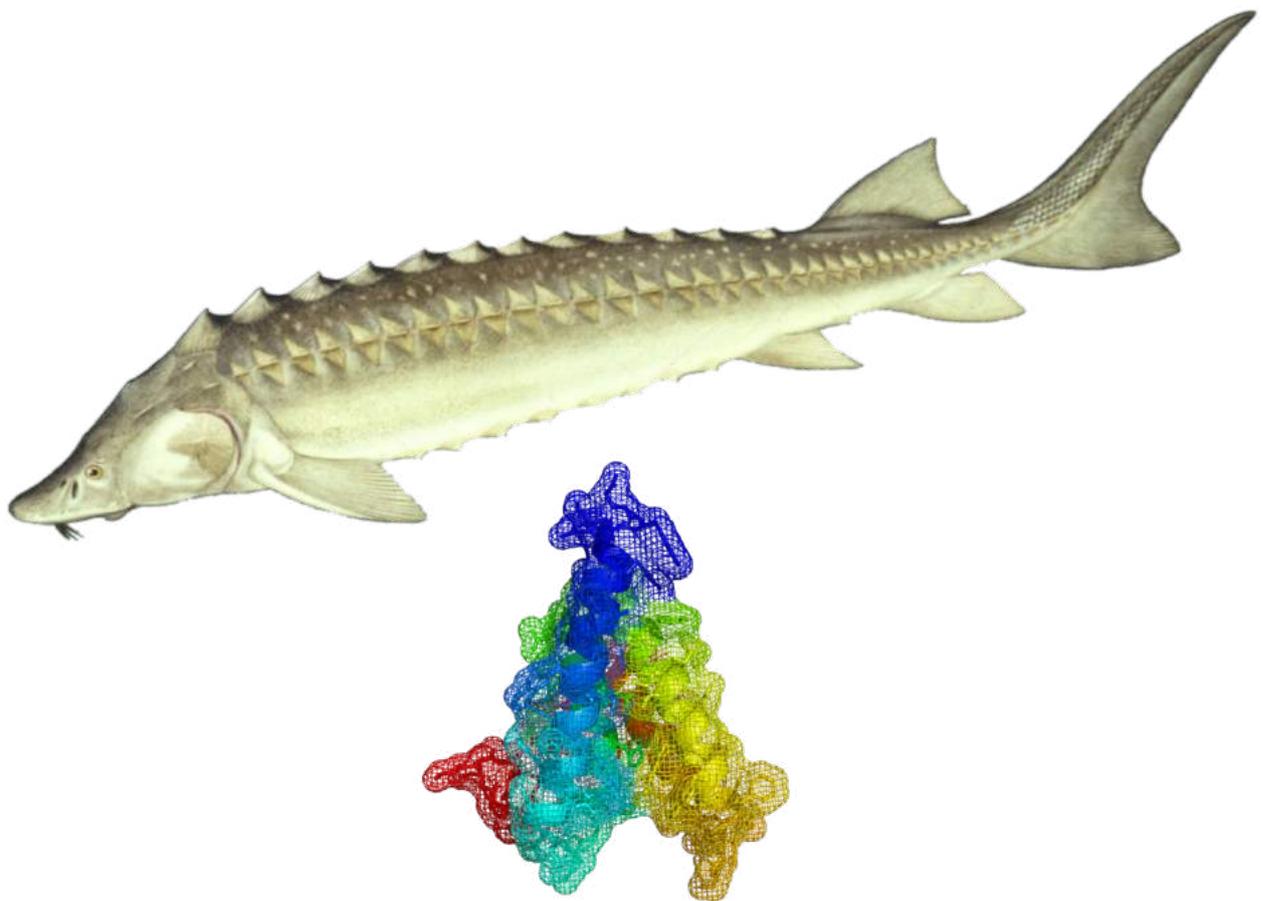


TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Identificación de la Proteína Amiloide A del Suero como Potencial Marcador de Infección en el Esturión Ruso y Desarrollo de un Inmunoensayo para su Detección



Lic. Mauricio Castellano

Orientadores: Dra. Ana María Ferreira, Dra. Andrea Villarino
Departamento de Inmunología - Sección Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias, UDELAR

Tribunal:
Dra. Denise Vizziano
Dr. Otto Pritsch
Dr. Andrés González

Abril 2019

RESUMEN

En Uruguay existen 2 granjas de acuicultura sobre el Río Negro dedicadas a la cría del esturión que posicionan a nuestro país entre los primeros 15 productores de caviar a nivel mundial. La primera granja instalada, “Esturiones del Río Negro”, cultiva en forma exitosa esturiones rusos (*Acipenser gueldenstaedtii*) produciendo un caviar que ha sido reconocido a nivel internacional por su calidad. Como toda actividad intensiva, la acuicultura, presenta desafíos para su desarrollo tanto en nuestro país como en el mundo. En este sentido, y a pesar del éxito de este emprendimiento, en el verano ocurre un incremento en la mortalidad de los peces debido a una combinación de factores que incluyen el aumento de la temperatura del agua, la ocurrencia de infecciones bacterianas por *Aeromonas hydrophila* y un debilitamiento del sistema inmune de los esturiones. Debido a que las hembras de esturión ruso alcanzan la madurez sexual luego de 7-8 años de cultivo, este aumento en la mortalidad genera importantes pérdidas económicas, debido al tiempo, esfuerzo e inversión que conlleva criar a estos animales antes de poder cosechar el caviar.

Para aportar a la solución de esta problemática, este trabajo de Maestría en Biotecnología planteó como objetivo: Identificar marcadores séricos asociados a inflamación/infección y desarrollar herramientas que permitan detectarlos a fin de poder monitorear la salud de los esturiones en las granjas de piscicultura. Como posibles marcadores, se eligió estudiar las Proteínas de Fase Aguda del esturión (PFA), las cuales son actores centrales del sistema inmune innato de los animales. Estas proteínas son sintetizadas a nivel hepático en respuesta a una infección o inflamación y volcadas a la circulación sistémica en donde sus niveles plasmáticos pueden aumentar más de 1000 veces. Estas características vuelven a las PFA marcadores ideales para monitorear la salud animal.

En este trabajo, utilizando aproximaciones bioinformáticas y de biología molecular se identificó por primera vez en el esturión ruso, la secuencia de varios genes con homología a las PFA reportadas en otros organismos. A continuación, para determinar cual de estas posibles PFA podría ser un buen marcador, se estudió su expresión hepática en esturiones estimulados o infectados con la bacteria *A. hydrophila*. En estos estudios se observó un aumento en la expresión del gen codificante de la Proteína Amiloide A del Suero (eSAA). Esto indicó que los niveles séricos de la eSAA podrían aumentar debido a estímulos inflamatorios y que la misma podría ser un potencial marcador inflamatorio. Para comprobar esto, se desarrolló un inmunoensayo de tipo ELISA para lo cual se generaron anticuerpos anti-eSAA y se obtuvo la eSAA recombinante para ser utilizada como estándar de dicho ensayo. El ELISA permitió cuantificar con muy buena especificidad y sensibilidad los niveles de eSAA en suero. Cabe destacar, que en los esturiones estimulados o infectados con *A. hydrophila* los niveles de eSAA en suero podrían inducirse hasta 35 veces respecto a la condición control.

En conjunto, los resultados de este trabajo demostraron por primera vez en la literatura que, en el esturión ruso, y posiblemente en el resto de los peces, la SAA es una proteína de fase aguda positiva ya que frente a un proceso inflamatorio se induce su expresión génica en hígado y aumentan sus niveles circulantes en sangre. A su vez, estos resultados sugieren que la eSAA podría ser un marcador de infección en el esturión ruso con utilidad para el monitoreo sanitario de esturiones criados en granjas de piscicultura.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer muy especialmente a Ana y Andrea por todo el tiempo y cariño que han depositado en mi formación académica y humana, por la rigurosidad y los valores científicos transmitidos, por fomentar mi curiosidad y por confiar en mí. Haber trabajado todos estos años con ellas fue un enorme placer.

Quiero agradecer el apoyo y cariño recibido por todos mis compañeros y amigos de la casita del medio (Maite, Valeria, María, Cecilia, Anabella, Yamila, Camilas, Leticia, Sofia y Marcio) del Laboratorio de Inmunología y de la sala 314 (Cesar, Lorena, Juan, Vivian, Susana) de la Sección Bioquímica. Gracias a ellos las jornadas de trabajo son lindas divertidas y pasan volando.

Al resto de los compañeros del Laboratorio de Inmunología y del departamento de Bioquímica y Biología Molecular por el excelente y ambiente de trabajo.

A los demás integrantes de la línea de investigación en inmunidad de esturión y en especial a Alejandro y a Valeria por toda su ayuda y por hacer posible que se realizaran los experimentos.

A María, muchísimas gracias por ayudarme y enseñarme a realizar los experimentos de qPCR.

A Denise Vizziano que gentilmente nos cedió la secuencia codificante de la SAP y WAP65 de esturión siberiano

A Agustín Correa que gentilmente nos cedió los vectores de expresión recombinante utilizados en este trabajo

A Esturiones del Río Negro, en particular a Daniel Conijeski y Elena Fernández, por poner a disposición las instalaciones de la granja y por la facilidad para disponer de peces y obtener muestras.

A la comisión académica de posgrado por las becas recibidas.

A los miembros del tribunal, Denise Vizziano, Otto Pritsch y Andrés González por aceptar corregir este trabajo y ser parte del tribunal de tesis.

A mi familia, Mamá, Papá, Ceci, Agus y Santi. Por todo el apoyo y por el amor incondicional de todos estos años. Sin duda no estaría aquí sin ellos.

A mis amigos por su cariño y afecto de siempre.

ABREVIATURAS

BCR: *B cell receptor*

CRP: Proteína C reactiva

DAMPs: *Damage associated molecular patterns*

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*

ERN: Esturiones del Río Negro

eSAA: Proteína amiloide A del esturión ruso

eSAAr: Proteína amiloide A del esturión ruso recombinante

FISH: *Fluorescence in-situe hybridization*

HPX: *Hemopexin*

hSAA: Proteína amiloide A humana

IMAC: *immobilized metal affinity chromatography*

KLH: *keyhole limpet hemocyanin*

LAMP: *loop mediated isothermal amplification of DNA*

LB: *lysogeny broth*

LFA: *lattera flow assays*

LPS: Lipopolisacárido

MAC: *Membrane attack complex*

MBL: *Mannose binding lectin*

MBP: *Maltose binding protein*

NAG: N-acetil glucosamina

NAM: ácido N-acetil murámico

NHS: N-hidroxisuccinimida

NLRs: *NOD-like receptors*

PAMPs: *Pathogen associated molecular patterns*

PBS: Amortiguador fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Proteínas de fase aguda

PG: Peptidoglicano

PM: Peso molecular

POC: *point of care*

PRR: *Pattern recognition receptors*

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT-PCR: retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

SAA: Proteína amiloide A del suero

SAP: Proteína amiloide P del suero

SC: Sistema del complemento

SI: Sistema inmune

SIA: Sistema inmune adaptativo

SII: Sistema inmune innato

SNP: *Single nucleotide polymorphisms*

TBS: Amortiguador Tris salino

TCR: *T cell receptor*

TEV: *Tobacco Etch Virus endopeptidase*

TLR: *Toll-like receptors*

TRX: Tiorredoxina

USACH: Universidad de Santiago de Chile

VA: Vía alternativa

VC: Vía clásica

VHH: *variable domain of heavy chain antibodies*

VL: Vía de las lectinas

WAP65: *Warm-temperature acclimation related 65 kDa protein*

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades de los esturiones	1
1.2. Acuicultura del esturión	4
1.3. Generalidades sistema inmune en peces	5
1.4. Lisozima	8
1.5. Sistema del complemento	10
1.6. Proteínas de fase aguda	12
1.6.1. SAA	15
1.6.2. Pentraxinas.....	16
1.6.3. Hemopexina y Haptoglobina	17
1.6.4. Hecpidina.....	17
1.6.5. Intelectina.....	18
1.6.6. Transferrina	19
1.6.7. Ceruloplasmina.....	19
1.7. Antecedentes de la línea de investigación en esturión ruso en Uruguay	20
1.8. Hipótesis	22
1.9. Objetivo General.	22
1.10. Objetivos Específicos	23
1.10.1. Identificar homólogos de potenciales PFA en el esturión ruso y analizar su expresión en hígado frente a la estimulación o infección con <i>A. hydrophila</i>	23
1.10.2. Obtener antígenos correspondientes a la proteína de esturión ruso seleccionada como posible PFA positiva para poder generar anticuerpos anti-PFA	23
1.10.3. Desarrollar un ELISA que permita cuantificar la PFA en muestras de suero	23
2. RESULTADOS.....	24
2.1. Identificación de potenciales PFA y análisis de su expresión en esturiones rusos estimulados o infectados con <i>A. hydrophila</i>.....	24
2.1.1. Identificación de la secuencia codificante de homólogos de PFAs en el esturión chino y siberiano a partir de datos de transcriptómica	24
2.1.2. Amplificación, clonado y secuenciación de potenciales PFA del esturión ruso.....	41
2.1.3. Estudio de la expresión en hígado de las PFA del esturión ruso en respuesta a la inoculación con bacterias <i>A. hydrophila</i> muertas o vivas	49
2.1.3.1. Puesta a punto de la reacción de qPCR en tiempo real	49
2.1.3.2. Expresión hepática de las potenciales PFA en respuesta al estímulo con <i>A. hydrophila</i> (experimento 1 y experimento 2)	54
2.1.3.3. Expresión hepática de la <i>saa</i> en respuesta a la infección con <i>A. hydrophila</i> (experimento 3)	62
2.1.3.4. Cuantificación absoluta de la expresión de la eSAA en varios órganos	64
2.2. Estudio de la inmunogenicidad y obtención de la forma recombinante de la SAA de esturión ruso.	64
2.2.1. Elección de posibles péptidos inmunogénicos de la eSAA	65
2.2.2. Expresión de la eSAA en forma recombinante	67
2.2.3. Purificación de la eSAAr.....	69
2.2.4. Análisis de la eSAAr por cromatografía de exclusión molecular	72

2.3. Optimización y aplicación de un ELISA para cuantificar la eSAA en suero de esturión ruso en respuesta a la estimulación o infección con <i>A. hydrophila</i>	73
2.3.1. Purificación de los anticuerpos anti-eSAA por cromatografía de afinidad.....	74
2.3.2. Desarrollo de un ELISA para cuantificar la eSAA en suero.....	76
2.3.2.1. Estabilidad de la eSAA del suero.....	76
2.3.2.2. Optimización del ELISA para la cuantificación de la eSAA en suero.....	77
2.3.2.3. Determinación por ELISA de los niveles de eSAA en suero de esturiones en respuesta a la estimulación o infección con <i>A. hydrophila</i> (experimento 1, 2 y 3).....	81
2.3.3. Correlación entre la expresión de <i>saa</i> en hígado y los niveles de eSAA en suero.....	84
2.3.4. Correlación entre los niveles de eSAA en suero y la actividad de la VA del SC, Ceruloplasmina y Lisoizima del suero (experimento 1 y 2).....	84
3. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	87
3.1. Discusión	87
3.1.1. Identificación en el esturión de genes codificantes de homólogos de PFA de teleósteos	87
3.1.2. Estudio de la expresión hepática de genes candidatos a PFA en respuesta a estímulos inflamatorios o a la infección con bacterias.....	88
3.1.3. Evaluación de los niveles séricos de eSAA en respuesta a estímulos inflamatorios o a la infección con bacterias.....	91
3.2. Perspectivas	93
3.2.1. Validar la eSAA como biomarcador de infección para su utilización en el monitoreo sanitario de los esturiones criados en granjas de piscicultura.....	94
3.2.2. Desarrollar un inmunoensayo, simple de realizar y transferible a las granjas de piscicultura, que permita detectar y cuantificar la eSAA del suero	96
3.2.3. Ampliar la búsqueda a nuevos marcadores de infección para su utilización en el monitoreo sanitario de los esturiones criados en granjas de piscicultura	97
3.2.4. Desarrollar herramientas para detectar microorganismos patógenos en granjas de piscicultura ...	98
4. MATERIALES Y MÉTODOS	100
4.1. Primera Sección	100
4.1.1. Identificación de la secuencia codificante de homólogos de proteínas candidatas a PFA en el esturión chino y siberiano a partir de datos de transcriptómica.....	100
4.1.2. Amplificación, clonado y secuenciación de homólogos de potenciales PFA del esturión ruso.....	101
4.1.2.1. Diseño de cebadores para la amplificación por PCR y el clonado por RF-cloning de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso.....	101
4.1.2.2. Amplificación de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso por PCR.....	103
4.1.2.3. Clonado de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso por RF-cloning	104
4.1.2.4. Selección de colonias transformantes, expansión del plásmido y secuenciación de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso.....	105
4.1.3. Análisis de la expresión por qPCR en tiempo real de las potenciales PFA del esturión ruso	105
4.1.3.1. Diseño de cebadores para cuantificar por qPCR la expresión de potenciales PFA del esturión ruso	105
4.1.3.2. Estudio de la expresión de las potenciales PFA del esturión ruso por qPCR	106
4.1.4. Experimentos de estimulación e infección de esturiones rusos con <i>A. hydrophila</i>	107
4.1.4.1. 1er experimento de estimulación.....	107
4.1.4.2. 2do experimento de estimulación	108
4.1.4.3. Experimento de Infección con <i>A. hydrophila</i>	109
4.1.4.4. Toma de muestras de suero y órganos.....	109
4.1.4.5. Análisis realizados sobre las muestras.....	110
4.1.4.6. Análisis estadístico	110
4.1.4.7. Cuantificación absoluta de la expresión de <i>saa</i> de esturión ruso en varios órganos	110

4.2. Segunda Sección.....	111
4.2.1. Elección de posibles péptidos inmunogénicos de la eSAA	111
4.2.2. Expresión y purificación de la eSAA en forma recombinante	112
4.2.2.1. Subclonado de la <i>saa</i> en vectores de expresión	112
4.2.2.2. Expresión de la eSAAr en <i>E. coli</i>	112
4.2.2.3. Purificación de la eSAAr	113
4.2.3. Análisis de la eSAAr por cromatografía de exclusión molecular	114
4.3. Tercera sección.....	115
4.3.1. Generación de anticuerpos policlonales anti-eSAA	115
4.3.2. Obtención de anticuerpos anti-eSAA	115
4.3.2.1. Acoplamiento de la eSAAr a la matriz de NHS-sefarosa	115
4.3.2.2. Purificación de los anticuerpos anti-eSAA por cromatografía de afinidad	116
4.3.2.3. Conjugación del anticuerpo anti-p88-eSAA a biotina	117
4.3.3. Puesta a punto y aplicación de un ELISA para la detección de la eSAA en muestras de suero.	117
4.3.3.1. Estabilidad de la eSAA del suero	117
4.3.3.2. Condiciones generales del ELISA para la cuantificación de la eSAA en suero.....	117
4.3.3.3. Puesta a punto del ELISA para la cuantificación de la eSAA en suero.....	118
4.4. Cuarta Sección.....	119
4.4.1. Preparación y obtención de células de <i>E. coli</i> quimio-competentes	119
4.4.2. Transformación química de <i>E. coli</i> con los vectores de interés.....	120
4.4.3. Electroforesis en geles de agarosa	120
4.4.4. Extracción y purificación de ARN total	120
4.4.5. Síntesis de ADNc.....	121
4.4.6. Electroforesis utilizando el sistema Tris-Tricina-SDS-PAGE	121
4.4.7. Electroforesis utilizando el sistema Laemmli SDS-PAGE	122
4.4.8. <i>Western Blots</i>	122
4.4.9. Cuantificación de proteína por el método de Bradford	123
5. BIBLIOGRAFÍA.....	124
6. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	136
.....	147

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los esturiones

Los esturiones (familia Acipenseridae) son un grupo de peces filogenéticamente antiguos constituido por unas 25 especies todas originarias del hemisferio norte¹. La mayoría habita en Europa, la tercera parte en América del Norte y el resto en Asia. En su hábitat natural pueden vivir más de 100 años y superar los 1000 kg, esto los vuelve uno de los peces más grandes y longevos de la tierra². La mayoría de las especies vive en el mar pero todas se reproducen y desovan en agua dulce, siendo indispensable que puedan acceder a los ríos para cumplir su ciclo de vida¹. Estos peces tienen un gran valor comercial ya que a partir de las huevas sin fertilizar se produce el caviar, un ingrediente de lujo de la cocina gourmet (ver 1.2). Los esturiones tienen una morfología muy característica, cuentan con cuerpo alargado, vientre plano, boca en posición ventral con barbas, esqueleto mayoritariamente cartilaginoso con cierto nivel de osificación, placas óseas a nivel de la piel y una mandíbula morfológicamente similar a los tiburones (Figura 1.1)². La conjunción de caracteres morfológicos comunes a peces óseos y cartilaginosos ha llevado a notorias confusiones de cladistas y sistemáticos que han clasificado en el pasado a este grupo junto a los tiburones³. Sin embargo, actualmente su pertenencia al mayor y más diverso clado de peces óseos, los Actinopterygii (del griego *aktinos*, "rayo" y *pterygion*, "aleta", por sus aletas con espinas radiales), está ampliamente aceptada tanto por datos morfológicos como moleculares y se cree que el ancestro de los esturiones poseía un esqueleto óseo completo que revirtió más tarde en la evolución³.



Figura 1.1. El esturión ruso (*A. gueldenstaedtii*)

El esturión ruso presenta una morfología con cuerpo alargado, vientre plano, boca en posición ventral con barbas, esqueleto mayoritariamente cartilaginoso con cierto nivel de osificación, placas óseas a nivel de la piel y una mandíbula morfológicamente similar a los tiburones. Ilustración tomada y adaptada de http://www.fishbiosystem.ru/ganoigeei/Acipenseridae/Acipenser_gueldenstaedtii2.html

Los actinopterygios aparecieron hace unos 375 millones de años⁴ y dentro de este grupo se encuentra el clado Teleostei (del griego *teleios*, "completo" y *osteon*, "hueso"), que emergió hace unos 275 millones de años, y un clado más antiguo denominado Chondrostei (del griego *chondros*, "cartílago" y *osteon*, "hueso") que emergió hace unos 320 millones de años⁵ (Figura 1.2). El clado Teleostei contiene casi todas las especies de peces Actinopterygii (~30000 especies) y es el grupo de peces más estudiado por la comunidad científica (existiendo varios organismos modelo para genómica y biología del desarrollo)⁴. Por otra parte, el clado Chondrostei contiene a las 25 especies de esturión (familia Acipenseridae) y 6 especies de peces espátula (familia Polyodontidae) (Figura 1.2), siendo por

lo tanto notoriamente menos diverso que los teleósteos⁵. Estas dos familias conforman el orden Acipenseriformes. Los esturiones se consideran fósiles vivos ya que su morfología se ha mantenido incambiada a lo largo de su historia evolutiva⁶ y porque presentan una tasa de evolución molecular lenta⁷. Estudios filogenéticos realizados a partir de genes mitocondriales⁸, nucleares⁴ y el registro fósil⁹ sugieren que el linaje de los esturiones apareció hace unos 140-180 millones de años, esto los vuelve uno de los peces óseos más antiguos que aún habita la tierra. Se estima que el último ancestro común entre los esturiones y los peces teleósteos existió hace unos 320 millones de años⁴. A diferencia de los teleósteos, los esturiones han sido poco estudiados, habiendo escasa información a nivel de secuencia y función de proteínas y prácticamente ningún reactivo específico, por lo cual el estudio de estos organismos implica un gran desafío experimental¹⁰.

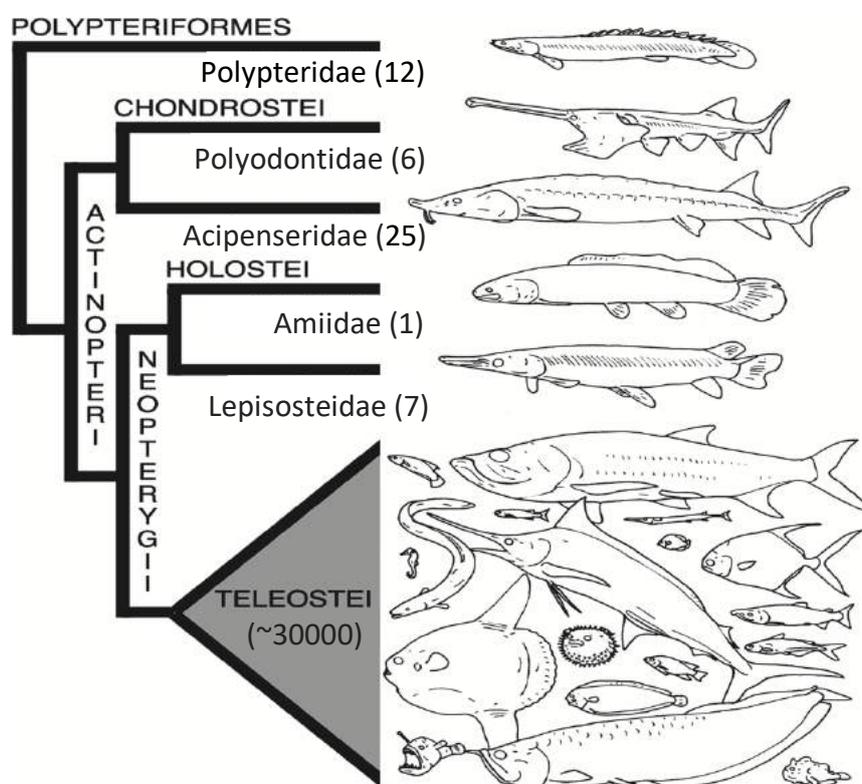


Figura 1.2. Árbol filogenético de la clase Actinopterygii

Árbol filogenético correspondiente a los actinopterygios, obtenido de Sallan 2014⁵ y adaptado con información de Near T. J. 2012⁴. La topología se basa en datos morfológicos y moleculares. Los números indican la cantidad de especies dentro de cada familia (Polypteridae, Polyodontidae, Acipenseridae, Amiidae, Lepisosteidae) o infraclase (Teleostei). Los dibujos representan ejemplos de la diversidad morfológica que existe dentro de cada clado.

Los esturiones fueron clasificados en el siglo XIX en cuatro géneros de acuerdo a sus caracteres morfológicos: *Pseudoscaphirynchus* (3 especies), *Scaphirynchus* (3 especies), *Huso* (2 especies) y *Acipenser* (17 especies)¹. Sin embargo, estudios filogenéticos recientes distinguen 4 clados monofiléticos que no están de acuerdo con dicha clasificación: éstos son el clado atlántico, el clado pacífico, el clado de esturiones de mar y un clado conformado por los esturiones del género

Scaphirynchusthe^{8,11} (Figura 1.3). El esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) y el esturión siberiano (*Acipenser baerii*), ambos pertenecientes al clado atlántico, divergieron hace unos 25 millones de años, mientras que el esturión chino (*Acipenser sinensis*), el cual integra el clado pacífico, se separó de las dos especies anteriores hace unos 120 millones de años⁸. Este trabajo se centró en el estudio del esturión ruso y para su abordaje utilizó información pública sobre el esturión chino y siberiano.

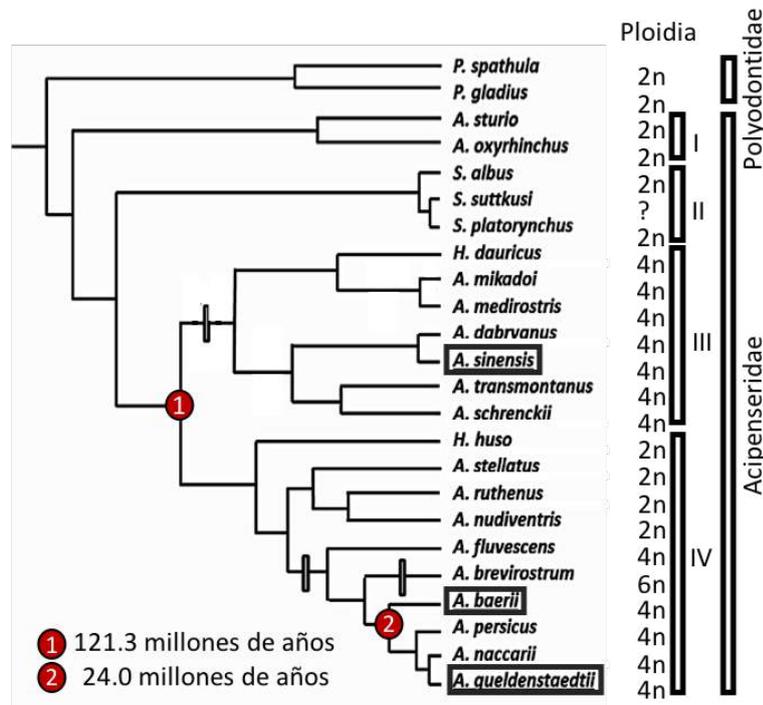


Figura 1.3. Árbol filogenético del orden Acipenseriformes

Árbol filogenético correspondiente al orden Acipenseriformes (22 especies pertenecientes a familia Acipenseridae y 2 especies pertenecientes a la familia Polyodontidae), generado a partir del gen *cytb* por Peng 2007⁸ y modificado utilizando datos reportados por Rajkov 2014¹⁴ y Peng 2007⁸. Se indican los clados esturiones de mar (I), Scaphirynchusthe (II), pacífico (III) y atlántico (IV). Se muestra la ploidía para cada especie de esturión, los eventos de duplicación completa del genoma (barras) y el tiempo estimado de separación de los nodos 1 y 2. Se señala la posición en el árbol del esturión ruso (*A. gueldenstaedtii*), siberiano (*A. baerii*) y chino (*A. sinensis*) mediante recuadros.

Los esturiones poseen uno de los genomas más grandes y complejos de todos los vertebrados, con entre 116 y 372 cromosomas por especie^{12,13}. Esto es producto de varias rondas completas de duplicación genómica ocurridas en los últimos 150 millones de años dentro del linaje de los esturiones (Figura 1.3)¹⁴. Actualmente los esturiones con 112-146 cromosomas se consideran diploides (2n), las especies con 240-270 cromosomas se consideran tetraploides (4n) y los esturiones con 360-370 se consideran hexaploides (6n) (Figura 1.3)¹⁵. El tamaño, complejidad y ploidía de sus genomas dificulta realizar estudios genómicos por lo cual no se conoce el genoma nuclear de ninguna especie de esturión, esto supone un importante desafío a la hora de estudiar estos organismos. Afortunadamente en los últimos años se han realizado estudios transcriptómicos a partir de varios órganos y especies de esturión que constituyen una fuente de información muy valiosa para encarar el estudio de estos organismos. Varios de estos estudios han sido realizados en larvas y en gónadas de adultos con el fin de desentrañar los mecanismos de desarrollo y diferenciación sexual de estos peces¹⁶⁻²³. A su vez,

recientemente se han publicado transcriptomas de otros órganos como bazo, hígado y riñón anterior que apuntan a entender el funcionamiento del sistema inmune y su respuesta frente a patógenos²⁴⁻²⁷. Estos y otros trabajos reflejan el interés que existe en comprender la biología de este pez debido al importante desarrollo que ha tenido la acuicultura de esturión en los últimos 30 años²⁸.

1.2. Acuicultura del esturión

Los esturiones poseen un enorme valor comercial ya que a partir de las huevas sin fertilizar se produce el caviar. La palabra caviar proviene de la expresión persa *mahii-xavi-yar* que significa “pez que contiene huevas”; actualmente el caviar más raro puede llegar a costar unos 10000 euros el kg²⁹. Las pesquerías rusas localizadas en el norte del Mar Caspio fueron entre 1950 y 1980 los mayores productores de carne de esturión y caviar²⁹. Desde entonces la sobrepesca, la pesca ilegal, la fragmentación y la contaminación de los ríos, hizo colapsar las reservas naturales del esturión (Figura 1.4a). Actualmente, el 92% de las especies de esturión podrían llegar a estar bajo amenaza de extinción si no se controla estrictamente su comercio y, desde 1998, se las incluye en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, por sus siglas en inglés, ver sitio web <https://www.cites.org/esp/prog/sturgeon/history.shtml>), que impone estrictas medidas para la pesca y comercialización²⁸.

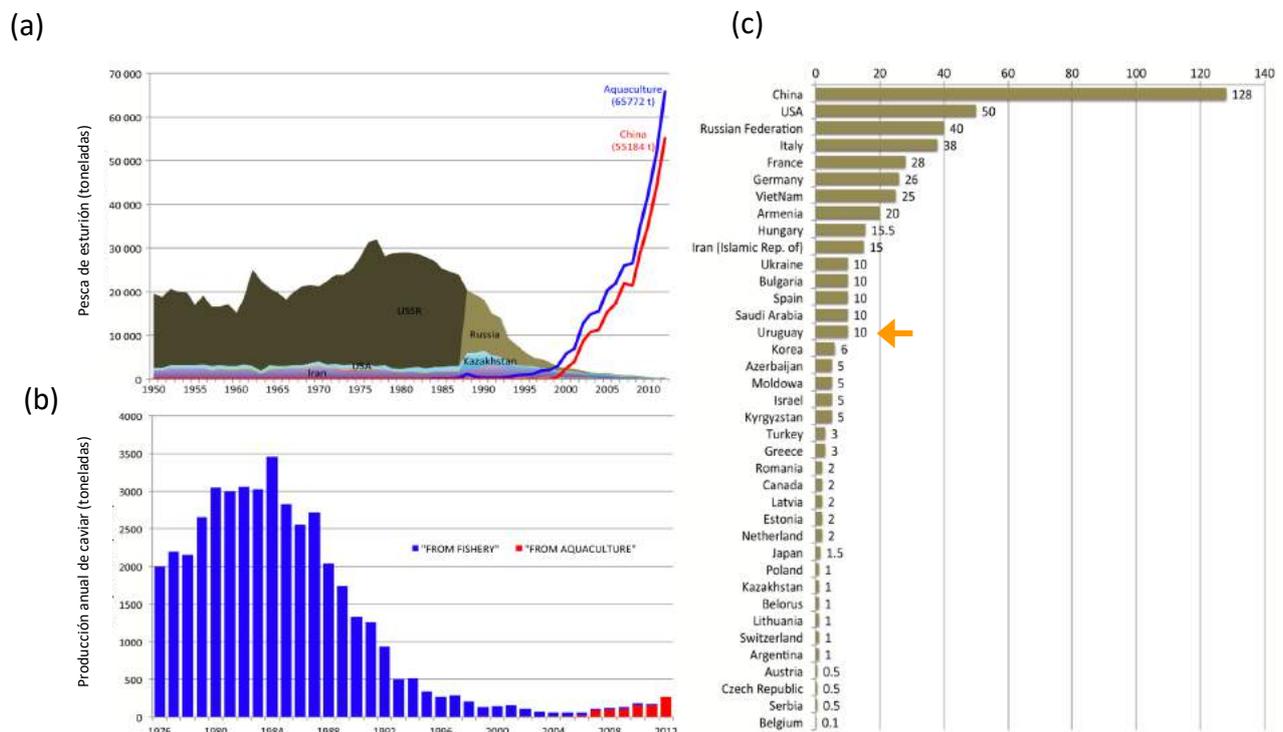


Figura 1.4. Producción mundial de esturiones y caviar

(a) El gráfico muestra las toneladas de esturiones pescados anualmente (área) en Irán, Estados Unidos, URSS-Rusia y Kazajistán desde el año 1950 hasta el 2011. En el mismo gráfico se indica la producción anual de toneladas de esturiones provenientes de la acuicultura en China (línea roja) y a nivel mundial (línea azul). (b) El gráfico indica las toneladas de caviar cosechado anualmente entre los años 1976 y 2012, provenientes de la pesca (azul) o de la acuicultura de esturiones (rojo). (c) Gráfico correspondiente a las toneladas de caviar que se estima se cosecharon en el año 2016 por los principales países dedicados a la cría de esturiones. La flecha naranja marca la posición de Uruguay en el *ranking* mundial. Todos los gráficos fueron obtenidos y adaptados de Bronzi P 2014³⁰.

El colapso de las reservas naturales de esturión, las medidas regulatorias impuestas por CITES, y la elevada demanda de caviar en el mercado han impulsado en los últimos 30 años el desarrollo de la acuicultura del esturión, que ha sustituido completamente a la pesca tradicional (Figura 1.4a)³⁰. De acuerdo a los datos más actualizados en el 2012 se produjeron unas 66000 toneladas de esturiones y más de 250 toneladas de caviar que provinieron casi completamente de la acuicultura (Figura 1.4a, Figura 1.4b)³⁰. Se estima que en los próximos 10 años esta industria seguirá creciendo y alcanzará una producción de 500-700 toneladas de caviar al año^{30,31}. Actualmente existen unas 640 granjas de esturiones en el mundo, siendo China el principal productor de caviar a nivel mundial. En Uruguay existen 2 plantas de acuicultura sobre el Río Negro dedicadas a la cría del esturión que posicionan a nuestro país entre los primeros 15 productores de caviar (Figura 1.4c)³⁰. Éstas son: “Esturiones del Río Negro” (ERN) localizada en Baygorria (Durazno) y “Estuario del Plata” localizada en San Gregorio de Polanco (Tacuarembó). La granja de piscicultura ERN ha logrado cultivar de forma exitosa esturiones rusos principalmente (*A. gueldenstaedtii*) obteniendo un caviar que ha sido reconocido internacionalmente por su excelente calidad (<http://magazine.wsj.com/gatherer/the-specialist/caviar-dreams>). A pesar del éxito de este emprendimiento, en verano ocurre un incremento en la mortalidad de los peces debido a una combinación de factores que incluyen el aumento de la temperatura del agua, la ocurrencia de infecciones bacterianas oportunistas y un debilitamiento del sistema inmune de los esturiones, problemática que se discutirá más adelante. Por esta razón, al igual que para la acuicultura de otros peces, entender el funcionamiento del sistema inmune de los esturiones es indispensable a la hora de abordar alguno de los problemas que aquejan al sector.

1.3. Generalidades sistema inmune en peces

El sistema inmune (SI) de los peces es extremadamente eficaz ya que permite a estos organismos sobrevivir en un ambiente cargado de patógenos como el agua³². Este sistema involucra varios órganos, células y componentes solubles que actúan en forma conjunta y coordinada para reconocer, contener y en última instancia eliminar a los patógenos que ingresan al organismo. Los peces óseos y cartilaginosos son los primeros organismos en contar con un SI completo en donde se distinguen dos grandes ramas: el sistema inmune innato (SII) y el sistema inmune adaptativo (SIA)³³. Si bien se ha establecido la presencia de ambos sistemas en estos peces, su funcionamiento preciso, incluyendo entre otras preguntas cómo se conectan y regulan estas dos ramas, aún no se ha elucidado. Por tanto, a continuación, se presentan primero los conceptos generales sobre el funcionamiento de ambos sistemas en mamíferos, para luego explicar las similitudes o diferencias descriptas en los peces.

El SII, evolutivamente antiguo y presente en todo el reino animal, cumple un rol central en las defensas tempranas, ya que sus componentes son los primeros en activarse ante el encuentro con patógenos (virus, bacterias y parásitos)³⁴. Esto ocurre debido a que dicha rama de la inmunidad cuenta con receptores, que llamaremos PRRs (del inglés, *pattern recognition receptors*), codificados en la línea germinal y que han sido evolutivamente seleccionados para reconocer un conjunto finito de motivos moleculares llamados señales de peligro. Estas señales de peligro incluyen motivos característicos y conservados en los patógenos denominados PAMPs (del inglés, *pathogen associated molecular patterns*) y motivos que derivan del daño celular denominados DAMPs (del inglés, *damage associated molecular patterns*) que ocurren usualmente en forma secundaria a una infección o frente

a un trauma³⁵. Los patógenos que ingresan al organismo son rápidamente reconocidos por una gran diversidad de PRRs presentes en los fluidos (por ejemplo, macromoléculas solubles en plasma y líquido intersticial) y, principalmente, en las células del SII (receptores en membranas y en el citosol). Los receptores solubles más relevantes forman parte de un sistema enzimático del plasma conocido como el sistema de complemento (SC) (ver 1.5). Este sistema puede dañar patógenos en forma directa mediante el ensamblaje de complejos líticos en sus membranas celulares y contribuir en forma indirecta a la eliminación de estos a través de la activación de células innatas y de mecanismos inflamatorios. Por otra parte, el reconocimiento de los patógenos por PRRs presentes en células innatas (incluyendo dendríticas, macrófagos, monocitos, granulocitos polimorfonucleares y células linfoides innatas) conduce a la activación de cascadas de señalización celular que se asocian a mecanismos de eliminación adaptados al tipo de patógeno reconocido³⁶. Por ejemplo, en el caso de bacterias extracelulares, las células dendríticas y los macrófagos residentes en tejidos utilizan varios PRRs para reconocerlas, activando la fagocitosis y la producción de moléculas líticas como péptidos antimicrobianos (defensinas o catelicidinas) y Lisozima (ver 1.4)³⁴. En forma paralela, el reconocimiento de la bacteria por PRRs activa vías de señalización intracelular que dan lugar a la síntesis de citoquinas, capaces de desencadenar el proceso inflamatorio destinado a restituir componentes plasmáticos y reclutar células del SI, de la sangre al sitio de infección^{37,38}. Este proceso es muy importante porque repone componentes innatos consumidos y refuerza los mecanismos efectores con la ayuda de otros tipos celulares, asistiendo al combate de los patógenos durante los primeros días post-infección. Además de estos efectos locales, la activación de células innatas tras el reconocimiento de PAMPs y/o DAMPs puede conducir a un estado inflamatorio con repercusiones sistémicas. Esto se debe a que algunas de las citoquinas producidas localmente alcanzan la circulación sanguínea, y son reconocidas por receptores en múltiples órganos, principalmente el hígado. En el hígado, estas citoquinas estimulan la producción de un grupo de moléculas denominadas proteínas de fase aguda (PFA), las cuales permean y se acumulan en los sitios inflamatorios, donde colaboran con los componentes innatos (SC y células) en la eliminación de los agentes patógenos (ver 1.6)³⁹.

El SIA, que se originó hace unos 450 millones de años, es exclusivo de vertebrados mandibulados y se encuentra presente, con creciente grado de complejidad, desde peces cartilagosos hasta mamíferos⁴⁰. Este sistema se activa cuando las defensas innatas son sobrepasadas, logrando generar una respuesta que se adapta al patógeno en cuestión. Esto es posible gracias a un proceso de generación y selección de clones de linfocitos específicos para motivos moleculares del patógeno, usualmente llamados antígenos. El reconocimiento específico de los antígenos es mediado por receptores de membrana presentes en los linfocitos B y T, llamados BCR (del inglés, *B cell receptor*) y TCR (del inglés, *T cell receptor*) respectivamente. Los eventos moleculares asociados al desarrollo de los linfocitos en los órganos inmunes primarios (médula ósea y timo en mamíferos) aseguran que se genere un enorme repertorio de linfocitos, ampliamente diverso en término de su especificidad⁴¹. Estos eventos incluyen la recombinación al azar de segmentos génicos mediada por recombinasas (RAGs) cuya expresión está restringida a los linfocitos. Una vez maduros, los linfocitos exponen sus receptores en la membrana plasmática y recirculan a través de los órganos linfoides secundarios (bazo y cadena de ganglios o nódulos linfáticos en mamíferos), patrullando el organismo con el objeto de detectar la presencia de patógenos y/o antígenos. Frente al encuentro con su antígeno específico, recibirán señales que, en conjunto con señales del SII, conducen a su activación y proliferación. Por tanto, la presencia del patógeno conduce a la selección, supervivencia y proliferación de aquellos linfocitos B y T específicos para el patógeno en cuestión, adaptando el repertorio de los

linfocitos circulantes a los patógenos con los cuales el organismo tuvo contacto. Por otra parte, la integración de las señales del SII y las señales derivadas del antígeno es indispensable para que los linfocitos se activen y generen células efectoras capaces de controlar y, en la mayoría de las situaciones, eliminar al patógeno. De acuerdo con lo anterior, a diferencia del SII, la capacidad de respuesta del SIA cambia a lo largo de la vida, ya que un conjunto de los linfocitos específicos que fueron activados por el patógeno sobrevive por largos períodos de tiempo en forma de linfocitos de memoria. Esto permite que el organismo esté protegido contra un futuro encuentro con el mismo patógeno siendo esta propiedad del SIA la base del funcionamiento de las vacunas⁴².

Como ya se mencionó, el SI de los peces tiene similitudes, pero también muestra notorias diferencias con el SI de vertebrados superiores, particularmente mamíferos. En cuanto al SIA, en los peces se ha demostrado la presencia de linfocitos B, T, de los segmentos génicos codificantes de los receptores BCR y TCR, y de las recombinasas RAGs que generan estos receptores. Sin embargo, a nivel funcional, esta rama de la inmunidad sería menos robusta que en mamíferos^{40,43}. Es posible que las diferencias en la arquitectura del SIA expliquen, al menos parcialmente, su menor potencial. Por un lado, los peces carecen de médula ósea, siendo el riñón anterior el principal órgano responsable de la hematopoyesis³². Además, carecen de ganglios linfáticos, hecho que dificulta comprender cómo circulan y en qué sitios anatómicos ocurre la activación de los linfocitos y su eventual interacción con los componentes del SII. En línea con este argumento, en peces el establecimiento de la respuesta adaptativa puede demorar varias semanas. Además, la ausencia de ganglios, y por tanto de centros germinales y células dendríticas foliculares, se relaciona con que la respuesta de anticuerpos en peces: es de baja afinidad (a pesar de que ocurre hipermutación somática), muestra una menor diversidad de isotipos de anticuerpos (es dudoso que exista cambio de clase), y genera una pobre memoria inmunológica (a pesar de que existen células de memoria). Este último hecho explica que la vacunación en los peces resulte poco efectiva⁴⁴⁻⁴⁶. En contraste, la eliminación de la respuesta adaptativa en pez cebra no es deletérea, pero sí lo es en mamíferos. De hecho, una mutación en las RAGs que impide los eventos de recombinación asociados a la generación del BCR y del TCR, no afectó la sobrevivencia de peces mantenidos en condiciones no estériles, pero es mortal para mamíferos⁴⁷. Es llamativo que estos mutantes sobreexpresan en intestino varios genes del SII, principalmente componentes del SC y la cascada de la coagulación, probablemente para compensar la falta de un SIA⁴⁸. A pesar de esta sobreexpresión, se ha observado que los peces *rag*^{-/-} infectados por vía intraperitoneal con *Mycobacterium marinum* presentan mayor mortalidad que los *rag*^{+/+}⁴⁹. En conjunto, la arquitectura y el funcionamiento del SIA de los teleósteos ha llevado a plantear la hipótesis de que en estos peces el SII cumple un rol preponderante en el combate de patógenos. Esto se ve apoyado además por la existencia de una mayor variedad de receptores innatos en comparación con mamíferos (en particular los receptores pertenecientes a la familia Toll conocidos como TLRs, del inglés *Toll like receptors*)⁵⁰, así como también por la existencia de varias isoformas de algunas proteínas del SC y una gran diversidad de péptidos antimicrobianos identificados únicamente en peces^{38,51-53}.

A continuación, se detallarán algunos de los componentes del SII que serán abordados en el presente trabajo.

1.4. Lisozima

Las Lisozimas, descubiertas en 1921 por el bacteriólogo Alexander Flemming, son una familia de enzimas anti-bacterianas que desempeñan un papel central en las defensas innatas de los organismos. Es importante mencionar que una Lisozima fue la primera proteína cuya estructura tridimensional se resolvió por cristalografía de rayos X, y esta familia de proteínas ha sido sumamente valiosa como modelo de estudio para abordar preguntas en varias áreas de las ciencias incluyendo la Biología molecular, Enzimología e Inmunología. Además, son ampliamente utilizada en la industria alimenticia por sus propiedades conservantes⁵⁴. En el reino animal existen 3 clases de Lisozimas, las de tipo-c (convencional) y tipo-g (descubierta originalmente en gansos) presentes únicamente en vertebrados, y en los invertebrados se identifica una clase adicional de Lisozimas, las de tipo-i. Las distintas Lisozimas difieren en su secuencia aminoacídica (homología menor a 20%), propiedades bioquímicas y enzimáticas, pero todas son proteínas monoméricas pequeñas que catalizan la hidrólisis del peptidoglicano (PG) bacteriano⁵⁴. El PG es un copolímero formado por una secuencia alternante de N-acetil-glucosamina (NAG) y ácido-N-acetil-murámico (NAM) unidos mediante un enlace β -1,4 glicosídico y entrecruzados por péptidos pequeños, esta estructura conforma la pared bacteriana (Figura 1.5a)⁵⁵. Las Lisozimas pueden desencadenar directamente la muerte de bacterias por dos mecanismos, uno a través de su actividad enzimática y el otro por su naturaleza catiónica. La actividad enzimática de todas las Lisozimas hidroliza las uniones β -1,4 entre los residuos de NAM y NAG del PG lo cual desestabiliza la pared y conduce a la lisis (Figura 1.5b)⁵⁵. Por esta razón, dichas proteínas lisan eficientemente bacterias gram positivas, cuya gruesa capa de PG está en contacto con el exterior, pero son menos eficientes en lisar bacterias gram negativas en donde el PG está recubierto por una membrana externa⁵⁴. Por otra parte, la naturaleza catiónica de la Lisozima (tipo-c y tipo-g, principalmente) permite que varias moléculas de esta proteína puedan intercalarse en la membrana plasmática de bacterias (cargada negativamente), generando poros macromoleculares que también conducen a la lisis bacteriana (Figura 1.6c)⁵⁵. La importancia de la Lisozima como componente de las defensas innatas se evidencia en que los patógenos han desarrollado varias estrategias para contrarrestar sus funciones efectoras. Estas incluyen: modificar la estructura del PG (mediante N-deacetilación de los residuos de NAG, u O-acetilación y N-glicosilación de los residuos de NAM) generando un impedimento estérico para la hidrólisis de las uniones β -1,4; modificar la composición de la cadena aminoacídica del PG o de los lípidos de membranas, para reducir la carga negativa de la envoltura bacteriana, impidiendo así la formación de poros; y sintetizar inhibidores de la Lisozima⁵⁵. Por otra parte, dado que la mayoría de los organismos codifican en sus genomas múltiples Lisozimas de varios tipos, se presume que aquellas que se expresan en el aparato digestivo podrían funcionar como enzimas digestivas, favoreciendo la obtención de nutrientes de la flora intestinal o degradando algunos glúcidos de la dieta⁵⁴.

Los peces teleósteos poseen varias Lisozimas, en pez cebra y salmón atlántico existen un total de 6 genes, 3 genes codifican Lisozimas de tipo-c y 3 genes codifican Lisozimas de tipo-g (Ensembl GRCz11, Salmobase^{56,57}). Estas se expresan en forma ubicua pudiendo encontrarlas en diversos órganos (hígado, riñón, tracto digestivo, bazo e intestino), en sangre y en forma muy abundante en mucosas y en el mucus que recubre la piel, lo cual constituye una adaptación de los peces para subsistir en un ambiente cargado de patógenos como el agua⁵⁸. Más aún, la infección o estimulación con diversos patógenos induce la expresión y síntesis de Lisozima en varios de estos sitios^{59,60}. A su vez, las células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) de mamíferos y teleósteos

también pueden secretar Lisozima al medio extracelular o dirigirla a los fagosomas, compartimientos de la célula especializados en la internalización de agentes particulados^{55,58}. En estos compartimentos, las bacterias y el PG son digeridos por la actividad enzimática de la Lisozima. Esta digestión favorecería la exposición de nuevos PAMPs que son reconocidos por varios PRRs (principalmente TLRs y NLRs (del inglés, *NOD like receptors*), potenciando la respuesta inflamatoria de estas células y la eliminación de los patógenos (Figura 1.5d)⁵⁵.

La cuantificación de la actividad Lisozima mediante ensayos enzimáticos ha contribuido al estudio de la respuesta de Lisozima en una variedad de peces. En particular, la actividad Lisozima en suero, puede medirse mediante un ensayo que utiliza bacterias gram positivas (*Micrococcus lysodeikticus*) como sustrato⁶¹. En relación con esto, durante mi trabajo de tesis de grado correspondiente a la Licenciatura en Bioquímica ajusté una metodología para cuantificar los niveles de Lisozima en suero de esturión ruso⁶².

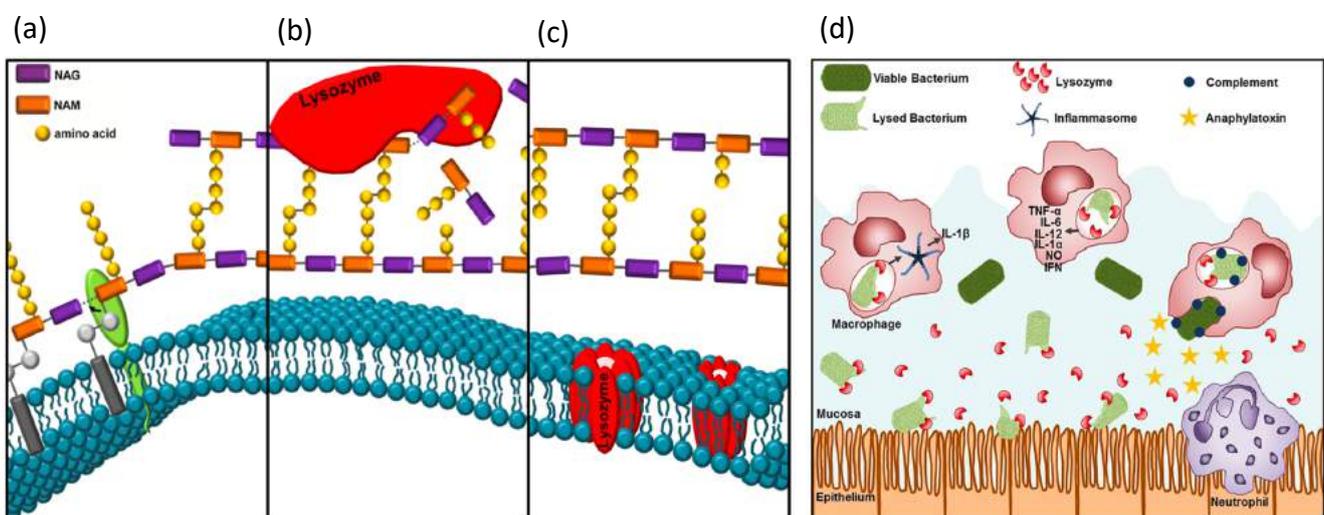


Figura 1.5. Efecto de las Lisozimas sobre la pared bacteriana y las células del sistema inmune

(a) Se representa la estructura del péptidoglicano (PG) bacteriano. Las cadenas del polímero están formadas por unidades repetidas del disacárido N-acetil D-glucosamina (NAG, en violeta) y N-acetil murámico (NAM, en naranja) unidos mediante un enlace β -1,4 glicosídico y un tetrapéptido (amarillo) que permite entrelazar las cadenas mediante puentes peptídicos. El polímero se ancla a la membrana plasmática mediante la unión de NAM a lípidos (gris). Se representa además la adición de sucesivos monómeros a las cadenas por la acción de glicosiltransferasas (en verde) que extienden el polímero de peptidoglicano. (b) Se representa a la Lisozima (en rojo) hidrolizando el enlace β -1,4 glicosídico entre los residuos NAM de un monómero y los residuos NAG del monómero adyacente. Dependiendo de la estructura de la pared bacteriana, la hidrólisis de PG mediada por la Lisozima puede conducir a la muerte celular. (c) La Lisozima también puede conducir a la lisis bacteriana por un mecanismo independiente de su actividad enzimática y basado en su naturaleza catiónica, que le permitiría ensamblarse en la membrana plasmática bacteriana, formando poros (cilindros rojos). (d) Se ilustran mecanismos asociados a la Lisozima que pueden modular la respuesta inmune. En el sitio de infección la Lisozima extracelular (rojo), secretada principalmente por el epitelio, puede matar a las bacterias, liberando PAMPs (PG, lipopéptidos, ácidos nucleicos, entre otros). Estos PAMPs generan o amplifican una respuesta inflamatoria que media el reclutamiento de células fagocíticas (neutrófilos principalmente). Las células residentes (macrófagos) y reclutadas (neutrófilos) también pueden secretar Lisozima al medio extracelular o dirigirla a los fagosomas que contienen bacterias fagocitadas. En estos compartimentos la digestión bacteriana mediada por Lisozima libera PAMPs que son reconocidos por diversos PRRs desencadenando una fuerte respuesta de citoquinas proinflamatorias. El depósito del complemento (círculos azules) en las bacterias o en los polímeros insolubles de PG y la liberación de anafilatoxinas (amarillo) facilitan la fagocitosis y promueven la amplificación de la respuesta inflamatoria, respectivamente. Debido a que las células innatas, incluyendo los fagocitos, responden pobremente al PG monomérico, generado por la digestión de la pared bacteriana por la Lisozima, a medida que avanza la respuesta, la generación de estos monómeros por la enzima contribuye al apagado de la inflamación. Figuras obtenidas de Ragland S. A. 2017⁵⁵.

1.5. Sistema del complemento

El SC constituye uno de los principales y más antiguos componentes de la inmunidad innata. Este sistema fue descubierto en 1890 como un componente termo sensible del suero capaz de complementar la actividad bacteriolítica de los anticuerpos, de ahí su nombre⁶³. En mamíferos el SC está compuesto por más de 40 proteínas solubles y de membrana que incluye PRRs, enzimas, moléculas anfipáticas y proteínas reguladoras. Su acción conjunta y coordinada permite opsonizar, ensamblar complejos líticos sobre membranas celulares, desencadenar una respuesta inflamatoria en el sitio de infección, modular la respuesta adaptativa y contribuir a la homeostasis eliminando células necróticas y apoptóticas^{64,65}. Para que se desencadenen estos mecanismos efectoras, el SC debe activarse ya que la mayoría de sus componentes se encuentran inactivos en plasma y tejidos. En general, la activación involucra el reconocimiento de estructuras en los patógenos, seguido de una serie de reacciones secuenciales que activan proenzimas generando una cascada enzimática a lo largo de la cual se activan todos los componentes inactivos del SC⁶⁶. Existen tres vías de activación del SC que difieren en los mecanismos de iniciación, pero convergen en la formación de complejos enzimáticos anclados a la superficie de los patógenos, denominados convertasas. Las convertasas son enzimas dependientes de Mg^{2+} que median la proteólisis de los componentes inactivos C3 (convertasa de C3) o C5 (convertasa de C5), cuyos fragmentos activos desencadenan de forma directa o indirecta todas las funciones efectoras del SC⁶⁷. La proteína C3 es el componente más abundante del SC en suero y cumple un papel central en este sistema. Esta proteína posee un grupo tioéster escondido que se expone cuando es cortado proteolíticamente por las convertasas de C3 en los fragmentos activos C3b y C3a⁶⁸. Este grupo ubicado en el fragmento C3b, es capaz de reaccionar con grupos nucleofílicos (como aminos e hidroxilos) de la superficie de los patógenos, lo cual conduce a la unión covalente de C3b a los mismos⁶⁹. El depósito de C3b facilita la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos que poseen receptores para esta molécula. Por otra parte, al aumentar el depósito de C3b sobre la superficie del patógeno, se forman nuevos complejos con las convertasas de C3 unidas a una nueva molécula de C3b, los cuales adquieren la capacidad de cortar al componente inactivo C5 en C5a y C5b. Este último interacciona en forma secuencial con los componentes C6, C7, C8 y con varias moléculas del componente C9, formando un complejo macromolecular (MAC, del inglés *membrane attack complex*) que se ensambla en la membranas externa de los patógenos, generando poros que conducen a la lisis celular (Figura 1.6)⁷⁰. Este mecanismo lítico, que puede desencadenarse por cualquiera de las tres vías, es el resultado de la activación completa del SC y hace posible la determinación de la actividad funcional de toda esta cascada⁷¹. Por otra parte, la acción de estas convertasas libera los fragmentos más pequeños C3a y C5a que tienen un potente efecto pro inflamatorio al actuar directamente sobre los epitelios vasculares y otras células del SI. La acción de estas moléculas da lugar al reclutamiento de más componentes del SC, anticuerpos y células fagocíticas desde la sangre al sitio de infección⁷².

Existen tres vías diferentes que dan inicio a la formación de convertasas de C3: la vía clásica (VC), la vía de las lectinas (VL) y la vía alternativa (VA). La VC es activada principalmente por anticuerpos que reconocen específicamente antígenos en la superficie del patógeno, por lo cual se la considera una rama adaptativa del SC. La VL es iniciada por PRRs como la lectina tipo-c de unión a manosa (MBL, del inglés *mannose binding lectin*) y las ficolinas que reconocen motivos glucídicos exclusivos de patógenos⁷³. La VA, cuya actividad será evaluada en este trabajo, se inicia sobre patógenos o células activadoras gracias a la activación espontánea de C3 y a la ausencia de

mecanismos reguladores sobre estas células⁷⁴. En solución el enlace tioéster de C3 es capaz de hidrolizarse dando lugar a un cambio conformacional en esta proteína. Este cambio conformacional expone un sitio de unión para la proenzima factor B, que al unirse es activada proteolíticamente por el factor D dando Bb⁷⁴. Esto genera una convertasa de C3 en la fase fluida, llamada C3(H₂O)Bb que, debido a su corta vida media, produce pequeñas cantidades de C3b circulante que actuarán como iniciadores de la VA (Figura 1.6). Diversos mecanismos reguladores impiden que el C3b depositado sobre las células propias reaccione en forma secuencial con los factores B y D para generar nuevas convertasas de C3, que conduzcan a la amplificación del depósito de C3b y por ende a la activación de la VA. En contraste, en la superficie de los patógenos, los cuales carecen de estos mecanismos reguladores, el C3b unido covalentemente interaccionará con los factores B y D formando la convertasa de C3 de la VA, llamada C3bBb. Esta convertasa es estable y genera grandes cantidades de C3b. Como el C3b producido es parte del complejo enzimático, sobre la superficie del patógeno ocurrirá una rápida amplificación de la síntesis y depósito de C3b por la formación de nuevas convertasas de la VA (Figura 1.6). Es importante recalcar que la VA es un mecanismo de gran relevancia dentro de las defensas innatas. Por un lado, esta vía cumple un papel esencial cuando no ocurre la activación de la VC y VL, ya que desencadena la activación de todos los componentes del SC y, por tanto, permite desplegar todas sus funciones efectoras. En segundo lugar, la VA es un poderoso circuito de amplificación de la VC y VL porque el C3b formado por cualquiera de ellas puede ser utilizado para formar convertasas de C3 y C5 de la VA, estableciendo un ciclo de retroalimentación positiva.

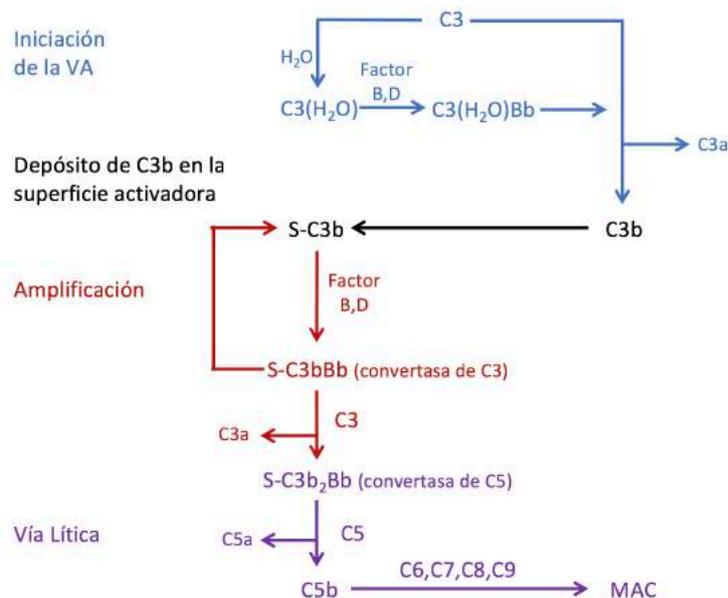


Figura 1.6. Esquema de activación de la Vía Alternativa del Sistema Complemento

Se muestra la cascada enzimática correspondiente a la VA del SC. Los componentes inactivos se indican con letras mayúscula (salvo la proteasa factor D que circula en forma activa) y cuando éstos son activados, por proteólisis específica, los fragmentos activos resultantes se les denomina añadiendo una letra a o b. En azul se muestran los pasos de la iniciación de la vía, desencadenada por la activación espontánea de C3, que da lugar a la convertasa de C3 de fase fluida, C3(H₂O)Bb. Esta convertasa cliva C3 a C3b, que puede depositarse sobre superficies activadoras (S-C3b) (negro). A continuación, la proteasa inactiva factor B, se une al S-C3b y es activada por el factor D, generando la convertasa de C3 de la VA que permanece anclada a la superficie blanco (S-C3bBb). Esta convertasa amplifica la cascada enzimática (rojo) al generar varias moléculas de C3b. Esto a su vez, permite que se forme la convertasa de C5 (S-C3b₂Bb) que cliva el componente C5 a C5b, el cual se asocia a C6, C7, C8, y varias moléculas de C9 formando un complejo de ataque a la membrana (MAC) que conduce a la lisis de la célula blanco (violeta).

El SC de peces teleósteos es similar al humano ya que están presentes las tres vías de iniciación y se han encontrado homólogos para casi todos las proteínas de este sistema⁷⁵. A su vez, estudios transcriptómicos en hígado y bazo de esturión indican que estos peces también cuentan con un SC completo^{26,27}. Sin embargo, el SC de teleósteos presenta diferencias respecto al de mamíferos, siendo la principal y más llamativa la existencia de múltiples isoformas de varios componentes del SC, tales como C3, C4, C5, C7, MBL y B/C2⁷⁶. Esta diversidad de componentes apoya la idea previamente mencionada de que el SC y en general el SII en peces cumple un papel preponderante en la inmunidad. Por otro lado, al igual que en mamíferos, los hepatocitos del hígado son los principales productores de las proteínas del SC en peces, aunque también se ha detectado expresión en branquias, riñón anterior, bazo, músculo y piel⁷⁷. Resulta interesante que algunas isoformas de C3 y C4 (ambas cuentan con enlace tioester pudiéndose unir covalentemente a superficies activadoras) presentan mayor afinidad por grupos aminos, y otras por grupos hidroxilos, lo cual se ha postulado como una estrategia para incrementar el tipo de superficies sobre las cuales podrían anclarse estos componentes del SC de peces⁷⁸. Más aún, las distintas isoformas de un mismo componente en condiciones basales se expresan de manera diferente en los distintos tejidos, lo cual podría reflejar una especialización en el combate de patógenos⁷⁹.

Por otra parte, al igual que en mamíferos, en teleósteos la síntesis de los componentes del SC está regulada por la inflamación. Esto se ha comprobado durante la administración de PAMPs tales como poly I:C, lipopolisacáridos (LPS) y β -glucanos, o durante procesos infecciosos tanto de origen viral como bacteriano⁷⁶. En los peces analizados esta regulación incluye mayormente el aumento de la expresión de varios genes del SC, aunque se ha observado en casos puntuales disminución de algún componente (incluyendo isoformas de C3). De todas maneras, la modulación de la expresión de los componentes del SC en peces es generalmente moderada⁷⁶. A modo de ejemplo, en el pez *Tor putitora* infectados con *Aeromonas hydrophila* se observó un aumento en la transcripción en hígado, bazo y músculo de los genes codificantes de los componentes C3 y C7⁸⁰. A su vez, en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas con *Aeromonas salmonicida* se observó por estudios proteómicos en hígado un incremento en la síntesis de varias proteína del SC (C1q, C3, C4, C5 y FB)⁸¹. De acuerdo con lo anterior e independientemente de la disminución puntual de algún componente del SC, la actividad funcional de la VA en teleósteos generalmente aumenta durante la infección con patógenos⁸²⁻⁸⁴.

Existen varios métodos para cuantificar la actividad del complemento. La mayoría de ellos están basados en la medición de la lisis de eritrocitos, como consecuencia de la activación de toda la vía que lleva al depósito del MAC en la membrana plasmática⁷¹. Estos métodos han sido aplicados para el análisis de la funcionalidad del SC tanto humano como de peces⁸²⁻⁸⁴. De hecho, en base a protocolos descritos para el SC humano⁷¹, en el marco de mis estudios de grado fue posible ajustar una metodología para cuantificar la actividad funcional de la VA del SC en suero de esturión ruso⁶².

1.6. Proteínas de fase aguda

La respuesta de fase aguda involucra varios cambios fisiológicos que ocurren en el organismo como consecuencia de un proceso inflamatorio, infeccioso o trauma y cuyo objetivo es contribuir a la

eliminación de los patógenos y al retorno del organismo a la homeostasis⁸⁵. Esta respuesta fisiológica es un componente central de la respuesta inmune innata e involucra la aparición de fiebre, alteraciones hormonales y metabólicas, así como profundos cambios en los niveles plasmáticos de un grupo de proteínas denominadas proteínas de fase aguda (PFA)⁸⁵.

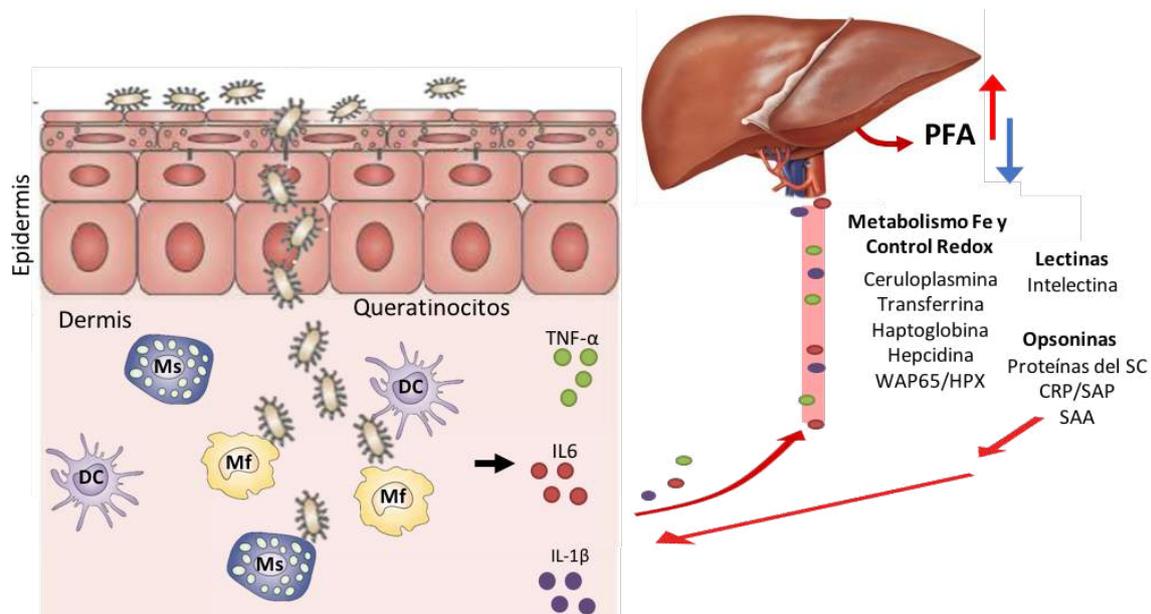


Figura 1.7. Esquema del desarrollo de la respuesta inmune innata local y la inducción de la respuesta de fase aguda en el hígado

En el panel de la izquierda se representa la estructura de la piel mostrando la presencia en la dermis de células del SII de origen mieloides, incluyendo células dendríticas (DC), macrófagos (Mf) y mastocitos (Ms). Ante el ingreso de un patógeno al organismo o frente a otro estímulo inflamatorio, estas células residentes reconocen PAMPs y/o DAMPs a través de sus PRRs induciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias, entre otras IL1 β , IL6 y TNF α . Estas citoquinas difunden en el tejido, pasan a la sangre y son censadas por los hepatocitos del hígado (panel de la derecha). El conjunto de las señales que imprimen estas citoquinas en los hepatocitos de mamíferos genera un cambio en la expresión y síntesis de más de 200 PFA que lleva a modificar los niveles plasmáticos de estas proteínas. Dentro de las PFA podemos distinguir dos grupos: PFA negativas y PFA positivas, que corresponden a componentes cuyos niveles plasmáticos descienden o aumentan durante un proceso inflamatorio, respectivamente. Una vez sintetizadas y volcadas a la circulación sistémica las PFA positivas permean y se acumulan en los sitios inflamatorios en donde reponen el consumo de los componentes innatos locales, asisten en la eliminación de patógenos durante los primeros días post-infección, limitan el daño que estos generan, facilitan la reparación de los tejidos y orquestan el retorno a la homeostasis luego de superada la infección. Janeway immunobiology 9th edition

Las PFA son proteínas plasmáticas sintetizadas principalmente por los hepatocitos en respuesta a la inflamación³⁹. Como ya se explicó, cuando un patógeno ingresa al organismo, es reconocido por PRRs presentes en células mieloides, en primera instancia células dendríticas y macrófagos residentes en los tejidos (Figura 1.7). Este reconocimiento induce la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL1 β , IL6 y TNF α ⁸⁶, las cuales difunden en el tejido y pasan a la sangre, alcanzando entonces múltiples órganos. La interacción de estas citoquinas con sus correspondientes receptores en los hepatocitos induce un cambio en la expresión y síntesis de más de 200 PFA que lleva a modificar los niveles plasmáticos de estas proteínas^{87,88}. Dentro de las PFA podemos distinguir dos grupos: PFA negativas y PFA positivas, que corresponden a componentes cuyos niveles plasmáticos descienden o aumentan durante un proceso inflamatorio,

respectivamente³⁹. En mamíferos la Albúmina y la Transferrina constituyen las principales PFA negativas y su descenso genera disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de PFA positivas³⁹. Luego de ser sintetizadas y volcadas a la circulación sistémica, las PFA positivas permean y se acumulan en los sitios inflamatorios en donde reponen el consumo de los componentes innatos locales, asisten en el combate a los patógenos durante los primeros días post-infección, limitan el daño que estos generan, facilitan la reparación de los tejidos y orquestan el retorno a la homeostasis luego de superada la infección.

Las PFA positivas se sub-clasifican en menores, moderadas o mayores en base a si sus niveles en suero se inducen menos de 2 veces, de 2 a 10 veces, o más de 10 veces respecto a sus valores basales⁸⁷. Mientras que las proteínas mayores tienden a inducirse rápidamente alcanzando sus niveles máximos en suero a las 24-72 hs post infección, las proteínas menores y moderadas generalmente tardan múltiples días en hacerlo. Para algunas PFA positivas estos aumentos son particularmente dramáticos ya que su concentración plasmática se modifica más de 1000 veces³⁹. Por esta razón, las PFA positivas que presentan notorios aumentos en un determinado organismo como consecuencia de la presencia de patógenos u otro proceso inflamatorio, constituyen herramientas útiles para monitorear la salud⁸⁹. La resolución del proceso inflamatorio/infeccioso y por consiguiente la desaparición de los estímulos inflamatorios, apaga la síntesis de PFA positivas llevando a una disminución en sus niveles serológicos. En cambio, los niveles de las PFA se mantendrán elevados si la infección o el estímulo inflamatorio persisten, tal como es el caso de infecciones o enfermedades inflamatorias crónicas⁹⁰.

Una característica importante de las PFAs es que están muy conservadas en vertebrados, lo cual sugiere que son moléculas centrales del SII y que desempeñan funciones similares en especies filogenéticamente distantes. Sin embargo, cuáles proteínas se comportan como PFA positivas varía notoriamente entre diferentes clases y familias de vertebrados⁸⁷. Por ejemplo en humanos los niveles serológicos de la proteína C reactiva (CRP) aumentan más de 1000 veces mientras que en ratones estos aumentos son moderados⁸⁷. A su vez, la inducción de estas proteínas depende de otros factores como la naturaleza química, la dosis y la persistencia en el tiempo del estímulo que gatilla su producción, sea un patógeno o un producto inflamatorio generado por un trauma o una enfermedad autoinmune. Por lo cual, para poder utilizar a las PFA como posibles marcadores de infección o inflamación es necesario en primer lugar identificar cuáles proteínas actúan como PFA en un determinado organismo.

En los teleósteos, que son los peces más estudiados y cercanos evolutivamente a los esturiones, se han identificado los genes de varios ortólogos que se comportan como PFA en mamíferos y se ha constatado que también se inducen a nivel hepático frente a estímulos inflamatorios. Sin embargo, aunque falta recabar más información a nivel de proteínas, resulta claro que la respuesta de fase aguda en los peces es diferente a la de mamíferos⁹¹. La literatura sugiere que en teleósteos las principales PFA positivas serían la proteína amiloide A del Suero (SAA), algunas Pentraxinas, la Hemopexina, la Hecpidina, una Lectina denominada Intelectina, la Transferrina, la Hemopexina, la Haptoglobina y la Ceruloplasmina. Tomando en cuenta esta información, a continuación, se describen las funciones de estas proteínas como moléculas de defensa en humano y ratón, especies donde han sido mayormente caracterizadas. Además, se resume lo que se sabe de ellas en peces teleósteos, haciendo énfasis en el número de genes codificantes y su expresión a nivel transcripcional y traduccional.

1.6.1. SAA

La SAA es una lipoproteína pequeña (en el entorno de 12 kDa) que circula en la sangre unida a las partículas de HDL, siendo el principal componente proteico de estas partículas durante un proceso inflamatorio⁹². En ratón y en el ser humano los niveles de SAA en suero aumentan más de 1000 veces durante una infección siendo una de las principales PFA positivas⁹³. Este aumento es compatible con varios estudios que indicarían que desempeña un papel importante en la respuesta inmune durante infecciones. En un modelo murino de infección por *Salmonella typhimurium*, se observó que ratones deficientes en *saa* presentan mayor carga bacteriana en hígado y bazo que sus contrapartes silvestres⁹⁴. Además, un modelo de sepsis, donde los hepatocitos fueron incapaces de sintetizar SAA (deficientes en el receptor de IL6) se asoció con mayor mortalidad, y este efecto se revirtió al administrar SAA recombinante⁹⁵. Éste último y otros estudios basados en el análisis de los efectos de la SAA recombinante, sugieren que esta PFA tiene propiedades pro-inflamatorias. Sin embargo, es importante remarcar que muchos de estos estudios fueron realizados con proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli* y los trabajos no mencionan si se controló la presencia de pirógenos (por ejemplo, LPS) que se sabe son contaminantes frecuentes en estas preparaciones. Actualmente el rol de la SAA como molécula efectora del sistema inmune innato sigue siendo oscuro y se han postulado diversas funciones para esta PFA. La información disponible sugiere que la SAA es capaz de actuar como molécula quimioatrayente de monocitos y granulocitos de la sangre⁹⁶ e inductora en neutrófilos de la producción de IL1 β , TNF α e IL8. Estas actividades contribuirían a reclutar y activar células innatas a un foco inflamatorio, amplificando la generación de IL6 e IL1 β y generando un circuito de retroalimentación positiva de su síntesis⁹³. Por otra parte, la SAA actuaría como opsonina al unirse a bacterias gram negativas como *E. coli*, favoreciendo su internalización por células fagocíticas⁹⁷. Asimismo, favorecería la eliminación de los patógenos internalizados porque induce en macrófagos la producción de especies reactivas del nitrógeno⁹⁸ y aumenta la supervivencia de los neutrófilos al inhibir su apoptosis⁹⁹. Recientemente se ha observado *In vitro* que la SAA, a diferencia de otras lipoproteínas, puede asociarse espontáneamente con fosfolípidos de membrana formando nanopartículas de tamaño similar a la HDL. Esto ha llevado a postular que la SAA *per se* podría remover lípidos de las membranas plasmática de células muertas en los sitios inflamatorios, contribuyendo de esta manera a reparar los tejidos dañados durante el proceso inflamatorio¹⁰⁰.

En humanos existen múltiples isoformas de SAA codificadas por 4 genes distintos (Ensembl GRCh38.p12⁵⁶) mientras que en teleósteos el número de genes varía entre las distintas especies observándose un único gen en pez cebra y salmón atlántico (Ensembl GRCz11, Salmobase^{56,57}) y tres genes en carpa¹⁰¹. Al igual que en mamíferos, la *saa* de teleósteos se expresa mayoritariamente en hígado y además se ha observado expresión extrahepática en otros órganos de relevancia inmunológica que en los peces incluyen al riñón anterior, bazo, branquias e intestino, tanto en condiciones basales como inflamatorias^{101,102}. Sin embargo, no existe información pública sobre los niveles séricos que la SAA podría alcanzar durante un proceso inflamatorio. Pero múltiples estudios a nivel de expresión génica indican en forma consistente que sería una de las principales PFA positivas mayores en peces. En salmónidos infectados con *A. salmonicidae*, la *saa* se induce dramáticamente en hígado llegando a constituir más del 10% del ARNm total del órgano luego de 120 hs de infección¹⁰³. Asimismo, en pez cebra (*Danio rerio*) infectados con la misma bacteria la expresión de *saa* aumenta más de 400 veces en las primeras horas¹⁰⁴. Por otra parte, en carpas infectadas con *A.*

hydrophila la expresión de *saa* en hígado aumenta más de 10.000 veces y sus niveles de ARNm permanecen elevados a los 7 días post-infección¹⁰¹.

1.6.2. Pentraxinas

Las pentraxinas son una familia de proteínas multiméricas capaces de actuar como PRRs solubles y como PFA. Dentro de esta familia, se destacan la CRP y a la proteína Amiloide P del suero (SAP) por su rol en la respuesta de fase aguda¹⁰⁵. A pesar de que estas proteínas pueden reconocer ligandos diferentes, ambas están estrechamente relacionadas estructural, funcional y evolutivamente¹⁰⁶. Aquí nos enfocaremos en la CRP ya que es una de las principales PFA positivas en humanos, induciéndose dramáticamente frente a múltiples procesos inflamatorios, incluyendo ciertas enfermedades autoinmunes, trauma estéril o infecciones. En particular, las infecciones pueden generar un incremento de más de 1000 veces en la concentración de CRP en plasma y en el foco infeccioso, por lo cual es ampliamente utilizada como marcador de inflamación³⁹. La CRP puede encontrarse en dos conformaciones diferentes: como monómero de 23 kDa (mCRP) o en su forma nativa como pentámero de 115 kDa (nCRP)¹⁰⁷. Esta proteína es sintetizada principalmente por el hígado y volcada a la circulación sistémica como nCRP, pudiendo disociarse irreversiblemente en los sitios inflamatorios en 5 subunidades de mCRP. Estas dos conformaciones son funcionalmente diferentes¹⁰⁷. nCRP actúa como PRR uniéndose a motivos fosforilcolina presentes en la superficie de patógenos o de células dañadas. Esta unión tiene al menos dos consecuencias; opsonizar la célula blanca, favoreciendo su eliminación por fagocitosis, y activa la vía clásica del SC desencadenando por tanto todos los mecanismos efectores de dicho sistema. Por otra parte, mCRP promueve la quimiotaxis y reclutamiento de leucocitos desde la sangre a los sitios inflamatorios¹⁰⁷. Estas funciones vuelven a CRP una PFA importante en el combate de patógenos, tal como lo evidencia la mayor sobrevivencia de ratones infectados que sobreexpresan nCRP o a los que se administró nCRP previo a la infección^{108,109}.

En mamíferos CRP y SAP son funcionalmente distinguibles y están codificadas por distintos genes originados por duplicación de un gen ancestral hace unos 200 millones de años. Por otra parte, los teleósteos poseen múltiples genes homólogos a CRP y a SAP existiendo 7 en pez cebra y 5 en salmón atlántico¹¹⁰. Estudios filogenéticos indican que las proteínas codificadas por estos genes no se agrupan ni con la CRP ni con la SAP de mamíferos, sino que forman un clado propio por lo cual se las denominará en esta tesis CRP/SAP y a sus genes *crp/sap*, respectivamente¹¹⁰. En salmón atlántico todas las *crp/sap* se expresan constitutivamente en varios órganos siendo algunas isoformas más abundantes en hígado y otras en bazo, músculo o branquias¹¹⁰. Asimismo, la infección con *A. salmonicida* no modifica la expresión de ninguno de estos genes en salmón atlántico y tampoco en pez cebra^{104,110}. Más aún, estudios proteómicos constatan una disminución en los niveles hepáticos de CRP/SAP en trucha arcoiris infectada con la misma bacteria⁸¹. Sin embargo, en otros teleósteos *crp/sap* se induce marginalmente durante la infección con patógenos^{111,112}. En conjunto, la nula o muy moderada regulación en la expresión de *crp/sap* durante infecciones sugiere que en los teleósteos la CRP/SAP no sería una de las principales PFA.

1.6.3. Hemopexina y Haptoglobina

La Hemopexina y la Haptoglobina son dos proteínas plasmáticas, también involucradas en el metabolismo del hierro, responsables de contener el daño que puede producir la lisis de los eritrocitos tanto en condiciones fisiológicas como frente a una infección¹¹³. La lisis de los eritrocitos libera hemoglobina a la sangre y favorece la rápida disociación del grupo hemo de esta proteína. Al no estar unido a la hemoglobina, el hemo puede catalizar varias reacciones radicalarias que modifican macromoléculas y dañan a los tejidos. Además de ser tóxico, el hemo libre constituye una fuente de hierro para patógenos, muchos de los cuales han desarrollado estrategias para lisar glóbulos rojos y obtener dicho mineral¹¹⁴. Para hacer frente a esto, los vertebrados cuentan con las proteínas Hemopexina y Haptoglobina, la primera secuestra el hemo libre y la segunda une la hemoglobina (esta unión impide la disociación del hemo), limitando de esta manera tanto el daño oxidativo como la disponibilidad de hierro para patógenos¹¹³. En humanos la Haptoglobina es una PFA positiva pero no la Hemopexina¹¹³. La Haptoglobina en mamíferos y peces teleósteos es codificada por el gen *hp*. En mamíferos este gen produce un polipéptido que se procesa proteolíticamente en dos cadenas (alfa y beta) las cuales se asocian formando una proteína tetramérica. Sin embargo, en peces teleósteos *hp* es más pequeño y codifica una única cadena ortóloga a la cadena beta de mamíferos¹¹⁵. En peces teleósteos la expresión de *hp* se encuentra restringida mayoritariamente al hígado siendo inducida fuertemente durante la infección con patógenos^{116,117}. A su vez, estudios proteómicos mostraron un aumento en los niveles de Haptoglobina en hígado de truchas arcoíris infectadas con *A salmonicida*⁸¹. Por otra parte, la Hemopexina es una glicoproteína monomérica de unos 60 kDa capaz de unir una molécula de hemo con altísima afinidad. Esta proteína es codificada en mamíferos por el gen *hpx*. En peces teleósteos esta proteína es codificada por dos genes ortólogos a *hpx* denominados *wap65-1* y *wap65-2*, haciendo referencia al tamaño de la proteína (65 Da) y a las siglas de su nombre en inglés (*warm acclimation protein*). Por simplicidad y dada la falta de información sobre estas proteínas en peces, en este trabajo nos referiremos a la Hemopexina de peces como WAP65/HPX y a los genes que la codifican como *wap65/hpx*¹¹⁸. *wap65-1* se expresa en forma constitutiva en múltiples tejidos mientras que la expresión de *wap65-2* está restringida mayoritariamente al hígado, siendo fuertemente inducida tanto por patógenos como por cambios en la temperatura del agua^{119,120}. En conjunto, la literatura sugiere que la Haptoglobina y la WAP65/HPX serían PFA positivas en peces teleósteos, aunque no existen a la fecha estudios que hayan cuantificado sus niveles en suero.

1.6.4. Hepcidina

La Hepcidina es una PFA positiva mayor en mamíferos inducida durante un proceso inflamatorio o por aumento en los niveles circulantes de hierro. La Hepcidina madura es un pequeño péptido de unos 20-25 aminoácidos con un rol dual, actúa como regulador maestro del metabolismo del hierro y como péptido antimicrobiano¹²¹. La regulación del metabolismo de este mineral se debe a que la Hepcidina puede interactuar con el transportador de hierro Ferroportina responsable de exportar el hierro desde el interior al exterior celular¹²¹. La Ferroportina se encuentra en macrófagos del hígado y bazo responsables de reciclar el hierro de los eritrocitos, en los hepatocitos que lo acumulan como reserva, y en los enterocitos que lo absorben de la dieta¹²². La unión de la Hepcidina a la Ferroportina induce la degradación del transportador impidiendo la liberación de hierro desde el interior al exterior celular, regulando así la biodisponibilidad de este mineral en el organismo y su

distribución intra y extracelular¹²³. Por esta razón, la inducción de la Hecpidina durante una infección inhibe el crecimiento de patógenos ya que restringe los niveles circulantes de hierro, el cual, como se mencionó anteriormente, es un mineral esencial para la sobrevivencia de los patógenos¹²⁴. A su vez, la Hecpidina presenta actividad microbicida intrínseca al intercalarse en las membranas de microorganismos lo cual conduce a su lisis¹²¹. La importancia de la Hecpidina en la inmunidad innata se pone de manifiesto en la menor sobrevivencia que presentan los ratones genéticamente deficientes en Hecpidina (*hamp*^{-/-}) infectados con *Vibrio vulnificus*, respecto a ratones silvestres¹²⁵. Los mamíferos cuentan con un único gen para la Hecpidina (*hamp*) mientras que los teleosteos presentan dos tipos de Hecpidinas codificadas por los genes *hamp1* y *hamp2*¹²⁶. Estos son funcionalmente diferentes, *hamp1* está especializado en regular el metabolismo del hierro mientras que *hamp2* se comporta como un péptido antimicrobiano¹²⁷. En peces teleosteos pueden existir múltiples copias de *hamp 1* y *2* que son expresadas en forma constitutiva en diversos tejidos como hígado (el mayoritario), bazo y riñón anterior^{127,128}. Frente a la infección con diversos patógenos la expresión en estos órganos aumenta notoriamente. Asimismo utilizando anticuerpos anti-Hecpidina se observa que la síntesis de este péptido se induce en riñón anterior e hígado durante una infección o frente a la administración de LPS^{129,130}. Por otra parte la administración de Hecpidina recombinante a la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*) modula sus niveles de hierro en sangre y aumenta la sobrevivencia frente a la infección con *Flavobacterium columnare*¹³¹. La gran diversidad de Hecpidinas, su inducción transcripcional y traduccional por patógenos y su implicancia en el combate de los mismos sugieren que esta molécula es una importante PFA positiva en los peces.

1.6.5. Intelectina

La Intelectina humana es una lectina soluble homotetramérica de 120 kDa (monómero 35 kDa) que une carbohidratos en forma calcio dependiente. Se describe como una lectina tipo-X¹³², ya que carece del dominio tipo-C asociado con este tipo de interacciones y presente en otras lectinas como la MBL. La Intelectina parece estar implicada en las defensas innatas ya que se expresa en sitios de entrada de patógenos como intestino y pulmón, se induce en ratón por la infección con parásitos intestinales y reconoce una amplia diversidad de glicanos presentes únicamente en microorganismos¹³³. Sin embargo, a diferencia de otras lectinas como la MBL, la Intelectina humana no activa el SC y su rol como molécula de defensa aún no ha sido claramente establecido. Estudios proteómicos han detectado a la Intelectina humana en plasma (Genecards¹³⁴), pero no se ha observado expresión o síntesis de Intelectina en hígado (Gene Expresión Database¹³⁵, Human Protein Atlas¹³⁶) lo cual sugiere que no sería una PFA en estos organismos. En humanos, la Intelectina es codificada por los genes *itln1* e *itln2*, mientras que algunos teleosteos como pez cebra existen hasta 6 genes ortólogos. En pez cebra, una de estas 6 isoformas se expresa constitutivamente en hígado y se induce fuertemente frente a la estimulación con *A. salmonicida*¹³⁷. Asimismo, una *itln* es el gen que más aumenta en hígado de pez gato infectados con *E. ictaluri*¹³⁸. En trucha arcoíris *itln* se expresa constitutivamente en hígado, riñón, intestino y, durante la infección con diversos patógenos los niveles de Intelectina aumentan en estos órganos, de acuerdo con su detección por inmunohistoquímica^{139,140}. A su vez estudios realizados en trucha arcoíris detectaron Intelectina en muestras de plasma¹³⁹. En conjunto, la literatura sugiere que los ortólogos de la Intelectina humana

en peces, a diferencia de mamíferos, se expresan en hígado en respuesta a estímulos inflamatorios y también circulan en plasma por lo cual podrían comportarse como PFA positivas.

1.6.6. Transferrina

La Transferrina es una glicoproteína monomérica del plasma de unos 70-80 kDa con dos dominios de unión al hierro de alta afinidad¹⁴¹. Esta proteína tiene como función unir casi la totalidad del hierro presente en el plasma y transportarlo en forma inerte a diversas células blanco (precursor de eritrocitos, macrófagos y hepatocitos), previniendo la formación de radicales libres catalizados por dicho metal¹⁴². Por endocitosis mediada por receptor la Transferrina cargada con hierro es internalizada en estas células en donde el cambio de pH endosomal favorece la liberación del hierro para su utilización¹⁴². Como se mencionó anteriormente la regulación de los niveles de hierro es un mecanismo importante para combatir a los patógenos lo cual explica que la Transferrina esté involucrada en la respuesta inmune temprana de los organismos¹¹⁴. En humanos la Transferrina ha sido identificada como una PFA negativa, no resultando claro cómo en este caso su disminución sería benéfica para el organismo. Este comportamiento contrasta con lo que sabe en peces teleósteos, donde la Transferrina puede comportarse tanto como PFA positiva o negativa dependiendo de la especie y del estímulo inflamatorio⁹¹. En pez cebra y salmón atlántico existe un único gen para la Transferrina (*tf*) (Ensembl GRCz11, Salmobase^{56,57}) mientras que en pez gato americano parecerían existir al menos dos copias en el genoma¹⁴³. En condiciones basales *tf* se expresa mayoritariamente en hígado y en menor medida en intestino, timo, riñón anterior y sangre periférica^{143,144}. En tilapia (*Oreochromis niloticus*) infectados con *A. hydrophila* la expresión de *tf* y la síntesis de Transferrina aumentan en hígado, bazo y riñón anterior¹⁴⁵. En esta misma línea, estudios proteómicos mostraron un incremento en los niveles séricos de Transferrina en salmones (*Salmo salar*) con enfermedad pancreática generada por el virus SAV3¹⁴⁶. En contraste, en pez cebra la expresión de *tf* en hígado se ve poco modificada por la infección con *A. salmonicidae*¹⁰⁴, mientras que en lúbrina (*Dicentrarchus labrax*) esta expresión disminuye notoriamente durante la infección con *Photobacterium damsela*¹⁴⁷. Asimismo, en el lenguado de oliva (*Paralichthys olivaceus*) la expresión de *tf* y la síntesis de Transferrina en hígado disminuyeron durante la infección con *Edwardsiella tarda*¹⁴⁸. Por lo tanto, en peces teleósteos no existe una tendencia clara sobre el comportamiento de la Transferrina, pudiendo actuar tanto como una PFA positiva como negativa.

1.6.7. Ceruloplasmina

La Ceruloplasmina es una glicoproteína plasmática de estructura monomérica y 120 kDa que coordina 6 átomos de cobre en su estructura.¹⁴⁹ De hecho, transporta la mayoría del cobre del plasma (40-70%), dirigiéndolo a células blanco para su incorporación como cofactor en múltiples proteínas, por lo cual está involucrada en variadas funciones del organismo. Además, la Ceruloplasmina actúa como enzima catalizando diversas reacciones de óxido-reducción dependientes de cobre¹⁵⁰. Puede actuar como ferroxidasa oxidando el Fe²⁺ a Fe³⁺ lo cual es necesario para que este metal sea incorporado a la Transferrina para su transporte. A su vez, la Ceruloplasmina oxida aminas biológicas y se postula que mediante este mecanismo inactiva pequeñas hormonas como epinefrina, norepinefrina y dopamina¹⁵⁰. Adicionalmente esta proteína cumple un rol central en descomponer

radicales libres y prevenir la oxidación de macromoléculas propias gracias a su actividad NO-oxidasa, glutatión-peroxidasa y superóxido dismutasa¹⁵⁰. En mamíferos la Ceruloplasmina es sintetizada principalmente en hígado y en menor medida por macrófagos y células mononucleares, comportándose a su vez como una PFA positiva moderada durante un proceso inflamatorio^{151,152}. En humanos, pez cebra y salmón atlántico la Ceruloplasmina es codificada por un único gen denominado *cp* (Ensembl GRCh38.p12, GRCz11 y Salmobase^{56,57}). En teleosteos, estudios realizados a nivel de expresión génica y proteína indican que la Ceruloplasmina también sería una PFA positiva en estos organismos^{81,138,153}. Su actividad aminaoxidasa permite cuantificar los niveles de Ceruloplasmina en suero utilizando sustratos sintéticos como p-fenilendiamina¹⁵⁴, propiedad que nos ha permitido medir la actividad Ceruloplasmina en suero de esturión ruso¹⁵⁵.

1.7. Antecedentes de la línea de investigación en esturión ruso en Uruguay

Como ya se mencionó, actualmente en nuestro país existen dos emprendimientos de acuicultura dedicados a la cría de esturiones para la producción y exportación de caviar. La acuicultura, como actividad intensiva, presenta problemáticas que desafían el desarrollo de este sector tanto en nuestro país como en el mundo¹⁵⁶. En este sentido, y a pesar del éxito de estos emprendimientos, durante los meses cálidos del año, en la granja con la cual hemos colaborado hasta ahora (ERN), ocurre un aumento en la mortalidad de los esturiones debido a infecciones con patógenos oportunistas como *A. hydrophila*¹⁵⁷ y *S. aureus* (Información provista por el Ing. Acuicultor Daniel Conijeski). Como las hembras de esturión ruso alcanzan la madurez sexual luego de 7-8 años de cultivo¹⁵⁸ este aumento en la mortalidad supone importantes pérdidas económicas, debido al tiempo, esfuerzo e inversión que conlleva criar a estos animales antes de que pueda ser cosechado el caviar. Por lo tanto, para que este incipiente sector productivo pueda desarrollarse en nuestro país es importante entender la génesis de esta problemática y más aún contribuir a solucionarla.

Para comenzar a entender esta problemática, durante mi tesis de grado de Licenciatura en Bioquímica desarrollé técnicas que permiten determinar la actividad funcional de tres componentes del SII del esturión ruso: la VA del SC, la Lisozima y la Ceruloplasmina^{62,159}. Utilizando estas metodologías se observó que, en hembras adultas mantenidas en las condiciones de cultivo de la granja, la actividad de estos componentes del SII presenta variaciones en verano respecto al invierno, observándose en verano un descenso significativo en la funcionalidad de la VA y de la Ceruloplasmina, y un modesto aumento en la actividad Lisozima del suero¹⁵⁹. Como la elevada temperatura del agua en el verano podría contribuir a las alteraciones observadas, estudiamos en condiciones controladas de laboratorio como la exposición de los peces a temperaturas del agua de invierno (18°C) y verano (24°C) repercute sobre la funcionalidad de estos componentes del SII. Nuestro estudio mostró que la exposición a 24°C reprodujo los resultados del verano, observándose una reducción en la actividad de la VA y de la Ceruloplasmina y un aumento en la actividad Lisozima¹⁵⁹. A su vez observamos que durante el verano o frente a la exposición a 24°C ocurre un marcado descenso en los niveles séricos de proteínas totales y se afecta el crecimiento de los esturiones, lo cual es consistente con una respuesta de estrés crónico^{160,161}. Por tanto, estos resultados mostraron que las temperaturas del verano, que pueden superar los 28°C, repercuten negativamente sobre la fisiología de los esturiones rusos (cuya temperatura óptima de crecimiento ronda los 15-22°C¹⁶²) generando una situación de

estrés crónico que puede explicar la disminución en la funcionalidad observada para algunos componentes centrales del SII^{163,164}. Estos y otros factores, como podría ser el aumento de la carga de patógenos en el agua, explican el incremento en las infecciones por bacterias (por ejemplo, *Aeromonas* y *Streptococcus*) y la mayor mortalidad registrada en los meses del verano.

Por otro lado, los estudios realizados apoyaron la necesidad de contar con herramientas que permitan monitorear el estado sanitario de los peces, particularmente mediante la detección temprana de procesos infecciosos. Con el fin de generar este tipo de herramientas, nos propusimos primero identificar posibles biomarcadores de infección/inflamación que permitan en una segunda etapa desarrollar ensayos para su cuantificación. Estos ensayos además de ser sensibles deberán resultar sencillos de implementar en las granjas de piscicultura. En principio, los componentes del SII ya estudiados en el esturión ruso, es decir la VA del SC, la Ceruloplasmina y la Lisozima podrían ser candidatos a comportarse como posibles biomarcadores. Sin embargo, además de que la literatura no sugiere que sean marcadores robustos (por ejemplo, PFA mayores), los ensayos ajustados para su cuantificación se basaron en medidas de actividad, que son más delicadas de realizar, requieren mayor entrenamiento del personal y una mayor infraestructura de laboratorio, lo cual vuelve poco factible su transferencia a las granjas. En este escenario resultó necesario expandir nuestra búsqueda a otras moléculas candidatas a biomarcadores tempranos de infección y que puedan cuantificarse en suero, ya que ésta es una muestra relativamente fácil de obtener de los peces.

Finalmente, corresponde mencionar que para abordar la búsqueda de biomarcadores de infección y/o inflamación es necesario contar con un modelo de inflamación en el esturión ruso. Al inicio de esta tesis, en la literatura disponible, existían muy pocos antecedentes en esturión de este tipo de modelos. Se conocía que la infección por vía intraperitoneal con bacterias del género *Aeromonas* (en particular *A. hydrophila* y *A. salmonicida*) ha sido ampliamente utilizada para desencadenar respuestas inflamatorias y estudiar la expresión de PFA en teleósteos (como se mencionó en 1.6). A su vez, en esturiones gigantes (*H. Huso*) infectados vía intraperitoneal con *A. hydrophila* inactivada se había observado un aumento en el porcentaje de neutrófilos eosinófilos y monocitos en sangre, indicando que las bacterias muertas desencadenaron una respuesta inflamatoria sistémica¹⁶⁵.

Por otra parte, recientemente se han publicado 4 trabajos de transcriptómica de hígado, bazo y riñón anterior de esturiones infectados por vía intraperitoneal con *A. hydrophila* o *Yersinia ruckeri* que buscan comprender el funcionamiento de SII de estos peces y su respuesta frente a patógenos. En los esturiones dabry (*Acipenser dabryanus*) infectados con *A. hydrophila* se indujo en riñón anterior la expresión de PRRs (principalmente TLRs) y las proteínas asociadas a las vías de señalización de estos receptores innatos, proteínas del SC y las citoquinas proinflamatorias IL1 β e IL8²⁴. Asimismo, en esturiones híbridos (*H. dauricus* x *A. schrenckii*) infectados intraperitonealmente con la misma bacteria se observó en bazo un aumento en la expresión de varios TLRs y diversas citoquinas como IL11, IL12, IL8, IL6 e IL1 β ¹⁶⁶. En particular la expresión de IL6 e IL1 β , citoquinas claves en la inducción de la respuesta de fase aguda en mamíferos y teleósteos (como se mencionó en 1.6), aumentaron 59 y 28 veces, respectivamente¹⁶⁶. Los resultados de estos dos transcriptomas indican que la infección vía intraperitoneal con *A. hydrophila* desencadena una respuesta inflamatoria en los esturiones. Para ninguno de estos artículos se encuentra disponibles la lista de genes expresados diferencialmente. En esturión amur (*Acipenser schrenckii*) infectado vía intraperitoneal con *Y. ruckeri* se observó en el transcriptoma de bazo aumento en la expresión del receptor de IL1 β , pero no se detectaron cambios en la expresión de PRRs y tampoco de citoquinas proinflamatorias como IL1 β e IL6²⁶. En el

transcriptoma de hígado de esta misma especie de esturión también infectado con *Y. ruckeri* aumentó la expresión de algunos TLRs y de IL8 pero tampoco se observó expresión de IL1 β o IL6²⁵. Estos resultados parecerían indicar que, al menos en el esturión amur (*A. schrenckii*), la infección con *Y. ruckeri* desencadena una respuesta inflamatoria menor a la inducida por *A. hydrophila*. La lista de todos los genes expresados de forma diferencial está disponible únicamente para el transcriptoma de bazo de esturión amur (*A. schrenckii*). Globalmente los resultados en la literatura para peces teleósteos y para esturión indican que la infección vía intraperitoneal con *A. hydrophila* u otras bacterias es un buen modelo para estudiar la respuesta inflamatoria en estos organismos.

1.8. Hipótesis

Como se mencionó anteriormente, el SII comprende un conjunto de mecanismos altamente conservados en el reino animal entre los que se incluye a la respuesta de fase aguda. Esta respuesta modula la expresión génica de los hepatocitos como consecuencia de la interacción con citoquinas inflamatorias, principalmente IL6 e IL1 β . A pesar de que los productos de esta modulación, es decir las PFA, identificadas en mamíferos y peces teleósteos pueden diferir, es sorprendente que en estos organismos filogenéticamente distantes se han descritos cambios similares en algunas proteínas (SAA, Hepsidina, Ceruloplasmina, Haptoglobina). Considerando que tanto los esturiones como los peces teleósteos integran el clado Actinopterygii de peces óseos, este trabajo plantea como hipótesis la existencia en el esturión de genes homólogos a las PFA identificadas en teleósteos y que estos genes se comportarían en forma similar, expresándose en el hígado en el marco de una respuesta de fase aguda. Más aún, se espera que alguna de las proteínas codificadas por estos genes, aunque no necesariamente las mismas que en los teleósteos, se comporten como PFA positivas mayores, es decir que sus niveles en sangre aumenten más de 10 veces en respuesta estímulos inflamatorios. Este último punto se apoya en que a pesar de que la mayoría de la información disponible sobre las PFA, proviene de estudios de expresión génica (existiendo muy pocos datos a nivel proteico), generalmente se observa una correlación positiva entre la expresión y la traducción de las PFA. Por lo tanto, aquellas PFA de esturión que más se induzcan respecto a los valores basales constituirían posibles biomarcadores inflamatorios. Por lo tanto, de acuerdo a esta hipótesis, este trabajo de maestría en Biotecnología buscará responder los siguientes tres grandes: ¿Existen en el esturión genes homólogos a las PFA identificados en teleósteos?, ¿Se induce la expresión de estos genes en hígado en respuesta a estímulos inflamatorios? ¿Los genes que más se induzcan en hígado darán lugar a un aumento en los niveles de estas PFA en sangre respecto a las condiciones basales?

1.9. Objetivo General.

En el marco de la hipótesis desarrollada anteriormente, este trabajo de maestría en Biotecnología planteó como objetivo general identificar biomarcadores séricos de infección y/o inflamación en el esturión ruso. Esto implicó identificar en el esturión ruso la secuencia codificante de homólogos de PFA de teleósteos, estudiar su expresión hepática en respuesta a estímulos inflamatorios o a la infección con bacterias, y desarrollar inmunoensayos para al menos una de las proteínas más promisorias, de modo de verificar si sus niveles séricos aumentan durante una respuesta de fase aguda. Como modelo inflamatorio se utilizó la infección o estimulación con *A. hydrophila* por vía intraperitoneal apoyándose en la literatura existente y en el hecho que se han

aislado varias cepas de *A. hydrophila* en esturiones rusos criados en ERN, lo cual sugiere que esta bacteria podría ser uno de los microorganismos responsables de la mortalidad observada en el verano¹⁵⁷.

1.10. Objetivos Específicos

A continuación, se detallan los 3 objetivos específicos de este trabajo de maestría en Biotecnología y las aproximaciones realizadas para cumplir cada uno de ellos:

1.10.1. Identificar homólogos de potenciales PFA en el esturión ruso y analizar su expresión en hígado frente a la estimulación o infección con *A. hydrophila*

- I. Identificar la secuencia codificante de homólogos de PFA en esturión utilizando datos de transcriptómica disponibles.
- II. Amplificar, clonar y secuenciar los homólogos de las PFA en el esturión ruso
- III. Estudiar la expresión en hígado de las proteínas candidatas a PFA en esturiones rusos estimulados o infectados con *A. hydrophila* y seleccionar una de ellas como potencial biomarcador.

1.10.2. Obtener antígenos correspondientes a la proteína de esturión ruso seleccionada como posible PFA positiva para poder generar anticuerpos anti-PFA

- I. Identificar potenciales péptidos inmunogénicos en la PFA de esturión ruso seleccionada
- II. Expresar en forma recombinante y purificar la PFA de esturión ruso seleccionada

1.10.3. Desarrollar un ELISA que permita cuantificar la PFA en muestras de suero

- I. Generar y purificar anticuerpos policlonales contra la forma nativa y contra péptidos potencialmente inmunogénicos de la PFA seleccionada
- II. Optimizar un ELISA que permita cuantificar la PFA en muestras de suero
- III. Determinar en los esturiones rusos estimulados o infectados con *A. hydrophila* los niveles séricos de la PFA seleccionada mediante ELISA

2. RESULTADOS

2.1. Identificación de potenciales PFA y análisis de su expresión en esturiones rusos estimulados o infectados con *A. hydrophila*

En este capítulo se describen los resultados correspondientes al objetivo específico 1 que comprendió la identificación de la secuencia codificante en esturión de los homólogos de potenciales PFA de teleósteos y el posterior análisis de su expresión hepática en esturiones rusos estimulados o infectados con la bacteria patógena *A. hydrophila*. Estos estudios permitirían seleccionar en este modelo al menos un candidato con las características correspondientes a una potencial PFA.

2.1.1. Identificación de la secuencia codificante de homólogos de PFAs en el esturión chino y siberiano a partir de datos de transcriptómica

Se buscó evaluar si alguna de las proteínas descritas como PFA en otros peces teleósteos, incluyendo la SAA, CRP/SAP, WAP65/HPX, Hecpídina, Intelectina, Transferrina y Haptoglobina podrían comportarse como PFA positivas en el esturión ruso (*A. gueldenstaedtii*)^{91,103,104}. Para ésto, se planteó analizar su expresión en respuesta a la estimulación o infección con *A. hydrophila*, una bacteria patógena que ha sido aislada del establecimiento de cría de esturiones, ERN en Uruguay. Además, para analizar si hubo desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda, se planteó analizar la expresión de los transcriptos de citoquinas proinflamatorias, como la IL1 β , IL6 o TNF α , cuyos niveles aumentan en condiciones de infección y a su vez participan en desencadenar la respuesta de fase aguda en mamíferos y también lo harían en peces^{85,167}. Debido a que la secuencia codificante de homólogos de estas proteínas no ha sido reportada para ninguna especie de esturión, en primer lugar, fue necesario identificarlas. Esto representó un desafío ya que no se ha secuenciado el genoma de ninguna especie de esturión y a su vez ninguna de las secuencias de estas proteínas ha sido depositadas en bases de datos públicos que recopilan información de secuencias (GenBank, EMBL o DDBJ). Afortunadamente, al inicio de este trabajo se dispuso de datos del transcriptoma de la larva de esturión siberiano (*A. baerii*)¹⁹ y dos transcriptomas de esturión chino (*A. sinensis*), uno de gónada²¹ y otro de órganos inmunes²⁷, sin embargo la anotación de estos transcriptomas no era pública. Utilizando los datos disponibles, se buscó identificar los homólogos de interés y diseñar cebadores para amplificar y secuenciar las potenciales PFA del esturión ruso, aprovechando la cercanía filogenética de las tres especies de esturión.

Para identificar las proteínas candidatas a PFA en el esturión, se tradujeron los transcriptomas y estos se utilizaron para realizar búsquedas con el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* para proteínas (BLASTp) utilizando como templatado las secuencias aminoacídicas de PFA de pez cebra. La identidad de los transcriptos traducidos encontrados en estas búsquedas se analizó mediante BLASTp contra la base de proteínas no redundantes del Gene Bank (nrNCBI), alineamientos con organismos modelo y búsqueda de dominios conservados. Una vez identificadas las secuencias aminoacídicas de las proteínas homólogas de interés de esturión chino y siberiano, se obtuvieron y alinearon los transcriptos correspondientes para analizar su grado de conservación y posibilidad de diseñar cebadores específicos.

Potencial PFA	Resultados BLASTp Base de datos: transcriptoma de órganos inmunes de esturión chino			Resultados BLASTp Base de datos: nrNCBI (primer HIT)			
	Transcripto identificado	Identidad (%)	e-value	Homología del Transcripto	Código de acceso	Identidad (%)	e-value
SAA	GETX01015093.1	69	1.65E-49	SAA	CEG62717.1	72	4.00E-53
CRP/SAP	GETX01022638.1	30	1.07E-22	Anhidrasa carbónica	XP_015192367.1	66	0
	GETX01029838.1	36	3.71E-21	CRP/SAP	XP_021435889.1	52	1.00E-36
	GETX01013873.1	34	9.81E-18	Pentraxina 4	XP_006001516.1	56	0
	GETX01025488.1	39	1.14E-17	CRP/SAP	XP_015217354.1	46	6.00E-21
WAP65/HPX	GETX01015919.1	49	1.24E-153	WAP65/HPX	XP_015219463.1	57	0
Hepcidina	GETX01012667.1	36	5.65E-04	Hepcidina	XP_006641712.1	46	2.00E-13
Intelectina	GETX01010297.1	67	4.40E-128	Intelectina	XP_015222783.1	73	3.00E-132
Transferrina	GETX01026229.1	56	0	Transferrina	XP_015217073.1	59	0
	GETX01030698.1	40	2.84E-154	Melano transferrina	XP_014340192.1	67	0
	GETX01023074.1	34	5.18E-99	Melano transferrina	XP_014344920.1	70	0
Haptoglobina	GETX01015586.1	49	7.07E-91	Haptoglobina	XP_006641404.2	51	5.00E-98
	GETX01025834.1	34	1.95E-37	Masp1	XP_015217030.1	79	0
	GETX01013684.1	30	1.78E-36	C1r	XP_006642449.1	51	0
	GETX01031128.1	31	1.16E-29	Maps2	XP_015192366.1	66	0
	GETX01017486.1	32	1.90E-29	Factor X coagulación	XP_018587608.1	56	0
IL1 β	GETX01022452.1	32	1.21E-20	IL1β	CEG62716.1	43	5.00E-47
	GETX01024662.1	35	6.59E-13	IL1β	NP_001117054.1	38	1.00E-19

Tabla 2.1. Identificación de los homólogos de potenciales PFA en el transcriptoma de órganos inmunes de esturión chino (*Acipenser sinensis*)

Utilizando la secuencia aminoacídica de la SAA, CRP/SAP, WAP65/HPX, Hepcidina, Intelectina, Transferrina, Haptoglobina e IL1 β de pez cebra se realizaron búsquedas en el transcriptoma traducido de órganos inmunes del esturión chino empleando el algoritmo BLASTp. Se indica el código del o los transcritos encontrados, su identidad de secuencia y e-value respecto a la secuencia de pez cebra empleada en la búsqueda. Las secuencias de los transcritos encontrados se tradujeron y analizaron por BLASTp contra la base de proteínas no redundantes de NCBI (nrNCBI). Se indica el nombre y código de acceso de la proteína identificada en primer lugar, el porcentaje de identidad de secuencia y el e-value correspondiente. En negrita se resaltan los transcritos del esturión chino cuyo análisis permitió identificarlos como homólogos de las PFA buscadas.

Potencial PFA	Resultados BLASTp Base de datos: transcriptoma de larva del esturión siberiano			Resultados BLASTp Base de datos: nrNCBI (primer HIT)			
	Transcripto identificado	Identidad (%)	e-value	Homología del Transcripto	Código de acceso	Identidad (%)	e-value
SAA	comp122687_c0_seq1	69	5.06E-55	SAA	CEG62717.1	70	6.00E-52
CRP/SAP	comp143758_c0_seq1	35	4.69E-36	CRP/SAP	XP_006631035.1	56	1.00E-81
	comp143012_c1_seq1	29	1.12E-22	Solute carrier family 2	XP_010739533.2	78	0
	comp143962_c0_seq1	32	3.12E-16	Pentraxina 4	XP_006001516.1	56	0
	comp141226_c0_seq1	35	2.07E-14	Receptor pentraxina neuronal	XP_023670199.1	57	0
	comp137088_c0_seq1	35	5.98E-14	Pentraxina neuronal	XP_006635265.1	85	0
	comp135710_c1_seq4	33	1.51E-13	Pentraxina neuronal	XP_015215559.1	80	0
WAP65/HPX	comp138318_c1_seq1	50	1.44E-156	WAP65/HPX	XP_015219463.1	56	0
Hepcidina	comp130481_c0_seq1	36	5.65E-04	Hepcidina	XP_006641712.1	46	2.00E-13
Intelectina	comp135402_c0_seq1	63	5.42E-145	Intelectina	XP_015222783.1	63	3.00E-155
Transferrina	comp137559_c1_seq1	57	0	Transferrina	XP_015217073.1	59	0
	comp144343_c0_seq5	40	6.53E-155	Melano Transferrina	XP_014340192.1	68	3.00E-159
	comp142376_c0_seq2	36	1.28E-86	Melano Transferrina	XP_014344920.1	66	0
	comp136507_c0_seq2	34	6.21E-41	Proteína de matriz	XP_015216849.1	80	0
	comp142376_c0_seq2	34	8.56E-24	Melano Transferrina	XP_014344920.1	66	0
Haptoglobina	comp126431_c0_seq1	47	2.36E-87	Haptoglobina	XP_020344734.1	51	6.00E-99
	comp140810_c0_seq1	35	2.53E-40	Masp1	XP_015217030.1	79	0
	comp144308_c0_seq1	31	4.05E-30	Masp2	XP_015192366.1	66	0
	comp140273_c0_seq3	32	1.07E-29	Proteasa de Serina 33	NP_001090463.1	54	1.00E-84
IL1 β	comp141711_c0_seq2	30	4.42E-19	IL1β	CEG62716.1	42	3.00E-47

Tabla 2.2. Identificación de los homólogos de potenciales PFA en el transcriptoma de la larva de esturión siberiano (*Acipenser baeri*)

Utilizando la secuencia de SAA, CRP/SAP, WAP65/HPX, Hepcidina, Intelectina, Transferrina, Haptoglobina e IL1 β de pez zebra se realizaron búsquedas en el transcriptoma de larva de esturión siberiano empleando el algoritmo BLASTp. Se indica el código del o los transcritos encontrados, su identidad de secuencia y e-value respecto a la secuencia de pez zebra empleada en la búsqueda. Las secuencias de los transcritos encontrados se tradujeron y analizaron por BLASTp contra la base de proteínas no redundantes de NCBI (nrNCBI). Se indica el nombre y código de acceso de la proteína identificada en primer lugar, el porcentaje de identidad de secuencia y el e-value correspondiente. En negrita se resaltan los transcritos del esturión siberiano cuyo análisis permitió identificarlos como homólogos de las PFA buscadas.

Potencial PFA	Resultados BLASTp Base de datos: transcriptoma de gónada de esturión chino			Resultados BLASTp Base de datos: nrNCBI (primer HIT)			
	Transcripto identificado	Identidad (%)	e-value	Homología del Transcripto	Código de acceso	Identidad (%)	e-value
CRP/SAP	m.59633	35	7.61E-35	CRP/SAP	XP_006631035.1	57	5.00E-83
CRP/SAP	m.106626	32	2.56E-26	Anhidrasa carbónica	XP_015192367.1	65	3.00E-80
CRP/SAP	m.101536	33	3.76E-18	Pentraxina 4	XP_006001516.1	72	5.00E-115
CRP/SAP	m.49188	28	4.69E-14	Pentraxina neuronal	XP_006635265.1	87	0

Tabla 2.3. Identificación del homólogo de la CRP/SAP en el transcriptoma de gónada de esturión chino (*Acipenser sinensis*)

Utilizando la secuencia de CRP/SAP de pez cebra se realizaron búsquedas en el transcriptoma de órganos inmunes del esturión chino empleando el algoritmo BLASTp. Se indica el código de los transcritos encontrados, su identidad de secuencia y e-value respecto a la CRP/SAP de pez cebra. Las secuencias de los transcritos encontrados se tradujeron y analizaron por BLASTp contra la base de proteínas no redundantes de NCBI (nrNCBI). Se indica el nombre y código de acceso de la proteína identificada en primer lugar, el porcentaje de identidad de secuencia y el e-value correspondiente. En negrita se resaltan los transcritos del esturión chino cuyo análisis permitió identificarlos como homólogos de CRP/SAP

En el caso de la SAA, el análisis de los transcriptomas traducidos de órganos inmunes del esturión chino (Tabla 2.1) y de larva del esturión siberiano (Tabla 2.2) permitió encontrar una única secuencia en cada uno de ellos con homología a la SAA de pez cebra. Ambas secuencias mostraron alrededor de un 70% de identidad respecto a la SAA de teleósteos en el análisis por BLASTp contra la base nrNCBI. El alineamiento de las secuencias de esturión junto a las SAA de peces teleósteos, ratón y humano permitió verificar que las secuencias encontradas están completas, presentan el péptido señal que permite su excreción al medio extracelular, así como el dominio Pfam 00277 y la secuencia *huella o firma* característica de SAA. Esto confirmó que dichas secuencias del esturión son homólogos de SAA (Figura 2.1a). Asimismo, este alineamiento mostró que la SAA es una proteína muy conservada en vertebrados y esto se extiende a los esturiones. A continuación, se alinearon los transcritos correspondientes a las secuencias identificadas en el esturión chino y siberiano (Figura 2.1b), observándose un porcentaje de identidad mayor al 97.0%, con sólo 13 cambios puntuales en la secuencia nucleotídica, en un total de 438 pb. Este nivel de conservación entre ambas especies permitió diseñar cebadores para amplificar, clonar y secuenciar el homólogo de la SAA madura del esturión ruso. Como se observaron 2 cambios puntuales en el extremo 5' de las secuencias, se diseñaron 2 cebadores directos para maximizar las chances de amplificación.

Respecto a la CRP/SAP, empleando la secuencia de pez cebra se encontraron un total de ocho secuencias que presentaban niveles significativos de homología en los transcriptomas traducidos de los órganos inmunes y de la gónada del esturión chino (Tablas 2.1 y 2.3, respectivamente). Sin embargo, el análisis de estas secuencias por BLASTp contra la base nrNCBI mostró que sólo dos de estas secuencias podrían corresponder a la CRP/SAP. Las secuencias identificadas en el transcriptoma de órganos inmunes se descartaron porque se dedujo que estos transcritos fueron incorrectamente ensamblados y se conservó la secuencia identificada en el transcriptoma de gónada. Asimismo, el análisis a partir del transcriptoma traducido de larva de esturión siberiano permitió encontrar seis secuencias con homología a la CRP/SAP de pez cebra, pero sólo una de ellas mostró un nivel estadísticamente significativo de identidad al realizar el BLASTp contra la base nrNCBI (Tabla 2.2). El

alineamiento de estas secuencias de esturión chino y siberiano junto a la CRP/SAP de peces teleósteos modelo mostró que estas proteínas están muy conservadas en los peces (Figura 2.2a). Además, se observó que las secuencias de esturión identificadas están completas, presentan el péptido señal y dos elementos característicos de estas pentraxinas (dominio Pfam 00354 y la secuencia *huella*) que contribuyen a apoyar su identificación como un homólogo de CRP/SAP. Por otra parte, al alinear las secuencias nucleotídicas correspondientes a los transcritos identificados en los dos esturiones (Figura 2.2b), se observó un alto grado de conservación (97.4% de identidad), con sólo 21 cambios puntuales en un total de 822 pb, lo cual permitió diseñar cebadores para amplificar, clonar y secuenciar el homólogo de la CRP/SAP del esturión ruso.

Por otra parte, siguiendo la misma estrategia se encontró una única secuencia con homología a la WAP65/HPX de pez cebra, tanto en el transcriptoma traducido de los órganos inmunes del esturión chino como en el de la larva del esturión siberiano (Tablas 2.1 y 2.2, respectivamente); en ambos casos las secuencias identificadas mostraron homología respecto a las WAP65/HPX de peces cuando se realizó un BLASTp contra la base nrNCBI. Del alineamiento de estas secuencias con las correspondientes a la WAP65/HPX de otros teleósteos se dedujo que esta proteína está muy conservada en los peces (Figura 2.3a). Además, las secuencias identificadas en los esturiones chino y siberiano están completas, poseen un péptido señal y cuentan con dos dominios Hemopexina característicos de estas proteínas, lo cual también contribuyó a confirmar su identidad como homólogo a WAP65/HPX. El alineamiento de los transcritos de esturión chino y siberiano (Figura 2.3b) mostró que la secuencia del esturión siberiano carece de una región de 18 nucleótidos que no afecta el marco de lectura. Salvo esta diferencia, ambas secuencias están muy conservadas existiendo 35 cambios puntuales en un total de 1368 pb (secuencia de esturión siberiano), lo cual corresponde a una identidad de secuencia mayor al 97.4%. Nuevamente, este nivel de conservación permitió diseñar cebadores para amplificar, clonar y secuenciar el homólogo de la WAP65/HPX del esturión ruso (Figura 2.3b).

En el caso de la Hecpidina se encontró una única secuencia con homología a dicha PFA en ambos transcriptomas (Tablas 2.1 y 2.2). Al alinear ambas secuencias de esturión junto a la Hecpidina de peces teleósteos, ratón y humano se observó que las secuencias identificadas en los esturiones están completas, tienen un tamaño muy similar a las de otros peces y presentan el mayor nivel de conservación en la región C-terminal (últimos 25 aminoácidos) que corresponde a la proteína madura (figura 2.4a). Se conoce que las Hecpidinas son sintetizadas como prepropéptido, siendo el péptido señal eliminado en el retículo endoplasmático y el propéptido una vez que la proteína se encuentra en circulación¹⁶⁸. Así, en las secuencias de esturión chino y siberiano se identificó la secuencia correspondiente al péptido de tránsito (1-21), al propéptido (22-64) y a la proteína madura (65-91). Además, las secuencias de esturión contienen el dominio Pfam 06446 característico de estas proteínas. En conjunto, estas observaciones confirmaron que dichas secuencias corresponden a un homólogo de la Hecpidina. El alineamiento de los transcritos correspondientes a las secuencias identificadas en esturión chino y siberiano (Figura 2.4b), mostró que son idénticas en un 98.5%, con solamente 4 cambios puntuales en un total de 270 pb y que la porción codificante de la Hecpidina madura es idéntica en ambas especies. En este escenario fue posible diseñar cebadores para amplificar, clonar y secuenciar el homólogo de la Hecpidina madura del esturión ruso.

También se identificó una secuencia homóloga a la Intelectina de pez cebra en los transcriptomas traducidos de los órganos inmunes del esturión chino y de la larva del esturión siberiano (Tabla 2.1 y 2.2). En este caso, el alineamiento de las secuencias de las Intelectinas de esturión con la de peces teleósteos modelo (Figura 2.5a) mostró que dicha proteína del esturión

siberiano está completa mientras que a la Intelectina de esturión chino le faltan 33 aminoácidos en el extremo N-terminal. De todas maneras, ambas secuencias cuentan con el dominio fibrinógeno típico de estas proteínas y están muy conservadas respecto a las secuencias de otros peces, lo cual sugiere que se trata de un homólogo de la Intelectina. Por otro lado, como se observa en la Figura 2.5b la secuencia nucleotídica codificante es muy similar en ambos esturiones, existiendo 32 cambios puntuales en un total de 882 pb (secuencia esturión chino), lo cual corresponde a una identidad de secuencia del 96.4%. Debido a que no se pudo determinar la secuencia completa para ambos esturiones, se diseñaron cebadores para amplificar esta proteína homóloga a partir de su dominio fibrinógeno.

En el caso de la Transferrina se encontró una única secuencia homóloga en ambos transcriptomas traducidos (Tabla 2.1 y 2.2). Al alinear la Transferrina de esturión chino y siberiano junto a las Transferrinas de peces teleósteos modelo (Figura 2.6a) se observó que ambas están completas y muy conservadas respecto a los demás peces. A su vez, las secuencias identificadas en el esturión cuentan con los dos dominios típicos de estas proteínas, poseen los residuos responsables de unir Fe^{++} (en donde la identidad de secuencia entre todas las especies es cercana al 100%) y un péptido de tránsito para su excreción al medio extracelular. Estas observaciones permiten corroborar que efectivamente las secuencias identificadas corresponden a un homólogo de la Transferrina en esturión. En la Figura 2.6b se observa el alineamiento nucleotídico de la región codificante de estos homólogos para el esturión chino y siberiano. La secuencia de esturión siberiano presenta 2 regiones ausentes de 3 nucleótidos cada una que no afectan el marco de lectura y 47 cambios puntuales en un total de 2008 pb (secuencia esturión siberiano) lo cual corresponde a una identidad de 97.7% respecto a la secuencia del esturión chino. Esta elevada conservación permitió el diseño de cebadores para amplificar, clonar y secuenciar el homólogo de la Transferrina madura del esturión ruso.

El análisis para la Haptoglobina permitió identificar una única secuencia con homología a la Haptoglobina de pez cebra tanto en el transcriptoma traducido de los órganos inmunes del esturión chino (Tabla 2.1) como en el de la larva de esturión siberiano (Tabla 2.2). Ambas secuencias cuentan con el dominio tripsina típico de estas proteínas, sus secuencias codificantes están completas (aunque carecen de 20 aminoácidos en el extremo C-terminal cuando se las compara con las secuencias de peces teleósteos) y muy conservadas respecto a la Haptoglobina de otros peces teleósteos (Figura 2.7a). Estos resultados permitieron confirmar que dichas secuencias corresponden a homólogos de Haptoglobina. Al alinear las secuencias nucleotídicas de la Haptoglobina de ambas especies de esturión, se observó una identidad de secuencia del 98%, detectándose 18 cambios puntuales en un total 882 pb (Figura 2.7b). En este caso las secuencias obtenidas se utilizaron para diseñar cebadores para amplificar regiones conservadas que permitan el análisis de su expresión en el esturión ruso. Corresponde mencionar que el desarrollo del trabajo demostró que ésta era una alternativa razonable ya que, como se desprende de estos análisis y como se verá más adelante, la secuencia de las PFA está muy conservada entre el esturión chino, siberiano y ruso.

Por otro lado, se buscaron en los transcriptomas disponibles homólogos de varias citoquinas proinflamatorias, incluyendo la $IL1\beta$, $IL-6$ y $TNF\alpha$ con el objetivo de poder cuantificar la generación de estos mediadores inflamatorios en el esturión ruso. A partir de los datos de transcriptómica disponibles se logró identificar únicamente secuencias homólogas a la $IL1\beta$, en ningún caso se encontraron homólogos de $IL6$ o el $TNF\alpha$. Respecto a la $IL1\beta$, se encontraron dos secuencias en el transcriptoma traducido de los órganos inmunes del esturión chino (Tabla 2.1, pero una de estas fue parcial y se descartó). Por otro lado, al analizar el transcriptoma de larva de esturión siberiano (Tabla 2.2) se encontró solamente una secuencia con homología a la $IL1\beta$ de pez cebra. El alineamiento de

ambas secuencias de esturión junto a la IL1 β de peces teleósteos modelo mostró que están completas, cuentan con el dominio que caracteriza a las interleuquinas de la familia IL1/IL18 y además están conservadas respecto a las IL1 β de teleósteos (Figura 2.8a), verificando de esta manera la identidad de las secuencias encontradas. A su vez, en estos homólogos se identificó la región correspondiente al propéptido de la IL1 β . Al alinear las secuencias nucleotídicas del esturión chino y siberiano homólogas IL1 β (Figura 2.8b) se observó la ausencia de 15 nucleótidos en el esturión chino que no afecta el marco de lectura. A su vez se detectaron 37 cambios puntuales en un total de 849 pb (esturión chino) lo cual corresponde a una identidad de secuencia del 95.6% entre ambas especies. Dada la identidad de secuencia observada, resultó posible diseñar cebadores para amplificar regiones conservadas que permitirían analizar la expresión de IL1 β en el esturión ruso.

En síntesis, en base a la información pública sobre transcriptomas de los esturiones chino y siberiano y a la aplicación de herramientas bioinformáticas se logró identificar la secuencia codificante completa de varios homólogos de proteínas candidatas a PFA en los esturiones chino y siberiano, incluyendo la SAA, CRP/SAP, WAP65/HPX, Hcpidina, Transferrina y Haptoglobina (Tabla 2.4). Además, se identificaron dos secuencias, una completa y otra parcial, de homólogos de la Intelectina en los esturiones siberiano y chino, respectivamente. El análisis de todas las proteínas condujo a la identificación de un único transcripto homólogo por especie, lo cual es esperable ya que las búsquedas en los transcriptomas se realizaron sobre los unigenes y no sobre el total de transcriptos existentes. Cabe mencionar que los unigenes fueron definidos, en los tres transcriptomas analizados, como el transcripto más largo, por lo cual no sería posible encontrar eventuales isoformas de estas proteínas generadas por corte y empalme (*splicing alternativo*) o duplicaciones génicas. A pesar de la posible pérdida de isoformas, resultó muy alentador haber identificado en las dos especies de esturión analizadas, los transcriptos de varios homólogos de proteínas candidatas a PFA y haber podido constatar que sus secuencias son prácticamente idénticas.

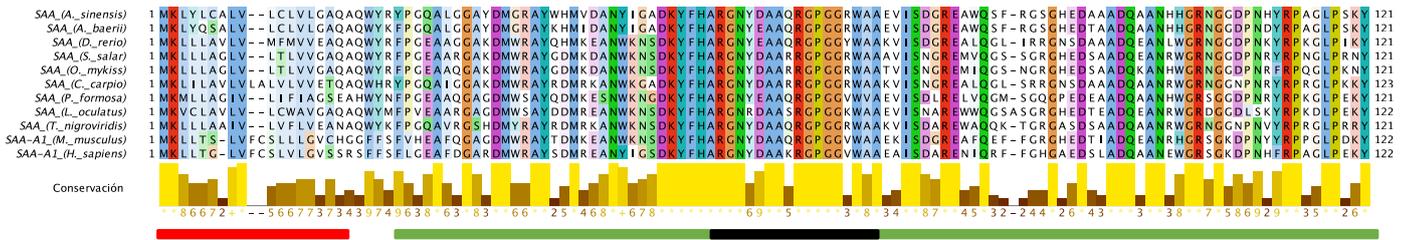
Potencial PFA	Secuencias identificadas			Resultados Blastp NCBI			Tamaño Proteína (kDa)	
	Chino	Siberiano	Cobertura	e-value	Identidad	Completa	Esturión	Pez cebra
SAA	X	X	100%	4.00E-52	70%	Si	13.2	13.6
CRP/SAP	X	X	86%	2.00E-82	52%	Si	26.8	25.0
WAP65/HPX	X	X	100%	0	57%	Si	53.5	51.0
Hcpidina	X	X	79%	3.00E-14	48%	Si	9.9	10.5
Intelectina	X	X	100%	9.00E-157	70%	SI	36.0	36.2
Transferrin	X	X	98%	0	58%	Si	77.3	74.6
Haptoglobina	X	X	99%	5.00E-98	51%	SI	32.7	33.5
IL1 β	X	X	82%	2.00E-47	43%	SI	31.7	31.0

Tabla 2.4. Potenciales PFAs identificadas en los transcriptomas de esturión (*Acipenser*)

Se indican los homólogos de PFAs que fueron identificados en los transcriptomas del esturión chino y siberiano. Se muestra el nivel de cobertura, e-value y el porcentaje de identidad para cada homólogo de esturión respecto a peces teleósteos, obtenidos mediante el análisis por BLASTp contra la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI. Los resultados corresponden a la proteína con mayor homología (primer hit). Se muestra también la masa molecular teórica (kDa) de los homólogos identificados en el esturión (calculado en Expasy) y de las proteínas del pez cebra (extraído de Uniprot). En ambos casos la masa molecular corresponde a las proteínas completas (incluyendo el péptido de tránsito y/o propéptido).

Por un lado, este hecho sugiere que las secuencias encontradas fueron correctamente ensambladas a partir de datos crudos de transcriptómica *de novo*, los cuales provienen de experimentos independientes con diferentes especies de esturión, órgano y estadio de desarrollo. Además, el alto nivel de conservación observado entre las dos especies de esturión, las cuales divergieron hace 121 millones de años, hace pensar que estas secuencias también estén conservadas en el esturión ruso cuyo último ancestro común con el esturión siberiano ocurrió hace unos 24 millones de años (Figura 1.3). También es importante resaltar la elevada conservación entre las secuencias de esturión y las correspondientes PFA de peces teleósteos, ratón y humano. Finalmente, los resultados obtenidos permitieron diseñar cebadores complementarios para amplificar las candidatas a PFA de esturión ruso evitando la utilización de cebadores degenerados.

(a)



(b)

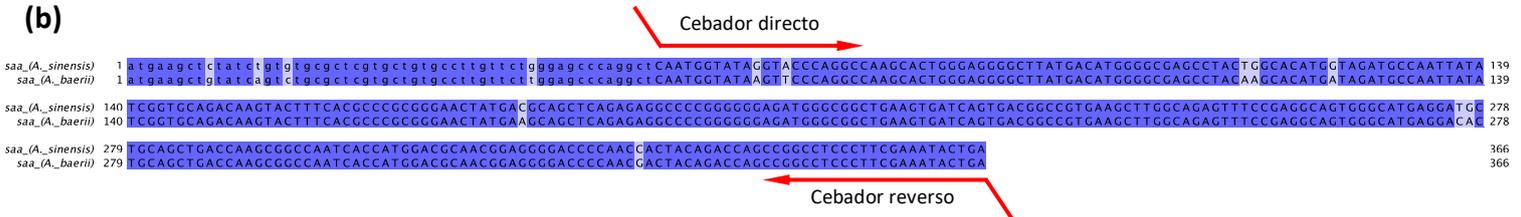
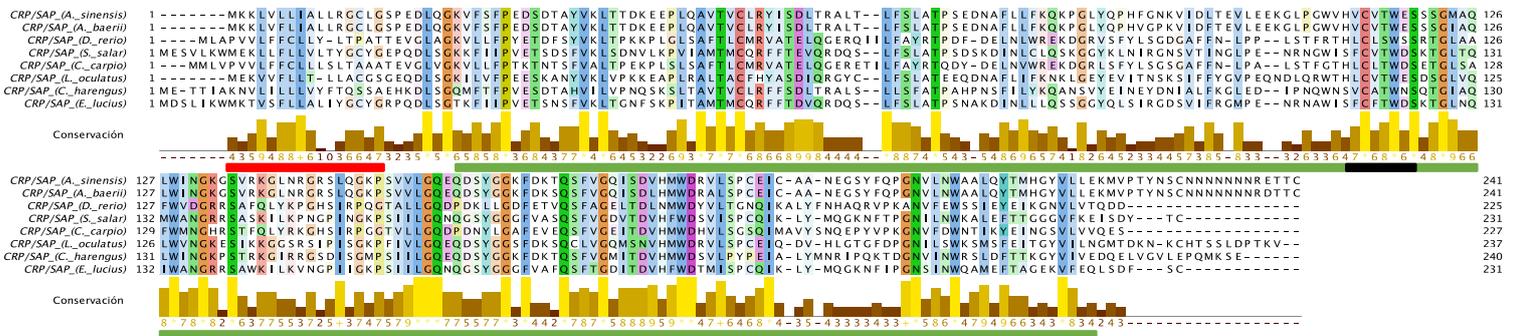


Figura 2.1. Alineamiento de homólogos de SAA

(a) Alineamiento aminoacídico de homólogos de la SAA del esturión chino (*Acipenser sinensis*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y de otras especies: peces teleosteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: Q642J9), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: B9EPA2), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, código: NP_001117908.1), carpa (*Cyprinus carpio*, código: BAA36700.1), molly amazónica (*Poecilia Formosa*, código: XP_007577171.1), catán pinto (*Lepisosteus oculatus*, código: W5MIJ6), pez globo de agua dulce (*Tetradon nigroviridis*, código: Q4SI54)]; y la SAA A1 de ratón (*Mus musculus*, código: P05366) y humana (*Homo sapiens*, código: PODJ18). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de identidad de las secuencias. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematizan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el péptido de tránsito el cual abarca los aminoácidos 1-18 (predicho con el programa SignalP 4.0), la barra verde el dominio que abarca los aminoácidos 22-121 (característico de la familia SAA, definido como Pfam 00277) y la barra negra el motivo que abarca los aminoácidos 55-71 correspondiente a la secuencias firma de la familia de las SAA (ARGNY-(ED)-AX-(QKR)-RGXGGXWA, definido como PS00992 en Prosite).

(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de la saa del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, la secuencia en minúscula corresponde al péptido de tránsito, la secuencia en mayúscula corresponde a la proteína madura. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. En rojo se indica la región de hibridación de los cebadores diseñados para el clonado por RF-cloning.

(a)



(b)



Figura 2.2. Alineamiento de homólogos de CRP/SAP

(a) Alineamiento aminoacídico de homólogos de la CRP/SAP del esturión chino (*Acipenser sinensis*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y de otras especies: peces teleósteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: A3KPG7), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: NP_001134140.1), carpa (*Cyprinus carpio*, código: BAB69039.1), catán pinto (*Lepisosteus oculatus*, código: XP_006631034.1), arenque del atlántico (*Clupea harengus*, código: XP_012685260.1) y lucio (*Esox lucius*, código: XP_01089529.1)]. Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de conservación a lo largo de la secuencia. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematizan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el péptido de tránsito que abarca los aminoácidos 1-16 (predicho con el programa SignalP 4.0), la barra verde indica el dominio que abarca los aminoácidos 24-219 característico de la familia de las CRP/SAP (definido como Pfam 00354), y la barra negra el motivo que abarca los aminoácidos 113-120 correspondiente a la secuencia firma de las CRP/SAP H-x-C-x-[ST]-W-x-[ST] (definido como PS00289 en Prosite).

(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de la *crp/sap* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, la secuencia en minúscula corresponde al péptido de tránsito, la secuencia en mayúscula corresponde a la proteína madura. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. En rojo se indica la región de hibridación de los cebadores diseñados para el clonado por RF-cloning.

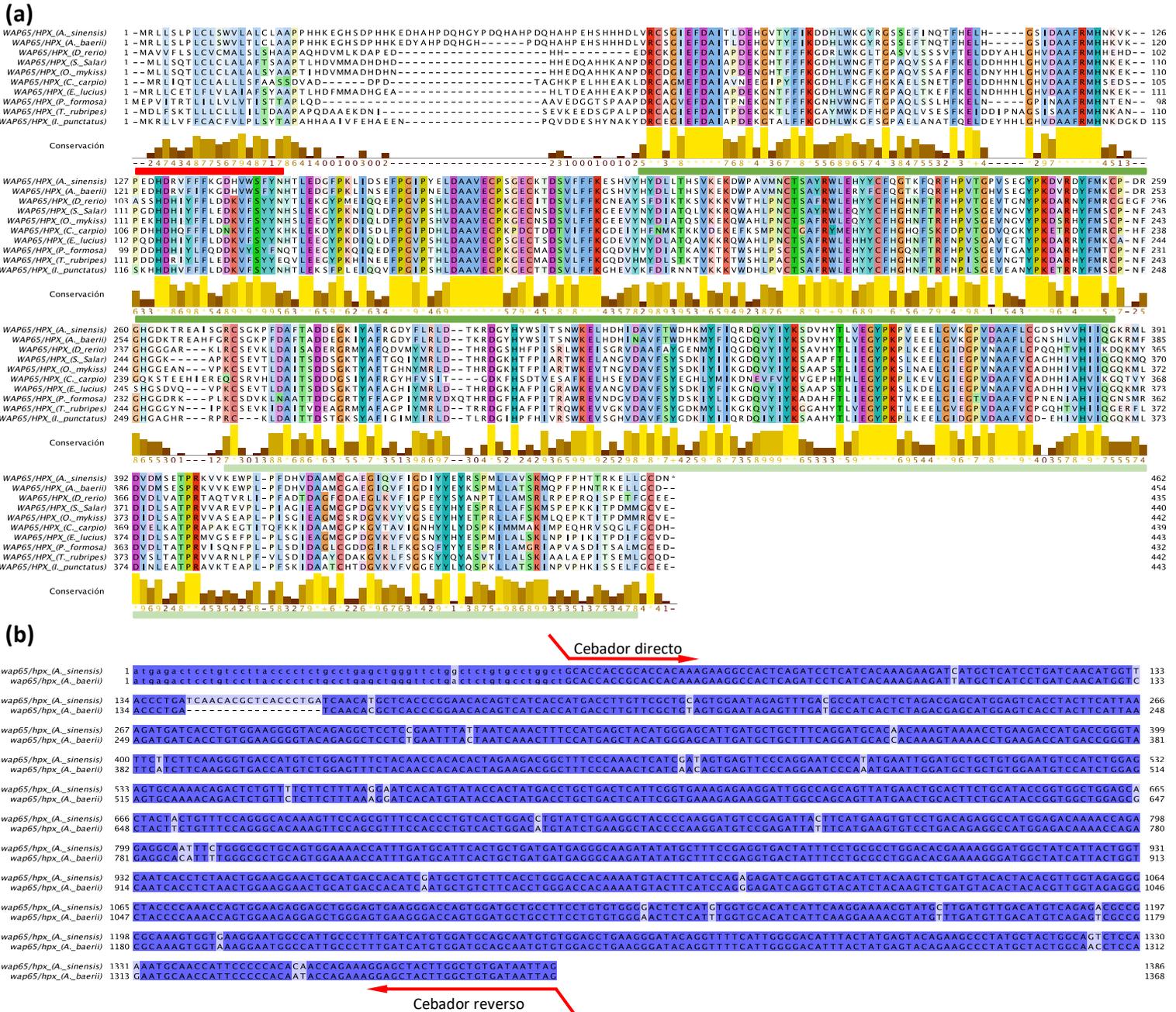
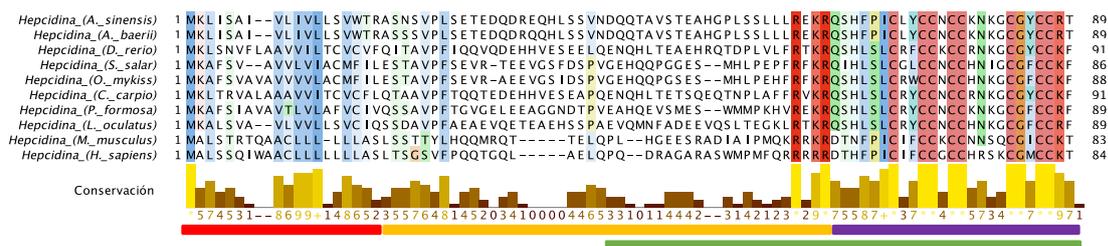


Figura 2.3. Alineamiento de homólogos de WAP65/HPX
(a) Alineamiento peptídico de homólogos de la WAP65/HPX del esturión chino (*Acipenser sinensis*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y de otras especies: peces teleosteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: XP_005173505.1), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: XP_014007262.1), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, código: XP_021464322.1), carpa (*Cyprinus carpio*, código: BAB60809.1), molly amazónica (*Poecilia Formosa*, código: XP_007541749.1), catán pinto (*Lepisosteus oculatus*, código: XP_015219463.1), pez globo (*Takifugu rubripes*, código: NP_001027761.1) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*, código: NP_001187178.1)]. Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de identidad de las secuencias. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematizan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el péptido de tránsito que abarca los aminoácidos 1-19 (predicho con el programa SignalP 4.0), la barra verde indica el primer dominio de la superfamilia Hemopexina-like (IPR036375, CDD) que abarca los aminoácidos 62-250, y la barra verde claro el segundo dominio Hemopexina-like que abarca los residuos 266-453.
(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de la *wap65/hpx* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, la secuencia en minúscula corresponde al péptido de transición, la secuencia en mayúscula corresponde a la proteína madura. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. En rojo se indica la región de hibridación de los cebadores diseñados para el clonado por RF-cloning.

(a)



(b)

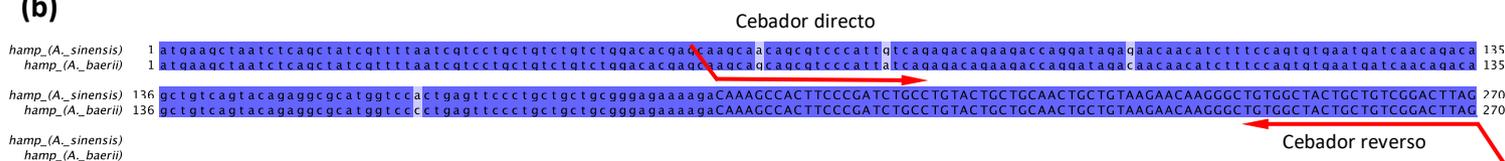
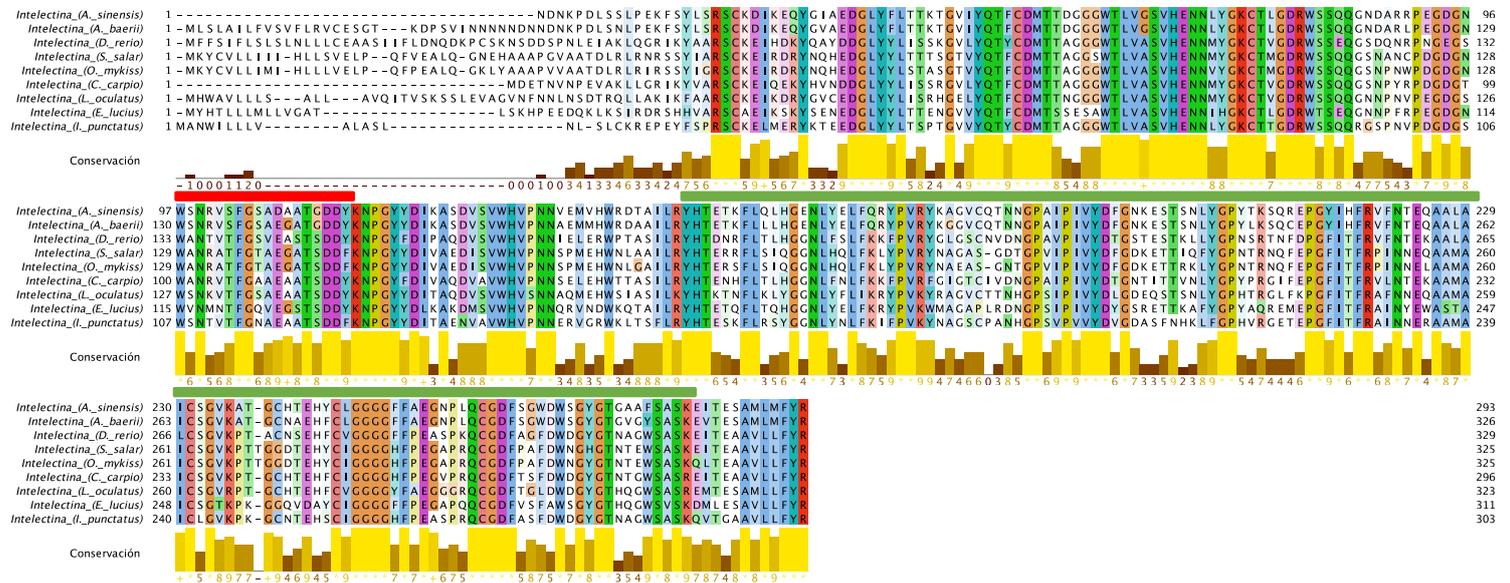


Figura 2.4. Alineamiento de homólogos de Hepcidina

(a) Alineamiento aminoacídico de homólogos de la Hepcidina del esturión chino (*Acipenser sinensis*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y de otras especies: peces teleósteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: P61516), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: Q801Y3), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, código: XP_021416707.1), carpa (*Cyprinus carpio*, código: AFY23859.1), molly amazónica (*Poecilia Formosa*, código: AOA087XH10), catán pinto (*Lepisosteus oculatus*, código: XP_006641712.1)] y la Hepcidina de ratón (*Mus musculus*, código: Q9EQ21) y humana (*Homo sapiens*, código: P81172). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de identidad de las secuencias. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematizan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el péptido de tránsito que abarca los aminoácidos 1-21 (predicho con el programa SignalP 4.0), la barra amarilla indica el propéptido (predicho con el programa Prop 1.0 Server) que abarca los residuos 22-64, la barra violeta indica la secuencia de la proteína madura que abarca los residuos 22-64 (predicho con el programa Prop 1.0 Server) y la barra verde el dominio que abarca los aminoácidos 43-89 característico de la familia Hepcidinas (definido como Pfam 06446).

(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de *hamp* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, la secuencia en minúscula corresponde al péptido de tránsito y propéptido, la secuencia en mayúscula corresponde a la proteína madura. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. En rojo se indica la región de hibridación de los cebadores diseñados para el clonado por RF-cloning.

(a)



(b)

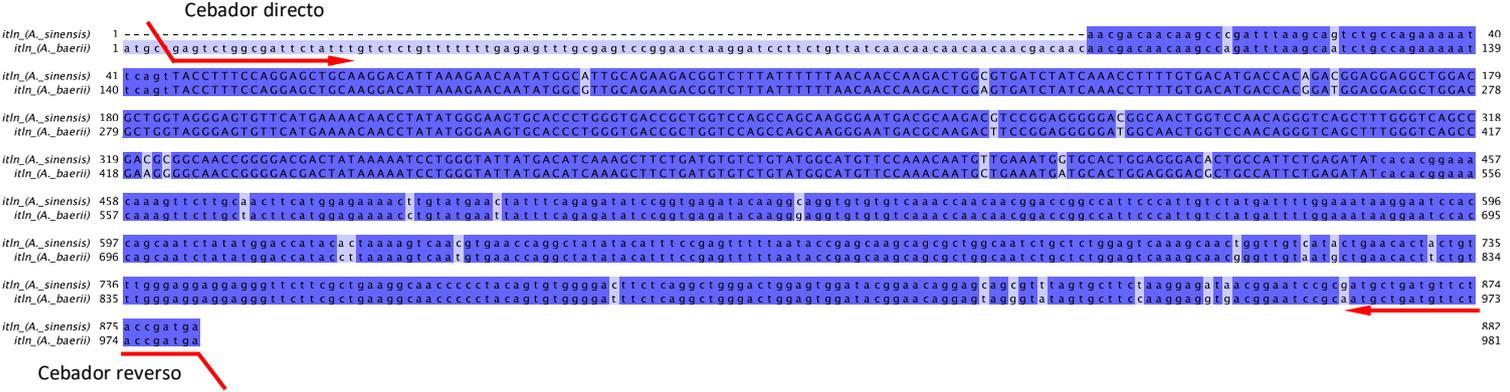


Figura 2.5. Alineamiento de homólogos de Intelectina
(a) Alineamiento aminoacídico de homólogos de la Intelectina del esturión chino (*Acipenser sinensis*, secuencia parcial), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y de otras especies: peces teleósteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: XP_021327597.1), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: XP_014001611.1), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, código: XP_021471522.1), carpa (*Cyprinus carpio*, código: XP_018962585.1), catán pinto (*Lepisosteus oculatus*, código: XP_006641047.1), lucio (*Esox lucius*, código: XP_012992883.1) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*, código: NP_001187175.1)]. Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de identidad de las secuencias. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematizan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el péptido de tránsito que abarca los aminoácidos 1-18 (predicho con el programa SignalP 4.0), la barra verde indica el dominio fibrinógeno que abarca los aminoácidos 49-182 (esturión siberiano) característico de la familia Intelectina (definido como SM00186 en SMART).
(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de *itln* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, la secuencia en mayúscula corresponde al dominio fibrinógeno. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. En rojo se indica la región de hibridación de los cebadores diseñados para el clonado por RF-cloning.

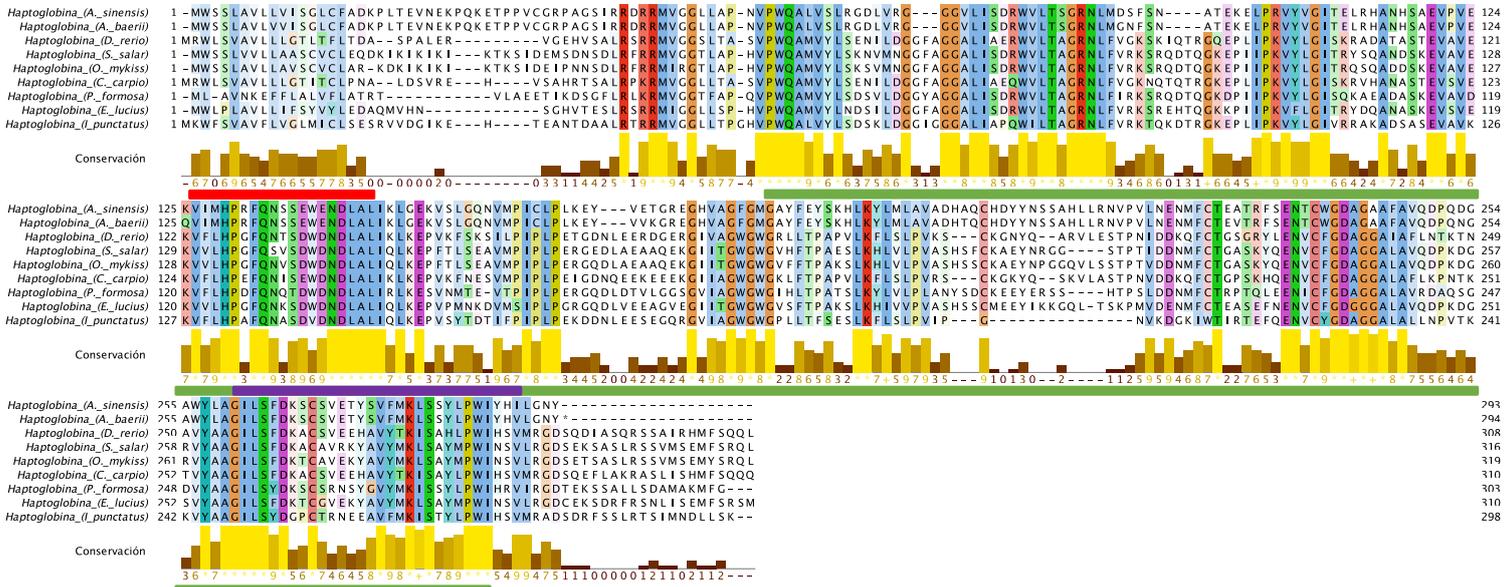
Figura 2.6. Alineamiento de homólogos de Transferrina

(a) Alineamiento aminoacídico de homólogos de la Transferrina del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y siberiano

(Acipenser baerii) y de otras especies: peces teleósteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: AOA2R8RRA6), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, código: XP_021444253.1), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: NP_001117127.1), molly amazónica (*Poecilia formosa*, código: XP_007559512.1), catán pinto (*Lepisosteus oculatus* código: XP_015217073.1), barramundi (*Lates calcarifer*, código: XP_018532175.1) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*, código: XP_017350663.1)]. Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de identidad de las secuencias. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematizan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el péptido de tránsito que abarca los aminoácidos 1-19 (predicho con el programa SignalP 4.0), la barra verde indica el primer dominio Transferrina (Pfam 00405) que abarca los aminoácidos 26-334 y la barra verde claro el segundo dominio Transferrina que abarca los residuos 345-686. Las barras negras y grises indican las secuencias firmas de unión a Fe^{2+} : (Y-x(0,1)-[VAS]-V-[IVAC]-[IVA]-[IVA]-[RKH]-[RKS]-[GDENSA] (PS00205 en Prosite) y ([YI]-x-G-A-[FLI]-[KRHNQS]-C-L-x(3,4)-G-[DENQ]-V-[GAT]-[FYW], (PS00206 en Prosite), respectivamente.

(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de la Transferrina del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, la secuencia en minúscula corresponde al péptido de tránsito, la secuencia en mayúscula corresponde a la proteína madura. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. En rojo se indica la región de hibridación de los cebadores diseñados para el clonado por RF-cloning.

(a)



(b)

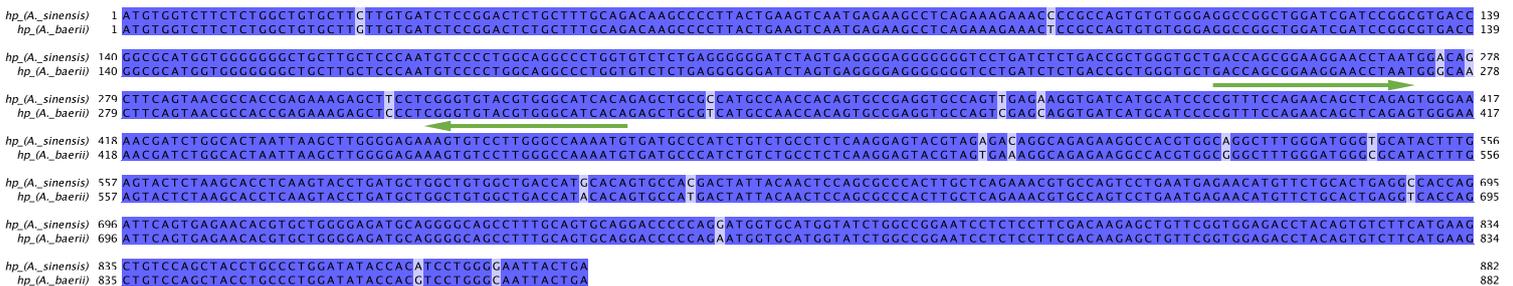
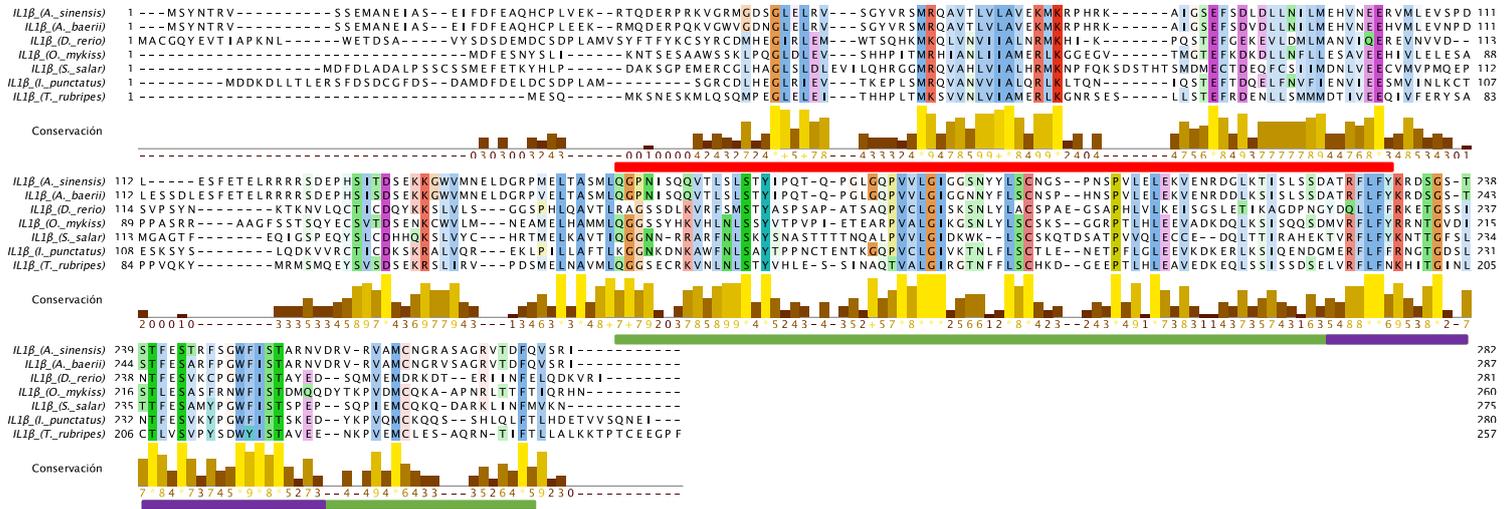


Figura 2.7. Alineamiento de homólogos de Haptoglobina

(a) Alineamiento aminoacídico de homólogos de la Haptoglobina del esturión chino (*Acipenser sinensis*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y de otras especies: peces teleosteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: NP_001352944.1), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: A0A1S3NVC7), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, código: XP_021462825.1), carpa (*Cyprinus carpio*, código: XP_018945206.1), molly amazónica (*Poecilia Formosa*, código: A0A087XGZ0), lucio (*Esox lucius*, código: XP_010903145.1) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*, código: W5U1I5)]. Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de identidad de las secuencias. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el péptido de tránsito que abarca los aminoácidos 1-17 (predicho con el programa SignalP 4.0), la barra verde el dominio tripsina que abarca los aminoácidos 57-286 característico de la familia Haptoglobina (definido como Pfam 00089) y la barra violeta indica una región conservada entre las Haptoglobinas de los peces que abarca los aminoácidos 130-159, en donde se diseñaron cebadores para cuantificar la expresión de *hp* por qPCR.

(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de *hp* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. Las flechas verdes indican los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de *hp* por qPCR.

(a)



(b)



Figura 2.8. Alineamiento de homólogos de IL1β

(a) Alineamiento aminoácido de homólogos de la IL1β del esturión chino (*Acipenser sinensis*), esturión siberiano (*Acipenser baerii*) y de otras especies: peces teleosteos [pez cebra (*Danio rerio*, código: E0WCW4), salmón atlántico (*Salmo salar*, código: R4Y366), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, código: Q9YGD3), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*, código: Q285L9) y pez globo (*Takifugu rubripes*, código: H2UVE3)]. Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. Los colores y su intensidad ilustran el grado de identidad de las secuencias. Bajo el alineamiento, los bloques de tonalidad amarilla esquematizan el grado de conservación a lo largo de la secuencia. La barra roja indica el dominio correspondiente al propéptido de *il1b* que abarca los aminoácidos 33-103 (Pfam 02394), la barra verde el dominio que abarca los aminoácidos 160-283 característico de la familia de interleuquinas 1/18 (Pfam 00340) y la barra violeta una región conservada entre las IL1β de peces que abarca los aminoácidos 225-283, en donde se diseñaron cebadores para cuantificar la expresión de *il1-b* por qPCR.

(b) Alineamiento nucleotídico de la secuencia codificante de los homólogos de *il1-b* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y del esturión siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega. En azul y celeste se marcan los nucleótidos idénticos y diferentes en ambas secuencias, respectivamente. Las flechas verdes indican los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de *il1-b* por qPCR.

2.1.2. Amplificación, clonado y secuenciación de potenciales PFA del esturión ruso

Se diseñaron y obtuvieron cebadores para amplificar la secuencia codificante de homólogos de la SAA, WAP65/HPX, Hecidina y Transferrina en esturión ruso. Para estas cuatro proteínas se decidió amplificar la secuencia correspondiente a la proteína madura previendo la necesidad de expresarlas en forma recombinante de acuerdo al objetivo específico 2 y 3 del trabajo. En el caso de la CRP/SAP, si bien se identificó correctamente la secuencia correspondiente al péptido señal, por error los cebadores fueron diseñados para amplificar la secuencia codificante completa. En el caso de la Intelectina se diseñaron cebadores para amplificarla a partir del comienzo del dominio fibrinógeno ya que la secuencia del esturión chino se encontró incompleta.

Como se mencionó anteriormente, las PFA de peces teleósteos se expresan mayoritariamente en hígado en respuesta a estímulos inflamatorios, pero también son expresadas en otros órganos de relevancia inmunológica como el riñón anterior y el bazo^{101,102}. En principio, buscando maximizar la probabilidad de amplificar los transcritos de las potenciales PFA, las PCR se realizaron a partir de una mezcla de ADNc de hígado y bazo obtenidos de esturiones rusos a las 72 hs post inoculación de la bacteria *A. hydrophila* muerta. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa; en la Figura 2.9 se muestran los resultados obtenidos. Para la *crp/sap*, *wap65/hpx*, *tf* y *hamp* la amplificación rindió un único producto del tamaño esperado de acuerdo con su migración en el gel de agarosa. Para *itln* y *saa* (utilizando el cebador directo 2, cuya secuencia fue obtenida a partir del esturión siberiano) se obtuvieron dos productos de PCR. En ambos casos el producto mayoritario presentó un tamaño que concuerda con el tamaño esperado (897 y 372 pb para *itln* y *saa*, respectivamente), y el minoritario mostró un tamaño mayor al esperado. Aunque la preparación del ARN se realizó en forma cuidadosa, incluyendo un paso de tratamiento con ADNasa I previo a la síntesis del ADNc, no se puede descartar que estos productos minoritarios sean resultado de la presencia de trazas de ADN genómico en dichas preparaciones, las cuales funcionarían como molde durante la reacción. Otra posibilidad es que los productos observados sean variantes de *splicing* alternativo de mayor tamaño y menor abundancia respecto al transcripto esperado. Sin embargo, esto es poco probable ya que, como fue comentado anteriormente, los transcritos identificados corresponderían (al menos en gónada, bazo, hígado y riñón anterior) a la variante de *splicing* más larga de estos dos genes. Alternativamente, estos productos podrían corresponder a eventos de amplificación inespecífica durante la reacción de PCR. Por todas estas razones, estos productos minoritarios y de mayor tamaño no fueron tenidos en cuenta a la hora de clonar cada uno de los genes. Finalmente, en todas las PCR se observó una banda menor a 250 pb que correspondería a los cebadores o dímeros de cebadores.

Todos los productos de amplificación obtenidos, correspondientes a las potenciales PFA de esturión ruso se purificaron y clonaron por el método de RF-cloning¹⁶⁹ en el vector pT7¹⁷⁰ (Figura 4.1). Luego se transformaron bacterias de la cepa *E. coli* DH5 α con las construcciones obtenidas y se evaluó por PCR de colonia la presencia de los insertos correspondientes. Se obtuvieron varios clones positivos conteniendo los transcritos de esturión ruso correspondientes a los homólogos de: *wap65/hpx* (3 clones), *crp/sap* (4 clones), *saa* (4 clones), *itln* (5 clones), *tf* (5 clones) y *hamp* (2 clones) (Figura Suplementaria 2.S1). Estos clones se expandieron, purificaron los plásmidos y enviaron a secuenciar. Se obtuvieron las secuencias completas de todos los homólogos de las potenciales PFA clonadas, con excepción de *tf*, que por su gran tamaño fue secuenciada en forma parcial. Los clones correctamente secuenciados se alinearon junto a las correspondientes secuencias de los esturiones chino y siberiano, observando que los mismos corresponden efectivamente a homólogos de las proteínas SAA, CRP/SAP,

WAP65/HPX, Hecpidina, Intelectina, y Transferrina del esturión ruso (Figuras 2.10-2.15). A partir de estos alineamientos, se observó que entre los clones de todos los homólogos identificados en el esturión ruso existen algunas variaciones puntuales que dan lugar tanto a cambios sinónimos como no sinónimos. Debido a que se utilizó una enzima de alta fidelidad a la hora de amplificar las secuencias de las posibles PFA del esturión ruso y a que los perfiles de secuenciación no indicaron la presencia de errores, las variaciones nucleotídicas encontradas parecen ser genuinas. En la Tabla 2.5 se muestran el número de variaciones puntuales a nivel nucleotídico y aminoacídico entre los distintos clones de esturión ruso analizados. Se observó que los clones de todos los homólogos analizados, con excepción de la Transferrina, exhibieron menos variaciones a nivel nucleotídico y aminoacídico entre ellas respecto a las variaciones que existen entre los esturiones chino y siberiano. Esto no es sorprendente ya que es de esperar que las variaciones acumuladas durante los más de 120 millones de años de evolución que separan al esturión chino del siberiano superen ampliamente las posibles variaciones que puedan existir para un determinado gen del esturión ruso. En el caso de la Transferrina, se encontraron muchos cambios en un clon en particular, por lo cual debería estudiarse si estas variaciones son genuinas, ya que por su mayor tamaño es posible que se deban, al menos en parte, a la dificultad de secuenciarla completamente o a artefactos durante la secuenciación.

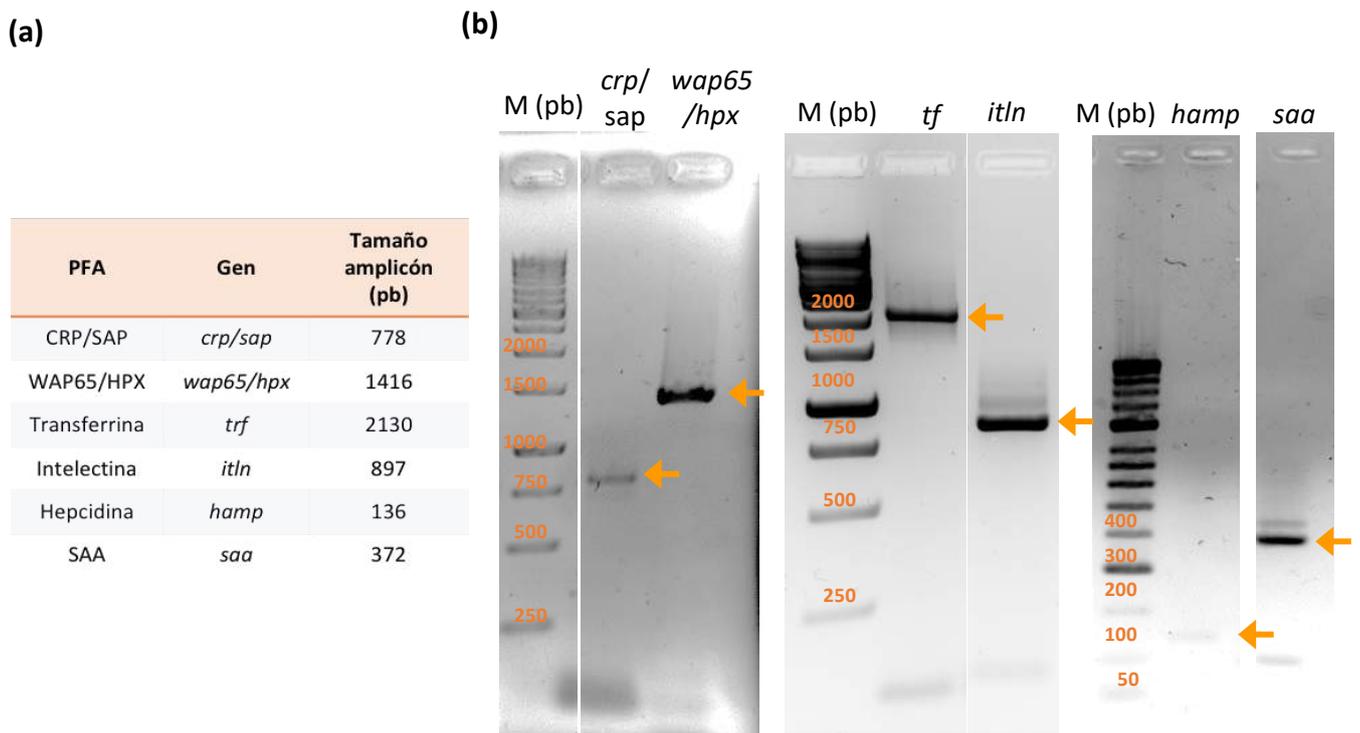


Figura 2.9. Amplificación por PCR de las potenciales PFA de esturión ruso y análisis por electroforesis de los productos obtenidos

Se amplificaron las secuencias nucleotídicas de los homólogos de potenciales PFA a partir de un pool de ADNc obtenido de hígado y bazo de esturión ruso. En (a) se muestra el tamaño esperado de los productos de PCR y en (b) se muestra el resultado del análisis por electroforesis en geles de agarosa señalando con flechas naranjas los productos principales, todos ellos del tamaño esperado. Los geles y la electroforesis se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

Respecto al origen de estas variaciones, existen múltiples causas que podrían explicarlas. Como el esturión ruso es un organismo de origen tetraploide podría existir hasta 4 alelos distintos por gen¹⁴ por lo cual las variaciones observadas podrían corresponder a polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) de distintas variantes alélicas. Más aún para algunas de estas PFA podría existir varios genes parálogos como se ha observado en peces teleósteos. Por otra parte, se utilizaron muestras de hígado y bazo para la preparación del ADNc lo cual podría haber contribuido a esta variabilidad, ya que estos órganos podrían expresar distintas isoformas de una misma PFA. Para esclarecer el origen de estas variaciones es necesario contar con el genoma del esturión ruso y un mayor número de datos transcriptómicos de diferentes órganos como bazo, riñón anterior e hígado que se sabe están implicados en la síntesis de proteínas de fase aguda.

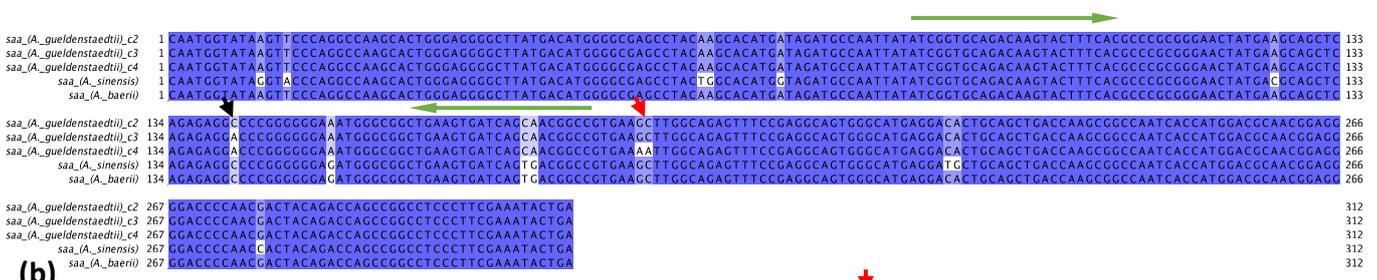
En síntesis, el trabajo realizado permitió amplificar, clonar, secuenciar e identificar la secuencia madura de homólogos de la SAA, WAP65/HPX, Hecpidina y Transferrina, la secuencia codificante completa del homólogo de la CRP/SAP y la secuencia parcial del homólogo de la Intelectina en el esturión ruso. En todos los casos se observó la presencia de variaciones a nivel nucleotídico (probablemente SNPs), que generan en su mayoría cambios puntuales en la secuencia aminoacídica de estas proteínas. Por razones de simplicidad, de aquí en más nos referiremos a las secuencias identificadas en el esturión ruso por el nombre de la proteína o gen homólogo, sin reiterar en cada caso que se trata de homólogos.

Potencial PFA	N° de clones secuenciados	Variaciones puntuales	
		Nucleotídicas	Aminoacídicas
SAA	4	3	1
Crp/Sap	4	17	9
Wap65/HPX	3	9	6
Hepcidina	2	0	0
Intelectina	5	21	11
Transferrina	5	55	35

Tabla 2.5. Variaciones puntuales en las secuencias de esturión ruso identificadas

Los homólogos de las potenciales PFA identificados en esturión ruso fueron amplificados por PCR utilizando como molde ADNc de esturión ruso. Los amplicones obtenidos se clonaron y se secuenciaron los clones positivos. La tabla muestra el número de clones secuenciados para cada PFA, el número de variaciones encontradas en la secuencia nucleotídica y cuántas de ellas conducen a variaciones aminoacídicas.

(a)



(b)

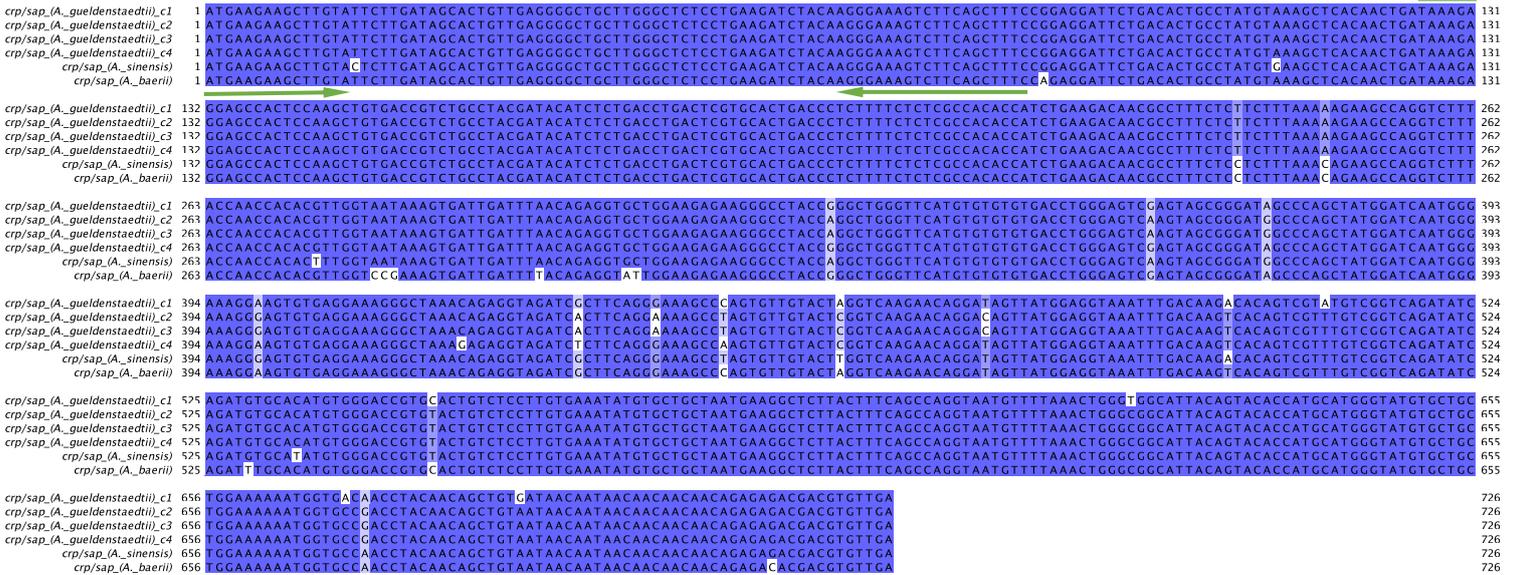


Figura 2.10. Alineamiento de las secuencias de homólogos de la *saa* de diferentes especies de esturión

(a) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas (codificante de la SAA madura) correspondientes a los tres clones secuenciados (c2, c3 y c4) del homólogo de la *saa* en el esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), junto a las secuencias de la *saa* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, el degradé en azul se corresponde con la identidad de secuencia. Las flechas indican las variaciones puntuales detectadas entre los clones. Los clones 3 y 4 presentan un cambio sinónimo (C por A, flecha negra), en el clon 4 también se observó un cambio no sinónimo que resulta en la sustitución de una A por N (AA por GC, flecha roja). Las flechas verdes señalan los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de la *saa* por qPCR.

(b) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la SAA madura de las tres clonas secuenciadas de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, los colores indican el tipo de aminoácido, en blanco se muestran las variaciones puntuales entre las secuencias. La flecha roja indica la sustitución aminoacídica de A por N observada en el clon 4.

(a)



(b)

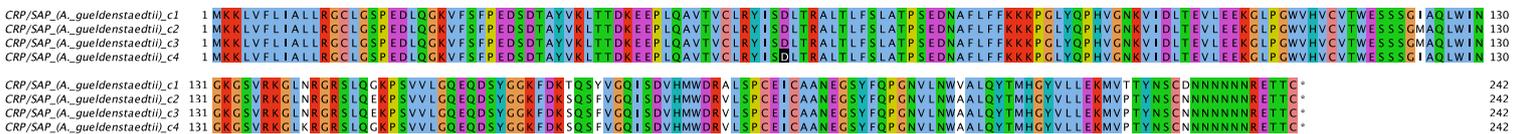


Figura 2.11. Alineamiento de las secuencias de los homólogos de la *crp/sap* de diferentes especies de esturión

(a) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas (codificante de la CRP/SAP madura) correspondientes a los cuatro clones secuenciados del homólogo de la *crp/sap* de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) junto a las secuencias de la *crp/sap* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, el degradé en azul se corresponde con la identidad de secuencia. Las flechas verdes señalan los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de la *saa* por qPCR.

(b) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la CRP/SAP madura de las cuatro clonas secuenciadas de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, los colores indican el tipo de aminoácido, en blanco se muestran las variaciones puntuales entre las secuencias.

(a)

wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	1	GCACACCGCACCAAAAGAGGCCACTCAGATCCTCATCACAAAGAAGATTATGCTCATCTGATCAACATG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	109
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	1	GCACACCGCACCAAAAGAGGCCACTCAGATCCTCATCACAAAGAAGATTATGCTCATCTGATCAACATG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	109
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	1	GCACACCGCACCAAAAGAGGCCACTCAGATCCTCATCACAAAGAAGATTATGCTCATCTGATCAACATG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	109
wap65/hpx_(A_sinensis)	58	GCACACCGCACCAAAAGAGGCCACTCAGATCCTCATCACAAAGAAGATTATGCTCATCTGATCAACATG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	184
wap65/hpx_(A_baerii)	58	GCACACCGCACCAAAAGAGGCCACTCAGATCCTCATCACAAAGAAGATTATGCTCATCTGATCAACATG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	186
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	110	ATCACCATGACCTTGTTCGCTGACAGTGGAAATAGAGTTTGTGCCATCACTCTAGACGAGCATGGAGTCACTACTTCAATAAAGATGATCACTGTGGAAGGGGTACAGAGGCTCCTCTGAATTTAC	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	236
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	110	ATCACCATGACCTTGTTCGCTGACAGTGGAAATAGAGTTTGTGCCATCACTCTAGACGAGCATGGAGTCACTACTTCAATAAAGATGATCACTGTGGAAGGGGTACAGAGGCTCCTCTGAATTTAC	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	236
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	110	ATCACCATGACCTTGTTCGCTGACAGTGGAAATAGAGTTTGTGCCATCACTCTAGACGAGCATGGAGTCACTACTTCAATAAAGATGATCACTGTGGAAGGGGTACAGAGGCTCCTCTGAATTTAC	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	236
wap65/hpx_(A_sinensis)	185	ATCACCATGACCTTGTTCGCTGACAGTGGAAATAGAGTTTGTGCCATCACTCTAGACGAGCATGGAGTCACTACTTCAATAAAGATGATCACTGTGGAAGGGGTACAGAGGCTCCTCTGAATTTAC	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	311
wap65/hpx_(A_baerii)	167	ATCACCATGACCTTGTTCGCTGACAGTGGAAATAGAGTTTGTGCCATCACTCTAGACGAGCATGGAGTCACTACTTCAATAAAGATGATCACTGTGGAAGGGGTACAGAGGCTCCTCTGAATTTAC	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	293
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	237	TAAATCAAATTTCCATGAGCTACATGGGACATTGATGCTGCTTTCAGGATGCAC	CACAAAGTAAAACTGAAGACCATGACCCGGTATTCA	TCTTCAAGGGTGACCATGCTGGAGTTTCTACAA		363
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	237	TAAATCAAATTTCCATGAGCTACATGGGACATTGATGCTGCTTTCAGGATGCAC	CACAAAGTAAAACTGAAGACCATGACCCGGTATTCA	TCTTCAAGGGTGACCATGCTGGAGTTTCTACAA		363
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	237	TAAATCAAATTTCCATGAGCTACATGGGACATTGATGCTGCTTTCAGGATGCAC	CACAAAGTAAAACTGAAGACCATGACCCGGTATTCA	TCTTCAAGGGTGACCATGCTGGAGTTTCTACAA		363
wap65/hpx_(A_sinensis)	312	TAAATCAAATTTCCATGAGCTACATGGGACATTGATGCTGCTTTCAGGATGCAC	CACAAAGTAAAACTGAAGACCATGACCCGGTATTCA	TCTTCAAGGGTGACCATGCTGGAGTTTCTACAA		438
wap65/hpx_(A_baerii)	294	TAAATCAAATTTCCATGAGCTACATGGGACATTGATGCTGCTTTCAGGATGCAC	CACAAAGTAAAACTGAAGACCATGACCCGGTATTCA	TCTTCAAGGGTGACCATGCTGGAGTTTCTACAA		420
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	364	CACACACTAAGAAGCGGCTTCCCAAATCATCAAGTGAAGTCCCAAGAAATCCAAATGAATTTGATGCTGCTGCTGGAATGTCCATCTGGAGAGTGCAAAACAGACTGTGTTCTCTTTAAAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	490
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	364	CACACACTAAGAAGCGGCTTCCCAAATCATCAAGTGAAGTCCCAAGAAATCCAAATGAATTTGATGCTGCTGCTGGAATGTCCATCTGGAGAGTGCAAAACAGACTGTGTTCTCTTTAAAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	490
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	364	CACACACTAAGAAGCGGCTTCCCAAATCATCAAGTGAAGTCCCAAGAAATCCAAATGAATTTGATGCTGCTGCTGGAATGTCCATCTGGAGAGTGCAAAACAGACTGTGTTCTCTTTAAAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	490
wap65/hpx_(A_sinensis)	429	CACACACTAAGAAGCGGCTTCCCAAATCATCAAGTGAAGTCCCAAGAAATCCAAATGAATTTGATGCTGCTGCTGGAATGTCCATCTGGAGAGTGCAAAACAGACTGTGTTCTCTTTAAAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	565
wap65/hpx_(A_baerii)	431	CACACACTAAGAAGCGGCTTCCCAAATCATCAAGTGAAGTCCCAAGAAATCCAAATGAATTTGATGCTGCTGCTGGAATGTCCATCTGGAGAGTGCAAAACAGACTGTGTTCTCTTTAAAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	547
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	491	GATCAGTGTATACCAATATGACCTGCTGACTCATTCGGTAAAGAGAAAGTATGGCCAGGATTTGAAGTCACTTCTGCATACCGGTTGGTGGAGCGCTACTTCTGTTTCCAGGGCACAAAGTT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	617
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	491	GATCAGTGTATACCAATATGACCTGCTGACTCATTCGGTAAAGAGAAAGTATGGCCAGGATTTGAAGTCACTTCTGCATACCGGTTGGTGGAGCGCTACTTCTGTTTCCAGGGCACAAAGTT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	617
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	491	GATCAGTGTATACCAATATGACCTGCTGACTCATTCGGTAAAGAGAAAGTATGGCCAGGATTTGAAGTCACTTCTGCATACCGGTTGGTGGAGCGCTACTTCTGTTTCCAGGGCACAAAGTT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	617
wap65/hpx_(A_sinensis)	566	GATCAGTGTATACCAATATGACCTGCTGACTCATTCGGTAAAGAGAAAGTATGGCCAGGATTTGAAGTCACTTCTGCATACCGGTTGGTGGAGCGCTACTTCTGTTTCCAGGGCACAAAGTT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	692
wap65/hpx_(A_baerii)	548	GATCAGTGTATACCAATATGACCTGCTGACTCATTCGGTAAAGAGAAAGTATGGCCAGGATTTGAAGTCACTTCTGCATACCGGTTGGTGGAGCGCTACTTCTGTTTCCAGGGCACAAAGTT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	674
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	618	CACGCTTTCCACCCTGTCACTGGACATGTATCTGAAGGCTACCCAAAGATGTCGGAGATTTATTCATGAAGTGTCTGACAGAGGCCATGGACAAAACAGAGAGGCACATTTTGGCCGCTGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	744
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	618	CACGCTTTCCACCCTGTCACTGGACATGTATCTGAAGGCTACCCAAAGATGTCGGAGATTTATTCATGAAGTGTCTGACAGAGGCCATGGACAAAACAGAGAGGCACATTTTGGCCGCTGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	744
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	618	CACGCTTTCCACCCTGTCACTGGACATGTATCTGAAGGCTACCCAAAGATGTCGGAGATTTATTCATGAAGTGTCTGACAGAGGCCATGGACAAAACAGAGAGGCACATTTTGGCCGCTGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	744
wap65/hpx_(A_sinensis)	693	CACGCTTTCCACCCTGTCACTGGACATGTATCTGAAGGCTACCCAAAGATGTCGGAGATTTATTCATGAAGTGTCTGACAGAGGCCATGGACAAAACAGAGAGGCACATTTTGGCCGCTGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	819
wap65/hpx_(A_baerii)	801	CACGCTTTCCACCCTGTCACTGGACATGTATCTGAAGGCTACCCAAAGATGTCGGAGATTTATTCATGAAGTGTCTGACAGAGGCCATGGACAAAACAGAGAGGCACATTTTGGCCGCTGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	809
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	745	AGTGGAAAACCAATTTGATGCATTCAGTCTGCTGATGATGAGGGAAGATATATGCTTTCAGGAGTGAATTTCTCGCCCTGGACACGAAAAGGATGGCTATCATTACTGGTCAATCACCTCTAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	871
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	745	AGTGGAAAACCAATTTGATGCATTCAGTCTGCTGATGATGAGGGAAGATATATGCTTTCAGGAGTGAATTTCTCGCCCTGGACACGAAAAGGATGGCTATCATTACTGGTCAATCACCTCTAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	871
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	745	AGTGGAAAACCAATTTGATGCATTCAGTCTGCTGATGATGAGGGAAGATATATGCTTTCAGGAGTGAATTTCTCGCCCTGGACACGAAAAGGATGGCTATCATTACTGGTCAATCACCTCTAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	871
wap65/hpx_(A_sinensis)	802	AGTGGAAAACCAATTTGATGCATTCAGTCTGCTGATGATGAGGGAAGATATATGCTTTCAGGAGTGAATTTCTCGCCCTGGACACGAAAAGGATGGCTATCATTACTGGTCAATCACCTCTAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	928
wap65/hpx_(A_baerii)	802	AGTGGAAAACCAATTTGATGCATTCAGTCTGCTGATGATGAGGGAAGATATATGCTTTCAGGAGTGAATTTCTCGCCCTGGACACGAAAAGGATGGCTATCATTACTGGTCAATCACCTCTAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	928
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	872	GAAAGGAAGTGCATGACACATCAATGCTGCTTTCACCTGGGACCAAAAATGACTTTCATCCAGGGAGATCAGGTGTACATCTCAAGTCTGATGTACACTACAGTTGGTAGAGGGCTACCCCAA	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	998
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	872	GAAAGGAAGTGCATGACACATCAATGCTGCTTTCACCTGGGACCAAAAATGACTTTCATCCAGGGAGATCAGGTGTACATCTCAAGTCTGATGTACACTACAGTTGGTAGAGGGCTACCCCAA	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	998
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	872	GAAAGGAAGTGCATGACACATCAATGCTGCTTTCACCTGGGACCAAAAATGACTTTCATCCAGGGAGATCAGGTGTACATCTCAAGTCTGATGTACACTACAGTTGGTAGAGGGCTACCCCAA	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	998
wap65/hpx_(A_sinensis)	947	GAAAGGAAGTGCATGACACATCAATGCTGCTTTCACCTGGGACCAAAAATGACTTTCATCCAGGGAGATCAGGTGTACATCTCAAGTCTGATGTACACTACAGTTGGTAGAGGGCTACCCCAA	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1073
wap65/hpx_(A_baerii)	929	GAAAGGAAGTGCATGACACATCAATGCTGCTTTCACCTGGGACCAAAAATGACTTTCATCCAGGGAGATCAGGTGTACATCTCAAGTCTGATGTACACTACAGTTGGTAGAGGGCTACCCCAA	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1155
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	999	ACCAAGTGAAGAGGAGCTGGAGTGAAGGACCAAGTGGATGCTGCTTCTCTGCTGGGAACCTCTCATTTGGTGACATCATCAAGGAAAACGTTGTTGATGTTGACATGTCAGAGAGCCCGGGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1125
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	999	ACCAAGTGAAGAGGAGCTGGAGTGAAGGACCAAGTGGATGCTGCTTCTCTGCTGGGAACCTCTCATTTGGTGACATCATCAAGGAAAACGTTGTTGATGTTGACATGTCAGAGAGCCCGGGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1125
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	999	ACCAAGTGAAGAGGAGCTGGAGTGAAGGACCAAGTGGATGCTGCTTCTCTGCTGGGAACCTCTCATTTGGTGACATCATCAAGGAAAACGTTGTTGATGTTGACATGTCAGAGAGCCCGGGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1125
wap65/hpx_(A_sinensis)	1074	ACCAAGTGAAGAGGAGCTGGAGTGAAGGACCAAGTGGATGCTGCTTCTCTGCTGGGAACCTCTCATTTGGTGACATCATCAAGGAAAACGTTGTTGATGTTGACATGTCAGAGAGCCCGGGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1200
wap65/hpx_(A_baerii)	1056	ACCAAGTGAAGAGGAGCTGGAGTGAAGGACCAAGTGGATGCTGCTTCTCTGCTGGGAACCTCTCATTTGGTGACATCATCAAGGAAAACGTTGTTGATGTTGACATGTCAGAGAGCCCGGGG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1182
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	1126	AAAGTGGTAAAGGAATGCCATTGCCCTTTGATCATGTGGATGACAGCAATGTGTGGAGTGAAGGGATACAGTGTTCATTTGGGGACATTTACTATGATACAGAGGCCCTATGCTACTGGCAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1252
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	1126	AAAGTGGTAAAGGAATGCCATTGCCCTTTGATCATGTGGATGACAGCAATGTGTGGAGTGAAGGGATACAGTGTTCATTTGGGGACATTTACTATGATACAGAGGCCCTATGCTACTGGCAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1252
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	1126	AAAGTGGTAAAGGAATGCCATTGCCCTTTGATCATGTGGATGACAGCAATGTGTGGAGTGAAGGGATACAGTGTTCATTTGGGGACATTTACTATGATACAGAGGCCCTATGCTACTGGCAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1252
wap65/hpx_(A_sinensis)	1201	AAAGTGGTAAAGGAATGCCATTGCCCTTTGATCATGTGGATGACAGCAATGTGTGGAGTGAAGGGATACAGTGTTCATTTGGGGACATTTACTATGATACAGAGGCCCTATGCTACTGGCAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1327
wap65/hpx_(A_baerii)	1183	AAAGTGGTAAAGGAATGCCATTGCCCTTTGATCATGTGGATGACAGCAATGTGTGGAGTGAAGGGATACAGTGTTCATTTGGGGACATTTACTATGATACAGAGGCCCTATGCTACTGGCAACT	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1309
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c2	1253	CCAGAATGCAACCAATCCCCACAATACCGAAAAGGAGCTACTTGGCTGTGATAATTAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1311
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c3	1253	CCAGAATGCAACCAATCCCCACAATACCGAAAAGGAGCTACTTGGCTGTGATAATTAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1311
wap65/hpx_(A_gueldenstaedtii),c4	1253	CCAGAATGCAACCAATCCCCACAATACCGAAAAGGAGCTACTTGGCTGTGATAATTAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1311
wap65/hpx_(A_sinensis)	1328	CCAGAATGCAACCAATCCCCACAATACCGAAAAGGAGCTACTTGGCTGTGATAATTAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1386
wap65/hpx_(A_baerii)	1310	CCAGAATGCAACCAATCCCCACAATACCGAAAAGGAGCTACTTGGCTGTGATAATTAG	-----	GTACCCTGATCAACAGGCTCACCA	GGAAACAGCTG	1368

(b)

WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c2	1	APPHHKEGHS ^{DP} PHK ^{EDY} AHP ^{DDH} CHP ^{DDH} AHP ^{ESH} HHDLVRC ^{SG} IEFDAITLDEHGVIYFIKDDHLWKG ^{RG} SEFTN ^{IF} HELHGS ^I DAAF ^{RMHHK} VK ^{PE} EDH ^{RV} FIK ^{GDH} WVS ^{FY} NHT ^{UK} EDG ^F	128
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c3	1	APPHHKEGHS ^{DP} PHK ^{EDY} AHP ^{DDH} CHP ^{DDH} AHP ^{ESH} HHDLVRC ^{SG} IEFDAITLDEHGVIYFIKDDHLWKG ^{RG} SEFTN ^{IF} HELHGS ^I DAAF ^{RMHHK} VK ^{PE} EDH ^{RV} FIK ^{GDH} WVS ^{FY} NHT ^{UK} EDG ^F	128
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c4	1	APPHHKEGHS ^{DP} PHK ^{EDY} AHP ^{DDH} CHP ^{DDH} AHP ^{ESH} HHDLVRC ^{SG} IEFDAITLDEHGVIYFIKDDHLWKG ^{RG} SEFTN ^{IF} HELHGS ^I DAAF ^{RMHHK} VK ^{PE} EDH ^{RV} FIK ^{GDH} WVS ^{FY} NHT ^{UK} EDG ^F	128
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c2	129	PKLINS ^{EF} GPIN ^{EL} DAAV ^{EC} PS ^{SG} EC ^{TD} SV ^{LF} FK ^{GS} HVHY ^{DL} L TH SV ^{KE} KDWP ^{AV} MN ^{CT} SAY ^R WLER ^Y FC ^{FQ} TK ^{FR} FHP ^{VT} G ^H VE ^{GP} KV ^{DR} Y ^{FM} K ^{CP} DR ^{GH} GD ^{TR} E ^{AH} F ^{GR} CS ^{GK} PF ^{DA} F	256
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c3	129	PKLINS ^{EF} GPIN ^{EL} DAAV ^{EC} PS ^{SG} EC ^{TD} SV ^{LF} FK ^{GS} HVHY ^{DL} L TH SV ^{KE} KDWP ^{AV} MN ^{CT} SAY ^R WLER ^Y FC ^{FQ} TK ^{FR} FHP ^{VT} G ^H VE ^{GP} KV ^{DR} Y ^{FM} K ^{CP} DR ^{GH} GD ^{TR} E ^{AH} F ^{GR} CS ^{GK} PF ^{DA} F	256
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c4	129	PKLINS ^{EF} GPIN ^{EL} DAAV ^{EC} PS ^{SG} EC ^{TD} SV ^{LF} FK ^{GS} HVHY ^{DL} L TH SV ^{KE} KDWP ^{AV} MN ^{CT} SAY ^R WLER ^Y FC ^{FQ} TK ^{FR} FHP ^{VT} G ^H VE ^{GP} KV ^{DR} Y ^{FM} K ^{CP} DR ^{GH} GD ^{TR} E ^{AH} F ^{GR} CS ^{GK} PF ^{DA} F	256
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c2	257	A ^{AD} DE ^{EG} K ^I Y ^A F ^{RC} GD ^Y F ^{LR} L ^{DT} K ^R DD ^Y HY ^{WS} I ^T SN ^{WE} EL ^{HD} H ^I NA ^{VF} WD ^H MY ^F I ^Q DD ^{QV} Y ^I X ^{SD} VHY ^T L ^{VE} GV ^{PK} VE ^{EL} LV ^{KG} CP ^{VD} AA ^{FL} LC ^{GD} HL ^{VH} I ^I Q ^K RM ^F D ^{VD} MS ^{ET} PR ^{KV} V ^K E ^{WP} LP	384
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c3	257	A ^{AD} DE ^{EG} K ^I Y ^A F ^{RC} GD ^Y F ^{LR} L ^{DT} K ^R DD ^Y HY ^{WS} I ^T SN ^{WE} EL ^{HD} H ^I NA ^{VF} WD ^H MY ^F I ^Q DD ^{QV} Y ^I X ^{SD} VHY ^T L ^{VE} GV ^{PK} VE ^{EL} LV ^{KG} CP ^{VD} AA ^{FL} LC ^{GD} HL ^{VH} I ^I Q ^K RM ^F D ^{VD} MS ^{ET} PR ^{KV} V ^K E ^{WP} LP	384
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c4	257	A ^{AD} DE ^{EG} K ^I Y ^A F ^{RC} GD ^Y F ^{LR} L ^{DT} K ^R DD ^Y HY ^{WS} I ^T SN ^{WE} EL ^{HD} H ^I NA ^{VF} WD ^H MY ^F I ^Q DD ^{QV} Y ^I X ^{SD} VHY ^T L ^{VE} GV ^{PK} VE ^{EL} LV ^{KG} CP ^{VD} AA ^{FL} LC ^{GD} HL ^{VH} I ^I Q ^K RM ^F D ^{VD} MS ^{ET} PR ^{KV} V ^K E ^{WP} LP	384
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c2	385	F ^D H ^V D ^{AA} M ^{CG} A ^E GI ^{QV} FI ^{GD} I ^Y E ^Y RS ^P ML ^{LA} T ^{SR} M ^{OP} FP ^{HN} TR ^K ELL ^{GC} DN [*]	437
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c3	385	F ^D H ^V D ^{AA} M ^{CG} A ^E GI ^{QV} FI ^{GD} I ^Y E ^Y RS ^P ML ^{LA} T ^{SR} M ^{OP} FP ^{HN} TR ^K ELL ^{GC} DN [*]	437
WAP65/HPX_(A_gueldenstaedtii),c4	385	F ^D H ^V D ^{AA} M ^{CG} A ^E GI ^{QV} FI ^{GD} I ^Y E ^Y RS ^P ML ^{LA} T ^{SR} M ^{OP} FP ^{HN} TR ^K ELL ^{GC} DN [*]	437

Figura 2.12. Alineamiento de las secuencias de los homólogos de la wap65/hpx de diferentes especies de esturión
(a) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas (codificante de la WAP65/HPX madura) correspondientes a los tres clones secuenciados del homólogo de la wap65/hpx de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), junto a las secuencias de la wap65/hpx del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, el degradé en azul se corresponde con la identidad de secuencia. Las flechas verdes señalan los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de la wap65/hpx por qPCR.
(b) Alineamiento de las secuencias aminoácidas de la WAP65/HPX madura de las tres clonas secuenciadas de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, los colores indican el tipo de aminoácido, en blanco se muestran las variaciones puntuales entre las secuencias.

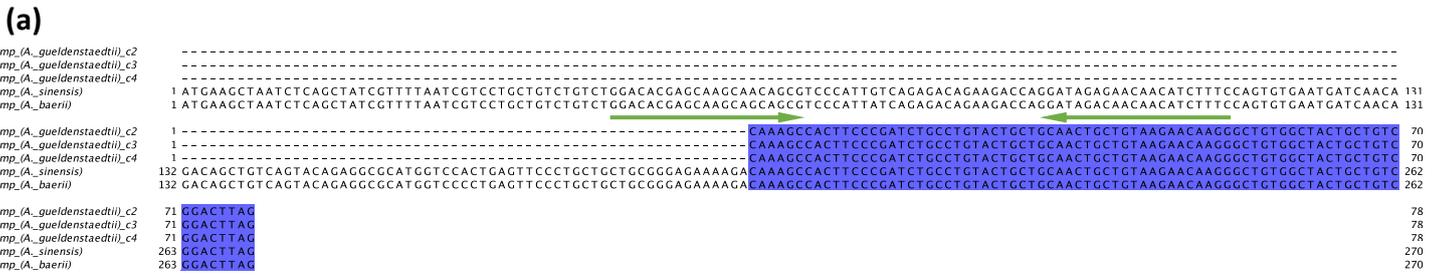


Figura 2.13. Alineamiento de las secuencias de los homólogos de *hamp* de diferentes especies de esturión

(a) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los tres clones secuenciados del homólogo de la *hamp* de esturión ruso (*A. gueldenstaedtii*), junto a *hamp* de esturión chino (*Acipenser sinensis*) y siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, el degradé en azul se corresponde con la identidad de secuencia. Las flechas verdes señalan los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de *hamp* por qPCR.

(b) Alineamiento de las secuencias aminoácidas de la Hepcidina madura de las tres clonas secuenciadas de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, los colores indican el tipo de aminoácido.

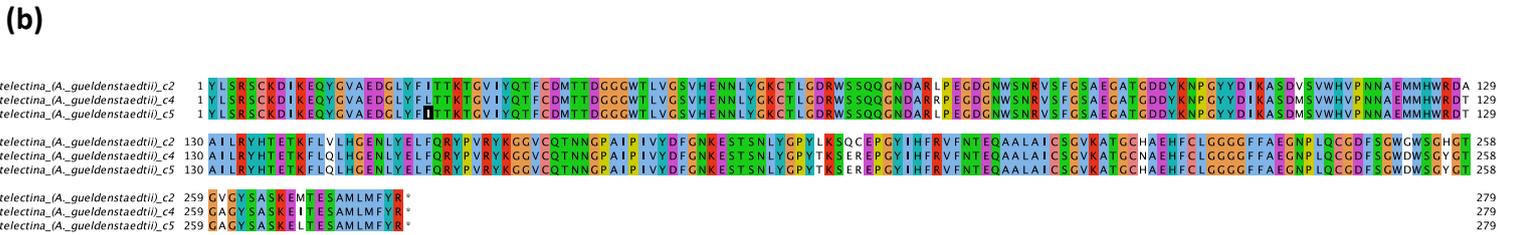
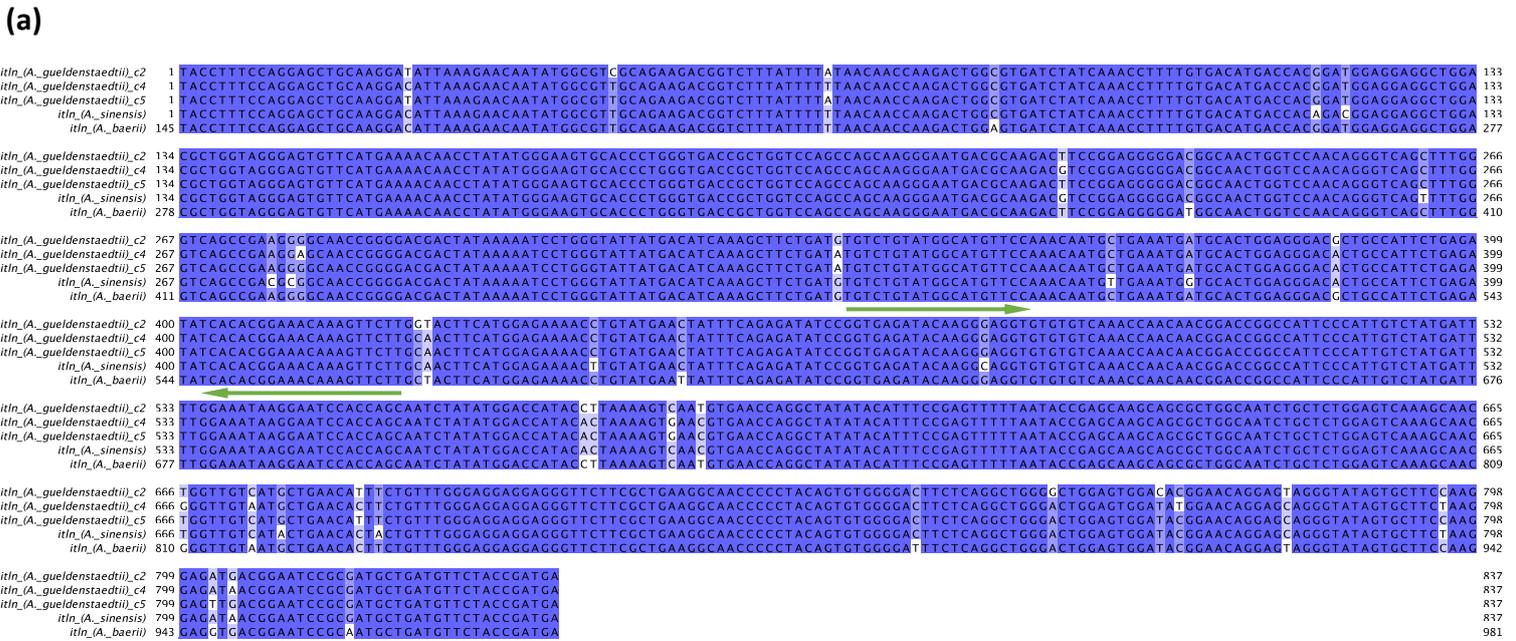


Figura 2.14. Alineamiento de las secuencias de los homólogos de *itln* de diferentes especies de esturión

(a) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los tres clones secuenciados del homólogo de *itln* de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), junto a *itln* de esturión chino (*Acipenser sinensis*) y siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, el degradé en azul se corresponde con la identidad de secuencia. Las flechas verdes señalan los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de *itln* por qPCR.

(b) Alineamiento de las secuencias aminoácidas de la Intelectina madura de las tres clonas secuenciadas de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, los colores indican el tipo de aminoácido.

Figura 2.15. Alineamiento de las secuencias de los homólogos de la *tf* de diferentes especies de esturión

(a) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas (codificante de la Transferrina madura) correspondientes a los tres clones secuenciados del homólogo de la *tf* esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), junto a las secuencias de la *tf* del esturión chino (*Acipenser sinensis*) y siberiano (*Acipenser baerii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, el degradé en azul se corresponde con la identidad de secuencia. Las flechas verdes señalan los cebadores diseñados para cuantificar la expresión de la *tf* por qPCR.

(b) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la Transferrina madura de las tres clonas secuenciadas de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, los colores indican el tipo de aminoácido, en blanco se muestran las variaciones puntuales entre las secuencias.

2.1.3. Estudio de la expresión en hígado de las PFA del esturión ruso en respuesta a la inoculación con bacterias *A. hydrophila* muertas o vivas

Una vez determinada las secuencias que codifican las proteínas de interés del esturión ruso (completas o parciales) se planteó estudiar su expresión hepática en respuesta a la estimulación con la bacteria *A. hydrophila* para identificar cuál(es) podrían comportarse como PFA positivas mayores y eventualmente funcionar como biomarcadores de infección/inflamación. Para ésto se realizaron dos experimentos de estimulación utilizando bacterias muertas por calor, uno de ellos realizado en las instalaciones de la granja ERN (experimento 1) y otro realizado en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP) de la Facultad de Veterinaria (experimento 2). Se optó por utilizar un modelo de estimulación con bacterias muertas porque al inicio de este trabajo no se contaba con la infraestructura ni con los antecedentes suficientes para realizar experimentos de infección. Más recientemente, se realizó un experimento piloto de infección con un número reducido de peces en las instalaciones del IIP (experimento 3). Respecto a la bacteria a utilizar en los experimentos, como ya se comentó, se eligió trabajar con *A. hydrophila* debido a que esta bacteria patógena es frecuentemente aislada de peces con síntomas de infección (enrojecimiento en zonas de la piel y alrededor del ano) en la granja ERN.

2.1.3.1. Puesta a punto de la reacción de qPCR en tiempo real

Para estudiar la expresión hepática de las proteínas seleccionadas como potenciales PFA fue necesario ajustar la metodología de PCR en tiempo real (qPCR). Esto implicó en primer lugar controlar la calidad del ARN total extraído de hígado y bazo (bazo, solo para el experimento 1). A partir de muestras de hígado y bazo de esturiones rusos, colectadas y conservadas en el reactivo comercial RNAlater, se preparó ARN total y se controló su integridad por electroforesis en geles de agarosa. Este control mostró que las muestras de ARN total obtenidas de todos los peces (con excepción de un pez del experimento 3) contenían 2 bandas intensas correspondientes a la subunidad 18s y 28s del ARN ribosomal y no presentaron fragmentos, detectables como manchas (*smears*), indicando que se logró extraer ARN sin afectar su integridad (Figuras 2.S2-2.S4). La única muestra que mostró signos de degradación (ausencia de las bandas de 18s y 28s, y presencia de *smears*) se descartó. Como se observa en la Figura 2.16, el tratamiento con ADNasa I eliminó el ADN genómico contaminante de las preparaciones de ARN total de hígado y bazo.

En segundo lugar, se diseñaron cebadores para qPCR, se verificó su especificidad y eficiencia de amplificación, y se determinó qué genes podrían funcionar como *housekeeping* (genes constitutivos de expresión invariable en las condiciones de estimulación utilizadas, requeridos para la normalización de los datos). Los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias nucleotídicas identificadas en el esturión ruso para *saa*, *crp/sap*, *wap65/hpx*, *itln*, *hamp* y *tf* (Figuras 2.10-2.15), seleccionando regiones conservadas entre los distintos clones secuenciados. En el caso de la *hamp*, para el diseño del cebador reverso se incluyó también la información de la secuencia de esturión chino

y siberiano determinadas en los transcriptomas (Figura 2.13a). Para diseñar los cebadores que amplificarían los transcritos de Haptoglobina e IL1 β , como ya se comentó, se utilizaron las secuencias de esturión chino y siberiano ya que los transcritos de estas proteínas no fueron secuenciados en el esturión ruso. Así, a partir de los alineamientos peptídicos de la Haptoglobina (Figura 2.7) e IL1 β (Figura 2.8), se determinaron regiones evolutivamente conservadas entre todos los peces. Utilizando las secuencias de *hp* e *il1-b* de esturión chino y siberiano correspondientes a estas regiones conservadas, se diseñaron cebadores que permitieran amplificar por qPCR dichos transcritos de esturión ruso. Por otra parte, se diseñaron cebadores para amplificar posibles genes *housekeeping*: beta-actina (*actb*) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), cuyas secuencias están depositadas en GenBank (MG722827.1 y KR906073.1).

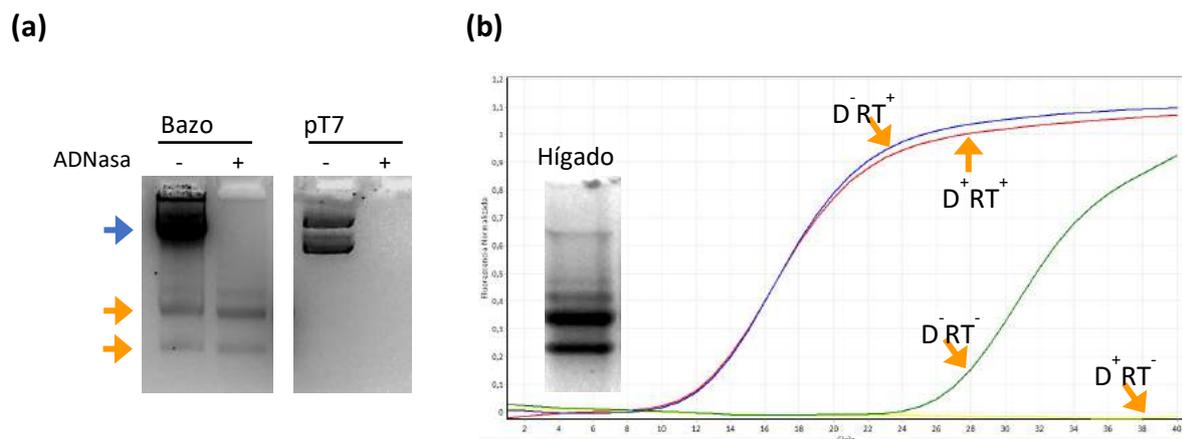


Figura 2.16. Presencia de ADN genómico en las muestras de ARN total y validación del tratamiento con ADNasa para su eliminación

(a) Se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (tal como se describe en Materiales y Métodos) una muestra de ARN total de bazo del experimento 1 previamente tratada (+) o no tratada (-) con ADNasa. Como controles positivos el vector pT7 se sometió al mismo tratamiento. La figura muestra el patrón de bandas obtenido en las muestras, las flechas naranjas indican la subunidad mayor y menor del ARN ribosomal, la flecha azul indica la contaminación con ADN genómico en las muestras de ARN total.

(b) Para validar que la ADNasa elimina ADN genómico contaminante, una muestra de ARN total de hígado que contenía restos de ADN genómico (muestra 3 experimento 2) y que fue representativa de las extracciones se sometió a varios tratamientos (como se describe en Materiales y Métodos): con ADNasa y retrotranscriptasa (D^+RT^+ , curva roja), sólo con la retrotranscriptasa (D^-RT^+ , curva azul), sólo con ADNasa (D^+RT^- curva amarilla) o con ninguna de las enzimas (D^-RT^- , curva verde). Cada una de estas muestras se cuantificó por qPCR utilizando los cebadores diseñados para la *saa*, en el gráfico se muestran las curvas de amplificación obtenidas para cada una de ellas.

Para verificar la especificidad de los cebadores diseñados, éstos se utilizaron para amplificar los transcritos correspondientes en muestras de ADNc de hígado de esturiones estimulados con bacterias muertas. Se utilizaron las muestras del experimento 2 ya que en este caso se obtuvo un mayor número de individuos. Luego, se analizó el tamaño y las curvas de desnaturalización de los amplicones obtenidos. Como se muestra en la Figura 2.17, el análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos obtenidos de la qPCR de cada gen, mostró en todos los casos un único amplicón que coincidió con el tamaño esperado. Además, en el perfil de las curvas de desnaturalización de los amplicones correspondientes a la *saa*, *wap65/hpx*, *hamp*, *itln*, *tf*, *hp*, *il1-b*, *actb* y *gapdh*, se observó un único pico con idéntica temperatura de desnaturalización en todas las muestras y, salvo para *crp/sap* y *actb* (se discutirá más adelante), no se constató amplificación de los blancos (con el mix de reacción de qPCR sin el molde de ADNc) (Figura Suplementaria 2.S5). Esto indicó

que cada par de cebadores amplificó un único e idéntico producto de PCR en todas las muestras y que no se formaron dímeros de cebadores que interferirían con la cuantificación de los transcritos. En el caso de la *crp/sap*, las curvas de desnaturalización obtenidas mostraron valores menores de dF/dT , lo que coincidió con la menor intensidad de la banda obtenida en la electroforesis (Figura 2.17), indicando una menor cantidad de producto formado durante la reacción. A su vez, entre las distintas curvas se observaron diferencias de hasta 1°C en la T_m de los picos sugiriendo que podrían estar amplificándose distintas isoformas de este transcripto. Resulta interesante que este comportamiento se observó solamente en el caso de la *crp/sap*, que entre los genes estudiados es el que presenta un mayor número de copias en el genoma de peces teleósteos (hasta 7), apoyando la posibilidad de que se hayan amplificado varias isoformas en el esturión ruso. Por otro lado, en el blanco se observó un pico de pequeña intensidad y con una T_m 1-2°C menor que el resto de las curvas, lo cual podría corresponder a dímeros de cebadores. Finalmente, es importante destacar que los cebadores diseñados para *il1-b* y *hp* a partir de las secuencias de esturión chino y siberiano amplificaron un único producto del tamaño esperado en el esturión ruso (Figura 2.17, Figura Suplementaria 2S.5), lo cual validó la aproximación utilizada para su diseño.

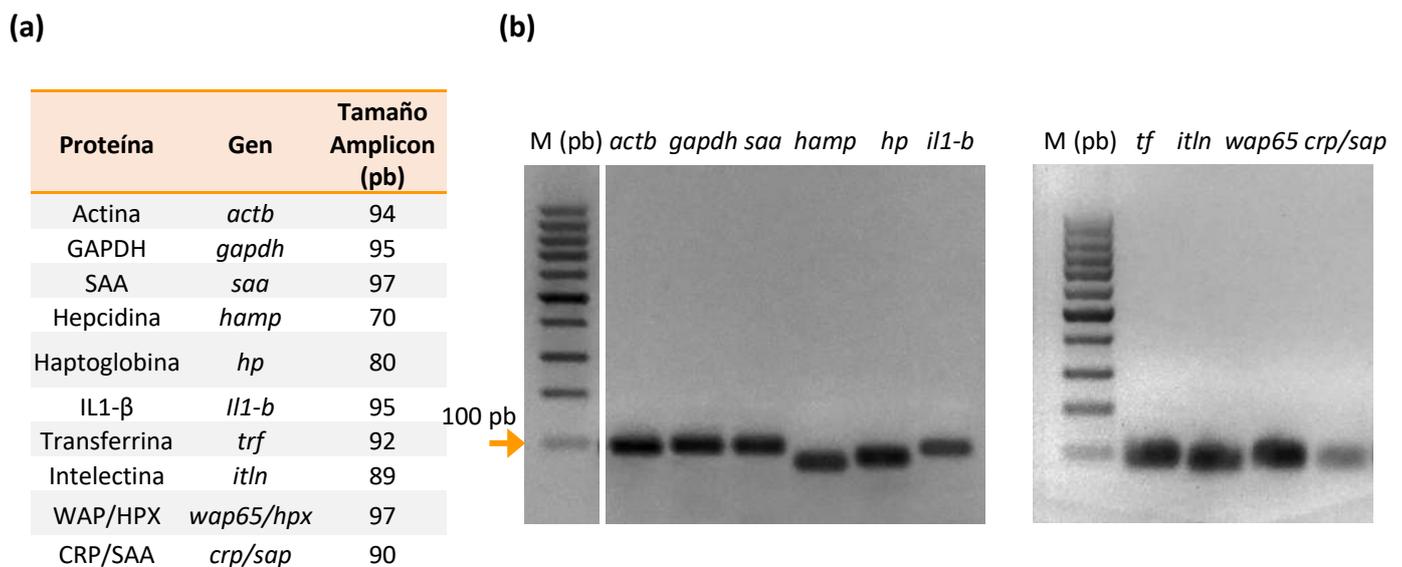


Figura 2.17. Análisis de la especificidad de los cebadores diseñados para qPCR: evaluación del tamaño de los amplicones (a) Tabla indicando el tamaño teórico (pb) de los amplicones correspondientes a los productos de qPCR que se obtendrían con los cebadores diseñados para cada uno de los genes indicados.

(b) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% mostrando los amplicones obtenidos por qPCR a partir de una única muestra de ADNc de hígado de esturión ruso (representativa de todas las muestras estudiadas), utilizando los cebadores diseñados para los genes *actb*, *gapdh*, *saa*, *crp/sap*, *wap65/hpx*, *hamp*, *hp*, *trf*, *itln* e *il1-b* descritos en la Tabla a. La flecha naranja indica la banda de 100 pb correspondiente al marcador de masa molecular (M, pb). Los gels y la electroforesis se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

Posteriormente, se verificó la eficiencia de todos los cebadores, ya que para realizar un estudio cuantitativo y comparativo es necesario que ésta sea cercana al 100%. Como se muestra en la Figura 2.18, todos los cebadores diseñados mostraron eficiencias mayores al 90%, por lo cual pueden ser utilizados para cuantificar la expresión génica en forma relativa con el método de $2^{-\Delta\Delta CT^{171}}$. La baja

expresión de *il1-b* impidió determinar la eficiencia de los cebadores diseñados para este gen ya que no fue posible amplificar dicho gen al realizar diluciones seriadas de una muestra de ADNc. En resumen, teniendo en cuenta la especificidad y eficiencia, los cebadores diseñados permitieron cuantificar en forma correcta los niveles de expresión de *saa*, *wap65/hpx*, *hamp*, *itln*, *trf* y *hp*, *actb* y *gapdh*, mientras que se considerarán como preliminares los datos que surjan del uso de los cebadores diseñados para *crp/sap* e *il1-b*, ya que en el marco de esta tesis no fue posible diseñar y validar otros cebadores. Más aún la eficiencia de *il1-b* también debería haber sido determinada en muestras de ADNc de bazo, ya que a priori este sería el principal órgano en donde se induciría dicho gen por una inflamación sistémica.

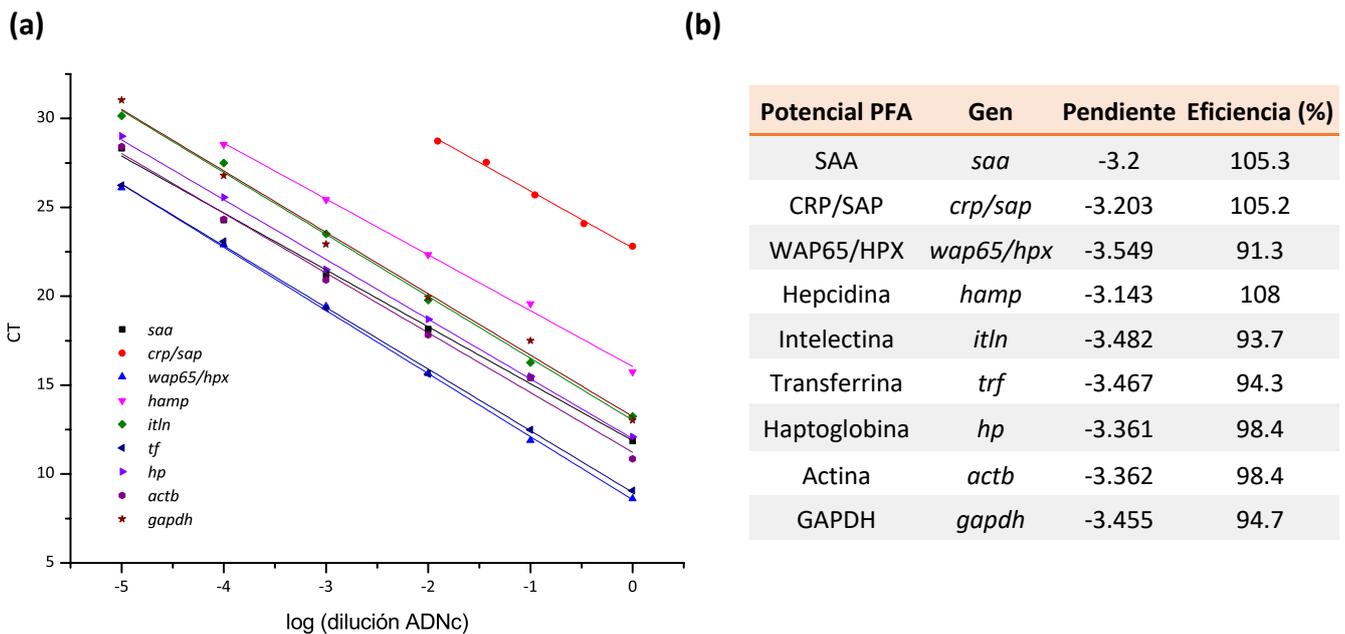


Figura 2.18. Análisis de la eficiencia de los cebadores diseñados para qPCR

Se realizó una qPCR utilizando diluciones seriadas de ADNc de hígado de esturión ruso (al décimo o al tercio según el nivel de expresión del gen de interés) y el par de cebadores en estudio. Para cada dilución se graficó el CT en función del logaritmo de la dilución de ADNc. Los datos obtenidos se ajustaron a una recta y se obtuvo la pendiente. La eficiencia porcentual de amplificación de los cebadores se calculó como $e = 10^{\frac{-1}{pendiente}} - 1 * 100$. En (a) se muestran las curvas de eficiencia obtenidas para todos los cebadores diseñados y en (b) se reportan los valores calculados para la pendiente y para la eficiencia de amplificación.

Para determinar la expresión relativa de los genes de interés entre distintas muestras por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, es necesario contar con uno o más genes *housekeeping* para poder normalizar los datos de expresión del gen de interés por los niveles de ARNm total de la muestra a comparar¹⁷². Considerando los antecedentes sobre genes que se comportan como *housekeeping* en hígado de peces teleosteos estimulados o infectados con diversos patógenos, se eligieron los genes *actb* y *gapdh*^{173,174}. En la Figura 2.19a se observan las curvas de amplificación obtenidas para estos genes utilizando las muestras de ADNc de hígado de los esturiones rusos estimulados con bacterias o inyectados con el tampón control (correspondientes al experimento 2). Se puede apreciar que todas las muestras amplificaron en un ciclo muy similar; el ciclo de amplificación promedio y el desvío estándar estimado para *actb* y para *gapdh* fueron 12.7 ± 0.7 y 14.5 ± 0.5 , respectivamente. A su vez, se observó que las gráficas no se agrupan en función del tratamiento (PBS en verde o *A. hydrophila* muerta en azul) y tampoco por la duración del mismo (24 o 72 hs), lo cual sugiere que las distintas

condiciones experimentales no modificaron la expresión de estos genes. En el caso de la actina se observó una pequeña y despreciable amplificación del blanco que ocurre a más de 21 ciclos de distancia de las muestras y correspondería a dímeros de cebadores de acuerdo a las curvas de desnaturalización (Figura Suplementaria 2.S5) Además, para validar la utilización de *actb* y *gapdh* como genes normalizadores, se estudió la estabilidad de todos los genes con el programa *GeNorm* especializado en la identificación de genes *housekeeping*¹⁷⁵. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 2.19b, en donde se graficó el índice de estabilidad para cada gen en estudio (M) calculado a partir de su expresión en muestras de hígado de esturiones rusos inoculados con *A. hydrophila* muerta o tampón PBS como control (experimento 2). Mediante este análisis se observó que *actb* y *gapdh* fueron los genes que mostraron valores menores de M, siendo los más estables dentro del conjunto de genes analizados y clasificados como buenos genes *housekeeping* por este programa. De acuerdo con estos resultados, *actb* y *gapdh* se utilizaron como genes normalizadores de la expresión hepática de las PFA en los esturiones estimulados o infectados con *A. hydrophila*.

En conjunto, los estudios realizados permitieron optimizar una metodología para cuantificar la expresión relativa de los genes codificantes de proteínas candidatas a PFA en muestras de hígado de esturiones rusos.

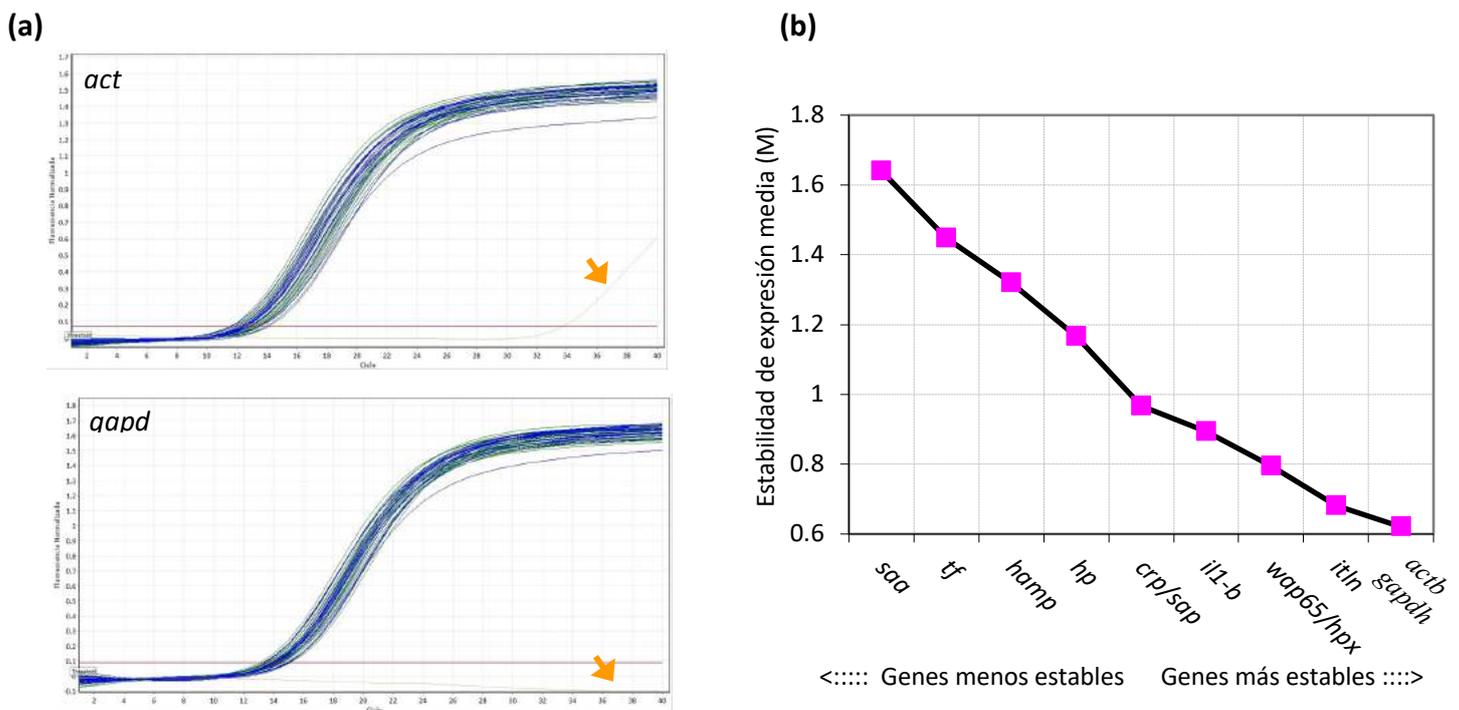


Figura 2.19. Validación de *actb* y *gapdh* como genes *housekeeping* para el análisis por qPCR de la expresión génica en hígado de esturión ruso

(a) Curvas de amplificación para los genes *actb* y *gapdh* obtenidas por qPCR utilizando como molde ADNc de hígado de esturiones rusos estimulados con bacterias *A. hydrophila* muertas (curvas en azul) o inoculados con PBS estéril como control (curvas en verde); todas estas muestras corresponden al experimento 2. La curva amarilla indicada con la flecha naranja corresponde al blanco de reacción y la línea roja indica el umbral en la región exponencial.

(b) Gráfico de la estabilidad de expresión de todos los genes en estudio construido con el programa *GeNorm* a partir de los datos de expresión relativa de los mismos. Cuanto menor es el valor del índice M, más estable es el gen.

2.1.3.2. Expresión hepática de las potenciales PFA en respuesta al estímulo con *A. hydrophila* (experimento 1 y experimento 2)

Como ya se mencionó se realizaron dos experimentos para evaluar en el esturión ruso la expresión hepática de las potenciales PFA en respuesta a la estimulación con bacterias *A. hydrophila* muertas. El primer experimento se realizó en el laboratorio húmedo de la empresa ERN; el diseño general del mismo se muestra en la Figura 2.20a (experimento 1) y se detalla en la sección 4.1.4.1 de Materiales y Métodos. En este ensayo se utilizaron 3 dosis diferentes de bacterias muertas para la estimulación y lotes de 20 peces por condición experimental. Sin embargo, debido a limitaciones de infraestructura, sólo se pudieron colectar en forma adecuada para estudios de expresión muestras de hígado y bazo de 3 peces estimulados con la mayor dosis de bacterias muertas y 3 peces controles (inyectados con PBS estéril) a cada tiempo (24 y 72 hs). El segundo experimento se realizó en el laboratorio del IIP, lo cual permitió trabajar y colectar muestras de hígado de un mayor número de individuos; el diseño experimental de este ensayo se esquematiza en la Figura 2.20b (experimento 2) y se detalla en el punto 4.1.4.2 de Materiales y Métodos. En los dos experimentos se midieron en suero los niveles de actividad de la VA del SC (ACH50), Ceruloplasmina y Lisozima, como marcadores que complementaron el análisis del desarrollo de una respuesta inflamatoria con repercusión sistémica. Además, se determinó por qPCR la expresión relativa en hígado de las potenciales PFA a las 24 y 72 hs post-estimulación, normalizando por la expresión de *actb* y *gapdh*. También se determinó la expresión de *il1-b* en el hígado (experimentos 1 y 2) y en el bazo (sólo experimento 1). Dada la gran dispersión que hemos observado en los niveles basales de los componentes innatos examinados hasta ahora en esturiones rusos, consideramos muy útil para el análisis de los parámetros en suero normalizar los niveles medidos al tiempo final (24 o 72 hs) con los valores basales medidos al día -7 (luego de la aclimatación de los peces). Esta estrategia de análisis fue practicable sólo en el experimento 1, donde los peces se individualizaron mediante la implantación de *chips* pero, desafortunadamente, no fue practicable para el segundo experimento ya que en este caso no se pudo individualizar a los peces.

Los resultados de los parámetros medidos en suero muestran que en el experimento 1 la estimulación con las bacterias muertas indujo una respuesta inflamatoria muy modesta. A las 24 hs post-estimulación se observaron leves aumentos (menores de 2 veces) en los niveles séricos de ACH50 (a la dosis 6×10^8 ufc/kg), Ceruloplasmina (a la dosis 6×10^9 ufc/kg) y Lisozima (a la dosis 6×10^7 ufc/kg) respecto a los peces control inoculados con PBS (Figuras 2.21-2.23). Esta estimulación no mostró un patrón claro de dosis dependencia, ya que la dosis más alta no coincidió siempre con la mayor respuesta. A las 72 hs no se observaron cambios en los niveles séricos de ninguno de estos componentes por la administración de las bacterias muertas. Más aún, a pesar de no haber podido aplicar un análisis estadístico debido al bajo número de muestras, no parecerían existir cambios en la expresión de *il1-b* en hígado o bazo (Figura 2.24).

En el experimento 2, la administración de las bacterias muertas no modificó los niveles séricos de ACH50, Ceruloplasmina y Lisozima (Figura 2.25-2.27) y la expresión hepática de la *il1-b* (Figura 2.28) tampoco parece haber sido modificada. En conjunto estos datos sugirieron que el modelo utilizado no generó una inflamación local con gran repercusión sistémica. Sin embargo, dado que los componentes del Complemento y la Ceruloplasmina no se comportan como PFA mayores en vertebrados, inclusive en peces, siguió siendo posible detectar cambios significativos en otras PFA. Por otro lado, estos estudios indicaron que la gran dispersión biológica del modelo y las dificultades para individualizar los

esturiones limitan la potencia en el análisis estadístico, y dificultan en forma importante la evaluación de la respuesta.

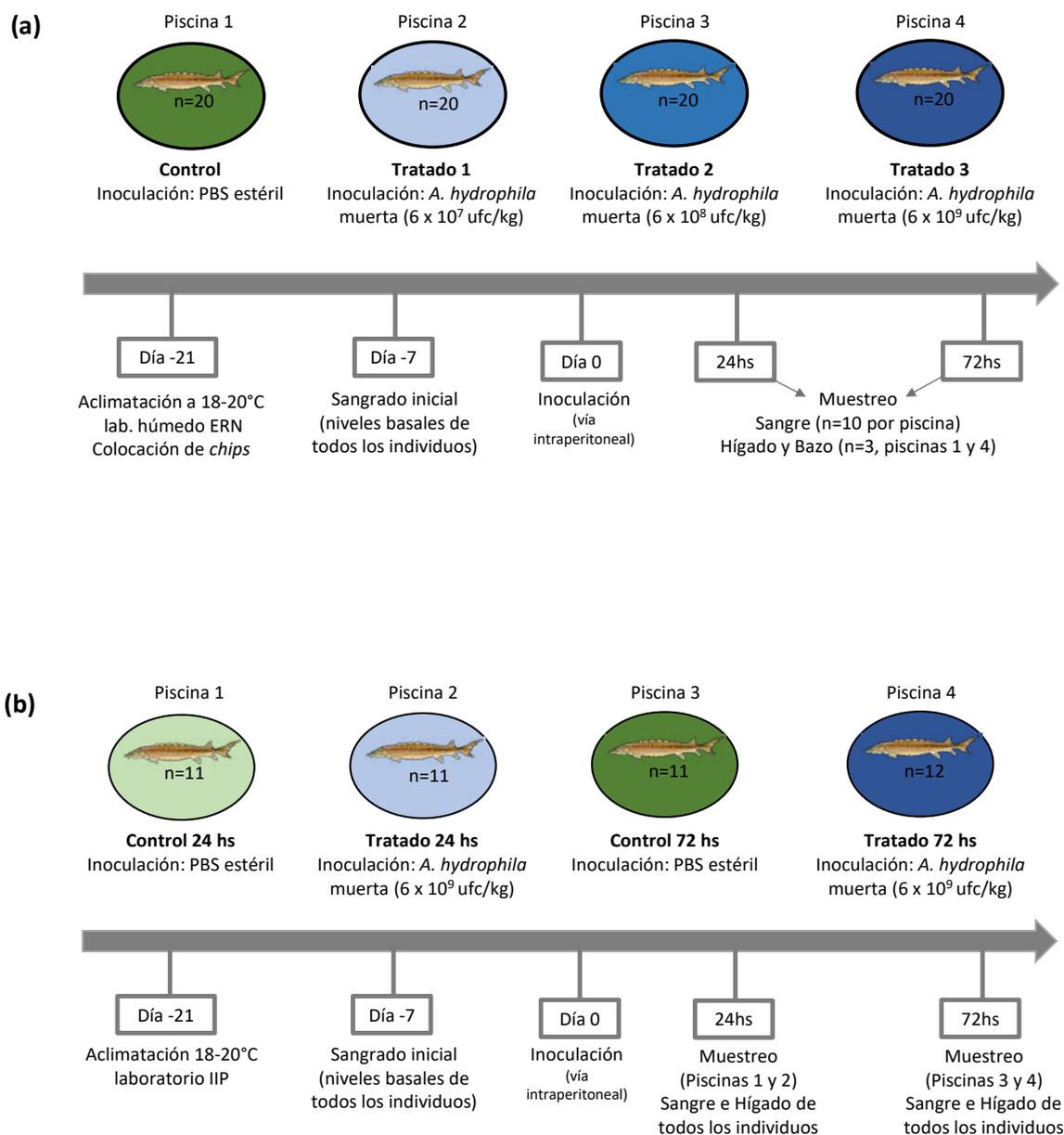


Figura 2.20. Diseño experimental de los ensayos de estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas En (a) se muestra el diseño del experimento 1 realizado en la granja de piscicultura ERN y en (b) el experimento 2 realizado en las instalaciones del IIP (Facultad de Veterinaria).

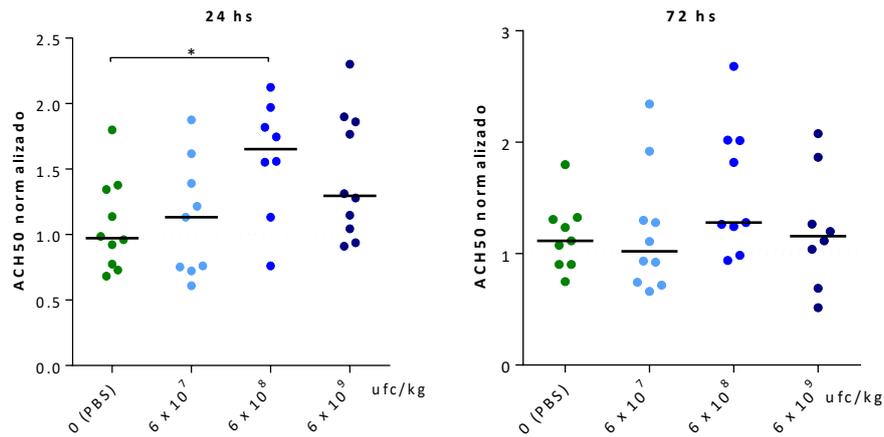


Figura 2.21. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la actividad de la VA del Complemento del suero (experimento 1)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^7 o 6×10^8 o 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (en tonos de azul) o PBS como control (verde). A las 24 y 72 hs post-estimulación se determinó la actividad de la VA del SC (ACH50, U/ml) del suero. Los gráficos muestran los valores obtenidos para cada pez normalizados por los niveles al día -7. Los valores medios de cada grupo de peces se expresan como la mediana ya que los mismos no mostraron distribución normal. A los efectos del análisis estadístico, estos valores se transformaron para su normalización, lo cual permitió emplear el test ANOVA y el post-test de Dunnett para comparar con el control (PBS). El asterisco (*) indica las diferencias significativas obtenidas ($p \leq 0.05$). Las mediciones de la actividad ACH50 fueron realizadas en este caso por la Dra. Valeria Silva.

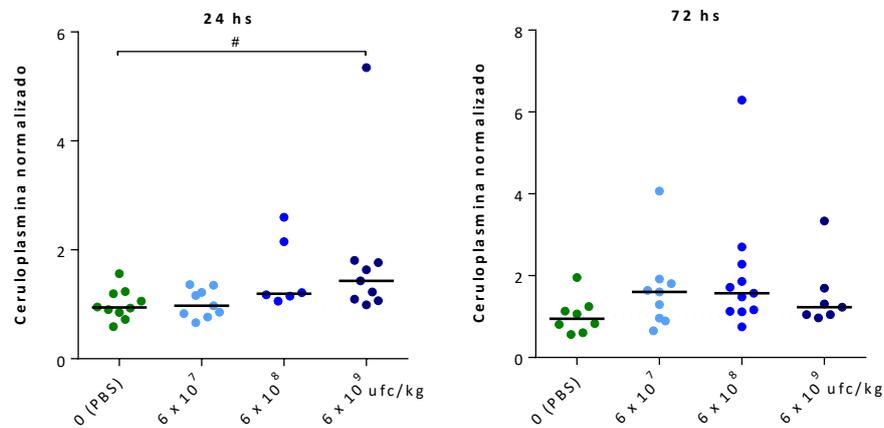


Figura 2.22. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la actividad Ceruloplasmina del suero (experimento 1)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^7 o 6×10^8 o 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (en tonos de azul) o PBS como control (verde). A las 24 y 72 hs post-estimulación se determinó la actividad Ceruloplasmina del suero en U/ml. Los gráficos muestran los valores obtenidos para cada pez normalizados por los niveles al día -7 y la mediana para cada grupo de peces ya que los datos no siguieron una distribución normal. En este caso no fue posible normalizar los datos con transformaciones matemáticas. El numeral (#) indica las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) obtenidas en comparación con el control (PBS), mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

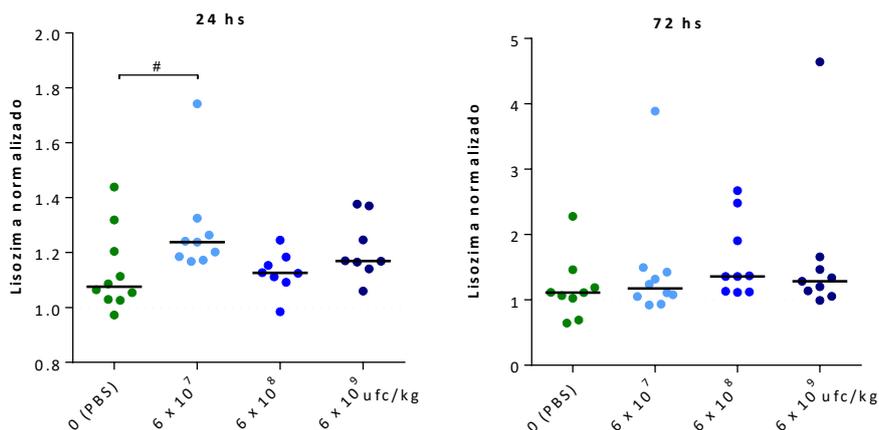
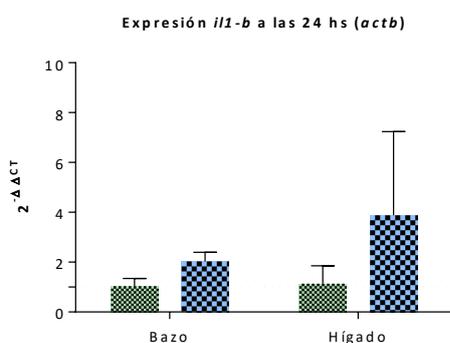


Figura 2.23. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la actividad Lisozima del suero (experimento 1)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^7 o 6×10^8 o 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (en tonos de azul) o PBS como control (verde). A las 24 y 72 hs post-estimulación se determinó la actividad Lisozima del suero en $\mu\text{g/ml}$. Los gráficos muestran los valores obtenidos para cada pez normalizados por los niveles al día -7 y la mediana para cada grupo de peces ya que los datos no siguieron una distribución normal. En este caso no fue posible normalizar los datos con transformaciones matemáticas. El numeral (#) indica las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) obtenidas en comparación con el control (PBS), mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

(a)



(b)

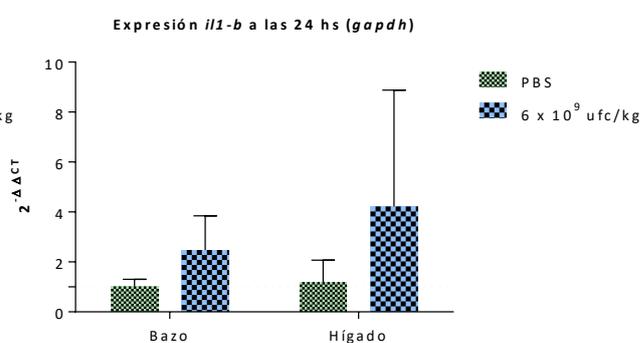


Figura 2.24. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la expresión de *il1-b* en hígado y bazo (experimento 1)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (en azul) o PBS como control (verde). A las 24hs post-estimulación se colectaron muestras de bazo e hígado de 3 peces de cada grupo. Se determinó mediante qPCR la expresión de la *il1-b* en ambos órganos. El gráfico muestra la media y el desvío estándar correspondiente al incremento relativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) en la expresión de *il1-b* normalizado por la expresión del grupo control y utilizando como gen *housekeeping actb* (a) o *gapdh* (b). El bajo número de muestras ($n=3$) no permitió analizar la distribución de los datos y aplicar test paramétricos por lo cual no se realizaron análisis estadísticos.

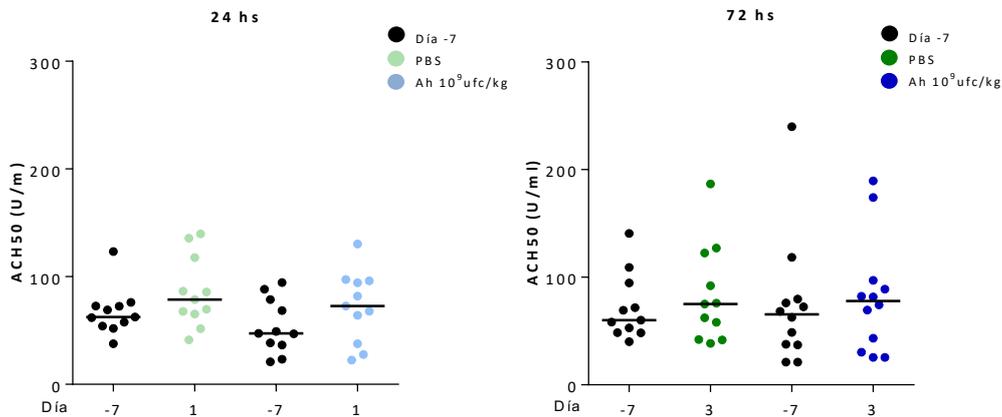


Figura 2.25. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la actividad de la VA del Complemento del suero (experimento 2)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (piscinas 2 y 4, círculos en tonos de azul) o PBS como control (piscinas 1 y 3, círculos en tonos de verdes). A las 24 y 72 hs post-estimulación se determinó la actividad de la VA del SC (ACH50) del suero. Los gráficos muestran los valores obtenidos a los días -7 (nivel inicial, círculos negros), 1 (24h) y 3 (72h) post-estimulación. En cada grupo la linea horizontal indica la mediana ya que los datos no mostraron distribución normal. Los mismos se analizaron con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn sin observar diferencias estadísticamente significativas. La determinación de los niveles de ACH50 fue realizada por el Lic. Marcio Aversa.

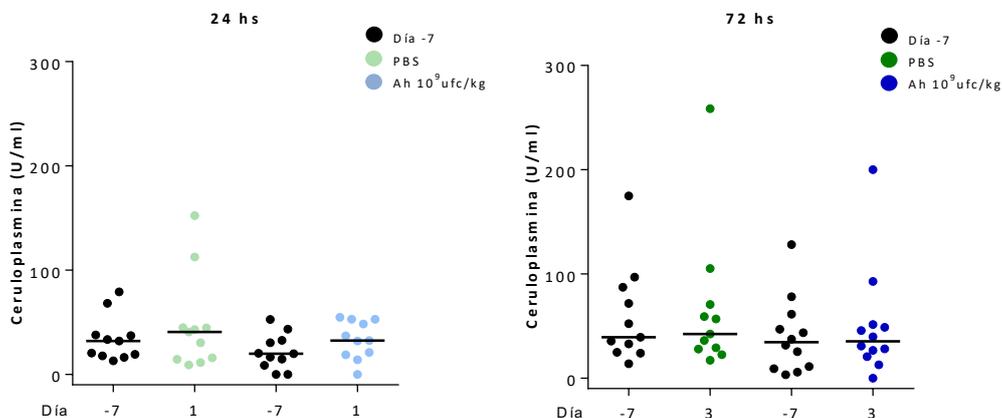


Figura 2.26. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la actividad Ceruloplasmina del suero (experimento 2)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (piscinas 2 y 4, círculos en tonos de azul) o PBS como control (piscinas 1 y 3, círculos en tonos de verde). A las 24 y 72 hs post-estimulación se determinó la actividad Ceruloplasmina del suero. Los gráficos muestran los valores obtenidos a los días -7 (nivel inicial, círculos negros), 1 (24h) y 3 (72h) post-estimulación. En cada grupo la linea horizontal indica la mediana ya que los datos no mostraron distribución normal. Los mismos se analizaron con el test no paramétrico Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn sin observar diferencias estadísticamente significativas. La determinación de los niveles de Ceruloplasmina fue realizada por el Lic. Marcio Aversa.

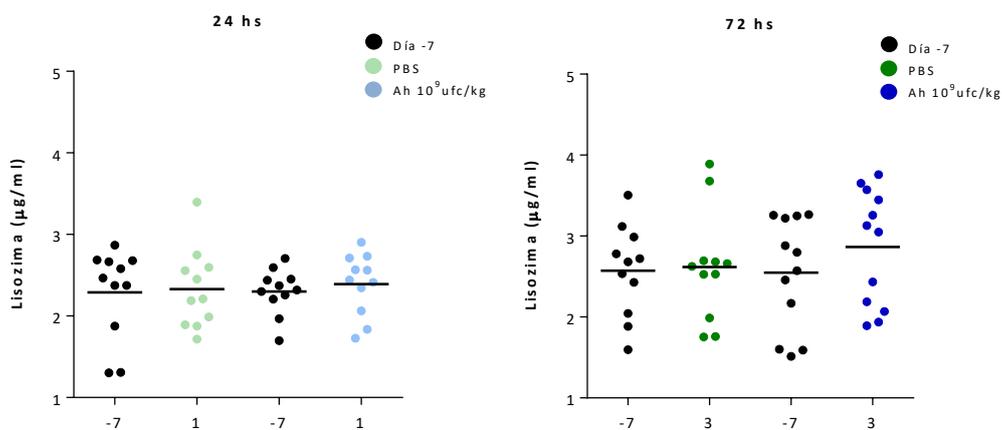


Figura 2.27. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la actividad Lisozima del suero (experimento 2)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (piscinas 2 y 4, círculos en tonos de azul) o PBS como control (piscinas 1 y 1, círculos en tonos de verde). A las 24 y 72 hs post-estimulación se determinó la actividad Lisozima del suero. Los gráficos muestran los valores obtenidos a los días -7 (nivel inicial, círculos negros), 1 (24h) y 3 (72h) post-estimulación. En cada grupo la línea horizontal indica la media ya que los datos se distribuyeron de forma normal. Los mismos se analizaron con el test paramétrico ANOVA y comparación múltiple de Tukey sin observar diferencias estadísticamente significativas. La determinación de los niveles de Lisozima fue realizada por el Lic. Marcio Aversa.

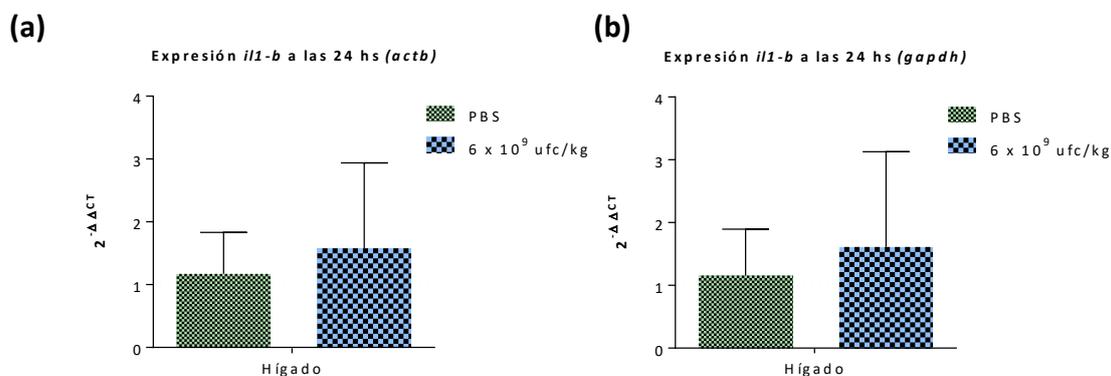


Figura 2.28. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la expresión de *il1-b* en hígado (experimento 2)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta ($n=11$, barras azules) o PBS como control (barras verdes). A las 24h post-estimulación se colectaron muestras de hígado y se analizó la expresión de *il1-b* por qPCR. Se graficó la media y el desvío estándar correspondiente al incremento relativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) en la expresión de dicho gen para cada condición (*A. hydrophila* o PBS) a las 24 hs normalizada por la expresión del grupo control y utilizando como gen *housekeeping actb* (a) o *gapdh* (b). El bajo número de muestras ($n=3$) no permitió analizar la distribución de los datos y aplicar test paramétricos por lo cual no se realizaron análisis estadísticos.

En relación con la expresión hepática de las potenciales PFA, en ambos experimentos se observó una gran dispersión en los niveles de expresión dentro de cada lote de peces (Figuras 2.29, y 2.30), reflejando que los individuos respondieron en forma muy dispar a la estimulación, probablemente como resultado de la elevada variabilidad biológica que caracteriza a una población exogámica. A pesar de esta dispersión, los resultados obtenidos en los dos experimentos mostraron que la estimulación con bacterias *A. hydrophila* parecería inducir un aumento a las 72 hs en la expresión de *saa*, cuando se comparó con los niveles de expresión en los peces control. Más aún, este aumento no dependió del gen utilizado para la normalización (*actb* o *gapdh*), indicando que no hubo un sesgo por el gen elegido como *housekeeping*. Para el experimento 1 a las 72 hs post-inoculación las bacterias muertas parecerían inducir la expresión de la *saa* 7.5 veces respecto al control de 24 hs y 4.5 veces respecto al control de 72 hs (se determinó el cociente entre las medias del $2^{-\Delta\Delta CT}$ del grupo tratado respecto al control correspondiente al normalizar con *actb* o *gapdh*, los valores reportados son el promedio de los cocientes obtenidos con cada *housekeeping*). Sin embargo, el bajo número de muestras (n=3) no permitió analizar la distribución de los datos y aplicar test estadísticos.

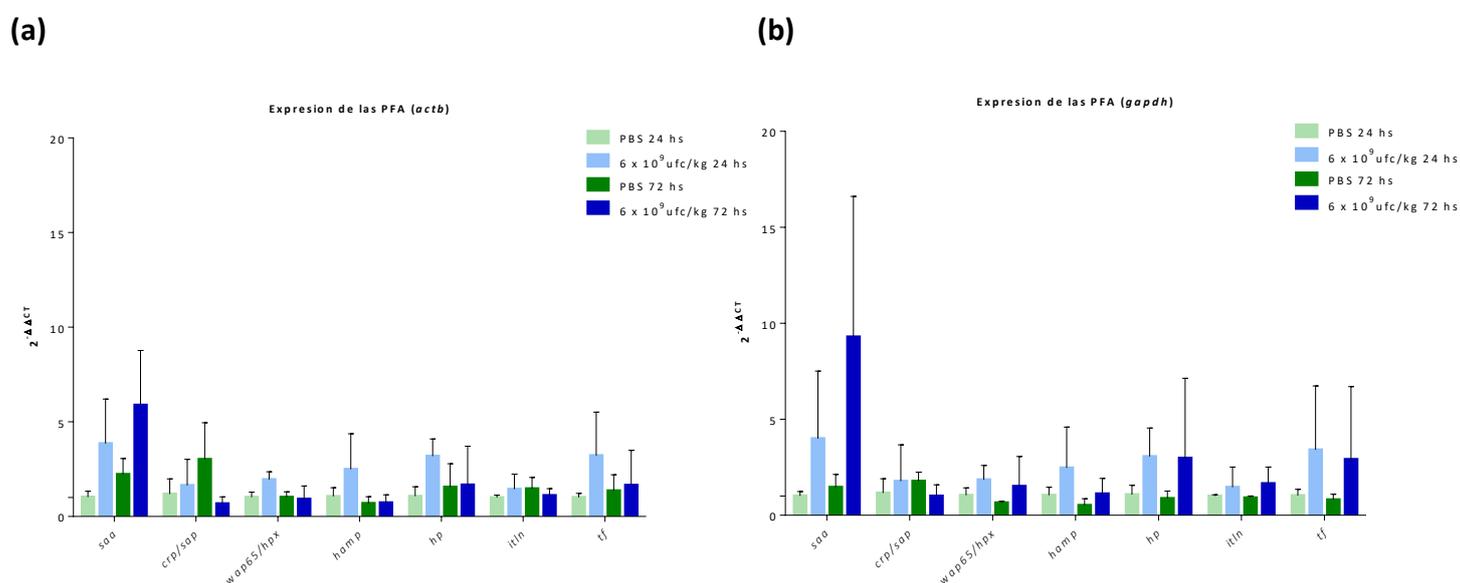


Figura 2.29. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la expresión hepática de las potenciales PFA (experimento 1)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (barras en tonos de azul) o PBS como control (barras en tonos de verde). A las 24 y 72hs se determinó la expresión génica de las potenciales PFA en hígado (3 peces por condición) mediante qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Se graficó la media y el desvío estándar correspondiente al incremento relativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) en la expresión de cada gen para cada tiempo y para cada condición (*A. hydrophila* o PBS) normalizada por la expresión en el grupo control a las 24 hs, utilizando como genes *housekeeping actb* (a) o *gapdh* (b). El bajo número de muestras (n=3) no permitió analizar la distribución de los datos y aplicar test paramétricos por lo cual no se realizaron análisis estadísticos.

A fin de representar correctamente la gran variabilidad biológica, se graficaron los valores de expresión individual de la *saa* normalizando por *actb* (Figura 2.30c) o *gapdh* (Figura 2.30d) correspondientes al experimento 2, en el cual se contó con un mayor número de individuos. Esto permitió comprobar que la variabilidad biológica supera los dos órdenes de magnitud dentro de un mismo grupo, y determinar que la distribución de los datos no es normal. A pesar de esta variabilidad y de la imposibilidad de utilizar test paramétricos (que tienen mayor potencia a la hora de constatar diferencias entre grupos) el análisis estadístico mostró que a las 72 hs post-estimulación con *A. hydrophila*, la expresión de la *saa* aumentó 9.7 veces respecto al grupo control de las 72 hs (se

determinó el cociente entre las medianas del $2^{-\Delta\Delta CT}$ del grupo tratado respecto al control correspondiente al normalizar con *actb* o *gapdh*, los valores reportados son el promedio de los cocientes obtenidos con cada *housekeeping*s).

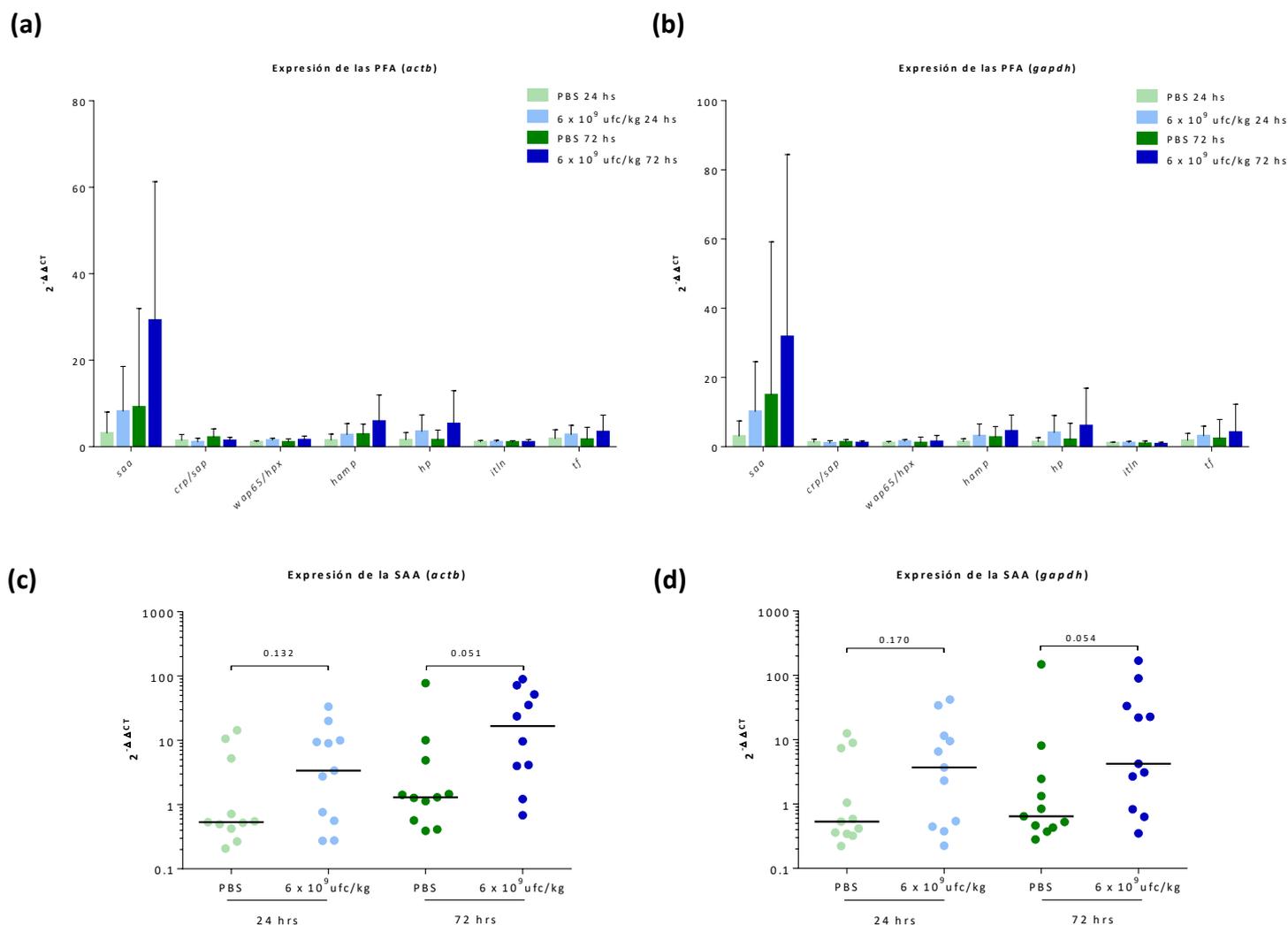


Figura 2.30. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre la expresión hepática de las potenciales PFA (experimento 2)

Se estimularon esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (barras y círculos en tonos de azul) o PBS como control (barras y círculos en tonos de verde). A las 24 y 72hs se determinó la expresión génica de las potenciales PFA en hígado (11 o 12 peces por condición) mediante qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Se graficó la media y el desvío estándar correspondiente al incremento relativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) en la expresión de cada gen para cada tiempo y para cada condición (*A. hydrophila* o PBS) normalizada por la expresión en el grupo control a las 24 hs, utilizando como genes *housekeeping actb* (a) o *gapdh* (b). Para visualizar la variabilidad biológica en (c) y (d) se muestra la expresión relativa de la *saa* de cada pez, para cada tiempo y condición. En (c) y (d) los datos que se distribuyeron de forma no normal, se analizaron dentro de cada tiempo con el test no paramétrico Mann-Whitney indicándose el valor *p* obtenido.

Por lo tanto, a las 72 hs la administración de las bacterias muertas indujo la expresión de *saa* respecto al control unas 4.5 veces en el experimento 1 y unas 9.7 veces en el experimento 2. Se hace notar que en ambos experimentos se observó en el grupo control leves variaciones (tendencia al

aumento) en la expresión de este gen a las 72 hs respecto de las 24 hs. En el caso del experimento 2, en donde fue posible aplicar análisis estadísticos, estas no alcanzaron la significancia. Se prestó atención a estas variaciones ya que podrían deberse a inflamación desencadenada por el pinchazo y/o por la administración de líquido en la cavidad peritoneal, factores que deben de cuidarse durante este tipo de experimentos. De todas maneras, para el experimento 2, la media y desvío estándar en la expresión de *saa* a las 72 hs del grupo control (Figuras 2.30a y 2.30b) se deben a un único individuo cuya expresión se aparta 2 ordenes respecto a la mediana del grupo (Figuras 2.30c y 2.30d).

Ninguna de las otras proteínas candidatas a PFA mostró variaciones estadísticamente significativas en su nivel de expresión génica. Sin embargo, en ambos experimentos se observaron algunas tendencias siendo las más notorias y reproducibles los leves incrementos en los niveles de los transcritos *trf*, *hamp* y *hp*, sugiriendo que no se puede descartar que la Transferrina, Hecpidina y Haptoglobina funcionen como modestas PFA en el esturión ruso. Finalmente, los resultados referidos a la expresión de *crp/sap* deben ser tomados con precaución ya que, como se discutió anteriormente, los cebadores no son probablemente óptimos para un análisis cuantitativo. En cualquier caso, estos genes no mostraron cambios significativos, independientemente del gen elegido como *housekeeping* para el análisis.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos sobre la expresión de las potenciales PFAs, confirman que en el experimento 2 las bacterias muertas indujeron una respuesta inflamatoria con repercusión sistémica ya que se observó una clara inducción de la *saa* a pesar de no constatare cambios significativos en la expresión de *il1-b* y ningún aumento en los niveles séricos de ACH50 y Ceruloplasmina y Lisozima.

Por último, los resultados de ambos experimentos sugieren que la SAA podría ser una PFA positiva en el esturión. Para verificar esto, se estudió la expresión hepática de la *saa* en un experimento piloto de infección con *A. hydrophila*.

2.1.3.3. Expresión hepática de la *saa* en respuesta a la infección con *A. hydrophila* (experimento 3)

Con el objetivo de profundizar en el análisis sobre la expresión hepática de *saa* durante una respuesta inflamatoria aguda, se realizó un ensayo piloto de infección con *A. hydrophila* y se estudió por qPCR la expresión relativa de *saa* en hígado a las 72 hs post-infección. El ensayo se consideró piloto porque se dispuso de un bajo número de peces y porque la respuesta frente a la infección se estudió únicamente a las 72 hs, tiempo en el cual se había observado la mayor inducción de *saa* en los experimentos 1 y 2. Estas restricciones se debieron a que el modelo de infección no estaba puesto a punto por lo cual no resultó posible ni lógico trabajar con un gran número de peces y varios tiempos sin la certeza de que la infección no provocara una rápida y alta mortalidad, anulando el valor del experimento. En la Figura 2.31 se muestra un esquema del diseño experimental de este ensayo. Como se observa en las Figuras 2.32a y 2.32b en los esturiones infectados con *A. hydrophila* la expresión hepática de *saa* a las 72 hs post-infección parecería aumentar respecto al control (cociente de medias) unas 5 veces al normalizar con *actb* y 6.4 veces al normalizar con *gapdh*, respectivamente. Es importante acotar que el bajo número de animales empleado en esta experiencia impidió analizar la distribución de los datos y aplicar test estadísticos paramétricos por lo cual es necesario realizar nuevos experimentos de infección para darle mayor solidez a las conclusiones. De todas maneras, dado que este resultado concuerda con lo observado en los experimentos de estimulación realizados

con la misma bacteria muerta, se consideró razonable continuar los estudios sobre la base de que la SAA sería una PFA positiva en el esturión ruso y podría eventualmente comportarse como un biomarcador de infección/inflamación.

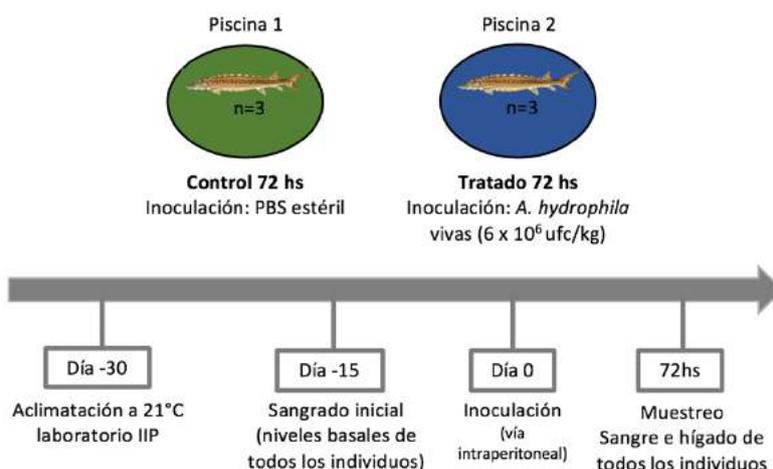


Figura 2.31. Esquema del experimento 3 de infección con *A. hydrophila* realizado en el IIP

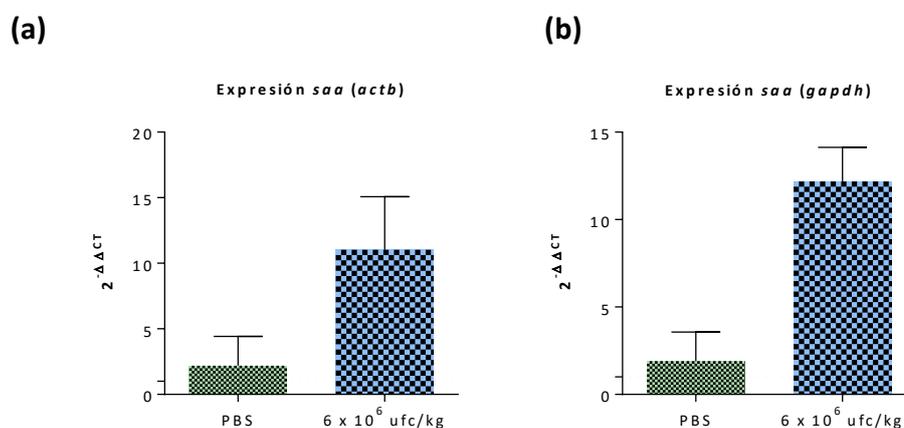


Figura 2.32. Efecto de la infección de esturiones rusos con *A. hydrophila* sobre la expresión de *saa* en hígado (experimento 3)

Se inyectaron esturiones rusos juveniles, por vía intraperitoneal, con 7×10^7 ufc/kg de *A. hydrophila* vivas (barras azules) o PBS como control (barras verdes). A las 24h post-aclimatación se colectaron muestras de hígado y se analizó la expresión génica de la *saa* (n=3 por condición) mediante qPCR como se describe en Materiales y Métodos. Se grafica la media y el desvío estándar correspondiente al incremento relativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) en la expresión de la *saa* a las 72 hs post-infección normalizada por la expresión del grupo control (PBS) y por el gen *housekeeping actb* (a) o *gapdh* (b). El bajo número de muestras (n=3) no permitió analizar la distribución de los datos y aplicar test paramétricos por lo cual no se realizaron análisis estadísticos.

2.1.3.4. Cuantificación absoluta de la expresión de la eSAA en varios órganos

Como parte de la caracterización de la SAA, se planteó estudiar en qué órganos se expresa el gen *saa* en peces aclimatados en el laboratorio en condiciones óptimas de temperatura y alimentación (ver Materiales y Métodos). Como ya se comentó sería posible que dicho gen además de expresarse en el hígado lo hiciera en otros tejidos de relevancia inmunológica como bazo, riñón anterior, branquias y cerebro. Así, se extrajo con éxito ARN total de buena calidad para cada uno de estos órganos y se verificó que en todos ellos fue posible amplificar el mismo transcripto de *saa*, ya que las curvas de melting obtenidas por qPCR presentan picos con idéntica TM (Figura Suplementaria 2.S6). A su vez se ajustó una curva estándar para cuantificar en forma absoluta los niveles de *saa* por qPCR (Figura Suplementaria 2.S7). Como se observa en la Figura 2.33 la *saa* también se expresó en bazo, riñón anterior, cerebro y branquias de esturiones rusos de 2 años de edad y mantenidos en las piscinas del IIP durante 24 días. Sin embargo, la expresión en hígado es más de mil veces superior a la registrada en los demás órganos. Esto indica que el hígado es el principal órgano responsable de la expresión de este gen en las condiciones de aclimatación y mantenimiento utilizadas y, en base a los estudios descriptos arriba utilizando modelos de estimulación o infección con *A. hydrophila*, probablemente también lo sea en condiciones de inflamación.

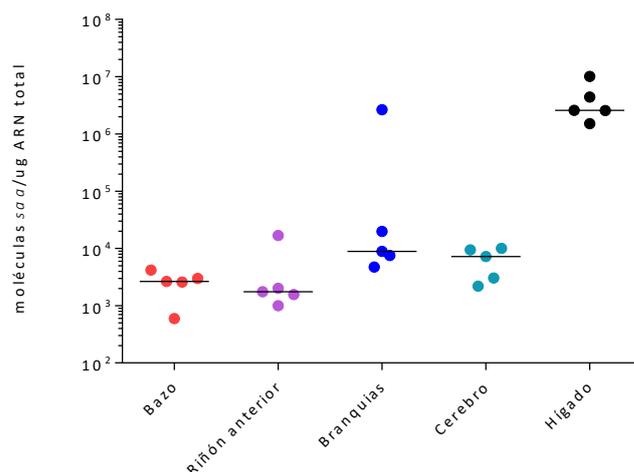


Figura 2.33. Expresión absoluta de la *saa* en distintos órganos en condiciones basales

Número de transcriptos correspondientes al gen *saa* por μg de ARN total en muestras de Bazo, Riñón anterior, Branquias, Cerebro, Hígado determinados mediante cuantificación absoluta por qPCR. La expresión del gen *saa* en distintos órganos se estudió a partir de 5 esturiones rusos de 2 años de edad aclimatados durante 24 días como se describe en Materiales y Métodos.

2.2. Estudio de la inmunogenicidad y obtención de la forma recombinante de la SAA de esturión ruso

Los resultados obtenidos sugirieron que en el esturión ruso la *saa* se induce en el hígado durante el curso de una respuesta inflamatoria (experimentos 1 y 2) o de una infección bacteriana (experimento 3), por lo cual asumiendo que exista una correlación entre la transcripción y traducción, esta proteína se comportaría como una PFA positiva y podría constituir un valioso marcador de infección y/o inflamación en dicho pez. Por esta razón, se propuso generar anticuerpos específicos

contra la SAA de esturión ruso (eSAA) y con ellos desarrollar un inmunoensayo enzimático (ELISA, del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*) que permita detectar y cuantificar sus niveles en suero. Para obtener los antígenos para la inmunización y generación de los anticuerpos anti-eSAA se plantearon dos estrategias alternativas y complementarias comprendidas en el objetivo específico 2. Por un lado, se buscó identificar posibles péptidos inmunogénicos de la eSAA utilizando herramientas bioinformáticas, los cuales serían luego empleados para la generación de anticuerpos en base a su acoplamiento a proteínas inmunogénicas (*carrier*) como la hemocianina de caracol (KLH, del inglés *keyhole limpet hemocyanin*). Contar con distintos péptidos correspondientes a diferentes regiones de la eSAA permitiría generar y obtener anticuerpos capaces de reconocer sitios diferentes de esta proteína, lo cual facilitará el diseño de un ELISA en formato sándwich. Por otro lado, se trabajó en la expresión y purificación de la eSAA en forma recombinante en bacterias (eSAAr), a fin de generar anticuerpos policlonales contra la proteína nativa y poder utilizar dicha proteína recombinante como estándar del ELISA.

2.2.1. Elección de posibles péptidos inmunogénicos de la eSAA

Con el objetivo de seleccionar péptidos potencialmente inmunogénicos de la eSAA se revisó la información disponible sobre la inmunogenicidad de la SAA humana (hSAA)¹⁷⁶. El mapeo antigénico de la hSAA describió la presencia de cuatro péptidos que son epítopes B en conejo y dan lugar a anticuerpos que reconocen la hSAA nativa, independientemente de si esta proteína está pura o unida a lipoproteínas¹⁷⁶. Esta característica es fundamental para poder detectar la totalidad de eSAA del suero de esturión, tanto la que se encuentre asociada a otras proteínas y lipoproteínas, especialmente la HDL, así como la que se encuentre libre. Como se observó anteriormente, la SAA está muy conservada en los vertebrados, desde el esturión al ser humano (Figura 2.1), por lo cual resultó factible identificar las secuencias ortólogas a estos péptidos inmunogénicos en la eSAA. Para esto se alinearon las secuencias de eSAA y hSAA junto con la de los cuatro péptidos mencionados anteriormente (Figura 2.34a). A partir de estos alineamientos se observó que un péptido se localiza en la región N-terminal y los otros tres en los últimos 50 aminoácidos de la proteína. En la eSAA madura, el péptido 1 corresponde a los aminoácidos 26-43 (p26-eSAA), el péptido 2 abarca los residuos 58-71 (p58-eSAA), el péptido 3 abarca los residuos 67-83 (p67-eSAA) y el péptido 4 corresponde a los aminoácidos 88-103 (p88-eSAA). Las secuencias de p26-eSAA, p58-eSAA, p67-eSAA y p88-eSAA son idénticas en un 89%, 57%, 65% y 75% respecto a los péptidos de la hSAA. En forma complementaria, para definir potenciales epítopes B se analizó la secuencia de la eSAA *in silico* con el algoritmo de predicción de epítopes B lineales Bepipred¹⁷⁷. Se determinó que este algoritmo predice un epítope B en la región que abarca los últimos 34 aminoácidos de la proteína, tal como se ilustra en la Figura 2.34a. Esta región solapa con la totalidad de la secuencia de p88-eSAA, con el 90% de p67-eSAA y parte de la secuencia de p58-eSAA. Este algoritmo también predice otro epítope B de unos 12 aminoácidos que solapa con parte de p26-eSAA. Por lo tanto, los péptidos de la eSAA identificados por homología a partir de los péptidos inmunogénicos descriptos para la hSAA se encuentran en regiones predichas como inmunogénicas por el algoritmo Bepipred, indicando que serían buenos epítopes B de la eSAA y permitirían detectarla en su forma nativa.

El nivel de homología y los estudios de predicción alentaron a considerar los cuatro péptidos identificados en la eSAA como posibles epítopes B a utilizar en los ensayos de inmunización. No obstante, se consideró importante analizar su potencial estructura secundaria y ubicación en la

estructura terciaria de la eSAA porque variaciones en unos pocos aminoácidos podrían alterar la estructura y/o grado de exposición de los péptidos al solvente, afectando su potencial como epítopes B. A tales efectos, se modeló con el programa SWISS-MODEL¹⁷⁸ la estructura de la eSAA utilizando como templado la estructura cristalográfica de la isoforma A3 de la SAA de ratón, sugerida como el

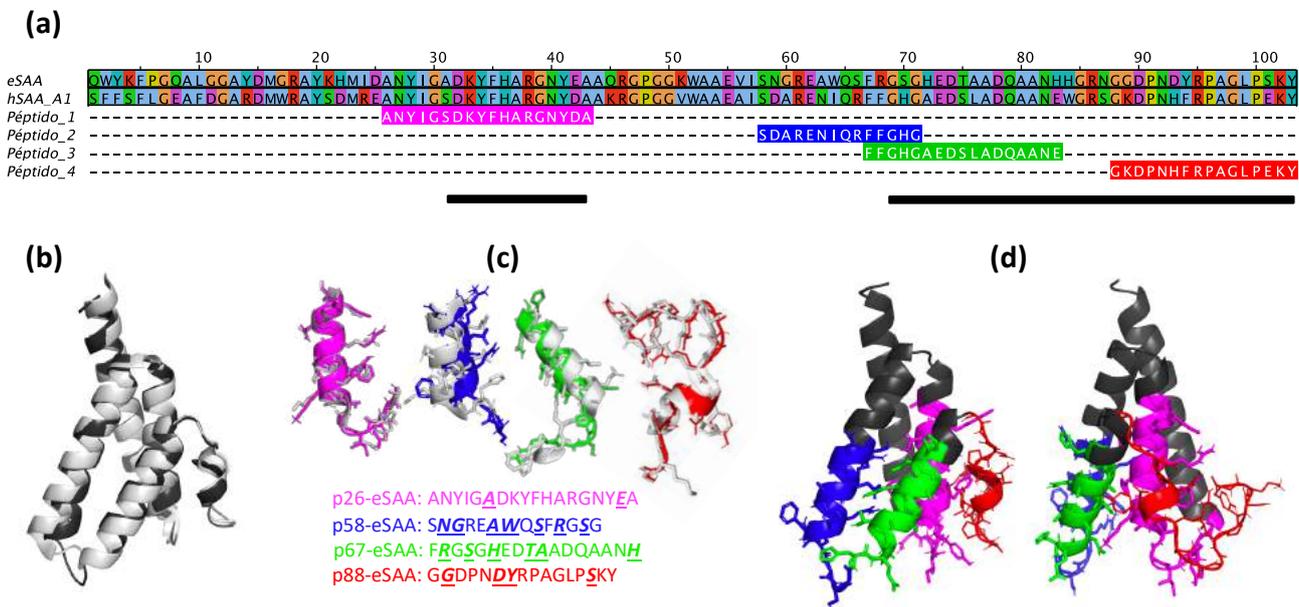


Figura 2.34. Estructura primaria y terciaria de la eSAA y hSAA y localización de potenciales péptidos inmunogénicos

(a) Alineamiento aminoacídico de la eSAA madura, la hSAA A1 y las secuencias de cuatro péptidos inmunogénicos de la hSAA A1 que reconocen la proteína nativa (176). Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega, los colores de la secuencia de las SAA indican el tipo de aminoácidos. Los péptidos 1, 2, 3 y 4 se colorean con magenta, azul, verde y rojo, respectivamente. Los homólogos a los péptidos 1, 2, 3 y 4 en la eSAA se llamaron p26-eSAA (AA 26-43), p58-eSAA (AA 58-71), p67-eSAA (AA 67-83) y p88-eSAA (AA 88-103), respectivamente. Las barras negras indican epítopes B lineales de la eSAA predichos *in silico* con el algoritmo Bepipred Linear Epitope Prediction.

(b) Alineamiento estructural de la hSAA A1 (PDB: 4IP9, gris) junto al modelo de la eSAA (negro) generado en SWISS-MODEL a partir de la SAA A1 murina (PDB: 4Q5G). El alineamiento se realizó y visualizó con Pymol.

(c) Alineamiento estructural de los péptidos 1, 2, 3 y 4 de la hSAA (en gris) con los péptidos p26-eSAA (magenta), p58-eSAA (azul), p67-eSAA (verde) y p88-eSAA (rojo) de la eSAA, cuyas secuencias se indican en la figura, subrayando los aminoácidos que cambian respecto a la hSAA. Las estructuras se visualizaron en Pymol.

(d) Modelo estructural de la eSAA mostrando la localización espacial de los péptidos p26-eSAA (magenta), p58-eSAA (azul), p67-eSAA (verde) y p88-eSAA (rojo), el resto de la proteína se indica en negro. Se muestra la estructura desde dos posiciones diferentes para visualizar los diferentes péptidos. La estructura se visualizó en Pymol.

mejor templado por el programa (rSAA, PDB: 4Q5G.1.A). El modelo obtenido se refinó con el programa GalaxyRefine¹⁷⁹ y se obtuvo una estructura con índice qmean de -0.82¹⁸⁰, correspondiente a un modelo de buena calidad. Al alinear la estructura cristalográfica de la hSAA (PDB: 4IP9) junto al modelo de eSAA, se observó que las estructuras de ambas proteínas son prácticamente idénticas (Figura 2.34b). A continuación, cuando se ubicaron en dichas estructuras los cuatro péptidos identificados en la hSAA junto a los correspondientes homólogos en la eSAA, se constató que los péptidos de ambas especies adquieren plegamientos muy similares (Figura 2.34c). Por lo tanto, es muy probable que los péptidos identificados en la eSAA posean una alta homología estructural respecto a los de hSAA y por lo tanto también sean epítopes B en conejo. La Figura 2.34d muestra la localización espacial de los 4 posibles péptidos inmunogénicos de la eSAA. Analizando la Figuras 2.34c y 2.34d se observó que, p26-eSAA, p58-eSAA y p67-eSAA presentan una estructura rica en alfa hélice y que, p58-eSAA y p67-eSAA

comparten cinco residuos que corresponden a un bucle. Por otro lado, p88-eSAA cuenta con una estructura en forma de bucle, muy conservada que cuenta con tres residuos de prolina que seguramente impiden la formación de una alfa hélice en esta región, tanto en la hSAA como en la eSAA. En relación con la definición de epítopes B, la presencia de estructuras tipo bucle (del inglés, *loops*) en los péptidos, como sucede en regiones de p26-eSAA, p58-eSAA y p67-eSAA y para la totalidad de p88-eSAA, no es un elemento necesariamente negativo ya que son regiones generalmente expuestas en las proteínas. De hecho, las zonas de mayor contacto con el antígeno en las inmunoglobulinas generalmente adquieren estructuras de *loop*¹⁸¹. Con respecto a la localización de los péptidos en la proteína, se observó que p26-eSAA forma parte de una hélice central de la eSAA mientras que p58-eSAA, p67-eSAA y p88-eSAA se localizan en la superficie de la proteína, por lo cual probablemente estén más accesibles para su reconocimiento por anticuerpos que p26-eSAA. Por otra parte, p88-eSAA se encuentra espacialmente distante de p58-eSAA y p67-eSAA, por lo cual los anticuerpos generados contra estos posibles epítopes permitirían reconocer a la eSAA por dos regiones diferentes sin que ocurra un impedimento estérico. Esto resultó un elemento muy importante a tener en cuenta pensando en el desarrollo de un ELISA de tipo *sandwich* que detecte la forma monomérica de la eSAA. Por lo tanto, en base a todos estos estudios se eligió generar anticuerpos contra p58-eSAA, p67-eSAA y p88-eSAA, los cuales se adquirieron de un laboratorio comercial en forma de conjugados a la proteína KLH.

2.2.2. Expresión de la eSAA en forma recombinante

Como alternativa al uso de péptidos inmunogénicos para la generación de anticuerpos anti-eSAA, se planteó utilizar como antígeno a la eSAA expresada en *E. coli*. Se eligió expresarla en bacteria por múltiples razones. En primer lugar, la eSAA madura es una proteína pequeña (11.5 kDa) con una estructura globular simple, rica en alfa hélices, según el análisis *in silico* descrito arriba (Figura 2.34b). Más aún, de acuerdo a la información disponible en UNIPROT para la SAA A1 humana (Código: P0DJ18) es posible que la eSAA no esté estabilizada por puentes disulfuros y que no posea modificaciones post-traduccionales. A su vez, se ha descrito la expresión de la SAA de varios orígenes (humano, trucha arcoíris y bacalao de estuario) en *E. coli*, apoyando la elección de este sistema de expresión procarionota¹⁸²⁻¹⁸⁴. Por otra parte, como el objetivo principal en este caso fue utilizar la eSAA para generar anticuerpos específicos en conejos y utilizarla como estándar de un ELISA, no se justificó en un principio utilizar un modelo de expresión eucariota.

Una vez seleccionado el modelo, se planteó la interrogante sobre cuál secuencia de *saa* elegir para su expresión recombinante. Como se observa en la Figura 2.10 las secuencias aminoacídicas de los clones 2 y 3 son idénticas, mientras que el clon 4 posee dos variaciones puntuales consecutivas que dan lugar a un cambio no sinónimo (⁶³A por ⁶³N en la proteína madura). En esta posición, la SAA del esturión chino y siberiano poseen un residuo A, al igual que los clones 2 y 3 correspondientes a la eSAA. Por otra parte, el clon 3 muestra un único cambio nucleotídico sinónimo respecto al clon 2 (¹⁴⁰A por ¹⁴⁰C). En función de estas observaciones se eligió expresar en forma recombinante el clon 2 de la eSAA porque en estas posiciones su secuencia es la más parsimoniosa (tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico) respecto a la SAA de esturión chino y siberiano. Para aumentar las probabilidades de éxito, la secuencia codificante de la eSAA se clonó en tres vectores distintos que permiten expresarla proteína fusionada a una cola de histidina (pT7-eSAA) o en forma quimérica, unida además a la

proteína de fusión tiorredoxina (pT7-TRX-eSAA) o a la proteína de unión a maltosa (pT7-MBP-eSAA) (Figura 2.35a).

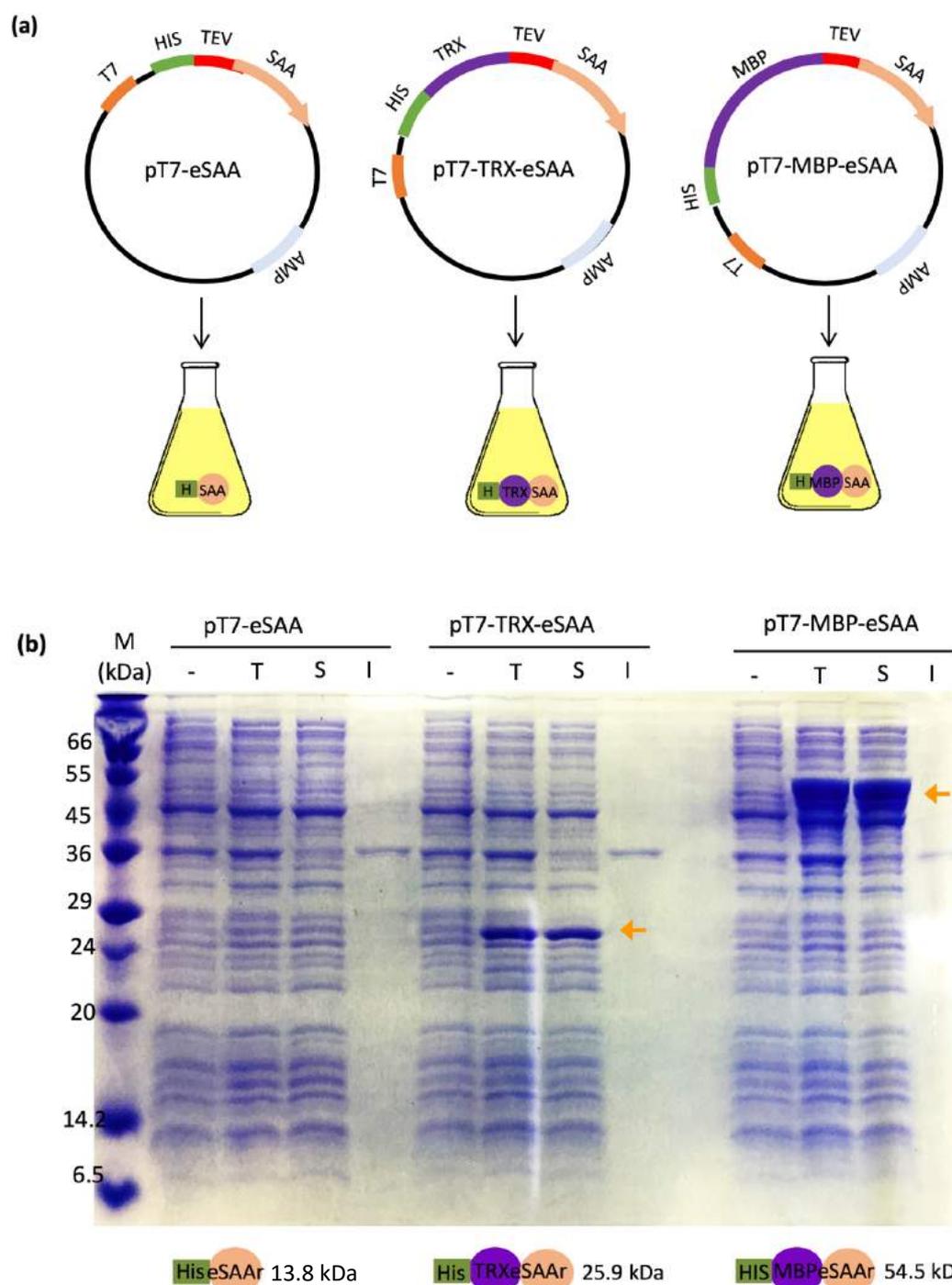


Figura 2.35. Expresión recombinante en *E. coli* BL21 DE3 Star de la His-eSAA, His-TRX-eSAA y His-MBP-eSAA

(a) Esquema de los tres vectores utilizados. El promotor fuerte T7 (T7) se muestra en naranja, la cola de histidina N-terminal se muestra en verde (His), las proteínas de fusión TRX o MBP se muestran en violeta, la secuencia de reconocimiento y corte de la proteasa TEV se muestra en rojo, la secuencia de la eSAA madura en naranja claro y el gen de resistencia a ampicilina en celeste.

(b) Electroforesis (Tris-Tricina-SDS-PAGE) en condiciones reductoras de las muestras obtenidas. Se observan la fracción sin inducir (-), y las distintas fracciones obtenidas luego de inducido el cultivo: total (T), soluble (S) e insoluble (I). Se indica el marcador de peso molecular (M) y el tamaño esperado para la His-eSAAr, His-TRX-eSAAr y His-MBP-eSAAr. Las flechas señalan las bandas compatibles con la expresión de la His-TRX-eSAAr y His-MBP-eSAAr.

Las tres construcciones se expresaron en la cepa *E. coli* DE3 Star en medio LB, durante 4 hs y a una temperatura de 30°C. Previo a la inducción (con IPTG 0.5 mM) se guardó una alícuota del cultivo de bacterias sin inducir como control. Finalizado el tiempo de cultivo, las suspensiones de bacterias se lisaron y se separaron los lisados totales, así como también sus fracciones insoluble y soluble para su análisis por electroforesis (Figura 2.35b). Cuando se utilizó la construcción pT7-eSAA no se observó la presencia de una banda diferencial respecto al control, que resultara compatible con la eSAA (PM teórico de la eSAAr 13.8 kDa), ni en el lisado total de las bacterias en las que se indujo la expresión ni en sus fracciones soluble e insoluble, indicando que no hubo expresión en estas condiciones. Cuando se utilizó el vector donde la eSAA se fusionó a la TRX (pT7-TRX-eSAA) se observó una banda de más de 24 kDa en el lisado total y en su fracción soluble, que no se encontró presente en la fracción sin inducir ni en la fracción insoluble. Esta banda concuerda con el tamaño molecular esperado para la proteína de fusión His-TRX-eSAAr (PM teórico 25.9 kDa). Finalmente, cuando se indujo la expresión de la eSAA fusionada a MBP (His-MBP-eSAAr) se observó una banda de aproximadamente 55 kDa, que fue muy abundante en el lisado total y en su fracción soluble, y no se detectó en la fracción sin inducir ni en la fracción insoluble. Esta banda es compatible con la presencia de la proteína de fusión His-MBP-eSAA que posee un PM teórico de 54.5 kDa. Por lo tanto, se logró expresar la eSAAr en forma soluble únicamente fusionada a la TRX o a la MBP. Esto representó un logro importante y vuelve a la eSAA una de las primeras proteínas de esturión en ser producidas en forma recombinante.

Existen varias razones que podrían explicar por qué la eSAA se expresó en bacterias solamente al estar unida a una proteína de fusión. En este sentido, la presencia de proteínas de fusión puede favorecer que la proteína recombinante se pliegue correctamente, que su solubilidad aumente e impida que se agregue, degrade o resulte tóxica para las bacterias^{185,186}. Cabe mencionar que no se optimizó el uso de codones para la secuencia codificante de la eSAA y esto pudo afectar en mayor medida el inicio de su traducción¹⁸⁷. Esto podría explicar que la fusión a las proteínas bacterianas TRX o MBP (fusionadas en posición *upstream* respecto a la eSAA) haya contribuido a mejorar la expresión de la eSAA al ser ambas proteínas propias de *E. coli* con sus codones optimizados para su correcta traducción. La dependencia de la presencia de una proteína de fusión para la expresión de la eSAA contrasta con resultados descritos por otros autores que lograron expresar la SAA A1 humana (clonada en el vector pet30a(+)) en ausencia de proteínas de fusión, utilizando la misma cepa bacteriana y similar temperatura de expresión de 25°C o 30°C¹⁸². En el presente trabajo de tesis no se exploró la utilización de otros medios de cultivos y otras temperaturas de expresión que podrían haber favorecido la expresión de la eSAA sin proteína de fusión.

En base al mayor nivel de expresión que se obtuvo para la eSAA fusionada a la MBP (notar en la Figura 2.35 que la His-MBP-eSAAr se expresó en mayor nivel que la His-TRX-eSAAr), se decidió purificar la His-MBP-eSAAr apostando a lograr un mayor rendimiento de la proteína recombinante.

2.2.3. Purificación de la eSAAr

Para obtener la eSAAr fue necesario realizar varios pasos de purificación que se esquematizan en la Figura 2.36a. En primer lugar, la fracción soluble conteniendo la His-MBP-eSAAr se purificó por cromatografía de afinidad por metales (IMAC, del inglés *immobilized metal affinity chromatography*) aprovechando que dicha proteína quimérica cuenta también con una cola de histidina. Las fracciones obtenidas en esta primera cromatografía se analizaron por electroforesis. Como se observó en gel de Tris-Tricina-SDS-PAGE de la Figura 2.36b, la banda correspondiente a la His-MBP-eSAAr no está presente en el percolado (FT) ni en los lavados sin imidazol (L1-L6), mientras que apareció al lavar con

bajas concentraciones de imidazol (L1' - L6' y L1'' - L6''). Esto sugiere que la His-MBP-eSAAr se unió mayormente a la matriz (IMAC 1), lo que se comprobó al observar una banda enriquecida en His-MBP-eSAAr en las eluciones con 300 mM de imidazol (E1-E6). Para obtener la eSAAr sin el tag, el pool de estas eluciones se digirió con la proteasa His-TEV_{sh} (del inglés, *Tabacco Etch Virus endopeptidase*) y los productos obtenidos de la digestión se fraccionaron nuevamente por IMAC (IMAC2). Esta segunda IMAC permitiría teóricamente obtener en el percolado a la eSAAr (sin tag) y separarla del resto de las proteínas, las cuales quedarían retenidas en la matriz por contar con cola de histidina (la proteasa His-TEV_{sh}, la His-MBP, y la His-MBP-eSAAr no digerida). En la Figura 2.36c se muestra el análisis por Tris-Tricina-SDS-PAGE de las fracciones obtenidas luego de la diálisis y digestión (DyD) y de esta segunda IMAC (IMAC2). El pool obtenido luego de la primera etapa de purificación (IMAC1) mostró contener principalmente un componente de PM aparente en el entorno de los 55 kDa, correspondiente a la His-MBP-eSAAr. En contraste, la muestra obtenida luego del tratamiento con la His-TEV_{sh} mostró la presencia de tres bandas muy intensas de PM aparente entre 35 y 55 kDa, alrededor de 35 kDa y entre 15 kDa y 10 kDa, las cuales serían compatibles con la His-MBP, la proteasa His-TEV_{sh} y la eSAAr de acuerdo con sus PM teóricos de 43.1 kDa, 35 kDa y 11.5 kDa, respectivamente. Dado que luego de la digestión con la His-TEV_{sh} prácticamente no se observó al componente de 55 kDa correspondiente a la His-MBP-eSAAr, se concluyó que en las condiciones experimentales la proteasa logró digerir el tag de la proteína quimérica casi por completo. Por otro lado, como resultado de la IMAC2 se logró unir la His-MBP, la His-MBP-eSAAr sin digerir y la His-TEV_{sh} a la columna ya que estas proteínas no se observaron en el percolado (carril FT). Sin embargo, la eSAAr no se recuperó en el percolado como era de esperar. Teniendo en cuenta que durante todas las etapas de purificación se utilizó un tampón de alta concentración salina (NaCl 0.5 M) no es probable que la eSAAr haya sido retenida sobre la matriz por interacciones iónicas. A su vez, el agregado del detergente SDS 0.1% (m/v) tampoco liberó la eSAAr, sugiriendo que ésta tampoco habría sido retenida por interacciones hidrofóbicas. En este escenario resultó evidente que la eSAAr estaría interactuando en forma directa con la matriz. Esta interacción está probablemente mediada por residuos de His ya que el análisis *in silico* de su estructura mostró la presencia de cuatro His expuestas al solvente, siendo dos de ellas consecutivas en su secuencia, lo cual facilitaría la coordinación del cobre y su unión a la matriz (Figura Suplementaria 2.S8). Por esto, se buscó despegar en forma diferencial a la eSAAr utilizando bajas concentraciones de imidazol (30 y 50mM). Si bien se logró eluir a la eSAAr, justo a esta coeluyeron otros productos de digestión, principalmente la His-MBP. Entonces, para eliminar la His-MBP y obtener una fracción enriquecida en la eSAAr pura, los eluidos obtenidos se pasaron por dos columnas sucesivas de una matriz comercial de amilosa que posee afinidad por la His-MBP¹⁸⁸. Como se observa en la Figura 2.36d esta última etapa de purificación fue exitosa y permitió eliminar la His-MBP y obtener a la eSAAr con un alto grado de pureza. Globalmente, el procedimiento de purificación rindió 1.8 mg de eSAAr por gramo de masa húmeda de bacterias.

A fin de verificar la identidad de la proteína expresada y purificada, ésta se analizó por espectrometría de masas observándose un pico mayoritario de 11440 Da que coincidió con el peso molecular teórico de 11447.4 Da predicho para la eSAAr (Figura Suplementaria 2.S9a). A su vez, se observó un pico minoritario de mayor tamaño (11673 Da) que correspondería a la eSAAr unida a pequeños fragmentos de la matriz del espectrómetro de masa. También se observaron otros dos picos de menor tamaño, uno de 7971.8 Da y otro de 5719.8 Da, que coinciden con el peso molecular teórico de 7975.8 y 5714.3 Da, correspondientes a los péptidos que abarcan los aminoácidos 1 a 72 y 1 a 52 de la eSAAr, respectivamente. Estos resultados sugieren que hubo degradación de la eSAAr durante

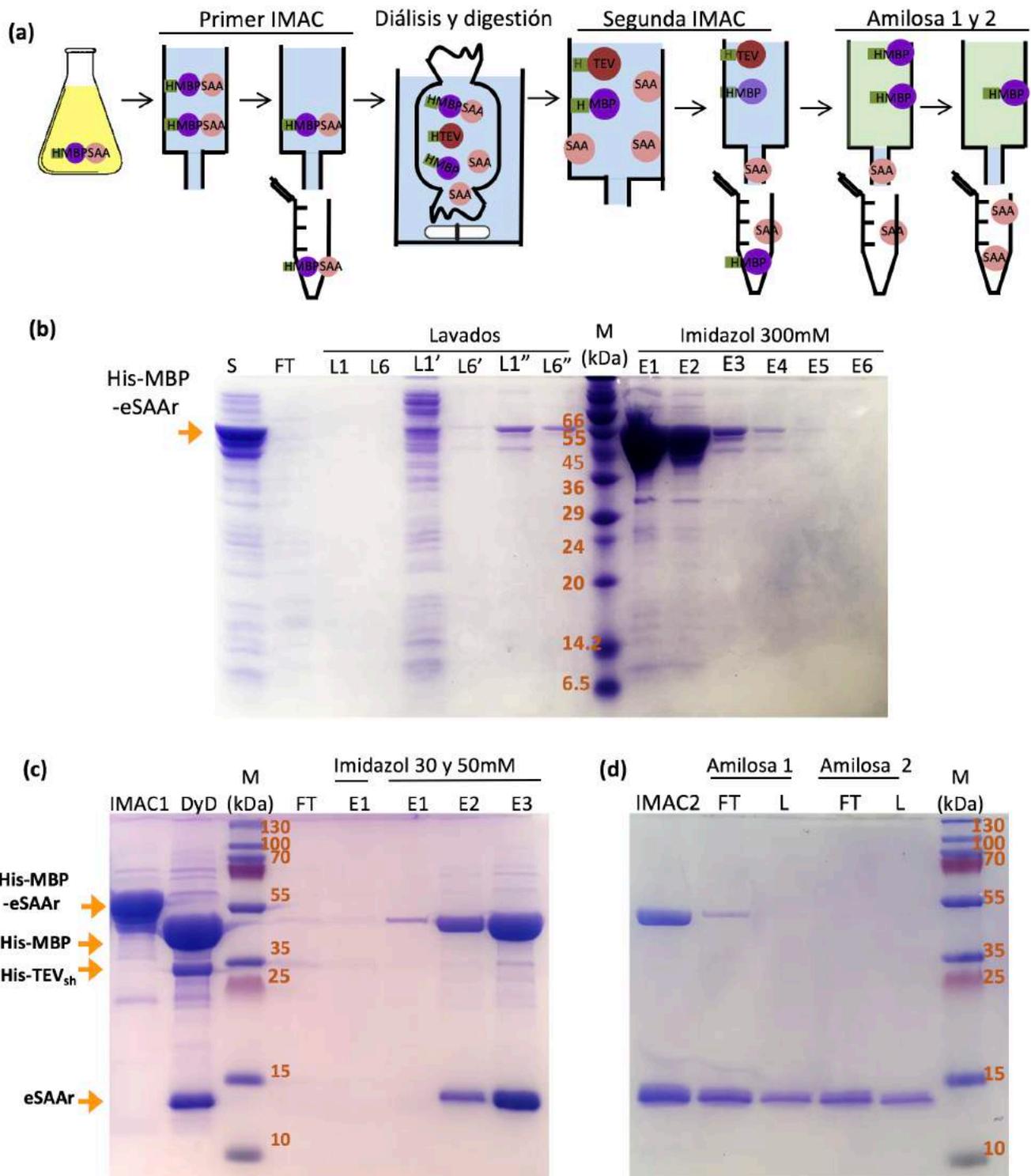


Figura 2.36. Purificación de la eSAAr a partir de la His-MBP-eSAAr

(a) Esquema de las diferentes etapas de purificación.

(b) Electroforesis (Tris-Tricina-SDS-PAGE) en condiciones reductoras correspondiente a las fracciones analizadas durante la IMAC 1: Fracción soluble (S), percolado (FT), lavados sin imidazol (L1 y L6), con imidazol 10 mM (L1' y L6'), con imidazol 20 mM (L1'' y L6''), eluciones con imidazol 300 mM (E1-E6). La M indica el marcador de masa molecular. La flecha naranja indica la banda de tamaño compatible con la His-MBP-eSAAr.

(c) Electroforesis (Tris-Tricina-SDS-PAGE) en condiciones reductoras del pool de las eluciones 1-6 de la IMAC1, del producto su diálisis y digestión con la proteasa His-TEV_{sh} (DyD), y de las fracciones obtenidas luego de realizar la IMAC2 utilizando la muestra DyD: percolado (FT), elución con imidazol 30 mM (E1) y eluciones con imidazol 50 mM (E1-E3).

(d) Electroforesis (Tris-Tricina-SDS-PAGE) en condiciones reductoras correspondiente al pool de las Eluciones E1-E3 obtenidas en la IMAC2, y de las fracciones obtenidas luego de pasar dicho pool por dos columnas sucesivas de amilosa: percolado (FT), lavado con buffer de lisis sin imidazol (L). En (c) y (d) se indica con flechas naranjas las bandas compatibles con la His-MBP-eSAAr, His-MBP, His-TEV_{sh} y eSAAr.

su expresión y/o purificación, la cual involucró cortes proteolíticos entre los residuos ^{72}S y ^{73}G o entre ^{52}G y ^{53}K . Por otro lado, no se observaron los picos correspondientes a los otros productos que se generarían por el corte (un solo corte por molécula) de la eSAAr en estos sitios (masas de 3489.6 Da y de 5751.0 Da). El fragmento de 3489.6 Da no fue detectado posiblemente porque el rango de m/z analizado fue de 5000 a 25000 Da aproximadamente; en el caso del fragmento de 5751.0 Da, se puede especular que este no se haya ionizado correctamente impidiendo su detección en el espectrómetro. Paralelamente la eSAAr se digirió con tripsina y las masas de los péptidos resultantes determinada por espectrometría de masas se utilizaron para realizar búsquedas con el programa Mascot (Matrix Science) empleando como base de datos los transcriptomas traducidos de esturión chino y siberiano (Figura Suplementaria 2.S9b). A partir de estas búsquedas se logró confirmar que los péptidos digeridos corresponden inequívocamente a la SAA de esturión ruso.

La degradación de la eSAAr observada luego de su purificación ocurrió a pesar de haber utilizado una cepa de *E. coli* deficiente en la proteasa de membrana *OmpT* (su ausencia reduce la degradación de proteínas heterólogas) y múltiples inhibidores de proteasas durante las etapas de purificación. Para solucionar esto, se podría haber expresado a la eSAAr con un tag de purificación adicional en su extremo C-terminal. El vector pT7 permite incorporar un Strep-tag (péptido sintético de 8 aminoácido) en dicha posición, el cual interacciona fuertemente con la estreptavidina¹⁸⁹. En este escenario, mediante una primer IMAC se purificaría a la His-MBP-eSAAr-strep del resto de las proteínas de *E. coli* y luego de la diálisis y la digestión, utilizando una matriz conteniendo estreptavidina se purificaría únicamente a la eSAAr que no haya sufrido degradación, ya que de lo contrario el Strep-tag se pierde. Más aún esta estrategia vuelve innecesaria utilizar la matriz de amilosa.

En suma, fue posible expresar la eSAAr fusionada a MBP, eliminar el tag de purificación y obtener una fracción con la eSAAr con alto grado de pureza, luego de varias etapas de purificación. Posteriormente se logró confirmar mediante espectrometría de masas que la proteína producida y purificada corresponde efectivamente a la SAA de esturión ruso recombinante.

2.2.4. Análisis de la eSAAr por cromatografía de exclusión molecular

Una vez purificada la eSAAr, se estudió su estado de oligomerización por cromatografía de exclusión molecular analítica utilizando una columna Superdex 75 10/300. En la Figura 2.37a se presenta el cromatograma obtenido donde se observó un pico mayoritario que, de acuerdo a la calibración de la columna, corresponde a un componente de PM aparente de 8.7 kDa (fracción f1). Al precipitar esta fracción y analizarla por electroforesis, se observó una banda de entre 10 y 15 kDa compatible con el tamaño esperado para la eSAAr (Figura 2.37b). Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados se puede concluir que en las preparaciones obtenidas la eSAAr se encuentra mayoritariamente como un monómero. De todas maneras, es importante remarcar que en el cromatograma se observan otros picos pequeños que corresponderían a proteínas de mayor tamaño, pero minoritarias respecto a la eSAAr monomérica. Esos picos podrían corresponder a restos de His-MBP observados en el perfil de SDS-PAGE de la muestra inyectada en la columna (Figura 2.37b) u oligómeros de la eSAAr ya que se ha visto que la SAAr de otros organismos tiende a formar tetrámeros y hexámeros¹⁸². La baja intensidad de estos picos impidió analizarlos por electroforesis. Para esclarecer esto sería necesario realizar estudios más exhaustivos con mayor cantidad de eSAAr. Sin embargo, es claro que en las condiciones analizadas la eSAAr se encuentra mayoritariamente en forma monomérica. La naturaleza monomérica de la eSAAr vuelve imprescindible contar con al menos dos anticuerpos que reconozcan epítopes distintos en dicha proteína recombinante, a fin de poder

utilizarla como estándar de un ELISA en formato *sándwich* que permita cuantificar la eSAA en suero de esturión.

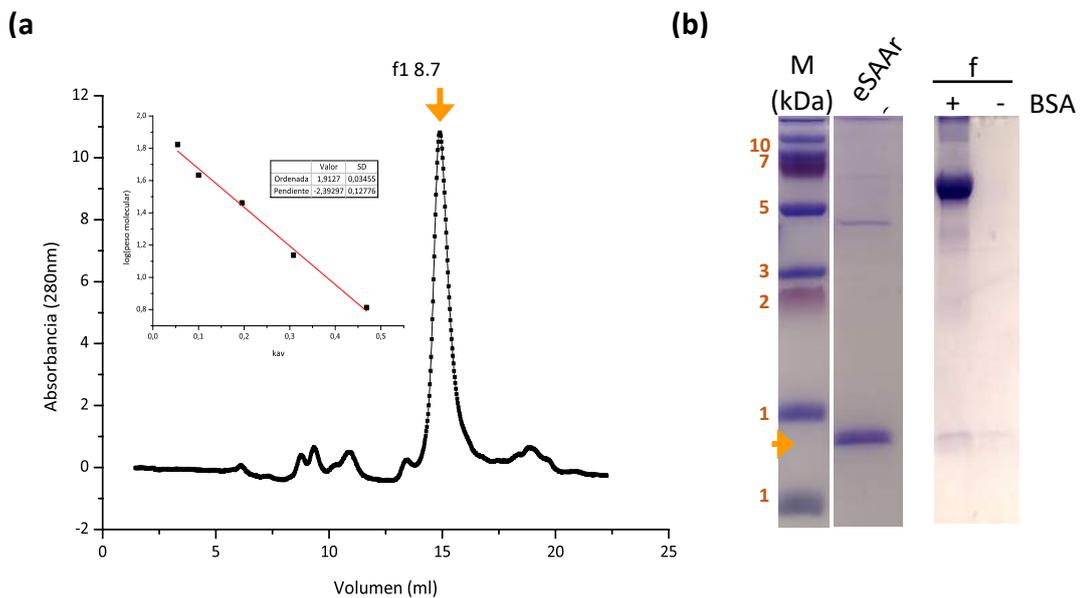


Figura 2.37. Análisis por cromatografía de exclusión molecular de la eSAAr

(a) Cromatograma correspondiente a la exclusión molecular de la eSAAr. Se sembraron 153 μg de eSAAr (100 μl) en una columna Superdex 75 10/300 equilibrada en Tris-HCl 20mM pH 7.2, NaCl 150 mM, Tween₂₀ 0.05% (m/v). La cromatografía se realizó a un flujo continuo 0.4 mL/min durante 130 min registrando la absorbancia a 280 nm. Se colectó la fracción f1 correspondiente al pico predominante eluído a los 14.9 ml. El gráfico inserto corresponde a la curva de calibración de la columna utilizada, obtenida mediante el análisis cromatográfico de los marcadores moleculares (aprotinina, ribonucleasa A, anhidrasa carbónica ovoalbumina y seroalbumina bovina) en las mismas condiciones que las utilizadas para fraccionar la eSAAr. Se grafica el log PM en función del Kav para cada uno de los estándares. En el gráfico principal, se indica el pico correspondiente a la f1, que contiene la eSAAr monomérica con un tamaño aparente de 8.7 kDa determinado a partir de la curva de calibración.

(b) Análisis por Tris-Tricina-SDS-PAGE correspondiente a la muestra inyectada en la columna (eSAAr) y del pico mayoritario obtenido en la cromatografía de exclusión molecular (f1) precipitado con TCA en presencia (+) o ausencia (-) de BSA 62.5 $\mu\text{g/ml}$ como proteína carrier. La flecha indica la banda correspondiente a la eSAAr.

2.3. Optimización y aplicación de un ELISA para cuantificar la eSAA en suero de esturión ruso en respuesta a la estimulación o infección con *A. hydrophila*

En este capítulo se describen los resultados correspondientes al objetivo específicos 3 que comprendieron la generación y purificación de los anticuerpos anti-eSAA y el desarrollo y optimización de un ELISA en formato *sandwich* para detectar la eSAA en las muestras de suero de los esturiones obtenidas en los experimentos de estimulación e infección con *A. hydrophila*.

2.3.1. Purificación de los anticuerpos anti-eSAA por cromatografía de afinidad

A fin de generar anticuerpos policlonales anti-eSAA se inmunizaron 3 conejos con p58-eSAA, p67-eSAA y p88-eSAA conjugados a KLH y un cuarto conejo con la eSAAr. A lo largo de la inmunización se determinaron mediante ELISA el título y la avidéz media (medida como la concentración de KSCN que disocia la mitad de los complejos formados entre el antígeno y los anticuerpos) de los antisueros (Figura Suplementaria 2.S10) para decidir el momento del sangrado final que permitiera obtener la mayor cantidad posible de anticuerpos de alta avidéz (ensayos realizados por la Dra. Valeria Silva, Cátedra de Inmunología, Facultad de Química). Para el conejo inmunizado con p58-eSAA-KLH, se obtuvo a los 200 días suero inmune capaz de reconocer la eSAAr con elevado título (409600) y avidéz media (5.6 M) (Figura Suplementaria 2.S10a). El conejo inmunizado con p88-eSAA-KLH presentó al día 87 un elevado título (102400) y buena avidéz media (3.1 M) (Figura Suplementaria 2.S10b). Como es habitual, se pensó en realizar una segunda inmunización para mejorar el título y la avidéz, para lo cual fue necesario esperar a que tanto el título de los anticuerpos anti-p88-eSAA como el título de los anticuerpos generados contra KLH (datos no mostrados) descendieran. Desafortunadamente esto tardó más de lo previsto y por problemas sanitarios en el bioterio tuvimos que sacrificar al animal al día 280 obteniéndose un suero inmune con un título de 5400 y una mejor avidéz media de 4.6 M, notoriamente menor al registrado a tiempos más tempranos. El conejo inoculado con p67-eSAA-KLH presentó al día 280 una respuesta pobre en término de título (5400) y avidéz media (1.35 M) (Figura Suplementaria 2.S10c) mientras que el conejo inoculado con eSAAr falleció durante el transcurso de la respuesta (Figura Suplementaria 2.S10d). De acuerdo con estos resultados, se eligieron para continuar el trabajo los antisueros anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA

Los anticuerpos anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA se purificaron a partir del suero inmune por cromatografía de afinidad utilizando la eSAAr inmovilizada a una matriz de Sefarosa. Para evaluar el éxito de la purificación se analizó por *Western Blot* la reactividad de las distintas fracciones obtenidas frente a la eSAAr, estas fueron: el suero inmune previo al pasaje por la matriz, la fracción del suero inmune que no se unió a la columna (percolado) y los anticuerpos eluidos. En la Figura 2.38a se muestran los resultados correspondientes a la purificación de los anticuerpos anti-p58-eSAA. En este caso, el suero inmune a una dilución 1/1000 reconoce una banda intensa de entre 10 y 15 kDa y una banda más tenue de unos 10 kDa que corresponderían a la eSAAr y a un producto de degradación de esta proteína, respectivamente. En contraste, el percolado no mostró reacción con la eSAAr, aún a una dilución 10 veces más concentrada que el antisuero original, indicando que la mayoría de los anticuerpos específicos anti-eSAA se unieron a la matriz. Por último, tal como se esperaba, los anticuerpos anti-p58-eSAA eluidos de la columna reconocieron fuertemente a la eSAAr de esturión incluso cuando se utilizaron a una dilución 10 veces mayor que la del antisuero de partida, indicando que la cromatografía de afinidad permitió obtenerlos puros y a mayor concentración. Similares resultados se obtuvieron en la purificación de los anticuerpos anti-p88-eSAA (Figura 2.38b). El suero inmune conteniendo estos anticuerpos reconoce la eSAAr ya que se observó en el *Western Blot* la misma banda de entre 10 y 15 kDa que coincide con el tamaño molecular de dicha proteína, aunque en este caso no se observó reactividad con el componente de menor tamaño. El percolado correspondiente a dicha purificación utilizado a una dilución 1/1000 no reaccionó con la eSAAr pero si cuando se empleó a una dilución 1/100, lo cual sugiere que algunos anticuerpos anti-p88-eSAA no se unieron a la matriz, indicando que en las condiciones utilizadas, la matriz se saturó. Por otro lado, los anticuerpos eluidos reaccionaron fuertemente con la eSAAr a una dilución 1/1000 (en este caso no se ensayaron diluciones mayores).

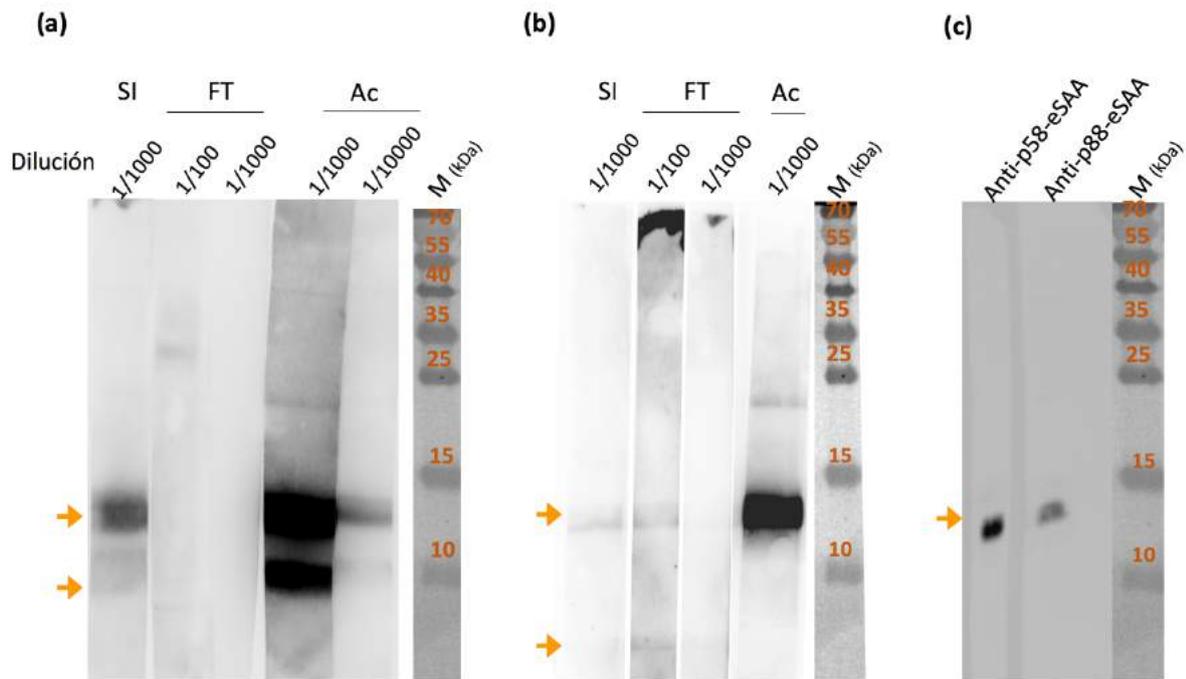


Figura 2.38. Estudio por *Western Blot* de la purificación de los anticuerpos anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA y su capacidad para detectar la eSAAr y la eSAA del suero de esturión

En la figura (a) y (b) se indican los resultados obtenidos para la purificación de los anticuerpos anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA, respectivamente. Se analizó por *Western Blot* la reactividad frente a la eSAAr de los sueros inmunes obtenidos en conejo (SI) conteniendo los anticuerpos anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA y de las fracciones obtenidas al purificar los anticuerpos por cromatografía de afinidad (utilizando una matriz de eSAAr-NHS-sefarosa). Para esto se separaron aproximadamente 4 μ g de eSAAr por SDS-PAGE (400 ng por tirilla), se transfirió la proteína recombinante a una membrana de PVDF, se cortó la membrana en tirillas y se las incubó con distintas diluciones de los sueros inmunes (SI), el percolado (FT) y las eluciones de los anticuerpos (Ac) anti-p58-SAA o anti-p88-SAA obtenidos luego de la purificación. La interacción se reveló utilizando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Se indica el marcador de peso molecular (M) y las bandas reconocidas por los anticuerpos con las flechas naranjas.

(c) Se analizó por *Western Blot* la reactividad de los anticuerpos anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA purificados contra la eSAA del suero de esturión ruso. Para esto se separó por SDS-PAGE 2 μ l de suero de esturión ruso infectado con *A. hydrophila*, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF, se incubó la membrana con los anticuerpos anti-p58-eSAA o anti-p88-eSAA y la interacción se reveló utilizando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Se indica el marcador de peso molecular (M) y la banda reconocida por los anticuerpos con una flecha naranja.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis por espectrometría de masas de la eSAAr, se dedujo que el fragmento con un peso aparente de 10 kDa detectado con el anticuerpo anti-p58-eSAA correspondería al producto de degradación de 7971.8 Da observado en el análisis de espectrometría de masas, ya que dicho fragmento contendría los aminoácidos 1 al 72 de la eSAAr que incluyen casi la totalidad de la secuencia del péptido p58-eSAA (aminoácidos 58 al 71 de la eSAA). Este fragmento no fue detectado con el anticuerpo anti-p88-eSAA porque éste reconoce los últimos 16 aminoácidos de la eSAA, que no están presentes en dicho fragmento. El fragmento de 5719.8 Da (probablemente aminoácidos 1 al 50 de la eSAA) detectado por espectrometría de masas de la eSAAr no fue observado con ninguno de los dos anticuerpos debido a que no contiene la secuencia de los péptidos utilizados. Por otro lado, no se detectaron los fragmentos de 5751.0 Da (aminoácidos 51 al 103 de la eSAA) y 3489.6 Da (aminoácidos 71 al 103 de la eSAA) que también se habrían generado por degradación de la proteína, y que a priori podrían ser detectados por el anticuerpo anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA,

respectivamente; esto podría deberse a la baja concentración en la muestra. Finalmente, se estudió por *Western Blot* la reactividad de los dos anticuerpos contra el suero de esturión. Como se observa en la Figura 2.38c se verificó que ambos anticuerpos purificados reconocen una banda en el suero de un esturión infectado con *A. hydrophila* que coincide con el tamaño esperado para la eSAA monomérica.

En suma, la caracterización inicial de los antisueros por ELISA, y la purificación y caracterización de los anticuerpos específicos anti-eSAA por *Western Blot* indicaron que se generaron y purificaron anticuerpos contra p58-eSAA y p88-eSAA y que estos reconocen en forma específica tanto a la eSAAr (en la columna de afinidad y en el *Western Blot*) como a la eSAA presente en el suero (*Western Blot*), por lo cual son útiles para el diseño de un ELISA.

2.3.2. Desarrollo de un ELISA para cuantificar la eSAA en suero

2.3.2.1. Estabilidad de la eSAA del suero

Como otros autores han observado que la hSAA en el suero puede degradarse por acción de las proteasas dificultando su cuantificación¹⁹⁰, antes de ajustar el ELISA específico para la detección de eSAA, se estudió su estabilidad en el suero. En base a estos antecedentes, se incubó un pool de suero de esturión durante 2 hs o 24 hs a temperatura ambiente o en hielo, y paralelamente se evaluó el efecto de agregar o no varios inhibidores de proteasas. Como inhibidores de proteasas de serina se utilizó PMSF y benzamidina y como inhibidores de metalo-proteasas se utilizó EDTA. Finalizada la incubación se analizó la integridad de la eSAA por *Western Blot* utilizando al anticuerpos anti-p58-eSAA para la detección, y como control de la cantidad de muestra analizada, la membrana se tiñó con rojo Ponceau (Figura 2.39a). Se utilizó el anticuerpo anti-p58-eSAA ya que éste permite detectar al menos un fragmento resultante de la proteólisis de la eSAAr (Figura 2.39a) y se especuló que dicho fragmento también podría generarse por acción de las proteasas del suero sobre la eSAA. Los resultados mostraron que la incubación del suero por 2 o 24 hs a temperatura ambiente no generó fragmentos que sean reconocidos por el anti-p58-eSAA. Además, teniendo en cuenta el control de carga, no se observaron diferencias en la intensidad de las bandas reconocidas por el anti-p58-eSAA en el suero incubado con o sin los inhibidores, así como tampoco se observan diferencias al incubar las muestras en hielo o a temperatura ambiente durante 2 o 24 hs. En conjunto, estos resultados indican que en las condiciones ensayadas la eSAA no sufrió degradación proteolítica en el suero. A continuación, se evaluó el efecto que el congelado y descongelado del suero podría tener en la estabilidad de la eSAA, ya que varias muestras de la seroteca que hemos construido desde el año 2014, en las cuales es relevante analizar los niveles de eSAA, han sido previamente descongeladas para el análisis de la funcionalidad de otros componentes del SI. La exposición a ciclos de congelado/descongelado se analizó en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas previendo que la acción de estas contribuyera a la degradación de la eSAA. Como se muestra en la Figura 2.39b el congelado y descongelado del suero no facilitó una posible degradación de la eSAA, por lo cual tampoco se observaron diferencias en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas.

Globalmente estos resultados indican que la eSAA, en las condiciones de almacenamiento y manipulación utilizadas, es un componente estable, lo cual constituye una característica favorable para ser considerada un biomarcador sérico.

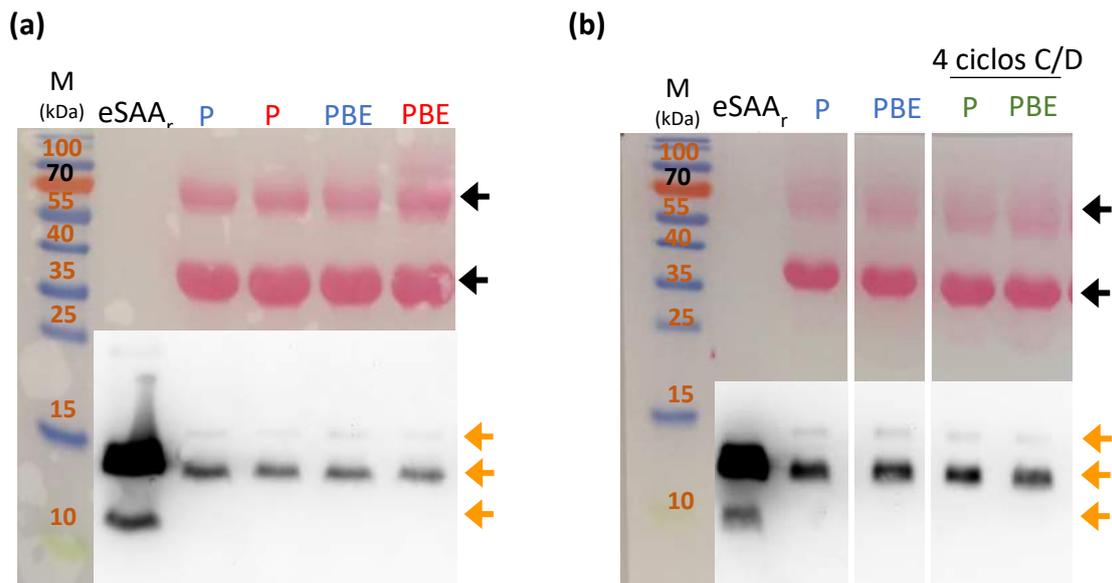


Figura 2.39. Estudio por *Western Blot* de la estabilidad de la eSAA frente a las proteasas del suero y a ciclos de congelado y descongelado

En **(a)** se indican las muestras correspondientes a pools de suero: normal (P) o suplementado con PMSF 5 mM, Benzamidina 10 mM, EDTA 25 mM (PBE) e incubados durante 2 o 24 hs (ensayo representativo de ambos experimentos) en hielo (azul) o a temperatura ambiente (rojo). En **(b)** se indican las muestras correspondientes a pools de suero: normal (P) o suplementado con PMSF 5 mM, Benzamidina 10 mM, EDTA 25 mM (PBE) sometidas a 4 ciclos de congelado y descongelado (verde) o mantenidas en hielo (azul). Las muestras (1.6 μ l) se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF que fue revelada con rojo ponceau como control de carga. Las flechas negras en la parte superior de la membrana indican dos bandas correspondientes al control de carga detectadas con rojo ponceau. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-p58-eSAA y la interacción se reveló utilizando un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Como control positivo se corrió en forma paralela 200 ng de eSAAr. Las flechas naranjas en la parte inferior de la membrana indican las bandas reconocidas por el anticuerpo anti-p58-eSAA. En ambas figuras se muestra el marcador de peso molecular (M).

2.3.2.2. Optimización del ELISA para la cuantificación de la eSAA en suero

Como se mencionó anteriormente se purificaron los anticuerpos anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA y se corroboró que estos reconocen de forma específica tanto a la eSAAr como a la eSAA del suero y a su vez, que la eSAA es estable en dichas muestras. Estos resultados plantearon desarrollar un inmunoensayo que permitiera cuantificar los niveles de eSAA, para luego poder determinar si esta proteína se comporta o no como un biomarcador. Para esto se diseñó un ELISA en formato *sándwich* que utiliza el anticuerpo anti-p58-eSAA para capturar a la eSAA del suero, al anticuerpo anti-p88-eSAA biotinilado para detectar la formación del inmunocomplejo y a la eSAAr como estándar para estimar la concentración de eSAA en las muestras problema. El empleo del anticuerpo anti-p88-eSAA biotinilado permite revelar su unión utilizando estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa (estreptavidina-PO).

La elección del anticuerpo anti-p58-eSAA para la captura se basó en la elevada avidéz media que presentó el antisuero de partida lo cual resulta determinante para la sensibilidad del ELISA, ya que permitiría reconocer y capturar a la eSAA aún en bajas concentraciones en una muestra tan compleja como el suero. Como primer paso de la puesta a punto del ELISA se ensayaron diferentes cantidades de anti-p58-eSAA (0.1 o 0.25 o 1 μ g por pozo) para la captura de la eSAAr en un rango de

concentraciones en las que podría encontrarse la eSAA en el suero (entre 1000 y 5 ng/ml, estimado de acuerdo con los datos obtenidos de la detección de la eSAA por *Western Blot* en suero de peces sanos y considerando que sus niveles aumentarían notoriamente en condiciones inflamatorias). En este ensayo se utilizó el anticuerpo secundario y la estreptavidina-PO a una concentración que se estimó en exceso. Cabe mencionar que como se disponía de una cantidad limitada de anticuerpo anti-p58-eSAA, se ensayó un número de concentraciones de anti-p58-eSAA y eSAAr reducidas en comparación con las posibilidades que teóricamente se podrían plantear. Como se observa en la Figura 2.40a, el ELISA desarrollado permitió detectar la eSAAr. A su vez, sensibilizando la placa con la menor cantidad de anticuerpo anti-p58-eSAA por pozo (0.1 µg) fue posible detectar como mínimo entre 5 y 50 ng/ml y se observó saturación a concentraciones mayores a 500 ng/ml del estándar. Como se observa en el gráfico, utilizando 0.25 o 1 µg de anticuerpo se podrían detectar concentraciones de eSAAr aún menores. Sin embargo, estimamos que la sensibilidad obtenida con 0.1 µg de anticuerpo sería suficiente para cuantificar la eSAA ya que, a pesar de que no conocíamos con exactitud los niveles de esta proteína en el suero de los esturiones y a que no existen datos sobre los niveles de SAA en suero de otros peces, en humanos, los individuos sanos presentan valores medios de SAA de 3.6 µg/ml y estos pueden superar los 2200 µg/ml durante la fase aguda¹⁹¹. Por otra parte, sensibilizar con 0.1 µg de anti-p58-eSAA permite que el reactivo rinda entre 2.5 y 10 veces más. Por estas razones para detectar a la eSAA todos los ELISAs utilizaron 0.1 µg de anti-p58-eSAA por pozo y un rango de concentraciones del estándar entre 0.69 y 500 ng/ml.

Debido a que el estudio anterior se basó en el uso de una solución de eSAAr en PBS que no constituye el tipo de muestra problema a testear, nos planteamos ensayar el efecto matriz del suero, es decir cómo y cuánto se ve afectada la detección de la eSAAr por la presencia de otros componentes del suero. Para evaluar el efecto matriz del suero se comparó la capacidad del ensayo diseñado en detectar la eSAAr solubilizada en PBS o en diluciones de un suero de esturión sin niveles detectables de eSAA (por *Western Blot*, utilizando el anticuerpo anti-p58-eSAA). Como se observa en la Figura 2.40b el suero de esturión a una dilución 1/5 y 1/20 provocó una notoria reducción en la sensibilidad del ensayo, mientras que al utilizar diluciones mayores del suero (1/100, 1/200 o 1/500) este efecto matriz disminuyó. En función de estos resultados se resolvió utilizar diluciones del suero mayores o iguales a 1/200 para asegurarnos que la cuantificación de la eSAA no resulte afectada por la interferencia de otros componentes del suero.

Finalmente, con el fin de optimizar el inmunoensayo, se ensayaron diferentes concentraciones del anticuerpo de revelado anti-p88-eSAA biotinilado (1/2500 y 1/5000) y tiempos de reacción de la peroxidasa (10 o 15 min). Como se observa en la Figura 2.40c al utilizar una dilución 1/2500 del anticuerpo de revelado y dejar transcurrir la reacción de color durante 15 min aumentó la señal del ensayo, pero no el ruido.

Una vez optimizado el ELISA (cantidad de anti-p58-eSAA, concentraciones de eSAAr en el estándar, efecto matriz del suero, dilución del anti-p88-eSAA biotinilado y tiempo de reacción de la peroxidasa), se buscó determinar el límite de detección para la eSAAr y eSAA. Para determinar el límite de detección de la eSAAr se cuantificó el estándar en 5 ensayos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado. Como se observa en la Figura 2.40d la cuantificación de la eSAAr fue muy reproducible entre los 5 ensayos. A continuación, se interpoló en cada una de estas 5 gráficas el valor de absorbancia a 450 nm correspondiente al promedio del blanco más 3 desvíos estándares. Los 5 valores interpolados se promediaron, se calculó el desvío estándar y se determinó el límite de detección para la eSAAr en 2.2 ± 0.9 ng/ml. Para calcular el límite de detección de la eSAA en las muestras de suero, nos basamos en que una dilución 1/200 de un suero de esturión ruso, sin niveles detectables

de eSAA por *Western Blot*, permitió cuantificar adecuadamente todo el rango de concentración del estándar de eSAAr (0.69 y 500 ng/ml) sin interferencias de los componentes del suero. Por lo tanto, como todas las muestras de suero se analizaron a partir de una dilución 1/200, el límite de detección del ensayo para la eSAA en suero fue $0.44 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$. Como se mencionó anteriormente, a pesar de que no se conocen los niveles de SAA en su suero de teleósteos, en humanos se ha visto que los individuos sanos presentan valores medios de SAA de $3.6 \mu\text{g/ml}$ y estos pueden superar los $2200 \mu\text{g/ml}$ durante la fase aguda¹⁹¹. Por lo tanto, la sensibilidad obtenida se considero adecuada y como se verá más adelante, esta fue suficiente para detectar la eSAA en muestras de suero

Por último, es relevante mencionar que el estándar de eSAAr utilizado en el ensayo presenta un producto de degradación que es reconocido por el anticuerpo de captura anti-p58-eSAA, pero no por el anticuerpo de revelado anti-p88-eSAA (Figura 2.40). Esto implica que durante el ELISA dicho fragmento podrá unirse al anticuerpo de captura, pero su interacción no será revelada por el anticuerpo secundario, por lo cual competirá con la eSAAr entera del estándar llevando a subestimar la concentración de eSAA en las muestras de suero. Mediante densitometría de la eSAAr separada por SDS-PAGE y detectada por *Western Blot* con el anti-p58-eSAA se determinó que la eSAAr entera y el fragmento de 7071.8 Da constituyen el 85% y 15% de la muestra, respectivamente (Figura Suplementaria 2S.11). Por lo tanto, asumiendo que este es el fragmento de degradación mayoritario como lo indican el espectro de masa (Figura Suplementaria 2.S9) y los resultados obtenidos durante la purificación de los anticuerpos (Figura 2.38), utilizando dicho estándar se subestimaría en un 15% la concentración de eSAA en las muestras de suero. Como este será un error sistemático presente en todas las muestras a analizar, no fue corregido.

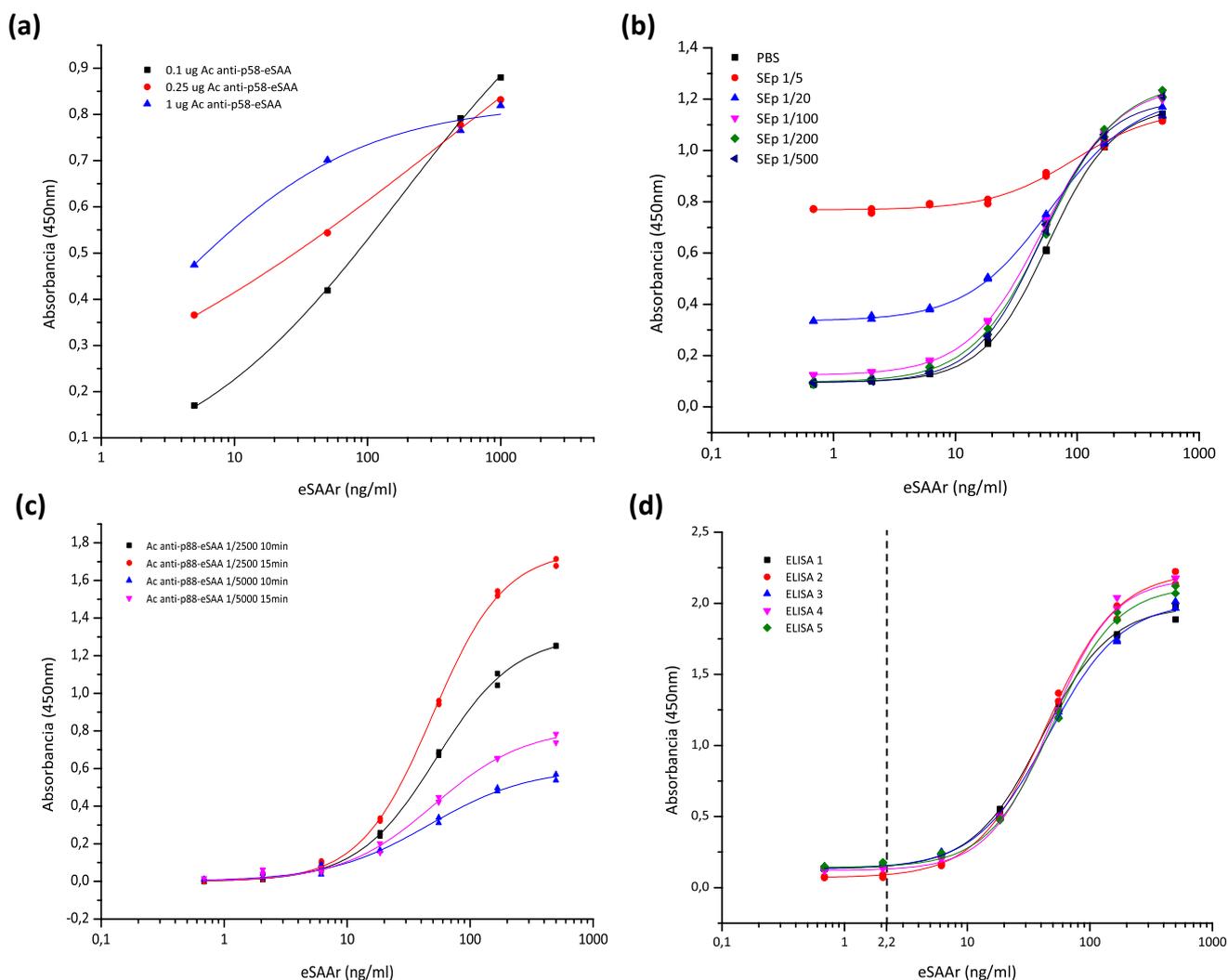


Figura 2.40. Optimización de un ensayo de ELISA en formato *sandwich* para la detección de eSAA en suero

Para detectar la eSAA en suero se diseñó un ELISA en formato *sandwich* que utiliza el anticuerpo anti-p58-eSAA para capturar a la eSAA, el anticuerpo anti-p88-eSAA biotinilado para detectar la formación del inmunocomplejo y a la eSAAr como estándar para estimar la concentración de eSAA en las muestras problema. La unión del anticuerpo anti-p88-eSAA biotinilado se reveló utilizando estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa (estrepavidina-PO). En (a) se muestra la Absorbancia a 450 nm registrada para el estándar (1000 o 500 o 50 o 5 ng/ml) al sensibilizar con 0.1 o 0.25 o 1 µg de anticuerpo anti-p58-eSAA. En (b) se grafica (por duplicado para cada curva) la Absorbancia a 450 nm vs la concentración del estándar de eSAAr (7 diluciones seriadas al tercio en el rango 0.69-500 ng/ml) preparado en PBS o en suero normal de esturión (sin niveles detectables de SAA por *Western Blot*) previamente diluido 1/5, 1/20, 1/100, 1/200, 1/500 en dicho tampón. En (c) se grafica (por duplicado para cada curva) la Absorbancia a 450 nm vs la concentración del estándar de eSAAr (7 diluciones seriadas al tercio en el rango 0.69-500 ng/ml) en PBS y utilizando una dilución 1/2500 o 1/5000 del anticuerpo anti-p88-eSAA biotinilado y un tiempo de reacción de la peroxidasa de 10 o 15 min para el revelado. En (d) se grafica (por duplicado para cada curva) la Absorbancia a 450 nm vs la concentración de 7 diluciones seriadas al tercio del estándar de eSAAr (0.69-500 ng/ml) en PBS correspondiente a 5 ensayos independientes. Para cada uno de estos 5 ensayos se determinó el promedio y desvío estándar del blanco y se interpoló en cada una de las curvas el valor de absorbancia a 450 nm correspondiente a la media + 3 desvíos estándares. A partir de los 5 valores de concentración de eSAAr obtenidos, se determinó el límite de detección (líneas punteadas) para la eSAAr en 2.2 ± 0.9 ng/ml (Media v Desvío estandar).

2.3.2.3. Determinación por ELISA de los niveles de eSAA en suero de esturiones en respuesta a la estimulación o infección con *A. hydrophila* (experimento 1, 2 y 3)

Utilizando el ELISA diseñado anteriormente, se estudiaron los niveles de eSAA en el suero de esturiones estimulados o infectados con la bacteria *A. hydrophila* con el objetivo de determinar si esta proteína se comporta como una PFA positiva en esta especie y si tiene o no utilidad como biomarcador. A tales efectos se analizaron las muestras de suero de los experimentos 1, 2 y 3 en los cuales se había cuantificado la expresión hepática de *saa*.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para el experimento 1. En la Figura 2.41a se muestran los niveles de eSAA en suero a los días -7, 1 (24 hs) y 3 (72 hs) post-estimulación con tres dosis distintas de *A. hydrophila* muerta o PBS como control. Para complementar este análisis y facilitar la comparación entre los diferentes estímulos, se graficó en la Figura 2.41b y en la Figura 2.41c la variación del nivel de eSAA individual para cada condición, es decir los niveles de eSAA a las 24 y 72 hs normalizados por su respectivo valor al día -7, ya que como se mencionó anteriormente en este ensayo fue posible individualizar a los peces. En primer lugar, se observó que la eSAA se detectó en el suero de los esturiones en un amplio rango de concentraciones (mediana: 30.8 µg/ml, rango: 1.4-794.9 µg/ml) previo a la administración de cualquier estímulo (todos los valores al día -7). Esto refleja que la eSAA se expresa en ausencia de un proceso inflamatorio, al menos detectable clínicamente, y que como para el resto de los parámetros innatos analizados existe una gran variabilidad en la concentración sérica entre los individuos. Del análisis del grupo control se observó que la inoculación produjo *per se* un aumento significativo en los niveles de eSAA a las 24 pero no a las 72hs, probablemente debido a la generación de DAMPs por el pinchazo (Figura 2.41a). Este aumento también se registró en todos los grupos estimulados con las bacterias muertas. Sin embargo, a las 72 hs sólo los esturiones estimulados con *A. hydrophila* a dosis de 6×10^8 o 6×10^9 ufc/kg mostraron incrementos significativos en los niveles de eSAA respecto al día -7 (Figura 2.41a), sugiriendo que el estímulo bacteriano indujo una respuesta inflamatoria que se asoció con aumento de los niveles séricos de eSAA.

A las 24hs, se observó para los niveles de eSAA normalizados (Figura 2.41b) un incremento que fue dependiente de la dosis bacteriana administrada (eSAA en el grupo 6×10^9 ufc/kg se indujo 1.6 veces más respecto al grupo 6×10^8 ufc/kg). A su vez, en los esturiones rusos inoculados con la mayor dosis de bacterias, la eSAA se indujo 3.35 veces (comparación entre medianas) respecto al control (Figura 2.41b). Por otro lado, a las 72hs se observó un aumento de 6.8 veces en los niveles de eSAA en los peces estimulados con 6×10^8 ufc/kg respecto al control (Figura 2.41c). En suma, los resultados de este experimento mostraron que la administración de bacterias de *A. hydrophila* muerta indujo un aumento significativo en los niveles de eSAA a las 24 y 72hs post-estimulación.

Con respecto al experimento 2, en la Figura 2.42 se muestran los niveles de eSAA séricos obtenidos del análisis a los días -7 y 1 (24hs) y 3 (72hs) post-estimulación con *A. hydrophila*, a una única dosis de 6×10^9 ufc/kg o PBS como control. Los esturiones mantenidos en condiciones basales (día -7) presentaron menores niveles detectables de eSAA a los observados en el experimento 1 (mediana: 5.8 µg/ml, rango: 0.45-92.4 µg/ml) (Figura Suplementaria 2.S12). En los esturiones inoculados con PBS no se observaron diferencias significativas en los niveles de eSAA a las 24 (Figura 2.42a) y 72 hs (Figura 2.42b) respecto al día -7, a pesar que dicha proteína parecería aumentar levemente. En los peces estimulados con las bacterias se observó una tendencia a mayores niveles de

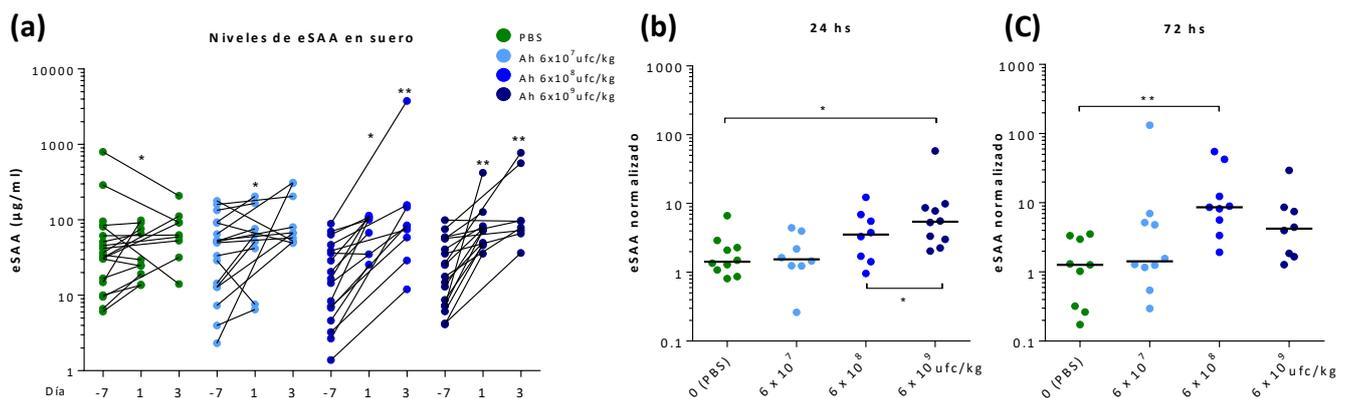


Figura 2.41. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre los niveles de eSAA en suero (experimento 1)

Se analizaron los niveles de eSAA ($\mu\text{g/ml}$) en el suero de esturiones estimulados (vía intraperitoneal) con *A. hydrophila* muerta a una concentración de 6×10^7 ufc/kg (círculos celestes), 6×10^8 ufc/kg (círculos azules), 6×10^9 ufc/kg (círculos azul oscuro) o PBS estéril (círculos verdes) como control de vehículo. Se utilizaron 20 peces mantenidos en 4 piscinas diferentes para cada una de las 4 condiciones, tal como se indica en Materiales y Métodos o Figura 2.20. Se cuantificaron por ELISA los niveles de eSAA al día -7 (nivel basal post-aclimatación, $n=20$) y a las 24 hs y 72 hs post estimulación (a cada tiempo, 10 individuos de cada grupo de peces estimulados con bacterias). Los esturiones de cada grupo fueron individualizados con chip. En (a) se muestra la evolución en los niveles de eSAA ($\mu\text{g/ml}$) correspondiente a los esturiones de cada grupo y cada tiempo. Las líneas indican los valores pareados. Los datos cuya distribución no fue normal, se analizaron con el test no paramétrico de Wilcoxon. Las diferencias significativas en cada grupo respecto al día -7 se indican con * o ** cuando $p < 0.05$ y $p < 0.005$, respectivamente. En (b) y (c) se grafica la variación del nivel de eSAA individual a las 24 hs o 72 hs calculado al normalizar los niveles de eSAA por su correspondiente valor del día -7. Los datos no mostraron distribución normal, por lo cual se indica la mediana de cada grupo con una línea horizontal. Los niveles de eSAA de cada grupo se compararon globalmente con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple de Dunn. Las diferencias significativas entre los grupos se indican con * o ** cuando $p < 0.05$ y $p < 0.005$, respectivamente.

eSAA a las 24 hs (Figura 2.42a) respecto al correspondiente día -7. Por otra parte, a las 72 hs (Figura 2.42b) los niveles de eSAA aumentaron 3.0 veces respecto al día -7. Como en este experimento no fue posible individualizar a los peces y por tanto no se pudieron determinar los valores de eSAA normalizados por el día -7, consideramos importante las comparaciones de los datos a diferentes tiempos dentro de cada grupo mantenido en una piscina, porque esto disminuye el efecto de la dispersión biológica. Por lo tanto, los resultados de este experimento mostraron que la eSAA en suero se induce por la administración de bacterias *A. hydrophila* muertas a una dosis de 6×10^9 ufc/kg. Además, tomados en conjunto, los resultados de los experimentos 1 y 2 son comparables e indican que esta proteína aumenta en suero debido a la administración de *A. hydrophila* muerta. A su vez, globalmente estos resultados concuerdan con los resultados de expresión de la *saa* en hígado observada en ambos experimentos para la dosis de 6×10^9 ufc/kg.

Finalmente, en la Figura 2.43a se muestran los niveles de eSAA del experimento piloto de infección con *A. hydrophila*. Los resultados de este experimento sugieren que los niveles de eSAA a las 72 hs son mayores que los niveles basales y los del grupo control inoculado con PBS. Al normalizar los datos respecto a los correspondientes valores basales (día -14), se observó que los esturiones infectados con *A. hydrophila* presentan niveles de eSAA 35 veces mayores a los del grupo control. Sin embargo, el bajo número de peces impidió analizar la distribución de los datos y emplear test paramétricos. De todas maneras, los resultados sugieren que los niveles séricos de la eSAA

aumentarían en respuesta a la infección con *A. hydrophila* lo cual también concuerda con el posible aumento observado en la expresión hepática de *saa* para este experimento.

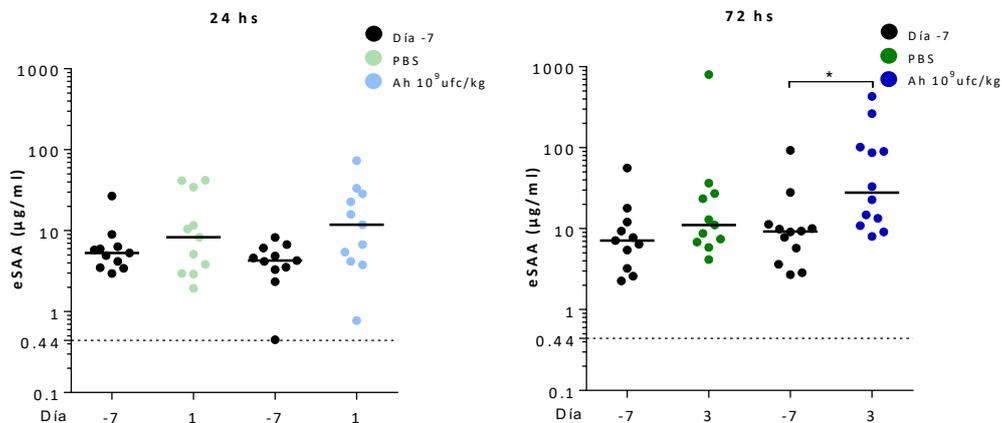


Figura 2.42. Efecto de la estimulación de esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas sobre los niveles de eSAA en suero (experimento 2)

Se analizaron los niveles de eSAA (µg/ml) en suero de esturiones estimulados (vía intraperitoneal) con *A. hydrophila* muerta a una concentración de 6×10^9 ufc/kg (círculos azules) o PBS estéril (círculos verdes) como control de vehículo. Los peces se distribuyeron y aclimataron en 4 piscinas tal como se ilustra en el Figura 2.20, pero en este caso no fue posible individualizarlos. Se cuantificaron por ELISA los niveles de eSAA (µg/ml) al día -7 previo a la estimulación con las bacterias (círculos negros) y a las 24 hs y 72 hs post estimulación. Los datos no mostraron una distribución normal indicándose con una barra la mediana en cada grupo. La línea punteada indica el límite de detección de eSAA por ELISA. Las comparaciones entre todos los grupos de un tiempo de análisis se realizaron con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test múltiple de Dunn. Las diferencias significativas entre los grupos se indican con * cuando $p < 0.05$.

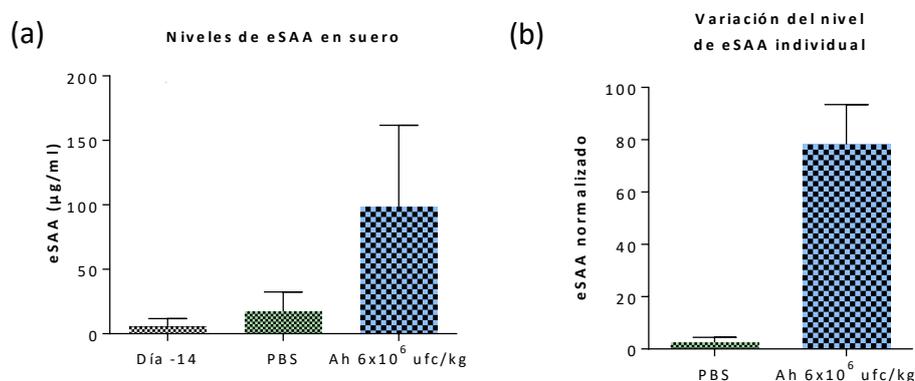


Figura 2.43. Niveles de eSAA en esturiones infectados con *Aeromonas hydrophila* (experimento 3)

Se analizaron los niveles en suero de eSAA (µg/ml) en esturiones aclimatados infectados (vía intraperitoneal) con 7×10^7 ufc/kg de *A. hydrophila* viva o PBS como control de vehículo. Se utilizaron 3 peces por grupo que fue posible individualizar tal como se describe en Materiales y Métodos. En (a) se muestran los niveles de eSAA (µg/ml) en el suero de los esturiones al día -14 previo a la inoculación de las bacterias (negro) y a las 72 hs post infección con *A. hydrophila* (azul) o PBS (verde). Se grafica el valor medio y el desvío estándar para cada uno de los grupos. En (b) se grafica la media y el desvío estándar de la variación del nivel de eSAA individual a las 72 hs calculado al normalizar los niveles de eSAA por su correspondiente valor del día -7. El bajo número de muestras ($n=3$) no permitió analizar la distribución de los datos y aplicar test paramétricos por lo cual no se realizaron análisis estadísticos.

Tomados en conjunto los resultados de los experimentos 1, 2 y 3 mostraron que el ELISA en formato *sandwich* diseñado y optimizado en este trabajo permitió detectar la eSAA en el suero de esturiones rusos. Además, utilizando este inmunoensayo se observó que dicha proteína circula en la sangre en niveles altamente variables en la población de esturiones rusos aún en ausencia de estímulos inflamatorios. A su vez, como se muestra en la Figura Suplementaria 2.S12, los niveles

basales de eSAA en el experimento 1 (mediana: 30.8 µg/ml, rango: 1.4-794.9 µg/ml) fueron mayores que los del experimento 2 (mediana: 5.8 µg/ml, rango: 0.45-92.4 µg/ml), esto puede deberse a diferencias en las condiciones de manipulación (diferente densidad de cultivo, horario luz oscuridad, calidad del agua, etc). A su vez, cuando se estimularon los esturiones con *A. hydrophila* muerta los niveles de eSAA en suero aumentaron (experimento 1 y 2) y este aumento parece depender de la dosis bacteriana utilizada (experimento 1). También, en el marco de un ensayo piloto, se observó que la eSAA parecería aumentar debido a la infección con *A. hydrophila*, apoyando la observación de que la eSAA es una PFA positiva en el esturión ruso. Es importante remarcar que la gran variación en los niveles basales de eSAA en suero y en la magnitud con la que esta proteína se induce frente a estímulos inflamatorios varía notoriamente de pez a pez, lo cual debe ser considerado para su eventual utilización como biomarcador de inflamación/infección.

2.3.3. Correlación entre la expresión de *saa* en hígado y los niveles de eSAA en suero

Para corroborar que la eSAA es efectivamente una PFA en el esturión ruso se estudió si existe o no una correlación entre los niveles de ARNm en hígado y los niveles de proteína en suero desencadenados tanto por la estimulación con bacterias muertas (experimento 1 y 2) como por la infección con *A. hydrophila* (experimento 3) (Figura 2.44). En el experimento 1 se analizaron los niveles de eSAA en suero de todos los peces, pero la expresión de este gen fue estudiada en unos pocos individuos, por lo cual se contó con pocos datos para el análisis de correlación. A pesar de esto se observó una tendencia ($p=0.078$) de correlación positiva entre los niveles de ARNm y proteína correspondientes a la eSAA. Para el experimento 2, en el cual se determinaron los niveles ARNm y proteína para todos los peces, se observó una clara y muy significativa correlación entre ambos parámetros ($p<0.0001$). Finalmente en el estudio piloto de infección con *A. hydrophila*, también se observó correlación significativa ($p=0.0167$) entre los niveles de ARNm y proteína de la eSAA. Estos resultados demuestran que el aumento de la eSAA en suero debido a la estimulación o infección con *A. hydrophila* se asocia con un incremento de la expresión y traducción en el hígado del gen *saa* identificado. Esto permite concluir que en este modelo de estudio la eSAA es una PFA positiva.

2.3.4. Correlación entre los niveles de eSAA en suero y la actividad de la VA del SC, Ceruloplasmina y Lisozima del suero (experimento 1 y 2)

Una vez comprobado que la eSAA es una PFA positiva en el esturión ruso, se estudió si los niveles de esta proteína correlacionan con la actividad de otros componentes del SII como la VA el SC (ACH50), la Ceruloplasmina y la Lisozima, a fin de integrar todos los parámetros humorales estudiados en este trabajo. Para esto se utilizaron los datos obtenidos para los experimentos de estimulación con *A. hydrophila* muerta (experimentos 1 y 2) ya que en éstos fue posible analizar los niveles de los 4 componentes. Como se observa en la Figura 2.45 y 2.46, en ambos experimentos se observó una fuerte y significativa correlación positiva entre los niveles de eSAA y la actividad de la VA del SC y de la Ceruloplasmina ($p<0.0001$ en ambos experimentos). Este resultado concuerda con el hecho de que la eSAA, las proteínas del SC y la Ceruloplasmina son sintetizados mayoritariamente a nivel del hígado en respuesta a señales compartidas (IL1 β , IL6, TNF), por lo cual es lógico que los niveles de estos componentes en cada pez correlacionen. En relación con la Lisozima, también se observó una

correlación positiva entre este componente y la eSAA en el experimento 1, pero no en el experimento 2 (Figura 2.46b y 2.46c). Es posible que este resultado dispar en el caso de la Lisozima, se relacione con el hecho que la actividad Lisozima del suero no está probablemente asociada a la síntesis hepática (sino a la síntesis mediada por células fagocíticas, principalmente macrófagos, neutrófilos⁵⁸), por lo cual la correlación observada sería consecuencia de la respuesta inflamatoria global, la cual podría haber afectado en magnitudes diferentes a distintos órganos/tejidos del esturión ruso.

Finalmente, resultó interesante observar en todos los gráficos de correlación del experimento 1 (Figura 2.41) que los datos correspondientes a los esturiones inoculados con PBS se agruparon por separado de los correspondientes a los peces estimulados con las distintas dosis de *A. hydrophila*, localizándose hacia la porción inferior izquierda y superior derecha del gráfico, respectivamente. Esto está de acuerdo con que la administración de las bacterias muertas indujo claramente la síntesis de estos cuatro componentes y que la magnitud de la respuesta individual de eSAA guardó relación (mucha o poca síntesis) con la del resto de los parámetros analizados, a pesar de la elevada variabilidad biológica que existe en la respuesta entre diferentes esturiones. Este agrupamiento de los datos no es tan claro en los gráficos correspondientes al experimento 2, pero esto podría estar afectado por el hecho de que en este caso no se logró normalizar los datos.

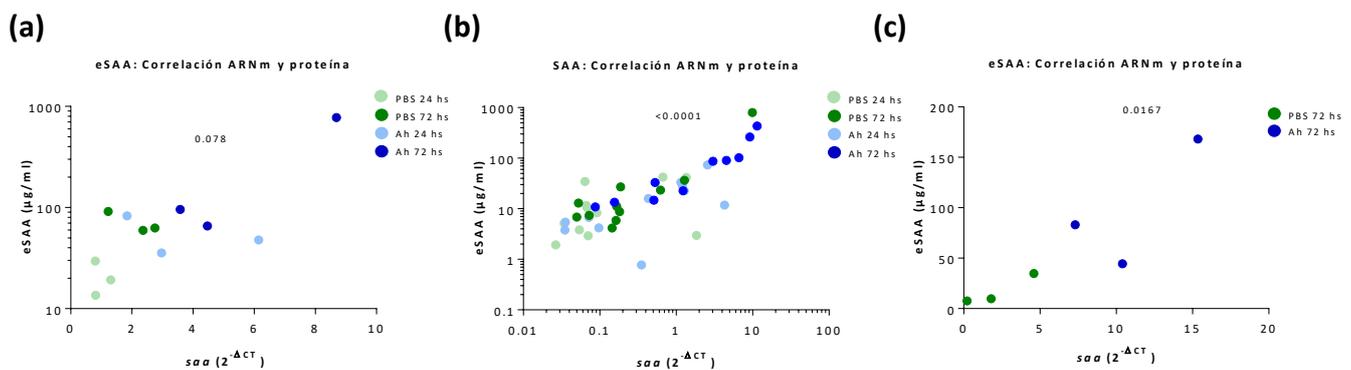


Figura 2.44. Correlación entre la expresión de *saa* en hígado y los niveles séricos de eSAA

Los gráficos muestran la correlación entre los niveles de eSAA ($\mu\text{g/ml}$) en suero determinados por ELISA y los niveles de ARNm de la *saa* en hígado determinados por qPCR y normalizados con actina ($2^{-\Delta\text{CT}}$). El gráfico (a) corresponde al experimento 1 y muestra los datos correspondientes a 12 peces para los cuales se determinó la expresión de *saa* y los niveles de eSAA a las 24 y 72 hs post inoculación con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (círculos azules) o PBS como control de vehículo (círculos verdes). El gráfico (b) corresponde al experimento 2 y muestra los datos de todos los peces para los cuales se determinó la expresión de *saa* y los niveles de eSAA en suero a las 24 hs y 72 hs post-inoculación con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta (círculos azules) o PBS como control de vehículo (círculos verdes). El gráfico (c) corresponde al experimento 3 y muestra los datos de 6 peces en los cuales se determinó la expresión de *saa* y niveles de eSAA a las 72 hs pos-infección con 7×10^7 ufc/kg de *A. hydrophila* (círculos azules) o PBS como control de vehículo (círculos verdes). Todas las gráficas se analizaron con el test de correlación no paramétrica Spearman r. Se indica el valor *p* valor obtenido para cada caso.

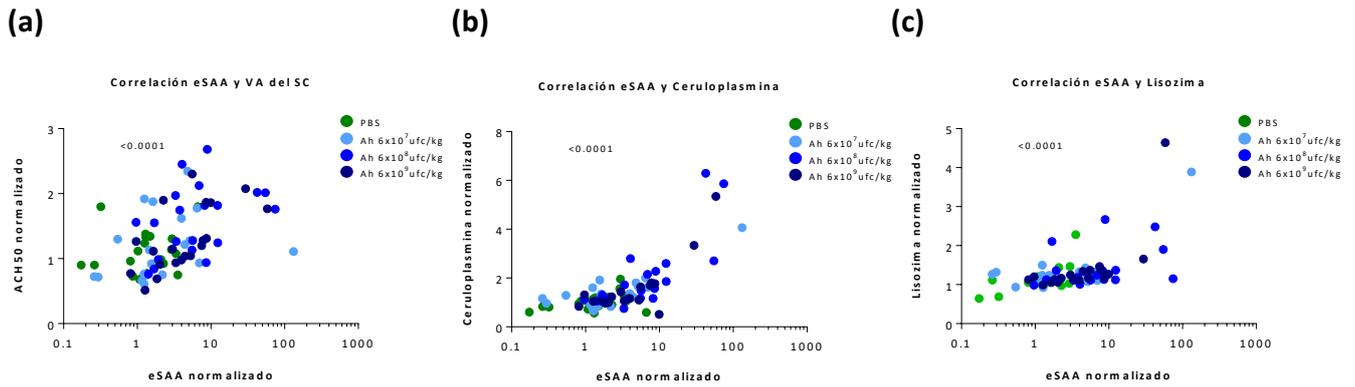


Figura 2.45. Correlación entre los niveles séricos de eSAA vs la VA del SC o la Ceruloplasmina o la Lisozima (experimento 1)

Se muestra en (a) la correlación entre los niveles séricos de eSAA ($\mu\text{g/ml}$) determinados por ELISA y normalizados por su correspondiente valor al día -7 vs la actividad funcional en suero de la VA del SC (ACH50) normalizado por sus respectivo valor al día -7; en (b) la correlación entre los niveles séricos de eSAA normalizados por su correspondiente valor al día -7 vs la actividad Ceruloplasmina (U/ml) del suero normalizada por sus respectivo valor al día -7, y en (c) la correlación entre los niveles séricos de eSAA normalizados por su correspondiente valor al día -7 vs la concentración de Lisozima ($\mu\text{g/ml}$) en suero normalizada por sus respectivo valor al día -7, correspondientes al experimento 1 realizado en la granja ERN. En todos los gráficos se representan los valores correspondientes a los dos tiempos de análisis (24 hs y 72 hs post-inoculación, no diferenciados) y se utilizan círculos en verde para el control (inyección de PBS) o en celeste, azul o azul oscuro para indicar la dosis de las bacterias muertas utilizada, según se indica en el gráfico. Todas las gráficas se analizaron con el test de correlación no paramétrica Spearman r. Se indica el valor p valor obtenido para cada caso.

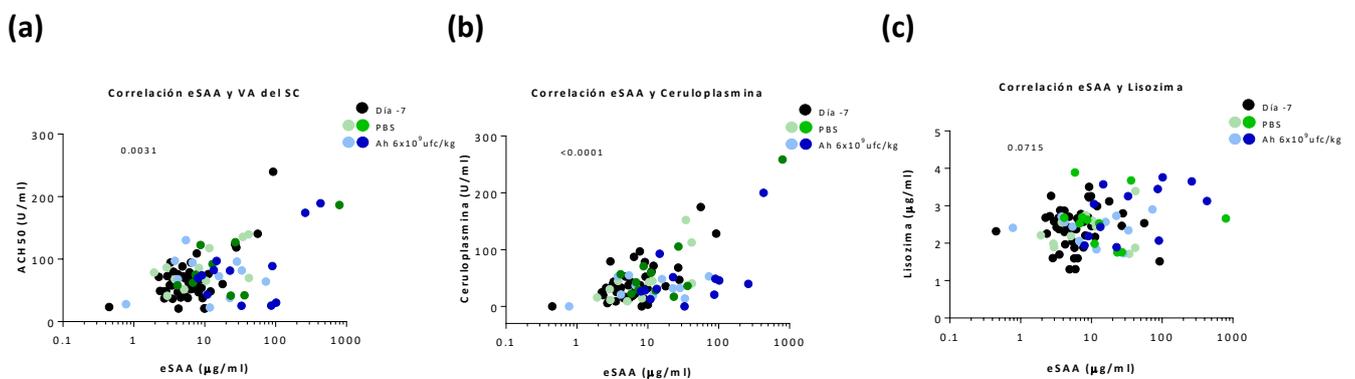


Figura 2.46. Correlación entre los niveles séricos de eSAA vs la VA del SC o la Ceruloplasmina o la Lisozima (experimento 2)

Se muestra en (a) la correlación entre los niveles séricos de eSAA ($\mu\text{g/ml}$) determinados por ELISA vs la actividad funcional en suero de la VA del SC (ACH50), en (b) la correlación entre los niveles séricos de eSAA vs la actividad Ceruloplasmina del suero (U/ml), en (c) la correlación entre los niveles séricos de eSAA vs la concentración de Lisozima en suero ($\mu\text{g/ml}$) correspondientes al experimento 2. En todos los gráficos se representan con círculos negros los valores basales (día -7 previo a la estimulación), con círculos verdes los valores correspondientes a los controles inyectados con PBS a las 24hs (tono claro) o 72hs (tono oscuro) post-inoculación, y con círculos en azul los valores correspondientes a la estimulación con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila* muerta a las 24 hs (tono claro) o 72 hs (tono oscuro) post-inoculación. Todas las gráficas se analizaron con el test de correlación no paramétrica Spearman r. Se indica el valor p valor obtenido para cada caso.

3. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

3.1. Discusión

La hipótesis planteada en este trabajo fue que en el esturión existen proteínas homólogas a las PFA identificadas en teleósteos y que éstas se comportan en forma similar, expresándose en el hígado en el marco de una respuesta de fase aguda. Más aún, se espera que algunas de las proteínas codificadas por estos genes, aunque no necesariamente las mismas que en los teleósteos, fueran PFA positivas mayores, es decir que sus niveles en sangre aumentaran más de 10 veces en respuesta a estímulos inflamatorios. Estas PFA mayores podrían ser útiles como biomarcadores inflamatorios y contribuir por tanto al monitoreo del estado sanitario de esturiones criados en granjas de acuicultura. De esta manera, la hipótesis planteada introduce las siguientes 3 interrogantes: ¿Existen en el esturión los genes codificantes de homólogos de las PFA identificadas en teleósteos?, ¿Se induce la expresión de estos genes en hígado en respuesta a estímulos inflamatorios? ¿Los genes que más se induzcan en hígado darán lugar a un aumento en los niveles de estas PFA en sangre respecto a las condiciones basales? A continuación, se discuten los resultados de esta tesis en el marco de cada una de las preguntas planteadas.

3.1.1. Identificación en el esturión de genes codificantes de homólogos de PFA de teleósteos

Con respecto a la primera interrogante, se planteó que en el esturión deberían existir genes codificantes homólogos a PFAs de teleósteos ya que estas proteínas se encuentran ampliamente conservadas en la evolución y se han identificado en teleósteos, los cuales junto a los esturiones integran el clado Actinopterygii (Figura 1.2). Al comienzo de este trabajo y en la actualidad, no se ha reportado ninguna secuencia en el esturión con homología a PFA en las bases de datos públicas que recopilan información de secuencias (GenBank, EMBL o DDBJ), y tampoco existen trabajos en donde estas proteínas hayan sido el foco de estudio. Por lo tanto, para abordar esta primera interrogante se analizaron 3 transcriptomas, 2 de esturión chino y 1 de esturión siberiano con el objetivo de identificar posibles genes homólogos a las PFA de peces teleósteos^{19,21,27,192}. Esto fue posible gracias a que en los últimos años se han secuenciado transcriptomas de múltiples órganos en varias especies de esturión y algunos de estos datos son públicos. Estos análisis permitieron encontrar transcritos de 7 posibles homólogos de PFA en ambas especies de esturión (SAA, CRP/SAP WAP65/HPX, Hecpídina, Intelectina, Transferrina y Haptoglobina), los cuales han sido reportados como PFA positivas o negativas en peces teleósteos. Al alinear las secuencias de las posibles PFA de esturiones y teleósteos (en algunos casos se incluyeron las secuencias de humano y ratón) se constató que estas proteínas están muy conservadas en todos los peces, incluido el esturión. Además, en dichas secuencias se identificaron dominios proteicos que caracterizan a cada una de las PFA. Todo esto permitió verificar la identidad de las secuencias encontradas en los transcriptomas y corroborar que los esturiones efectivamente poseen genes homólogos a varias PFA de teleósteos. Es importante mencionar que se identificó un único transcripto por PFA tanto para el esturión chino como para el siberiano debido a que los datos de transcriptómica analizados contienen únicamente el transcripto más largo de cada gen y no incluyen variantes de *splicing* alternativo de menor tamaño o isoformas de genes parálogos.

Sin embargo, se sabe que algunas PFA de teleósteos presentan múltiples copias en el genoma, lo cual también es factible que ocurra en el esturión. Por otra parte, resultó interesante que a pesar de que los esturiones chino y siberiano divergieron hace 121 millones de años (Figura 1.3), las secuencias identificadas fueron prácticamente idénticas en ambas especies (95-97% de identidad de secuencia a nivel nucleotídico), probablemente porque estas proteínas están muy conservadas en la evolución (desde mamíferos hasta la lamprea) y debido a que los esturiones presentan una tasa de evolución molecular lenta⁷. Como el último ancestro común entre el esturión siberiano y el esturión ruso, foco de estudio de esta tesis, ocurrió hace 24 millones de años (Figura 1.3), nos planteamos que las secuencias identificadas anteriormente también deberían existir en esta especie de esturión. La elevada identidad de secuencia entre el esturión chino y siberiano facilitó diseñar cebadores que permitieron obtener la secuencia de 6 potenciales PFA de esturión ruso: SAA, CRP/SAP WAP65/HPX, Hecidina, Intelectina y Transferrina (Figuras 2.10-2.15)

3.1.2. Estudio de la expresión hepática de genes candidatos a PFA en respuesta a estímulos inflamatorios o a la infección con bacterias

Como segunda interrogante se planteó si alguno de los genes de estas potenciales PFA de esturión ruso se podría inducir en hígado en respuesta a estímulos inflamatorios. Para abordar esta segunda pregunta, se ajustó una metodología de qPCR que permitió estudiar la expresión hepática de las posibles PFA del esturión ruso, utilizando como modelo de infección o inflamación la inoculación vía intraperitoneal de bacterias *A. hydrophila* vivas o muertas, respectivamente. Se eligió trabajar con este modelo por dos grandes razones. En primer lugar, se han aislado varias cepas patógenas de *A. hydrophila* en esturiones rusos criados en ERN, lo cual sugiere que esta bacteria podría ser uno de los microorganismos responsables de la mortalidad observada en la granja durante el verano. En segundo lugar, la administración por vía intraperitoneal de *A. hydrophila* muerta o viva ha sido utilizada con éxito como modelo de infección/inflamación en muchísimos peces teleósteos y en 3 especies de esturión y un híbrido de esturión (punto 1.7). A tales efectos, se realizaron 2 experimentos independientes, uno en la granja ERN (experimento 1) y otro en las instalaciones del IIP (experimento 2) en los cuales se estudió la expresión hepática de las posibles PFA a las 24 hs y 72 hs post-inoculación. En el experimento 1 (Figura 2.29) la administración de las bacterias muertas parecería inducir a las 72 hs un aumento de 4.5 veces en la expresión de la *saa* respecto al control. Sin embargo, la imposibilidad de realizar análisis estadísticos (n=3) llevó a realizar un segundo experimento (Figura 2.30) con un mayor número de peces (n=11) en donde se constató que la administración de las bacterias muertas induce un aumento de 9.7 veces en la expresión hepática de la *saa* respecto al grupo control. El resto de los genes estudiados prácticamente no modificó su expresión por la administración de las bacterias. Para apoyar los resultados obtenidos anteriormente, se realizó un experimento piloto de infección en las instalaciones del IIP (experimento 3). Se infectaron vía intraperitoneal un número reducido de esturiones rusos (n=3) con *A. hydrophila* y a las 72 hs post-infección se observó que la *saa* se parecería inducirse unas 5.7 veces respecto al control (el bajo número de peces impidió realizar análisis estadísticos). Por lo tanto, los resultados de los experimentos 1, 2 y 3 sugieren que, al menos en las condiciones experimentales estudiadas en este trabajo, la expresión de *saa* en hígado se induce por la estimulación o infección intraperitoneal con la bacteria *A. hydrophila*. Estos resultados indicaron que la SAA probablemente podría comportarse como una PFA positiva en el esturión ruso. Esta información es novedosa porque no existen en la literatura datos disponibles sobre la expresión hepática de *saa* en condiciones de infección o inflamación en ninguna especie de esturión. En el

transcriptoma de hígado de esturión amur (*A. schrenckii*) infectado con *Y. ruckeri* (dosis 1×10^8 ufc/kg de pez) los investigadores no reportan expresión diferencial de la *saa*. En este trabajo los autores observaron 1112 genes expresados de manera diferencial (468 aumentaron y 644 disminuyeron su expresión), pero sólo muestran datos de 63 genes. Por lo tanto, la *saa* podría ser uno de los restantes 405 genes inducidos (la lista de genes expresados diferencialmente no es pública). Respecto a la expresión de *saa* en otros órganos, observamos que, en condiciones basales la *saa* del esturión ruso se expresa en riñón anterior, bazo, cerebro y branquias, siendo la expresión en estos órganos unas 1000 veces menor a la observada en hígado. En esta línea, en el transcriptoma de bazo de esturión amur (*A. schrenckii*) infectado con *Y. ruckeri*, la expresión de *saa* disminuyó 500 veces respecto al control (datos suplementarios de este artículo)²⁶. Esta respuesta en bazo no se contrapone con el aumento de la expresión hepática de *saa* observada en este trabajo ya que se trata de especies y órganos diferentes. Más aún la disminución en la expresión de *saa* en bazo probablemente no repercute en los niveles circulantes de eSAA ya que de acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis (Figura 2.33) el hígado es el principal órgano donde este gen se expresa en el esturión ruso (en condiciones basales y probablemente también frente a estímulos inflamatorios). Existen otras dos publicaciones que analizan la expresión diferencial en un modelo de infección con *A. hydrophila* en bazo en el esturión híbrido (*H. huso* x *A. schrenckii*) y en riñón anterior en el esturión dabry (*A. dabryanus*), pero la lista de genes modulados no está disponible.

Los resultados de esta tesis apuntan a que, de los genes estudiados, la *saa* es el mejor reportero del estado inflamatorio en el esturión ruso. Sin embargo, nos llamó la atención que el nivel de inducción observado fue sensiblemente menor (4.5 - 9.7 veces) al reportado para otros peces teleósteos (1000-10000 veces). Además, este gen fue el único cuya expresión mostró un cambio significativo en respuesta a la estimulación con bacterias muertas, lo cual sugeriría que los otros genes candidatos estudiados no se comportan como PFA positivas en el esturión ruso. Sin embargo, estos resultados deben de ser interpretados con cuidado. Por un lado, es relevante comentar que la cuantificación de la expresión génica dejó afuera posibles variantes de *splicing* o genes parálogos que podrían existir para las posibles PFA del esturión ruso analizadas en este trabajo. Esto se debe a que en los transcriptomas se identificó un único transcripto para cada homólogo de PFA. Por tanto, y dado que en el genoma de teleósteos los genes de algunas PFA existen en múltiples copias, no se puede descartar que existan variantes no evaluadas en este estudio cuya expresión se induzca frente a estímulos inflamatorios. Por otra parte, existieron varias limitaciones con los modelos de estimulación e infección utilizados. Por un lado, la gran variabilidad biológica observada en los modelos influyó en la potencia de los análisis estadísticos, volviendo necesario trabajar con un elevado número de peces por grupo de análisis para obtener resultados concluyentes. Por otro lado, la respuesta inflamatoria en los ensayos de estimulación podría no haber sido suficientemente robusta. Esta afirmación se basa en que no se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de *il1-b* en hígado y bazo, que fueron los órganos que pudimos coleccionar y analizar. Considerando que la IL1 β sería sintetizada por células innatas del sitio inflamatorio y/o en aquellos órganos linfoides a los que pudieran llegar las bacterias inoculadas, hubiera sido importante coleccionar y cuantificar la expresión de estas citoquinas en células del peritoneo y en el riñón anterior. Lamentablemente, al tiempo en que se realizaron estos ensayos no habíamos ajustado la técnica de lavado peritoneal y tuvimos dificultades para reconocer el riñón anterior. Corresponde también mencionar que en los transcriptomas que fue posible analizar al comienzo de este trabajo no se logró identificar los genes de la IL6 y el TNF α . Sin embargo, estudios más recientes han identificado IL6 en esturión híbrido (*H. dauricus* x *A. schrenckii*)¹⁶⁶. Como esta citoquina está fuertemente involucrada en el disparo de la respuesta de fase aguda sería importante

profundizar en el análisis de su expresión en los modelos de inflamación/infección (punto 1.6). Por otro lado, el análisis de las actividades de la VA del SC, la Ceruloplasmina y la Lisozima en suero (únicos marcadores que podíamos medir en el suero de esturión) no reflejaron el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria intensa ya que estos aumentaron marginalmente (experimento 1, Figura 2.21-2.23) o no lo hicieron (experimento 2, Figura 2.25-2.27)

Como ya se comentó en la Introducción, varios componentes del SC y la Ceruloplasmina son PFA positivas en teleósteos, aunque modestas, por lo cual resultó lógico esperar que una inflamación robusta hubiera generado aumentos significativos, aunque de baja intensidad, en algunos de estos marcadores. Respecto a la actividad Lisozima, también se hubiera esperado un aumento ya que ésta se induce en teleósteos infectados con *A. hydrophila* (puntos 1.5, 1.6)

De acuerdo con lo anterior, es lógico cuestionarnos por qué los estímulos usados en nuestros modelos no ocasionaron respuestas más intensas. Esto implica analizar qué bacteria, dosis y vía de inoculación fueron utilizadas. En los ensayos de estimulación utilizamos varias dosis de *A. hydrophila*, cubriendo un rango de 3 órdenes de magnitud (experimento 1) y llegando a valores que son 2 órdenes de magnitud superiores a los utilizados en la infección (experimento 3), pero no se observó un claro efecto dosis respuesta en los marcadores séricos que se evaluaron. A su vez, a la mayor dosis el análisis de la expresión hepática de las candidatas a PFA sólo mostró resultados positivos en el caso del gen *saa* (experimentos 1 y 2). Respecto al uso de bacterias autoclavadas como estímulo, podemos cuestionarnos si el método de muerte de las bacterias afectó fuertemente la integridad estructural de sus componentes. Se eligió matar a las bacterias mediante un autoclavado corto (10 minutos), que de acuerdo a la bibliografía es un tiempo que no debería provocar una degradación importante de los componentes de la pared bacteriana¹⁹³. De esta manera se estimó que gran parte de los PAMPs se habrían conservado durante el proceso de autoclavado. Respecto al uso de *A. hydrophila*, varios trabajos en otras especies de esturión han utilizado esta bacteria logrando detectar respuestas inflamatorias significativas en modelos de infección. La infección intraperitoneal con *A. hydrophila* (dosis 2×10^6 ufc/kg por pez) en esturiones dabry (*A. dabryanus*) indujo un aumento de 4.6 veces en la expresión de *il1-b* en riñón anterior y en esturiones híbridos (*H. dauricus* x *A. schrenckii*) un aumento de 28 y 59 veces en la expresión de *il1-b* e *il6* en bazo^{24,166}. A su vez, en ambos artículos se observó un fuerte aumento en la expresión de los genes de varios PRRs (principalmente TLRs), lamentablemente en ninguno de estos trabajos está disponible la lista completa de los genes expresados diferencialmente. Por otra parte, el uso de otras bacterias para infectar esturiones no ha logrado inducir respuestas inflamatorias más potentes, al menos si comparamos los resultados anteriores con los reportados en la infección del esturión amur (*A. schrenckii*) con *Y. ruckeri*. En estos trabajos, estudios transcriptómicos enfocados al análisis de la expresión diferencial en bazo e hígado, no observaron cambios en la expresión de *il1-b* e *il6* en ninguno de estos órganos^{8,9}. Lógicamente, es posible que el uso de otras especies bacterianas más virulentas pueda ser útil para lograr una estimulación o infección de mayor intensidad.

A pesar de que no se puede descartar que la intensidad de la respuesta observada se deba a que los esturiones rusos tienen un comportamiento diferente a peces teleósteos y mamíferos, los resultados de este trabajo (bajo inducción hepática de *saa*, nula inducción de *il1-b* en hígado y bazo, marginal o nulo aumento en la actividad funcional de la VA del SC, Ceruloplasmina y Lisozima en suero) sugieren que el modelo utilizado no desencadenó una respuesta inflamatoria robusta. Por lo tanto, es necesario mejorar el modelo, lo cual a su vez plantea las siguientes interrogantes: ¿es posible que algunos de los demás genes estudiados en este trabajo, cuya expresión no se vio modificada por la administración de las bacterias, se comporten como PFA positiva?, ¿podría ocurrir que la *saa* se

induzca aún más de lo que se observó en este trabajo? Esto último aumentaría el potencial de *saa* como biomarcador de inflamatorio.

3.1.3. Evaluación de los niveles séricos de eSAA en respuesta a estímulos inflamatorios o a la infección con bacterias

La tercera pregunta que nos planteamos fue si el aumento de expresión de *saa* en hígado se traduciría en un aumento de esta proteína en sangre y a su vez si está podría ser un eventual biomarcador de infección/inflamación. Para abordar esta pregunta se buscó desarrollar un inmunoensayo de tipo ELISA en formato *sandwich* que permitiera cuantificar los niveles de eSAA en suero. Se diseñó un ELISA que utilizó anticuerpos policlonales que reconocen epítopes diferentes de la eSAA para la captura de la proteína del suero (anti-p58-eSAA) y su posterior detección (anti-p88-eSAA biotinilado). Además, se expresó y purificó la eSAAr, la cual fue utilizada como estándar para estimar la concentración de eSAA en las muestras problema. En el marco de esta tesis nos propusimos que el ELISA diseñado debería contar con una sensibilidad adecuada que permitiera evaluar posibles diferencias en los niveles de eSAA entre esturiones rusos estimulados o infectados con bacterias y los correspondientes peces control. Pudimos verificar que el ensayo diseñado tiene muy buena sensibilidad, permitiendo detectar 2.2 ng/ml de eSAAr en una solución salina. Sin embargo, dado que no contábamos con sueros de esturiones rusos carentes de eSAA, no se logró determinar con exactitud la mínima concentración de eSAA que se podría detectar en dichas muestras con este ELISA. Como se explicó en resultados, en las condiciones ensayadas, donde las muestras de suero se analizaron a una dilución 1/200, fue posible estimar el límite de detección en 0.44 µg/ml. Esta sensibilidad fue adecuada para cuantificar la eSAA en los experimentos de estimulación e infección con bacterias. Con el objetivo de establecer con mayor exactitud el límite de detección del ELISA para la eSAA, es necesario ensayar sueros carentes de eSAA y suplementados con concentraciones conocidas de eSAAr. Para obtener un suero de esturión ruso depletado de eSAA, se podría realizar una cromatografía de inmunoafinidad utilizando una matriz acoplada a anticuerpos policlonales anti-eSAAr. También corresponde mencionar que disponer de un suero depletado de eSAA permitirá revisar la dilución de uso del suero en el ensayo, ya que el efecto matriz determinado podría en parte deberse a la presencia de trazas de eSAA que no fueron detectadas en el suero por *Western Blot*. Más aún, contar con un suero depletado en eSAA permitiría realizar la curva estándar del ensayo en suero, en vez de en solución salina.

Utilizando este inmunoensayo se analizaron las muestras de suero de los esturiones rusos estimulados (experimento 1 y 2) o infectados (experimento 3) con *A. hydrophila* observando que la administración de las bacterias indujo un aumento en los niveles de eSAA con una gran variación entre individuos (Figuras 2.41-2.43). Cabe destacar que en el caso de la infección este aumento parecería ser del orden de 35 veces respecto al grupo control. A su vez, en los experimentos realizados en este trabajo se observó que existe una correlación positiva entre la expresión hepática de *saa* y los niveles de eSAA en suero. Teniendo en cuenta que, en el esturión ruso, el hígado es el órgano en donde se encontró mayor expresión de *saa*, la correlación observada indicaría que, al igual que en mamíferos, el aumento en los niveles de eSAA circulante en plasma durante una fase aguda se debe a un incremento en la síntesis hepática de esta proteína.

El notorio aumento en los niveles séricos de eSAA por la infección indica que esta proteína se comporta como una PFA positiva mayor y podría ser un potencial marcador de inflamación/infección en los esturiones rusos. Resulta importante resaltar que este resultado no sólo es novedoso, sino que

se deduce de la correlación positiva entre los dos parámetros analizados: la expresión hepática de *saa* y los niveles en suero de SAA (Figura 2.44). No existen en la literatura sobre actinopterigios ningún estudio que examine esta correlación. Más aún, la mayoría de la información disponible sobre SAA en peces teleosteos refiere a estudios a nivel de expresión hepática (punto 1.6) Además, los pocos trabajos que analizan a nivel proteico la presencia de SAA en hígado o plasma en modelos de infección han reportado resultados contradictorios. Por un lado, mediante el análisis del proteoma de hígado del lenguado oliva (*P. Olivaceus*) no se encontró inducción de SAA a las 24 hs post-infección con *E. tarda* (dosis 3.6×10^7 ufc/kg por pez, vía intraperitoneal)¹⁴⁸. Asimismo, utilizando métodos proteómicos, tampoco se observó aumento en los niveles de SAA en hígado de truchas arcoíris (*O. makiss*) infectadas con *A. salmonicida* (dosis 5×10^5 ufc/kg por pez, vía intraperitoneal) a las 48 hs post-infección (datos suplementarios del artículo)^{81,194}. En el mismo sentido, usando métodos proteómicos¹⁹⁵ o *Western Blot*¹⁹⁶ no se detectó la SAA en el plasma de trucha arcoíris estimuladas con LPS o infectadas con *Flavobacterium psychrophilum*. En contraste, otros trabajos han detectado mediante inmunohistoquímica la presencia de niveles aumentados de SAA en el hígado de trucha arcoíris infectada con *Y. ruckeri*¹⁸³, estimuladas con LPS¹⁹⁶ o infectadas con *F. psychrophilum*¹⁹⁶. Estos últimos trabajos concuerdan con el hecho que la infección en este mismo pez con *A. salmonicida* (vía intramuscular dosis 2.5×10^4 ufc/kg por pez) induce la expresión hepática de *saa* a las 48 hs post-infección y luego de 120 hs los transcritos de *saa* llegan a constituir el 10% del ARN mensajero total del hígado¹⁰³. En este escenario, es posible que los resultados negativos observados por métodos proteómicos y por *Western Blot* se deban a limitaciones técnicas. En el caso de los estudios proteómicos, el procesamiento de muestras complejas (extractos de tejido o plasma) implica generalmente pasos de fraccionamiento de la muestra previos al análisis con el fin de separar proteínas abundantes que normalmente impiden la detección de otras menos representadas. Por tanto, no puede descartarse que en dichos estudios se hayan perdido la SAA durante los pasos de preparación de la muestra, ya que el objetivo de estos trabajos fue realizar una caracterización general del proteoma y no se optimizó la técnica buscando detectar PFA, en particular la SAA. En cuanto a la detección de la SAA del plasma por *Western Blot*, el resultado negativo observado en truchas podría deberse a un impedimento de la reacción del anticuerpo provocado por la interacción de la SAA con lípidos de la HDL; en este sentido se reportó que la delipidación de la SAA recombinante mejora su detección por *Western Blot*¹⁸³. De todas formas, este resultado negativo (que no es mostrado por los autores del artículo) no es fácil de explicar ya que en nuestro trabajo se obtuvieron dos anticuerpos policlonales, contra los péptidos p58-eSAA y p88-eSAA, que reconocieron en forma específica tanto a la eSAAr como a la eSAA del suero de esturiones rusos, y no fue necesario delipidar las muestras. Más aún, utilizando ambos anticuerpos, fue posible ajustar un ELISA que permite cuantificar la eSAAr y la eSAA del suero, lo cual comprueba que ambos anticuerpos reconocen efectivamente a la misma proteína. Por lo tanto, en este trabajo se logró detectar y cuantificar la eSAA en el suero de esturiones rusos y constatar que los niveles circulantes de esta proteína aumentan por estímulos inflamatorios, de esta manera se demuestra por primera vez que la SAA es una PFA positiva en peces actinopterigios.

Respecto al uso de la eSAA como un marcador inflamatorio, se debe tener en cuenta que se observó una gran variabilidad en los niveles basales de eSAA y también en la inducción frente a estímulos inflamatorios. En cuanto a los niveles basales, se observó que los esturiones aclimatados en el laboratorio de ERN presentaron niveles de eSAA significativamente mayores que los esturiones aclimatados en el laboratorio del IIP (ERN: mediana=34.1 rango=2.3-794.9 $\mu\text{g/ml}$; IIP: mediana=6.4 rango=2.3-92.4 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Estas diferencias podrían deberse a condiciones disímiles de

cultivo que hayan generado una respuesta de estrés en los peces. El estrés es una respuesta fisiológica adaptativa de los organismos, que se desencadena para hacer frente a cambios del ambiente (agente estresor) que alteran la homeostasis de los mismos¹⁹⁷. En la acuicultura los peces están sometidos a múltiples agentes estresores como la temperatura del agua, la densidad de cultivo, la presencia de compuestos tóxicos, bajas densidades de oxígeno disuelto en agua, entre otros¹⁹⁸. A pesar de que la respuesta de estrés es generalmente beneficiosa y en el corto plazo puede potenciar la respuesta inmune, cuando el agente estresor persiste en el tiempo, los cambios fisiológicos que estos gatillan en el organismo pueden volverse perjudiciales para los peces produciendo alteraciones metabólicas, cambios en la regulación osmótica, supresión del sistema inmune, mayor susceptibilidad a patógenos y alteraciones en el comportamiento, crecimiento y desarrollo de los mismos^{163,199}. Por lo tanto, las diferencias observadas en los valores basales pueden deberse a que se utilizaron diferentes densidades de cultivo (33.3 kg/m³ vs 7.8 kg/m³ en el experimento 1 y 2, respectivamente) en ambos experimentos. El efecto de la densidad de cultivo sobre el funcionamiento del sistema inmune de los peces y su capacidad de responder ante patógenos dependerá de cuan elevada sea esta, del tiempo y de la especie en cuestión, entre otras¹⁶³. En carpa mantenidas a una densidad cercana a 30 kg/m³ los niveles basales de varios componentes del SII innato disminuyeron luego de 30 días²⁰⁰. Sin embargo, en otros peces mantenidos a similares de densidad de cultivo durante dos semanas se indujo la expresión hepática de varios componentes del complemento²⁰¹. Por lo tanto, se podría plantear que la densidad de cultivo del experimento 1 podría inducir en el esturión ruso la expresión y síntesis de eSAA. Esta hipótesis encuentra apoyo en observaciones realizadas en teleosteos, donde se constató que algunos factores de estrés inducen la expresión hepática de este gen²⁰². No obstante, existen muchos reportes que muestran que la administración de cortisol (uno de los principales mediadores generados rápidamente en respuesta al estrés) inhibieron la expresión de citoquinas y PFA, incluyendo la SAA²⁰³, lo cual se contrapone a la hipótesis planteada. Más aún, estudios realizados en el marco de la tesis de grado de Licenciatura en Bioquímica del Lic Marcio Aversa sugieren que el estrés crónico inducido por calor provocaría un descenso en los niveles séricos de eSAA²⁰⁴. Por lo tanto, es necesario profundizar en el análisis de los niveles basales de SAA en esturiones sanos y como se ven afectados por variaciones en factores ambientales o introducidos por las condiciones de cría.

Por otro parte, en cuanto a la magnitud de la respuesta observada frente a la estimulación o infección con *A. hydrophila*, ésta varió entre 2.8-35 veces respecto al control, cubriendo un rango de concentraciones entre 2 y 3700 µg/ml, que indudablemente refleja una enorme variación individual. La variación individual observada tanto en los niveles basales como en la respuesta a la estimulación podría dificultar el establecimiento de niveles de SAA (rangos) correspondientes a esturiones sanos y enfermos, limitando su utilización como biomarcador inflamatorio. En función de lo anterior, resultará importante en el futuro realizar un análisis a partir de un gran número de muestras de individuos sanos e infectados que permitan establecer con mayor confianza los niveles de eSAA en condiciones de salud e infección. Más aún estos niveles serán válidos solamente en las condiciones de aclimatación estudiadas, y podrían variar con factores ambientales como la temperatura o la densidad de cultivo.

3.2. Perspectivas

La cría de esturiones es un incipiente sector de gran potencial para la matriz productiva de nuestro país. Sin embargo, la acuicultura como actividad intensiva, presenta problemáticas que desafían su desarrollo tanto en nuestro país como en el mundo. En este sentido, en la principal granja

de cría de esturiones del Uruguay (ERN), durante los meses cálidos del año ocurre un aumento en las infecciones y en la mortalidad de los peces debido, en parte, a que las altas temperaturas del agua afectan el crecimiento y deterioran el sistema inmune innato de los esturiones. Con el fin de contribuir a solucionar esta problemática, en esta tesis de maestría en Biotecnología se buscó identificar posibles marcadores de infección que contribuyan a evaluar la salud de los esturiones. Con este objetivo en mente, y gracias al desarrollo de un ELISA, se identificó que los niveles en suero de la eSAA aumentan en los esturiones estimulados o infectados con bacterias. De esta manera la eSAA es un posible marcador de infección que puede ser cuantificado en el suero por inmunoensayos y, por lo tanto, en caso de ser validado, tendrá gran utilidad para el monitoreo de la salud de los peces y la detección en forma temprana de procesos infecciosos. En este marco, este trabajo de maestría en biotecnología plantea las siguientes perspectivas:

3.2.1. Validar la eSAA como biomarcador de infección para su utilización en el monitoreo sanitario de los esturiones criados en granjas de piscicultura

Para validar la utilidad de la eSAA como biomarcador en primer lugar se deberá ajustar un buen modelo de infección ya que esto fue una limitante del trabajo y nos llevó a utilizar un modelo de estimulación con bacterias *A. hydrophila* muertas. Esto se debió a que carecíamos de la infraestructura necesaria para realizar este tipo de ensayo y no se contaba con experiencia previa sobre modelos de infección. Afortunadamente en los últimos años gracias a fondos del grupo y a la colaboración con el Dr. Vet. Alejandro Perretta acondicionamos un laboratorio de experimentación en el IIP de Montevideo que permite realizar este tipo de experimentos. A fin de ajustar el modelo de infección se ensayarán distintas dosis de *A. hydrophila* (por vía intraperitoneal, 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 ufc/kg) y se determinará la dosis óptima de bacterias estudiando la respuesta inmune local y sistémica desencadenada por la infección a varios tiempos (24, 48, 72 y 96 hs). Se aspira a utilizar la dosis más alta que no produzca una alta mortalidad en las 96hs post-infección.

Para evaluar la respuesta inmune local desencadenada por la infección se podría estudiar si ocurre reclutamiento de células del SII a la cavidad peritoneal. En ensayos preliminares del grupo, se lograron realizar con éxito lavados peritoneales y analizar las poblaciones celulares en peritoneo por citometría de flujo en términos de tamaño y granularidad celular. Además, se podría complementar la caracterización histológica de las poblaciones peritoneales con la colaboración con el Dr. Perretta, quién cuenta con experiencia en histología y citología de esturión. No existen aún anticuerpos comerciales de detección de marcadores fenotípicos que permitan distinguir las células del SII de esturión, y los anticuerpos desarrollados para teleosteos generalmente son incompatibles entre diferentes especies de peces (comentario de la Dra. Mónica Imarai, departamento de Biología de la USACH). Para distinguir poblaciones celulares por sus marcadores fenotípicos, se podría utilizar la metodología de fluorescencia por hibridización de sondas acoplado a citometría de flujo (*FISH-flow cytometry*, por sus siglas en inglés) que permite cuantificar los ARNm que expresa una determinada célula mediante el uso de sondas fluorescentes complementarias a estos²⁰⁵. Por otra parte, mediante qPCR se podría cuantificar las citoquinas pro-inflamatorias *il1-b* e *il6* (recientemente identificada en un esturión híbrido¹⁶⁶) expresadas por las células reclutadas en la cavidad peritoneal.

Para evaluar la respuesta inmune sistémica desencadenada por la infección utilizaría las metodologías desarrolladas por nuestro grupo de investigación, evaluando en hígado la expresión hepática de los homólogos a PFA (en particular *saa*) y en suero los niveles de eSAA, actividad de la VA del SC y la actividad Ceruloplasmina y Lisozima. También se podría analizar si la infección genera

cambios en las poblaciones de leucocitos circulantes observando al microscopio frotis de una muestra de sangre²⁰⁶. Además analizaría a los esturiones en búsqueda de síntomas típicos de infección (hemorragia ocular, aletas y ano enrojecidos, hemorragias internas o externas)²⁰⁷ y buscaría aislar *A. hydrophila* de la sangre y diferentes órganos para evidenciar la diseminación de las bacterias por el organismo lo que indica que la infección se volvió sistémica²⁰⁷.

Por otro lado, en un futuro sería interesante contar con un modelo de infección de *A. hydrophila* por inmersión, en el cual los peces son sumergidos en agua previamente inoculada con la bacteria. Este modelo reflejaría de forma más fidedigna la ruta por la cual las bacterias ingresan a los esturiones en su hábitat natural o en las granjas de piscicultura. También sería interesante ampliar los modelos de infección a otras bacterias patógenas aisladas en la granja como *S. aureus*, comparando las respuestas inflamatorias con las observadas al infectar con *A. hydrophila*.

Una vez optimizado el/los modelos de infección será posible abordar la validación de la eSAA como biomarcador de infección. Para ello, inicialmente bajo condiciones controladas en el laboratorio, realizaría nuevos experimentos de infección (con *A. hydrophila* o *S. aureus* vía intraperitoneal y/o por inmersión) utilizando un gran número de esturiones por grupo (n=20 como mínimo). Empleando el ELISA desarrollado en este trabajo cuantificaría los niveles en suero de eSAA, determinando el nivel basal en esturiones sanos, cuánto aumenta durante la infección aguda y cuánto tiempo permanece elevado respecto a la condición control. Además de analizar los niveles de eSAA a las 24 y 72 hs post infección, como fue estudiado en este trabajo, determinaría también los niveles a tiempos más prolongados (4, 7 y 10 días) a fin de establecer el curso temporal de la respuesta de esta PFA. Estos estudios permitirán determinar valores de corte entre esturiones sanos y enfermos que serán útiles para la eventual implementación de la eSAA como biomarcador de infección/inflamación en la granja.

Por otra parte, será necesario estudiar el efecto que factores de estrés, como la temperatura del agua y la densidad de cultivo tienen sobre los niveles basales de eSAA y su respuesta frente a estímulos inflamatorios. En particular para la temperatura, nuestro grupo observó que esturiones rusos cultivados en los meses de verano o mantenidos en el laboratorio durante 37 días a una temperatura similar a la del verano (24°C) presentan un deterioro en la funcionalidad de la VA del SC y Ceruloplasmina. Como la eSAA, al igual que los componentes del SC y la Ceruloplasmina, es sintetizada en el hígado, el estrés por temperatura podría disminuir los niveles basales circulantes de esta proteína y/o afectar cuanto se induce durante una infección. Esto se ve respaldado por estudios proteómicos que demuestran que en salmón atlántico (*S. salar*) el estrés crónico por alta temperatura 21°C inhibe la síntesis proteica respecto a salmones mantenidos a baja temperatura (15°C)²⁰⁸.

Una vez finalizados los estudios en condiciones controladas de laboratorio y en caso de que estos sean promisorios, se deberá evaluar si la eSAA también se comporta como un biomarcador en los esturiones adultos cultivados en la granja de Uruguay durante diferentes situaciones de cría (época del año, alimentación, etc). Por razones de infraestructura, los esturiones que se utilizaron y utilizarán en los experimentos de laboratorio fueron y serán peces pequeños (200-300g, de alrededor de 1,5 años de edad e inmaduros sexualmente). En cambio, la población de esturiones de la granja incluye hembras adultas, de diferente tamaño, edad (hasta los 8 años) y grado de maduración sexual. Por lo tanto, podría ocurrir que en las hembras los niveles basales de eSAA y su inducción por estímulos inflamatorios fuera diferente al de los esturiones juveniles, siendo modulados por ejemplo por hormonas sexuales y el estadio de desarrollo gonadal del pez²⁰⁹. Además, será importante determinar si los valores basales de eSAA en el verano se deprimen respecto a los de invierno, y si a pesar de esto,

igual es posible determinar valores de corte entre esturiones sanos y enfermos que permitan determinar si un pez está cursando una infección en cualquier época del año. Por otro lado, sería relevante, contar con muestras de ambas granjas de Uruguay, lo que nos permitiría comparar los resultados y niveles de eSAA en dos especies diferentes de esturión (ruso y siberiano), criadas en condiciones que no son exactamente equivalentes. Además, sería interesante evaluar si los resultados y los reactivos generados para el estudio en esturión son trasladables a otros peces teleósteos. Esto es viable ya que el grupo cuenta con contactos en Chile y Argentina, que trabajan en el laboratorio con peces como salmón, pacú y pejerrey.

3.2.2. Desarrollar un inmunoensayo, simple de realizar y transferible a las granjas de piscicultura, que permita detectar y cuantificar la eSAA del suero

En caso de verificar la utilidad de la eSAA como biomarcador de infección planteo como perspectiva desarrollar inmunoensayos de flujo lateral (LFA, del inglés *lateral flow assays*), más conocidos como tiras reactivas (tipo test de embarazo). Es necesario que el ensayo sea sensible, simple de realizar, no requiera infraestructura de laboratorio, ni personal altamente capacitado para su realización y lectura²¹⁰. Se espera que un ensayo LFA sea fácilmente transferido a las granjas de piscicultura, en donde podrá aplicarse para monitorear la salud de los esturiones, siendo una herramienta adicional a la hora de tomar decisiones importantes como administrar antibióticos o cambiar las condiciones de cultivo de los peces. Para desarrollar un test LFAs es necesario contar con grandes cantidades de anticuerpos anti-eSAA. Como los anticuerpos generados en este trabajo son un reactivo finito (obtenidos a partir del suero de un conejo inmunizado que fue sangrado a término), se deberá emplear otra estrategia que permita obtener dichas moléculas de manera sencilla e ilimitada. Para esto propongo generar en forma recombinante anticuerpos monoclonales y mono-dominio anti-eSAA derivados de anticuerpos de cadena pesada. Este tipo de anticuerpos, que se encuentra en camélidos y tiburones, está compuesto únicamente por un homodímero de cadenas pesadas, careciendo de las cadenas livianas que caracterizan a los anticuerpos convencionales²¹¹ (Figura 3.1a). A pesar de esto, los anticuerpos de cadena pesada retienen las propiedades fisicoquímicas que permiten unir de forma específica y con muy alta afinidad a los antígenos²¹². Mientras que en los anticuerpos convencionales, la región de unión al antígeno está determinada por dos dominios variables (uno en la cadena pesada y otro en la liviana), en los anticuerpos de cadena pesada esta región depende de un único dominio variable (el de la cadena pesada)²¹² (Figura 3.1a). Este dominio se conoce como VHH (del inglés, *variable domain of heavy chain antibodies*) o nanobody. Los VHHs son herramientas biotecnológicas muy atractivas porque: son moléculas pequeñas (10 veces más chicos que los anticuerpos convencionales), reconocen antígenos de manera específica y con elevada afinidad, son solubles y fisicoquímicamente estables, y gracias a estas características, es posible expresarlos en forma recombinante en sistemas procariontes como *E. coli*²¹². Para obtener VHHs anti-eSAA es posible utilizar la tecnología conocida como *phage display*, la cual ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio por el grupo del Dr. Gualberto Gonzales, para la obtención de este tipo de moléculas²¹³. A grandes rasgos, esta metodología consiste en inmunizar llamas con el antígeno de interés (eSAAr, p58-eSAA-KLH, p88-eSAA-KLH), un vez ocurrida la respuesta de anticuerpos, se purifican las células mononucleadas de la sangre (Linfocitos B y T), se extrae el ARN total y por RT-PCR se amplifica la región codificante correspondiente al dominio variable de todo el repertorio de anticuerpos de cadena pesada que expresa la llama (esto incluye los anticuerpos anti-antígeno de

interés y anticuerpos anti-antígenos irrelevantes)²¹⁴ (Figura 3.1b). A continuación, se construye una librería mediante el clonado de todos estos productos de PCR en vectores fagémidos. Estos vectores (cada uno contiene la secuencia de un VHH determinado) se introducen en *E. coli* para generar de forma recombinante cientos de miles de fagos que empaquetan la secuencia de un VHH determinado y lo expresan en su superficie. Utilizando el antígeno de interés es posible realizar múltiples rondas de selección (mediante ELISA o citometría de flujo) para seleccionar aquellos fagos que expresen VHHs anti-eSAA de buena afinidad (Figura 3.1b). Luego de seleccionados dichos fagos y obtenidas las secuencias que codifican los VHHs de interés, estas se clonan en un vector de expresión y se incorporan en *E. coli* para expresar los VHHs en forma recombinante. De esta manera cada vez que sea necesario contar con más cantidad de VHHs anti-eSAA, simplemente los clones seleccionados se vuelven a expresar en *E. coli*²¹⁴. Por último, los VHHs anti-eSAA podrán utilizarse para desarrollar LFA que permitan determinar los niveles de eSAA en muestras de sangre de esturión^{215,216}.

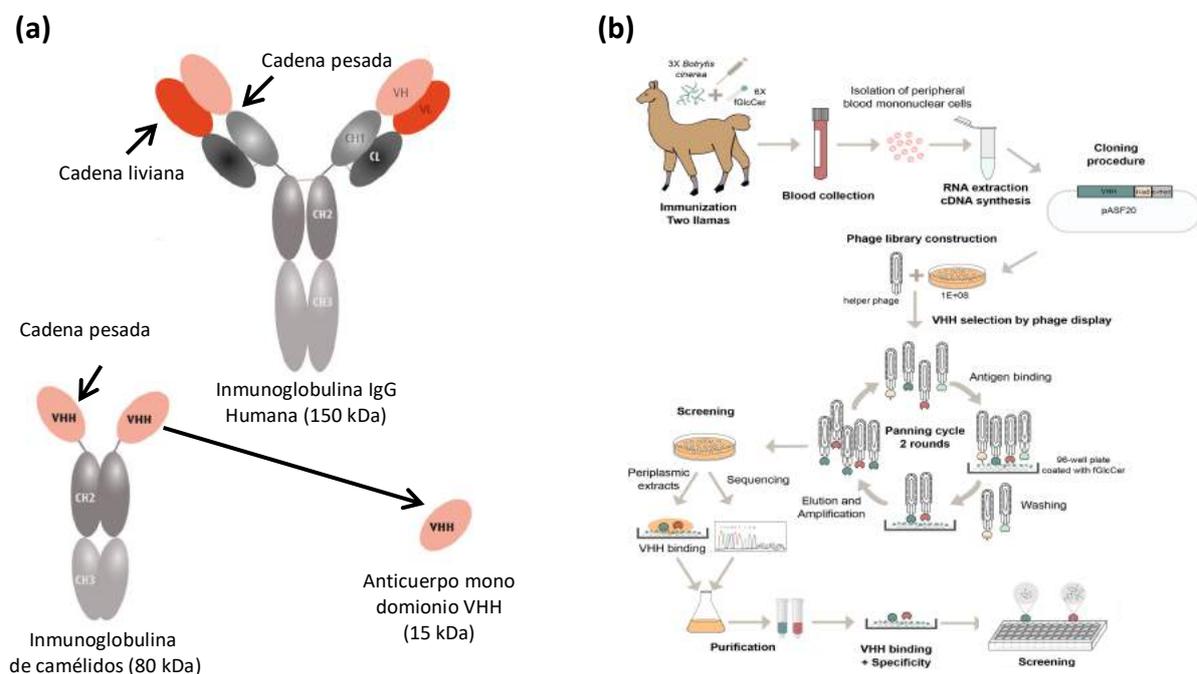


Figura 3.1. VHH y su obtención por phage display

(a) Se muestra la estructura de la inmunoglobulina IgG humana compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas la cual reconoce al antígeno a través de dos dominios variables VH y VL de la cadena pesada y liviana, respectivamente. Se muestra la estructura de las inmunoglobulinas de cadena pesada de los camélidos la cual reconoce al antígeno a través de un único dominio variable que se denomina VHH y el cual puede expresarse en forma recombinante como anticuerpo monodominio. Adaptado de <https://www.hybridbody.com/contenu/synthetic-vhh-library-menu/take-advantage-of-vhh-antibody-properties>

(b) Se muestra un esquema de la tecnología phage display para la generación, obtención y selección de anticuerpos tipo VHH monoclonales. Adaptado de Front Microbiol. 2017 Jun 14;8:1059

3.2.3. Ampliar la búsqueda a nuevos marcadores de infección para su utilización en el monitoreo sanitario de los esturiones criados en granjas de piscicultura

Para contar con más y mejores herramientas para el diagnóstico del estado sanitario de los esturiones sería interesante ampliar la búsqueda de marcadores más allá de las PFA a fin de identificar

nuevos indicadores de infección. Debido a que los marcadores podrían a priori ser ácidos nucleicos, proteínas o pequeños metabolitos realizaría múltiples aproximaciones ómicas para determinar si alguno de estos se modula en la sangre o suero por una infección. Elgiría estudiar posibles marcadores en sangre o suero ya que, al igual que la eSAA, esto permitirá posteriormente desarrollar herramientas para su fácil detección (sin sacrificar a los peces) y cuantificación. En la sangre, la mayoría de los ARNs corresponden a células del sistema inmune. Debido que la infección con patógenos aumenta el número de leucocitos circulantes, y también modula los genes que estos expresan, propongo estudiar el transcriptoma de las células de la sangre para identificar transcriptos con potencial de marcador inflamatorio. Pensando en que el marcador sea de naturaleza proteico, estudiaría el proteoma del suero de esturiones infectados, al fin de identificar proteínas que se induzcan por el estímulo inflamatorio. Para la correcta identificación y cuantificación de las proteínas, es necesario contar con el genoma del organismo o un buen transcriptoma en el cual se expresen los transcriptos de las proteínas que se busca identificar. En este caso particular será necesario contar con el transcriptoma de hígado de esturión ya que la mayoría de las proteínas del suero son sintetizadas en este órgano. A pesar de que existen transcriptomas de hígado de otras especies de esturión que podrían ser utilizados como base de datos (estos permitieron detectar la eSAAr), secuenciaría el transcriptoma de este órgano en el esturión ruso permitirá tener una base de datos propia de la misma especie y realizar estudios correlativos entre la transcripción hepática y los niveles de proteína en sangre. Alternativamente y para tener una base de datos buena secuenciaría y anotaría el genoma del esturión ruso empleando algunas de las metodologías de tercera generación que permiten determinar la secuencia de moléculas enteras (Pacbio, Oxford nanopore) sin que el ensamblado o las regiones repetidas del genoma resulten un inconveniente en este organismo poliploide²¹⁷. Mas aún, contar con el genoma del esturión ruso podría mejorar el análisis de los datos transcriptómicos que se obtengan de las células de la sangre o de hígado. Por último, realizaría estudios metabolómicos a partir del suero de esturión ruso con el fin de identificar metabolitos cuyos niveles aumenten durante una infección. En el marco de un proyecto ANII (Fondo María Viñas) dirigido por la Dra Valeria Silva y un proyecto CSIC dirigido por la Dra. Ana María Ferreira, nuestro grupo de trabajo planea realizar estudios proteómicos del suero y ha comenzado a realizar estudios transcriptómicos en hígado para la identificación de nuevos marcadores de infección, entre otros.

Una vez identificado el o los mejores marcadores en sangre o suero desarrollaría metodologías para cuantificarlos. En caso que el mejor marcador sea un ARNm optimizaría una metodología de qPCR para su determinación. Sin embargo, estas metodologías son difíciles de transferir a las granjas debido a que requieren equipamiento sofisticado para su determinación. En caso que el marcador sea una nueva proteína o un metabolito, al igual que para la eSAA, propongo generar anticuerpos monoclonales recombinante tipo VHH y ajustaría ensayos LFA fácilmente transferibles y aplicables.

3.2.4. Desarrollar herramientas para detectar microorganismos patógenos en granjas de piscicultura

Además de contar con herramientas para determinar si los esturiones están cursando un proceso infeccioso (detección de marcadores inflamatorios en particular transcriptos, proteínas o metabolitos de la sangre), sería útil desarrollar herramientas para determinar cuales patógenos circulan en las granjas en un determinado momento. El uso de ambas herramientas permitirá realizar

un monitoreo fino de la salud de los peces ya que se estudiará en forma paralela la salud de los peces y la ocurrencia de infección por patógenos del ambiente.

Hoy en día la granja ERN utiliza técnicas microbiológicas clásica basados en el aislamiento y cultivo de microorganismos conocidos para determinar la presencia de algunos patógenos como *A. hydrophila* y *S. aurus* en esturiones enfermos. Debido a que se estima que solo el 0.1-1% de los microorganismos de un ambiente son cultivables²¹⁸, es probable que otros microorganismos, que no es posible crecer en el laboratorio, estén implicados o sean los principales causantes de las patologías observadas en la granja. Actualmente es posible determinar el perfil taxonómico de una comunidad bacteriana en base a la secuenciación del gen de la subunidad 16s del ARN ribosomal (rADN) o por estudios metagenómicos²¹⁸. Estos últimos implican secuenciar todo el ADN de la comunidad mediante *shotgun sequencing*, ensamblar los fragmentos secuenciados para obtener, en el mejor de los casos, el genoma completo de los microorganismos de la comunidad²¹⁸. Más aún ambas metodologías permiten realizar estudios cuantitativos entre distintas muestras o condiciones experimentales²¹⁹.

Por lo tanto, utilizando aproximaciones metagenómicas o de secuenciación del rADN planteo como perspectiva a futuro caracterizar la comunidad microbiana en el agua de las instalaciones de ERN y del embalse de Baygorria en distintas épocas del año. Paralelamente también evaluaría muestras (sangre, bazo y riñón anterior) de esturiones con síntomas de infecciones. Estos estudios permitirán identificar nuevos microorganismos patógenos, estudiar su abundancia relativa durante los distintos meses del año y correlacionar estos datos con el desarrollo de infecciones en los esturiones. Una vez identificados los nuevos patógenos, desarrollaría herramientas de tipo POC (del inglés, *point of care*) para el diagnóstico temprano de infecciones por los mismos. En particular propongo optimizar un ensayo basado en la tecnología LAMP (del inglés, *loop mediated isothermal amplification of DNA*)²²⁰. Esta metodología permite amplificar moléculas de ADN a temperatura ambiente y con elevada especificidad y sensibilidad²²¹. A su vez, esta no requiere equipamiento de laboratorio (termocicladores) y es posible de adaptar a un formato LFA lo cual vuelve su transferencia y aplicabilidad factible^{222,223}.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Primera Sección

En esta sección se describe la metodología utilizada para abordar el objetivo específico 1 que implicó obtener las secuencias de potenciales PFA del esturión ruso y analizar su expresión diferencial en muestras de hígado de esturiones estimulados o infectados con *A. hydrophila*

4.1.1. Identificación de la secuencia codificante de homólogos de proteínas candidatas a PFA en el esturión chino y siberiano a partir de datos de transcriptómica

Entre las posibles PFA nos planteamos identificar las secuencias codificantes de homólogos de la SAA, CRP/SAP, WAP65/HPX, Hecpidina, Intelectina, Transferrina y Haptoglobina de esturión. No se buscó la secuencia de la Ceruloplasmina ya que se cuenta con un ensayo enzimático para cuantificar sus niveles en suero. Para esto, se analizó un transcriptoma de larva del esturión siberiano¹⁹ y dos transcriptomas de esturión chino, uno de gónadas²¹ y otro de órganos inmunes²⁷, empleando múltiples herramientas bioinformáticas disponibles en la plataforma online GALAXY²²⁴. Además, se realizó la búsqueda de la secuencia codificante de varias citoquinas asociadas a la inflamación aguda en mamíferos y peces incluyendo la IL1 β , IL6 y TNF α . Si bien los transcriptomas mencionados se encuentran ensamblados y son de acceso público, la identidad de las secuencias no se encuentra anotada ni reportada en las bases de datos GenBank, EMBL o DDBJ. Por esta razón, se empleó la siguiente estrategia para identificar los transcritos de interés. En primer lugar, se tradujeron ambos transcriptomas utilizando el programa getorf de EMBOSS²²⁵ y se buscaron los posibles marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de cada transcritos y se extrajeron todos los ORFs mayores a 100 aminoácidos flanqueados por un codón de inicio y de finalización. Por otro lado, a partir de la base de datos refseq de GenBank, Uniprot o Ensembl se obtuvo la secuencia aminoacídica de la SAA (Q642J9), CRP/SAP (NP_001039325.1), WAP65/HPX (XP_005173505.1), Hecpidina (P61516), Intelectina (XP_021327597.1), Transferrina (A0A2R8RRA6), Haptoglobina (NP_001352944.1), IL1 β (E0WCW4), IL6 (NP_001248378.1) y TNF α (Q1L8A5) de pez cebra. Utilizando estas secuencias se empleó el algoritmo BLASTp²²⁶ para realizar búsquedas de secuencias homólogas en los transcriptomas de esturión traducidos. Se reportaron aquellas secuencias con e-value menor a 10^{-10} salvo para la Hecpidina que se utilizó un evalue de 10^{-3} . Para confirmar la identidad de los transcritos encontrados se realizó BLASTp contra la base de datos de proteínas no redundantes de GenBank. Posteriormente, se seleccionaron como homólogos de PFA e IL1 β de esturión a aquellas secuencias completas que presentaron mayor porcentaje de identidad, cobertura y menor e-value respecto a las correspondientes secuencias presentes en peces teleosteos. Para confirmar la identidad de las secuencias de los homólogos encontrados en esturión, se buscaron dominios proteicos conservados utilizando los programas InterProScan²²⁷ y SMART²²⁸. Además, se calculó el peso molecular teórico (Expasy) de cada proteína y se analizó la presencia de péptido señal con los programas signalP 4.0²²⁹. Para el homólogo de la Hecpidina se buscó además el propéptido con Prop 1.0 Server²³⁰. Posteriormente, a partir de los transcritos identificados se obtuvieron las secuencias codificantes

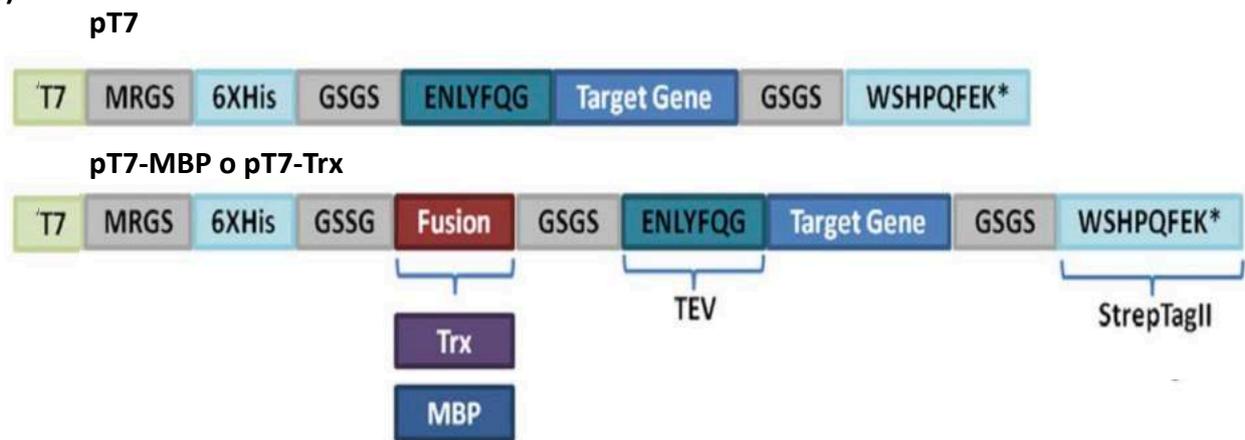
completas y peptídicas de esturión utilizando el programa SnapGene (GSL Biotech; available at snappgene.com) o la herramienta translate tool (Expasy). Con fines comparativos las secuencias peptídicas de las proteínas homólogas candidatas a PFA, así como la citoquina IL1 β de esturión chino y siberiano se alinearon con las correspondientes secuencias de peces teleósteos. Cuando el grado de homología lo permitió se incluyó la secuencia humana y de ratón en estos alineamientos. Las secuencias utilizadas fueron descargadas de la base de datos refseq de GenBank, Uniprot o Ensembl. Finalmente, se alinearon las secuencias nucleotídicas de las PFA e IL1 β homólogas de esturión chino y siberiano. Todos los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega²³¹ empleando el programa JalView²³².

4.1.2. Amplificación, clonado y secuenciación de homólogos de potenciales PFA del esturión ruso

4.1.2.1. Diseño de cebadores para la amplificación por PCR y el clonado por RF-cloning de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso

Teniendo en cuenta la elevada conservación que existe entre las secuencias nucleotídicas de las potenciales PFA del esturión chino y siberiano, fue posible diseñar cebadores directos para amplificar los homólogos de *saa*, *crp/sap*, *wap65/hpx*, *hamp*, *itln* y *tf* del esturión ruso. Los cebadores se diseñaron utilizando el programa (<http://rf-cloning.org>)²³³ para poder clonar los genes en el vector pT7¹⁷⁰ con la metodología de RF-cloning¹⁶⁹. En dicho programa se cargó la secuencia del vector pT7 (Esquema de vector, Figura 4.1) junto a la secuencia de la PFA de interés de esturión chino o siberiano. El mismo genera cebadores que incluye una secuencia complementaria al gen de interés y otra al vector destino. Los cebadores para amplificar los homólogos de *saa*, *wap65/hpx*, *hamp* y *tf* se diseñaron para amplificar únicamente la proteína madura (sin péptido señal o propéptido). Los cebadores para el homólogo de *crp/sap* se diseñaron para amplificar la proteína completa, y los cebadores del homólogo de *itln* se diseñaron para amplificar la secuencia en donde comienza el dominio fibrinógeno. Para los homólogos de *saa*, se observaron varios cambios de nucleótidos puntuales en el sitio de unión del cebador directo, por lo cual se diseñaron cebadores para ambas especies con el fin de aumentar las probabilidades de amplificar el transcripto del esturión ruso (denominados SAA directo 1 y SAA directo 2). Los cebadores elegidos se analizaron con el programa Oligo Analyzer²³⁴ verificando que no formaran horquillas, homodímeros ni heterodímeros que pudieran dificultar la amplificación y clonado. Todos los cebadores se adquirieron en Macrogen. En la Tabla 4.1 se detallan los cebadores diseñados para cada PFA en donde se representa la secuencia que hibrida al vector pT7 y al gen de interés en *itálica* y *subrayado*, respectivamente. En el caso de la *sap* y *wap65* de esturión siberiano, antes de identificar estas secuencias en el transcriptoma, se contó con secuencias gentilmente cedida por la Dr. Denise Vizziano que facilitaron el diseño de los cebadores que permitieron amplificar estos genes en el esturión ruso.

(a)



(b)

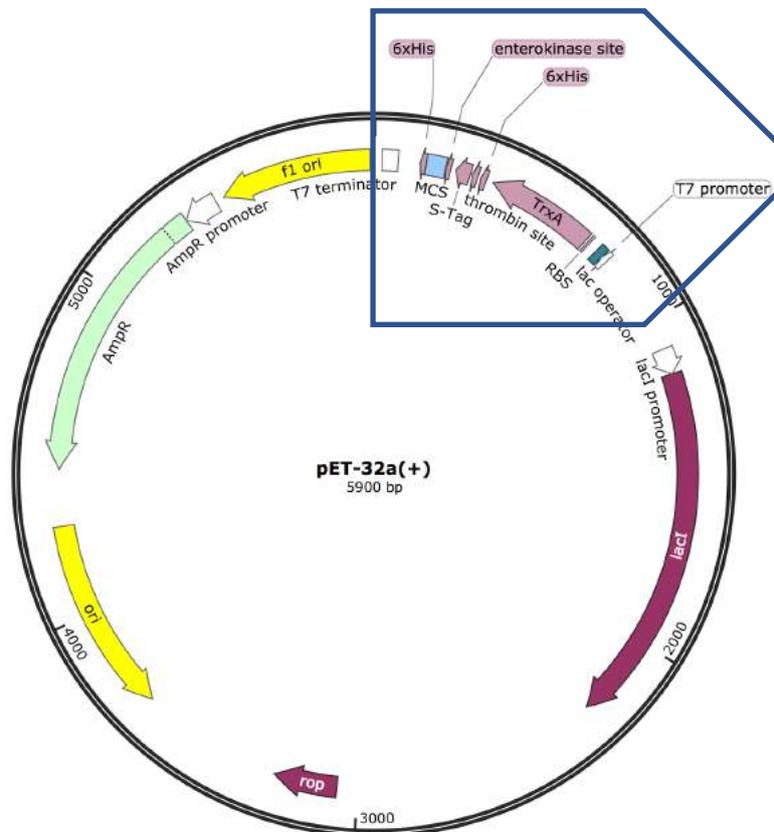


Figura 4.1 Familia de vectores utilizada para el clonado de PFA y expresión de la eSAAr

(a) Esquema de las modificaciones del pET32a (+) que dan lugar a los vector pT7 o pT7-MBP y pT7-TRX. Se muestran las modificaciones realizadas por Correa y colaboradores en la región de clonado del vector comercial pET-32a (+) de manera que en la proteína recombinante de interés exista la posibilidad de contar en la región N-terminal con un His-tag, una proteína de fusión (MBP o TRX), seguido de una secuencia de corte de la proteasa TEV (permite eliminar el His-tag y la eventual proteína de fusión). Además, la región C-terminal, codifica un tag adicional (StrepTagII) que puede o no ser utilizado durante la expresión recombinante (adaptado de Correa 2014) (170)).

(b) Esquema del vector pET-32a (+) que dio lugar a la familia de vectores pT7 utilizados en esta tesis. Se representa el gen de resistencia a la ampicilina (*AmpR*), el origen de replicación bacteriano (*ori*), el gen del represor *lacI* (*lacI*). El recuadro azul indica la región de clonado bajo el control del promotor T7 y regulación del operador *lac* en donde se localiza el sitio múltiple de clonado (MCS), el gen de la proteína de fusión (la tiorredoxina o TrxA en este esquema) y varios tags de purificación. (Realizado con SnapGene (GSL Biotech; available at snapgene.com)). Esa región fue modificada como se indica en la parta (a) de la figura

Tabla 4.1. Cebadores diseñados para la amplificación y clonado por RF-cloning de los homólogos de las potenciales PFA de esturión ruso

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>saa</i>	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCCAAT	
	<u>GGTATAGGTACCCAGGCC3'</u> (directo 1)	5'GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCC
	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCC <u>CAATGGTATAAGTTCCCAGGCC3'</u> (directo 2)	<u>TCAGTATTTTGAAGGGAGGCC3'</u>
<i>crp/ sap</i>	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCC	5'GGTGGCTCCAGCTGCCGGATCC
	<u>ATGAAGAAGCTTGTACTCTTGATAG3'</u>	<u>TCAACACGTCGTCTCTCTG3'</u>
<i>wap65 /hpx</i>	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCC	5'GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCCC
	<u>GCACCACCGCACCACAAA3'</u>	<u>TAATTATCACAGCCAAGTAGCTCC3'</u>
<i>hamp</i>	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCC	5'GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCC
	<u>CAAAGCCACTTCCCGATCTGC3'</u>	<u>CTAAGTCCGACAGCAGTAGCCA3'</u>
<i>itln</i>	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCC	5'GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCC
	<u>TACCTTTCCAGGAGCTGCA3'</u>	<u>TCATCGGTAGAACATCAGCATC3'</u>
<i>tf</i>	5'GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCC	5'GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCCTT
	<u>GCACCAGCTGCCGATTCT 3'</u>	<u>AAGCTTGCTGGCACTTGT3'</u>

4.1.2.2. Amplificación de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso por PCR

Las secuencias de los homólogos de *saa*, *crp/sap*, *wap65/hpx*, *hamp*, *itln* y *tf* de esturión ruso se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) a partir de ADN copia (ADNc) de hígado y bazo de esturión ruso obtenido como se detalla en el punto 4.4.5. Todas las PCR se realizaron con la ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad (ThermoScientific, #F530S) en un volumen final de 50 µl, conteniendo 10 µl de tampón High fidelity 5X, 1 µl de solución de dNTPs (10 mM cada uno) (ThermoScientific #R0181), 2.5 µl de cada cebador (10 µM), 25 ng de ADNc de hígado y 25 ng de ADNc de bazo, 0.5µl de ADN polimerasa (0.02U/µl) y cantidad suficiente de agua ultrapura (Synergy). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Mastercycler, Eppendorf) empleando programas específicos para cada PFA. En primer lugar, se desnaturizó el ADNc a 98°C durante 30 s. Posteriormente se realizaron 35 ciclos que consistieron en una etapa inicial de desnaturización del ADN a 98°C durante 8 s, seguidos de una segunda etapa de hibridación de los cebadores y una última etapa de extensión por la polimerasa. Los parámetros para estas dos últimas etapas se definieron de acuerdo a las recomendaciones del programa Rf-cloning, las especificaciones de la polimerasa utilizada y la temperatura de desnaturización (TM) de los cebadores (porción que hibrida con el gen) así como el tamaño de la secuencia a amplificar. Luego de finalizados los 35 ciclos, se realizó una extensión final a 72°C durante

5 min para terminar de elongar aquellos amplicones que hubiesen quedado rezagados. En la Tabla 4.2 se indican los programas de PCR utilizados para la amplificación de cada uno de los genes.

Tabla 4.2. Programas de PCR utilizados para la amplificación de las potenciales PFA de esturión ruso

Gen potencial PFA	Desnaturalización inicial	Ciclos de amplificación			Extensión final
		Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
<i>saa</i>	98°C 30 s	98°C 8 s	58°C 20s	72°C 21s	72°C 5 min
<i>crp/sap</i>			58°C 20s	72°C 21s	
<i>wap65/hpx</i>			58°C 20s	72°C 45s	
<i>hamp</i>			58°C 20s	72°C 21s	
<i>itln</i>			57°C 20s	72°C 30s	
<i>tf</i>			59°C 20s	72°C 60s	

Los productos obtenidos de la reacción de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa como se detalla en el punto 4.4.3. Cuando en el gel se observó únicamente la banda de tamaño correspondiente al amplicón esperado, se la purificó directamente de la mezcla de reacción utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (ThermoScientific, #K0692). Cuando se observaron bandas adicionales a la esperada se realizó una segunda electroforesis sembrando la totalidad del producto de la reacción de PCR, se visualizó el gel en un transiluminador con luz led azul (FastGene GelPic LED, NIPPON Genetics) para no inducir mutaciones, se cortó la banda conteniendo el amplicón del tamaño esperado y se lo purificó utilizando el mismo kit. Finalmente, se determinó la concentración y pureza de los amplicones obtenidos determinado la absorbancia (Abs) a 280 nm y el índice $Ab_{S_{260nm}}/Ab_{S_{280nm}}$ en un equipo NanoDropLite (ThermoScientific). A estos amplicones se les llama “megacebadores”.

4.1.2.3. Clonado de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso por RF-cloning

Los amplicones obtenidos correspondientes a las potenciales PFA de esturión ruso se incorporaron al vector de expresión pT7¹⁷⁰ mediante la técnica de RF-cloning¹⁶⁹. Ésta consiste en realizar una PCR que utiliza como megacebador las secuencias amplificadas en el punto 4.1.2.2 y como molde al vector destino, en este caso pT7. Esto es posible ya que los megacebadores obtenidos cuentan con extremos que hibridan al vector. Todas las reacciones de PCR se realizaron con la ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad en un volumen final de 50 µl conteniendo 10 µl de tampón High fidelity 5X, 1 µl de solución de dNTPs (10 mM cada uno) (ThermoScientific, #R0181), 120-200 ng de megacebador, 30 ng de vector pT7, 0.5 µl de ADN polimerasa (0.02 U/µl) y cantidad suficiente de agua ultrapura. Todas las PCRs se realizaron utilizando el siguiente protocolo. En primer lugar, se desnaturalizó el ADN a 98°C durante 30 s. Posteriormente se realizaron 30 ciclos de desnaturalización del ADN a 98°C durante 10 s, seguidos de una etapa de hibridación de los megacebadores al vector pT7 a 60°C durante 60 s y una extensión a 72°C durante 5 min. Terminado el ciclo anterior, se realizó

una extensión final de 7 min a 72°C. El producto de la PCR se incubó con 20 unidades de enzima DpnI 10 U/μl (ThermoScientific, #ER1701) durante 2 hs a 37°C para degradar en forma selectiva el vector parental metilado. Posteriormente, con dicho producto se transformaron las bacterias *E. coli* DH5α como se detalla en el punto 4.4.2. Las colonias crecidas se analizaron como se describe a continuación, a fin de evaluar la presencia de las secuencias de las potenciales PFA del esturión ruso.

4.1.2.4. Selección de colonias transformantes, expansión del plásmido y secuenciación de los homólogos de potenciales PFA del esturión ruso

Para confirmar que las colonias crecidas contenían el plásmido con los correspondientes insertos, se seleccionaron 3-4 colonias y se analizaron por PCR de colonia²³⁵ utilizando los mismos cebadores descritos en el punto 4.1.2.1. Todas las PCR de colonia se realizaron con la Taq polimerasa (ThermoScientific, #EP0402) en un volumen final de 50 μl conteniendo la colonia seleccionada, 5 μl de tampón Taq 10X, 1 μl de solución de dNTPs (10 mM cada uno) (ThermoScientific, #R0181), 2.5 μl de cada cebador (10 μM), 4 μl de MgCl₂ (25 mM), 0.25 μl de Taq Polimerasa (5 U/μl) y cantidad suficiente de agua ultrapura (Synergy). Las reacciones de PCR se realizaron en termociclador (Mastercycler, Eppendorf) empleando condiciones específicas para cada gen de acuerdo al tamaño del mismo, T_m de los cebadores (considerando para el cálculo de la T_m tanto la porción que hibrida con el gen como la que hibrida con el vector) y las especificaciones de la polimerasa utilizada. En primer lugar, se desnaturalizó el ADNc a 95°C durante 2 min. Posteriormente se realizaron 30 ciclos que consistieron en una etapa inicial de desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 s, seguidos de una etapa de hibridación de los cebadores de 30 s a 68°C, y una última etapa de extensión a 72°C que varió con el tamaño de la secuencia: 30 s para *saa* y *hamp*; 90 s para *crp/sap* y *wap65/hpx*; 130 s para *itln* y *tf*. Finalizados los 30 ciclos, se realizó la etapa de extensión final (72°C, 7 min). Los productos de las PCR de colonia se analizaron por electroforesis en gel de agarosa como se describe en el punto 4.4.3. Las colonias en las que se confirmó la presencia del inserto se cultivaron toda la noche en 3 mL de medio LB con ampicilina (100 μg/mL) a 37°C y bajo 200 rpm de agitación. Los plásmidos se extrajeron y purificaron con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoScientific, #K0503), se controló su pureza y se determinó su concentración tal como se describió anteriormente para los amplicones. Los plásmidos se enviaron a secuenciar (Macrogen) para identificar las secuencias codificantes de las potenciales PFA del esturión ruso. A continuación, se analizó el cromatograma correspondiente a la secuenciación de cada clon utilizando el programa SnapGene software (from GSL Biotech; available at snappgene.com) para identificar los clones correctamente secuenciados. Las secuencias seleccionadas de esturión ruso se alinearon junto a las correspondientes secuencias del esturión chino y siberiano utilizando el algoritmo Clustal Omega²³¹ y se visualizaron utilizando el programa JalView²³².

4.1.3. Análisis de la expresión por qPCR en tiempo real de las potenciales PFA del esturión ruso

4.1.3.1. Diseño de cebadores para cuantificar por qPCR la expresión de potenciales PFA del esturión ruso

A partir de las secuencias homólogas a *saa*, *crp/sap*, *wap65/hpx*, *hamp*, *itln* y *tf* identificadas en esturión ruso, se diseñaron cebadores para qPCR teniendo en cuenta que los mismos hibridizaran en regiones libres de cambios puntuales entre los distintos clones secuenciados. Para poder cuantificar los homólogos de *il1-b* y *hp* cuyas secuencias no fueron identificadas en el esturión ruso, se diseñaron cebadores complementarios a la secuencia nucleotídica del esturión chino y siberiano en regiones donde las mismas fuesen idénticas, y a su vez que comprendieran dominios evolutivamente conservados de IL1 β y Haptoglobina. Además, se diseñaron cebadores para los homólogos de *gapdh* y *actb* de esturión ruso a partir de las secuencias MG722827.1 y KR906073.1 depositadas en la base de datos GenBank, respectivamente. Todos los cebadores de qPCR se diseñaron con el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). Se chequeó que los mismos no formaran horquillas ni homo o heterodímeros (IDT), que amplificaran amplicones pequeños de entre 70-100 pb, y que tuviesen similar temperatura de desnaturalización y porcentaje GC. Los cebadores se adquirieron en Macrogen y sus secuencias se muestran en la Tabla 4.3

Tabla 4.3. Cebadores para estudiar la expresión diferencial de las potenciales PFA de esturión ruso

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
<i>saa</i>	5'- ATCGGTGCAGACAAGTACTTTTCAC-3'	5'- GGCCGTCCTGATCACTTCAG-3'
<i>crp/sap</i>	5'-AAAGAGGAGCCACTCCAAGCT-3'	5'-TGGTGTGGCGAGAGAAAAGA-3'
<i>wap65/hpx</i>	5'-GGTGACATCATTCAAGGAAA-3'	5'-CACATGATCAAAGGGCAATGG-3'
<i>hamp</i>	5'-CTGCGGGAGAAAAGACAAAGC-3'	5'-AGCCCTGTTCTTACAGCAGTTG-3'
<i>itln</i>	5'-GGTGAGATAACAAGGGAGGTGTGT-3'	5'-TGCTGGTGGATTCTTATTTCC-3'
<i>tf</i>	5'-TGCCGTCTCCAGGTTCTTTT-3'	5'-GGGCACAGTTGGCACACA-3'
<i>il1-b</i>	5'-CGACCCGGTTCCTGTTTTACA-3'	5'-GTTCTGGCGGTGCTGATAA-3'
<i>hp</i>	5'-CCGTTTCCAGAACAGCTCAGA-3'	5'-CATTTTGGCCAAGGACACTT-3'
<i>gapdh</i>	5'-GCCTACACAGCCACACAGAAGA-3'	5'-GGTGTGGCTGGAATGATGT-3'
<i>actb</i>	5'-ACACCCAGCCATGTACGTT-3'	5'-ACACCATCACCAGAGTCCATCA-3'

Para verificar la especificidad de los cebadores diseñados se realizó una qPCR utilizando como molde muestras de ADNc de hígado de esturión ruso (ARN obtenido de 4.1.4.1 y 4.1.4.2) siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.1.3. En estos ensayos, se analizó el perfil de las curvas de desnaturalización y los amplicones obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa tal como se describe en el punto 4.4.3 para determinar si poseían el tamaño esperado.

4.1.3.2. Estudio de la expresión de las potenciales PFA del esturión ruso por qPCR

Para estudiar la expresión de las PFA e *il1-b* del esturión ruso se realizaron reacciones de qPCR en un volumen final de 10 μ l mezclando los siguientes reactivos: 2 μ l de ADNc (obtenido como se describe en el punto 4.4.5), 0.9 μ l de los cebadores directo y reverso (10 μ M) y 5 μ l del reactivo 2x QuantiNova SYBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, #208054). Las reacciones de qPCR se realizaron en el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, #R1012168) utilizando el mismo programa para todos los genes, lo cual permitió analizarlos de forma simultánea. El programa consistió en un primer paso de activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 15 min. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de amplificación que consistieron en una etapa inicial de desnaturalización del ADN a 95°C durante 15 s,

seguidos de una segunda etapa de hibridación de los cebadores y extensión de la polimerasa a 60°C durante 60 s. En cada ciclo, luego de finalizada la extensión por la polimerasa, se adquirió la fluorescencia en el canal verde correspondiente a la emisión del SYBR. Concluidos los 40 ciclos, se realizó una rampa de desnaturalización, para verificar la obtención de productos únicos, calentando las muestras progresivamente de 72°C a 90°C en intervalos de 1°C y registrando la fluorescencia en el canal verde. Las curvas de amplificación se analizaron con el software Rotor gene Q series (versión 2.3.1) y en la región exponencial de las mismas se determinó manualmente el umbral que separa la señal del ruido. A continuación, para cada muestra se determinó el ciclo de corte de dicho umbral (CT) para cada uno de los genes de interés y para *actb* y *gapdh* (genes *housekeepings*), cuya expresión no fue alterada por las condiciones experimentales. Los datos de CT se exportaron y analizaron en el programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA). El incremento relativo en la expresión de un gen entre la condición problema y control se determinó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, siendo $\Delta\Delta CT = (\Delta CT_{\text{muestra}} - \Delta CT_{\text{control}})$, $\Delta CT_{\text{muestra}} = (CT_{\text{gen}} - CT_{\text{housekeeping}})_{\text{muestra}}$ y $\Delta CT_{\text{control}}$ el promedio del $(CT_{\text{gen}} - CT_{\text{housekeeping}})$ de los controles correspondientes a las 24hs^{172,236}. La determinación de la expresión relativa de un gen por el método anteriormente descrito es válida sólo si la eficiencia de los cebadores diseñados es cercana al 100%²³⁷. Para verificar esto, se realizaron reacciones de qPCR para cada par de cebadores utilizando como molde 5 diluciones seriadas (al décimo o al tercio) de una muestra representativa de ADNc de hígado de esturión ruso (obtenida según se describe en 4.4.5 con muestras de esturiones colectadas en el experimento 2). Se determinó el CT de cada dilución y se construyó el gráfico CT en función del logaritmo de la dilución de ADNc. Los datos se ajustaron a una recta utilizando el programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA) y se obtuvo la pendiente. La eficiencia porcentual de los cebadores se calculó como $e = 10^{\frac{-1}{\text{pendiente}}} - 1 * 100$. Por otro lado, la validez de *actb* y *gapdh* como genes *housekeepings* para nuestros experimentos se constató determinando el valor CT promedio y desvío para estos genes entre todas las muestras obtenidas en el experimento descrito en 3.2. A su vez la utilización de estos genes como *housekeepings* se validó con el programa GeNorm¹⁷⁵, utilizando los datos de expresión relativa de todos los genes analizados en los experimentos detallados en 4.1.4.

4.1.4. Experimentos de estimulación e infección de esturiones rusos con *A. hydrophila*.

A continuación se describen los experimentos de estimulación e infección de esturiones rusos con *A. hydrophila* (cepa H2, GenBank MF629003¹⁵⁷) realizados para analizar la expresión diferencial en hígado de las potenciales PFA, correspondientes al Objetivo específico III. En estos experimentos participaron varios miembros del grupo de investigación en Inmunidad Innata de esturiones y de la granja ERN (Grupo de Inmunidad Innata de esturiones: Mauricio Castellano, Valeria Silva-Álvarez, Marcio Aversa, Ignacio Quartiani, Alejandro Perreta, Andrea Villarino y Ana María Ferreira. ERN: Elena Fernández-López, Daniel Conijieski). La manipulación de los peces se realizó siguiendo las guías de buena práctica establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Universidad de la República) y protocolos aprobados por dicha comisión (expediente, 240011-001213-16 y protocolo #775).

4.1.4.1. 1er experimento de estimulación

Se realizó un experimento de estimulación con distintas concentraciones de *A. hydrophila* en

el laboratorio húmedo de experimentación de la granja ERN, localizada en Baygorria (Durazno, Uruguay). En la figura 2.31a se muestra el esquema correspondiente a este experimento. Se utilizaron 80 esturiones rusos de aproximadamente 2 años de edad (entre 400 y 500 g) que fueron distribuidos en 4 tanques (lotes de n=20) suministrados con agua de pozo de excelente calidad en términos de concentración de amonio (< 0.5 mg/L), nitritos (0.83 ± 0.05 mg/L) y pH (7.0 ± 0.1). Los esturiones se individualizaron con chip (Datamars) y aclimataron durante tres semanas en las siguientes condiciones: flujo continuo del agua de 3 L/min, densidad de cultivo promedio de 33.3 kg/m³, temperatura de 18-20°C y O₂ disuelto en el agua 7.1 ± 0.9 mg/L. Los peces se alimentaron 2 veces por día (mañana y tarde) con ración de mantenimiento preparada por ERN (47% proteínas, 12.5% lípidos y 3% de fibras peso seco) utilizando cantidades equivalentes al 2% del peso vivo del pez. Finalizada la alimentación se limpiaron los tanques para remover los restos de comida. Una semana previa al comienzo del experimento se colectó sangre de todos los peces (día -7), mediante punción de la vena caudal. Para la estimulación (día 0), los esturiones se encontraban en ayuno de 24 hs. La estimulación se realizó inoculando cada lote de peces, por vía intraperitoneal, con una suspensión de *A. hydrophila* muerta por calor (autoclavada 10 min, 120°C) en PBS estéril (Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM, KCl 2.7 mM, NaCl 138 mM). Se utilizaron dosis de 6×10^7 , 6×10^8 o 6×10^9 ufc/kg de pez. Como control del vehículo los esturiones del lote remanente se inocularon con PBS estéril. A las 24 y 72 hs post-estimulación se sacrificaron 10 peces de cada lote utilizando una dosis letal de eugenol²³⁸ y se colectó una muestra de sangre de cada pez y una muestra de hígado y de bazo de 3 esturiones del grupo control y 3 esturiones del grupo inoculado con 6×10^9 ufc/kg de *A. hydrophila*. La recolección de las muestras de sangre y obtención de suero, así como la recolección de muestras de hígado y bazo se realizó como se describe en el punto 4.1.4.4. Vale la pena aclarar que la infraestructura de los laboratorios de la granja ERN no permitió realizar muestreo de órganos de un mayor número de peces ni de todos los lotes experimentales.

4.1.4.2. 2do experimento de estimulación

Este segundo experimento de estimulación se realizó en el laboratorio húmedo del Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP, Facultad de Veterinaria, UdelaR), que consiste de una sala a temperatura controlada (18°C) donde se dispone de 5 piscinas de 500 L, alimentadas con agua de red a un flujo continuo de 0.94 L/min. El sistema de alimentación de agua incluye pasos de filtración a través de un filtro de partículas (20 x 2,5", 0.5 μ , Siam Cast Nylon Co. Ltd, Tailandia) y otro de carbón activado (20 x 2,5", Siam Cast Nylon Co., Ltd) que permiten remover partículas y fundamentalmente elementos que pueden estar en niveles tóxicos para los peces como el cloro. En la figura 2.31b se observa el esquema correspondiente a este experimento. En este experimento se utilizaron 45 esturiones rusos de 2 años de edad (entre 200 y 400 g), que fueron generosamente donados por la granja ERN. Los peces se transportaron desde Baygorria hasta el laboratorio húmedo del IIP donde se distribuyeron en 4 tanques (3 lotes de n=11 y un lote n=12) a una densidad de cultivo de entre 7.1 y 7.8 kg/m³. Los peces se aclimataron durante tres semanas a una temperatura de 18-20°C y se alimentaron 2 veces por día tal como se describió para el experimento 1. Finalizada la alimentación se limpiaron los tanques para remover los restos de comida. En este caso no se pudo individualizar a los peces ya que los chips se pierden en un lapso de dos a tres semanas debido al pequeño tamaño de los esturiones. A su vez, se intentó individualizarlos utilizando un precinto plástico en la aleta caudal pero no fue posible ya que se observó que a la semana muchos peces mostraban heridas en la piel. Una semana previa al comienzo del experimento se sangraron los esturiones de todos los lotes (día -7).

Para la estimulación (día 0), los esturiones se encontraban en ayuno de 24 hs. Se inocularon los peces de dos lotes por vía intraperitoneal con *A. hydrophila* inactivada por calor a una dosis de 6×10^9 ufc/kg de pez en PBS estéril y los dos lotes restantes con PBS estéril como control. A las 24 y 72 hs se sacrificaron todos los peces de un lote tratado y uno control, y se extrajo una muestra de hígado de cada pez. Previo al sacrificio se colectó una muestra de sangre de la vena caudal. La recolección de las muestras de sangre y posterior obtención de suero, así como la recolección de las muestras de hígado se realizó como se describe en el punto 4.1.4.4.

4.1.4.3. Experimento de Infección con *A. hydrophila*

Se realizó un experimento piloto de infección en las instalaciones del laboratorio húmedo del IIP (Facultad de Veterinaria, UdelaR), con un número reducido de peces de acuerdo con la disponibilidad de esturiones rusos. En la figura 2.32 se observa el esquema correspondiente a este experimento. Se utilizaron esturiones rusos de 2 años de edad (entre 200 y 400 g) que fueron generosamente donados por la granja ERN. Los peces se distribuyeron en 2 tanques con 3 peces cada uno y se aclimataron durante 4 semanas a un flujo continuo de 0.94 L/min y temperatura de 21°C. Los peces se alimentaron dos veces al día como se describió en el experimento 1. Dos semanas previo al comienzo del experimento se sangraron todos los esturiones de los 2 lotes. Para la estimulación (día 0), los esturiones se encontraban en ayuno de 24 hs. Los peces se inocularon vía intraperitoneal con una suspensión de *A. hydrophila* a 7×10^7 ufc/kg en PBS estéril (Piscina 2) o PBS estéril como control de vehículo (Piscina 1). A las 72 hs se sacrificaron todos los peces y se recolectó una muestra de sangre e hígado de cada pez como se describe en el punto 4.1.4.4

4.1.4.4. Toma de muestras de suero y órganos

Los esturiones se sangraron de la vena caudal por personal especializado de la granja ERN o por el Dr. Vet. Alejandro Perreta. Para la colección de muestras de sangre, los peces se mantuvieron en ayuno por 24 hs. La extracción de sangre se realizó en menos de 3 min para cada pez. La sangre se dejó coagular en hielo durante 3 a 4 hs y posteriormente se separó el suero por centrifugación a 2800 g durante 20 min y 4°C. El suero de esturión se alicuotó y conservó a -80°C hasta su posterior utilización. Inmediatamente después de sacrificados, se realizó la disección de los peces (a cargo del personal especializado de ERN o por el Dr. Vet. Alejandro Perreta). La disección de cada pez y la obtención y procesamiento de los órganos se realizó en pocos minutos y en condiciones de máxima limpieza que minimizaran la presencia de ARNasas. Para esto el instrumental de disección se trató previamente con solución descontaminante de ARNasas (RNase Away, ThermoScientific, #10328011) y se usó material de plástico libre de ARNasas y ADNasas. El material de disección se limpió exhaustivamente entre el procesamiento de cada órgano y cada pez, para impedir la contaminación cruzada entre las muestras. Se realizaron varios cortes en el vientre del esturión para exponer los órganos de la cavidad peritoneal. Se tomaron muestras de aproximadamente 3 mm³, las cuales se sumergieron rápidamente en una solución que protege la integridad del ARN (RNAlater, Qiagen, código 76106). Las muestras de órgano embebidas en RNAlater se incubaron durante 24 hs en la heladera para permitir la penetración de la solución protectora al tejido y luego se conservaron a -80°C.

4.1.4.5. Análisis realizados sobre las muestras

A partir de las muestras de órganos se extrajo el ARN total (punto 4.4.4), se sintetizó el ADNc (punto 4.4.5) y se determinó en las muestras de hígado la expresión génica de las potenciales PFA, a su vez en las muestras de hígado y bazo se cuantificó la expresión de la citoquina *il1-b* siguiendo los protocolos descritos en el punto 4.1.3.2. En las muestras de suero se determinaron los niveles de eSAA por ELISA (punto 4.3.3.2) y la actividad de la vía alternativa del complemento (VAH50), Lisozima y Ceruloplasmina siguiendo protocolos ajustados durante mi tesis de grado de la Lic en Bioquímica¹⁵⁹. Para las muestras en las que se determinó la expresión hepática de *saa* por qPCR y los niveles de eSAA en suero por ELISA se construyeron gráficos de correlación entre ambos parámetros.

4.1.4.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, La Jolla California USA). En los experimentos en los que se contó con un número de datos pequeño por lote experimental (n=3) que imposibilitó analizar su distribución, no se realizaron análisis estadísticos. En los experimentos con 10 o más individuos por lote, se analizó la distribución de los datos con el test D' Agostino & Pearson. Si los datos presentaron distribución normal y varianzas homogéneas se aplicaron test paramétricos. En caso de existir dos condiciones experimentales los datos se compararon de a pares con un t-test y cuando existieron 3 o más condiciones experimentales estas se analizaron con un ANOVA de una vía y comparación múltiple de Tukey. Por otra parte, cuando los datos se distribuyeron de forma no normal, se probaron varias transformaciones buscando alcanzar la normalidad y homogeneidad de varianza entre todos los grupos. Cuando esto resultó, se realizó el análisis descrito anteriormente. Los datos que no presentaron normalidad y/o homogeneidad de varianza fueron analizados con test no paramétricos. Cuando se contó con dos condiciones experimentales, los grupos se compararon de a pares con el test Mann-Whitney. Cuando existieron 3 o más condiciones experimentales, los grupos se compararon todos contra todos con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. En el caso de que los datos estuvieran pareados los grupos se compararon de a pares con el test no paramétrico de datos pareados, Wilcoxon. Por último, los análisis de correlación entre distintos parámetros fueron analizados con el test no paramétrico Spearman r.

4.1.4.7. Cuantificación absoluta de la expresión de *saa* de esturión ruso en varios órganos

La expresión de la *saa* en distintos órganos se estudió a partir de 5 esturiones rusos de 2 años de edad (entre 200 y 400 g), mantenidos en las instalaciones del IIP. Los esturiones se aclimataron durante 24 días como fue descrito en los puntos 4.1.4.1 y 4.1.4.2. Finalizada la aclimatación se sacrificaron los peces y se obtuvieron muestras de hígado, bazo, riñón anterior, branquias y cerebro, tal como se detalla en el punto 4.1.4.4. Se extrajo el ARN total (punto 4.4.4) y se sintetizó el ADNc (punto 4.4.5). Se determinaron los niveles absolutos de transcritos de *saa* en las muestras por qPCR. Para esto se preparó un estándar amplificando por PCR el transcripto de *saa* previamente clonado en el vector pT7-SAA (punto 4.1.2). El amplicón se analizó por electroforesis en gel de agarosa (ver 4.4.3),

se purificó con el kit GeneJET Gel Extraction (ThermoScientific, #K0692) y cuantificó por Abs₂₈₀ utilizando el equipo Nanodrop (ThermoScientific). Se cuantificó el nivel de expresión de la saa en las muestras y en diluciones seriadas del estándar siguiendo el protocolo de qPCR descrito en el punto 4.1.3.2. Finalizado el ensayo, se determinó el ciclo de amplificación (CT) de la saa para las 5 muestras de ADNc correspondientes a cada órgano y para las diluciones seriadas del estándar de *saa*. A partir de los valores obtenidos para el estándar se construyó el gráfico CT en función del número de moléculas de SAA y los datos se ajustaron a una recta (mediante el programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA). A partir de esta recta y de los valores de CT obtenidos para cada una de las muestras, se determinó el número de moléculas de SAA por µg de ARN total en cada órgano. A su vez se analizaron las curvas de desnaturalización obtenidas para cada muestra y cada órgano.

4.2. Segunda Sección

En esta sección se describe la metodología realizada para abordar el objetivo específico 2 que comprendió la identificación de péptidos potencialmente inmunogénicos en el homólogo de la SAA del esturión ruso, así como la expresión, purificación y caracterización de esta proteína en forma recombinante (eSAAr). De aquí en adelante, para simplificar, nos referiremos al homólogo de la SAA del esturión ruso simplemente como eSAA.

4.2.1. Elección de posibles péptidos inmunogénicos de la eSAA

Para identificar posibles péptidos inmunogénicos en la eSAA se llevó a cabo la siguiente estrategia. En primer lugar, se realizó un estudio de homología para lo cual se alineó la secuencia peptídica de la eSAA madura junto a la SAA A1 humana y los péptidos ANYIGSDKYFHARGNYDA, SDARENIQRFFGHG, FFGHGAEDSLADQAANE y GKDPNHFRPAGLPEKY que abarcan los aminoácidos 27–44, 59–72, 68–84 y 89–104 de la SAA A1 humana madura. Estos péptidos fueron identificados como epítopos B, habiéndose observado a su vez que los anticuerpos generados en conejo contra éstos permiten reconocer a la SAA A1 humana en condiciones nativas¹⁷⁶. A partir de estos alineamientos se infirió la secuencia homóloga de estos péptidos en la eSAA. Los alineamientos se realizaron con el algoritmo Clustal Omega²³¹ y el programa Jalview²³². Paralelamente se identificaron posibles epítopos B lineales en la eSAA utilizando el algoritmo Bepipred Linear Epitope Prediction versión 1.0¹⁷⁷. A continuación, se modeló la estructura de la eSAA para determinar la estructura y localización espacial de los péptidos identificados por los estudios de homología. Para la construcción del modelo, se buscó el mejor templado con el algoritmo HHblits²³⁹ y se modeló su estructura a partir de la estructura cristalográfica de la SAA A3 de ratón (PDB: 4q5g.1.A) utilizando el programa Swiss Model¹⁷⁸. La estructura monomérica de la eSAA se refinó con el programa GalaxyRefine obteniendo 5 nuevas estructuras¹⁷⁹. Estas estructuras se evaluaron con el algoritmo qmean a fin de determinar el mejor modelo¹⁸⁰. El modelo de la eSAA se alineó con la estructura cristalográfica de la SAA A1 humana (PDB: 4IP9) a fin de validar el modelo. A continuación, se alinearon las estructuras de los cuatro péptidos identificados en la hSAA junto a los correspondientes homólogos identificados en la eSAA a fin de observar la estructura que estos adquieren en ambas proteínas. Posteriormente se determinó la localización espacial de los posibles péptidos inmunogénicos identificados por homología en la eSAA. Esto permitió seleccionar 3 péptidos candidatos para generar anticuerpos que en el esturión abarcan los aminoácidos 58-71, 67-83 y 88-103 por lo cual se los denominó p58-SAA, p67-SAA y p88-SAA

respectivamente. Para los alineamientos y la visualización de las estructuras se utilizó el programa PyMOL Molecular Graphics System Version 2.0 (Schrödinger, LLC).

4.2.2. Expresión y purificación de la eSAA en forma recombinante

4.2.2.1. Subclonado de la *saa* en vectores de expresión

La secuencia codificante de la eSAA previamente clonada en el vector de expresión pT7 (Esquema de vector, Figura 4.1) se amplificó por PCR como se describió en el punto 4.1.2.2. A continuación, dicha secuencia se subclonó mediante RF-cloning en los vectores de expresión pT7-MBP y pT7-TRX, utilizando el mismo protocolo descrito en el punto 4.1.2.3. Estos tres vectores permiten expresar la eSAA sola (pT7) o en forma quimérica unida a la proteína de fusión tiorredoxina (pT7-TRX) o a la proteína de unión a maltosa (pT7-MBP)¹⁷⁰. A su vez, los tres vectores codifican una cola de histidina en el extremo N-terminal de la proteína para facilitar su purificación y un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV_{sh} que permite eliminar la proteína de fusión y el tag de histidina. En la figura 4.1 y 2.35a se observan esquemas de los vectores utilizados. Los vectores se introdujeron en bacterias *E. coli* DH5 α para su expansión y se verificó por PCR de colonia la presencia de inserto de la SAA siguiendo el protocolo detallado en 4.1.2.4. Posteriormente, los plásmidos se expandieron, purificaron y secuenciaron como se detalló en el punto 4.1.2.4. A continuación, los vectores se introdujeron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star, utilizada para la expresión de proteínas recombinantes²⁴⁰, tal como se describe en el punto 4.4.2. Se seleccionaron las colonias transformantes y se realizó un precultivo en medio LB con ampicilina 100 μ g/mL que se incubó toda la noche (16 hs) a 37°C bajo 200 rpm de agitación. Al otro día se prepararon las suspensiones stock de *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada con cada uno de los vectores por adición de 500 μ l de cada precultivo a una solución de 500 μ l de glicerol 50% v/v. Los stocks se conservaron a -80°C y denominaron pT7-eSAA, pT7-TRX-eSAA, pT7-MBP-eSAA.

4.2.2.2. Expresión de la eSAAr en *E. coli*

A partir de cada stock glicerol de *E. coli* BL21 (DE3) Star conteniendo los vectores pT7-eSAA, pT7-TRX-eSAA, pT7-MBP-eSAA se realizaron 3 precultivos en medio LB con ampicilina 100 μ g/mL. Estos se incubaron durante toda la noche (16 hs) a 37°C y 200 rpm de agitación. Al día siguiente se inocularon 500 μ l de cada precultivo en matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB fresco con ampicilina 100 μ g/mL. Los tres cultivos se incubaron a 37°C y 200 rpm de agitación hasta registrar una turbidez 0.6 a los 600nm (Espectrofotómetro UV-160a, Shimadzu). En esta etapa se guardó una alícuota del cultivo que se rotuló como "fracción sin inducir". Luego, se continuaron los cultivos a 30°C y se indujo la expresión con IPTG (Duchefa, I1401) 0.5 mM. Alcanzadas las 4 hs, se colectaron las bacterias por centrifugación durante 15 min a 4°C y 6000 rpm. Las mismas se resuspendieron en tampón de lisis frío (Tris-HCl 20mM pH 7.2, NaCl 0.5M, glicerol 10% m/v), conteniendo Tritón X-100 al 0.1% m/v, utilizando una relación de 10 mL de tampón por gramo de peso húmedo de bacterias. Se agregaron inhibidores de proteasas benzamidina 1mM, PMSF 1mM, inhibidor de tripsina de la soja (SBTI, por sus siglas en inglés) o cocktail de inhibidores de proteasa (Sigma, #S8830) y se lisaron las

bacterias mediante sonicación en frío, realizando 4 ciclos de 5 min (*Power output* 50 y *Pulser* de 40%, *Omni International Ultrasonic Homogenizer, Sonic Ruptor 250*), con intervalos de 10 min de descanso entre cada ciclo. El lisado se incubó con ADNasa I (AppliChem, #A3778) a una concentración final de 5 µg/mL durante 1 hr manteniendo el lisado en hielo y suplementándolo con MgCl₂ 10 mM. Inmediatamente después se guardó una alícuota que se rotuló como fracción total. Luego, se procedió a centrifugar el lisado durante 1 hr a 4°C y 13000 rpm y el sobrenadante se filtró por 0.22 µm y se rotuló como “fracción soluble”. El precipitado se resuspendió con tampón de lisis conteniendo urea 2 M en el mismo volumen que la fracción soluble y se rotuló como “fracción insoluble”. Las fracciones sin inducir, total, soluble e insoluble se analizaron por Tris-Tricina-SDS-PAGE como se describe en el punto 4.4.6. Posteriormente, cuando fue necesario obtener mayores cantidades de las proteínas recombinantes, se siguió el mismo procedimiento a partir de cultivos de 500 mL.

4.2.2.3. Purificación de la eSAAr

La purificación de la eSAAr implicó varios pasos. En primer lugar, se purificó la His-MBP-eSAAr a partir de la fracción soluble obtenida en 2.2.2 por IMAC y posteriormente se realizó un paso de digestión enzimática de la His-MBP-eSAAr con la proteasa His-TEV_{sh} que escinde la proteína de fusión liberando la eSAAr. Finalmente, la obtención de la eSAAr pura requirió una segunda IMAC y un último paso de cromatografía sobre una matriz de amilosa para eliminar totalmente la His-MBP contaminante. A continuación, se describen cada uno de estos pasos.

La fracción soluble correspondiente a la expresión de la His-MBP-eSAAr se fraccionó por IMAC en batch. Se utilizaron 3 mL de la matriz *Chelating Sepharose Fast Flow* (GE, #28-4047-39) en la cual se inmovilizaron iones Cu⁺⁺ de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Posteriormente la matriz se equilibró en tampón de lisis suplementado con imidazol 5 mM y se incubó con la fracción soluble conteniendo la His-MBP-eSAAr (20 mL, 270 mg de proteína total) durante 1 hr, a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se colectó el percolado conteniendo las proteínas no unidas. Luego, se realizaron lavados sucesivos, con 7 mL de tampón de lisis sin imidazol, conteniendo Tween₂₀ 0.05% m/v, tampón de lisis conteniendo imidazol 10 mM y Tween₂₀ 0.05% (m/v) y finalmente tampón de lisis conteniendo imidazol 20 mM y Tween₂₀ 0.05% (m/v); cada etapa de lavado con estos tampones se repitió 5 veces a fin de despegar las proteínas débilmente unidas a la matriz. Las proteínas inmovilizadas se eluyeron con tampón de lisis conteniendo imidazol 300 mM y Tween₂₀ 0.05% (m/v). Se colectaron fracciones de 1.5 mL hasta no detectar más proteína por el método de Bradford (punto 4.4.9) La columna se conservó en etanol 20% (v/v) hasta su regeneración siguiendo las instrucciones del fabricante. Las fracciones eluidas se analizaron por Tris-Tricina-SDS-PAGE como se indica en el punto 4.4.6 y se preparó un pool con aquellas eluciones en donde se detectó la mayor cantidad de His-MBP-eSAAr, el pool se cuantificó por el método de Bradford (punto 4.4.9) y se almacenó a 4°C hasta su diálisis.

Para obtener la eSAAr se digirió la His-MBP-eSAAr con la Proteasa His-TEV_{SH} recombinante²⁴¹ (preparada en la Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias) utilizando una relación de 1 mg de His-TEV_{SH} cada 20 mg de His-MBP-SAA (a una concentración ≤ 2.5 mg proteína/mL para evitar su precipitación). La digestión se realizó durante una diálisis en la cual se removió el imidazol de forma secuencial; inicialmente se utilizó el tampón de lisis suplementado con imidazol 150 mM, Tween₂₀ 0.05% (m/v) y DTT 1 mM, y se fueron haciendo diluciones seriadas al medio con el mismo tampón, pero sin imidazol, a fin de ir eliminándolo gradualmente. Los primeros dos pasos de la secuencia se

realizaron el mismo día durante 2 hs a 18°C, luego se continuó dializando toda la noche a 4°C, y se finalizó la diálisis al llegar a una concentración final de imidazol 37.5 mM.

El producto de la diálisis y digestión se centrifugó a 10000 g durante 10 min y 4°C para eliminar cualquier precipitado. A continuación, se fraccionó nuevamente por IMAC para separar la His-MBP, la His-TEV_{SH} y la proteína de fusión His-MBP-SAA no digerida a fin de obtener la eSAAr en forma pura. La muestra se incubó en *batch*, utilizando una relación de 1 mL de matriz por 20 mg de proteína, durante 20 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se recuperó el percolado que contendría la eSAAr. Sin embargo, la SAAr interaccionó con la matriz (punto 2.2.3), por lo cual fue necesario eluirlo con tampón de lisis suplementado con una baja concentración de imidazol (50 mM) y Tween₂₀ 0.05% (m/v). Se colectaron 6-7 fracciones de 500 µl hasta no detectar más proteína por el método de Bradford (punto 4.4.9). Todas las fracciones se analizaron por Tris-Tricina-SDS-PAGE como se describe en el punto 4.4.6. Se preparó un pool con aquellas fracciones donde se eluyó la mayor cantidad de eSAAr y se determinó su concentración proteica por el método de Bradford (punto 4.4.9). Este pool mostró además la presencia de His-MBP. Para eliminar la His-MBP, el pool se fraccionó sobre una matriz de amilosa que presenta afinidad por la MBP¹⁸⁸, utilizando dos columnas en línea (1 mL, NEB, #E8021S), previamente equilibradas en tampón de lisis suplementado con imidazol 50 mM y Tween₂₀ 0.05% (m/v). Se recuperó el percolado y se lavó la matriz con el mismo tampón. Los percolados y los lavados se analizaron por Tris-Tricina-SDS-PAGE (punto 4.4.6). Se mezclaron los lavados y percolados conteniendo a la eSAAr y se determinó la concentración por el método de Bradford (punto 4.4.9). El rendimiento de la purificación fue entre 1-3.5 mg de SAAr por gramo de masa húmeda de células. La eSAAr se almacenó a -20°C a una concentración de 0.5 mg/mL para evitar su precipitación. El peso molecular de la eSAAr y su secuencia se determinó por espectrometría de masa con el equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Abi Sciex, Servicio del Instituto Pasteur Montevideo) utilizando la eSAAr purificada o la eSAAr purificada y digerida con tripsina, respectivamente. Para confirmar la identidad de la eSAAr, se realizaron búsquedas a partir de las masas correspondientes a los péptidos digeridos con tripsina utilizando el programa Mascot (Matrix Science) y como base de datos los transcriptomas traducidos de esturión chino y siberiano.

4.2.3. Análisis de la eSAAr por cromatografía de exclusión molecular

Se analizó la eSAAr por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 75 10/300 GL (GE, #17-5174-01). La columna se equilibró en tampón SEC (Tris-HCl 20mM pH 7.2, NaCl 150 mM, Tween₂₀ 0.05%) y se inyectaron 100 µl de la muestra (1.53 mg/mL). La exclusión molecular se realizó a temperatura ambiente utilizando un equipo AKTA *prime plus* (GE Healthcare) a un flujo constante de 0.4 mL/min durante 130 min. Se monitoreó la Abs_{280nm} y se colectaron las fracciones correspondientes a los picos detectados. Para la calibración de la columna se utilizó una mezcla de estándares conteniendo aprotinina (6.5 kDa), ribonucleasa A (13.2 kDa), anhidrasa carbónica (29.0 kDa), ovoalbúmina (42.7 kDa) y seroalbumina bovina (66.5 kDa) (GE, #28-4038-41). El volumen muerto se determinó utilizando el colorante azul de dextrano (GE, #28-4038-41). La exclusión molecular de los estándares y del azul de dextrano se realizó en las mismas condiciones que las detalladas para el análisis de la SAAr. Se determinó el cociente de reparto para cada estándar K_{av} como: $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$, donde V_e , V_0 y V_t representan el volumen de elución de cada estándar, el volumen muerto y el volumen total de la columna respectivamente. Se graficó el log PM en función del K_{av} para cada estándar y se ajustaron los datos a una recta utilizando el programa Origin 8.5

(OriginLab, Northampton, MA). A partir de este gráfico se estimó el PM aparente del componente eluido en la fracción mayoritaria. Además, esta fracción se concentró por precipitación con ácido tricloro acético (TCA) y se analizó por Tris-Tricina-SDS-PAGE (punto 4.4.6). Para la precipitación de la muestra, se agregó 1 volumen de solución TCA 100% (m/v) cada 4 volúmenes de muestra y se incubó en hielo durante 10 min. A los efectos de favorecer la precipitación, a una alícuota se le adicionó BSA (62.5 µg/mL). El precipitado se separó del sobrenadante por centrifugación a 14000 g durante 5 min a 4°C. El pellet se lavó dos veces con acetona, se dejó secar y se resuspendió en tampón de muestra para su análisis por Tris-Tricina-SDS-PAGE (punto 4.4.6).

4.3. Tercera sección

En esta sección se describe la metodología utilizada para abordar el objetivo específico 3 que comprendió la generación y purificación de anticuerpos de conejo policlonales anti-eSAA y el desarrollo de un ELISA para detectar dicha proteína en muestras de suero.

4.3.1. Generación de anticuerpos policlonales anti-eSAA en conejo

Se prepararon en conejo anticuerpos policlonales anti-p58-eSAA, anti-p67-eSAA y anti-p88-eSAA utilizando como inmunógenos los correspondientes péptidos conjugados a la proteína inmunogénica hemocianina de caracol (KLH, por sus siglas en inglés, GenScript). A su vez se generaron anticuerpos anti-eSAAr. La manipulación de los conejos (inoculaciones y sangrado) fue realizada por el personal del campo experimental del Instituto de Higiene (lugar físico donde se mantuvieron a los animales) siguiendo las recomendaciones de la CHEA y los protocolos avalados por dicha Comisión (Expediente No 101900-000054-16). Brevemente, se inocularon los conejos con 400 µg del conjugado péptido-KLH o la eSAAr emulsionado con adyuvante completo de Freund (Sigma, #F5881), y se colectó sangre en forma periódica (cada 2 o 3 semanas) durante varios meses. El título y la avidéz de los anticuerpos del suero se monitoreó por ELISA siguiendo protocolos convencionales^{242,243} para decidir el momento del sangrado final que permitiera obtener la mayor cantidad posible de anticuerpos de alta avidéz (Ensayos realizados por la Dra. Valeria Silva, Cátedra de Inmunología, Facultad de Química).

4.3.2. Obtención de anticuerpos anti-eSAA

4.3.2.1. Acoplamiento de la eSAAr a la matriz de NHS-sefarosa

Para purificar los anticuerpos anti-péptido-eSAA por cromatografía de afinidad primero se inmovilizó la eSAAr de esturión ruso a una matriz. Para esto se utilizó agarosa activada (General Electric #71-500-14 AD), que contiene grupos N-hidroxisuccinimida (NHS) capaces de generar uniones covalentes con grupos amino libres en péptidos o proteínas. La eSAAr obtenida se dializó toda la noche a 4°C contra el tampón de unión (PBS 100 mM pH 7.2, NaCl 0.5 M, glicerol 10% m/v, Tween₂₀ 0.05% m/v) para eliminar el Tris ya que éste reacciona con los grupos NHS. Finalizada la diálisis se centrifugó la muestra durante 10 min a 10000 g y 4°C para eliminar cualquier precipitado que se hubiese formado. La unión a la matriz se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se activó la matriz con 10 volúmenes de HCl 1 mM frío. Se equilibraron 0.5 mL de la matriz en el tampón de unión e inmediatamente se adicionó la solución de eSAAr (4.16 mg totales a una concentración

final de 0.6 mg/mL en el tampón de unión). La reacción se llevó a cabo en *batch* con agitación orbital a temperatura ambiente durante 2 hs. Finalizada la reacción se separó el sobrenadante por decantación y se bloquearon los grupos reactivos libres de la matriz por incubación con tampón Tris-HCl 100mM pH 8.5 durante 2 hs a temperatura ambiente y con agitación orbital. Finalizado este bloqueo se realizaron 6 lavados alternando tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8.5 con tampón acetato 100 mM pH 8.5, NaCl 500 mM. Se cuantificaron las proteínas de la diálisis y del percolado por el método de Bradford (punto 4.4.9) y se determinó el porcentaje de acoplamiento de la eSAAr a la matriz. La matriz obtenida, eSAAr-NHS-Sefarosa (conteniendo 3.75 mg de eSAAr inmovilizada), se conservó a 4°C en etanol 20% (v/v).

4.3.2.2. Purificación de los anticuerpos anti-eSAA por cromatografía de afinidad

Los anticuerpos de conejo anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA se purificaron mediante cromatografía de afinidad, utilizando la matriz eSAAr-NHS-Sefarosa obtenida en el punto 4.3.2.1. A tales efectos, cada antisuero conteniendo anti-p58-eSAA (5 mL, título 410000, avidez media 5.6) o anti-p88-eSAA (65 mL, título 5400, avidez media 4.6 M) se diluyó 1:1 en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) y centrifugó a 5000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante límpido se aplicó en la columna eSAAr-NHS-Sefarosa (0.5 mL) previamente equilibrada en TBS. Se guardó el percolado y se realizaron lavados sucesivos de la matriz con 5 mL de TBS, 10 mL de Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM conteniendo Tween₂₀ 0.2% (m/v) y 5 mL de TBS. Los anticuerpos unidos a la matriz se eluyeron por cambio de pH realizando varias eluciones cada una con 500 µl de tampón glicina (Glicina-HCl 200 mM pH 2.0, NaCl 150 mM). En los eluidos se se neutralizó rápidamente el pH ácido con 50 µl de tampón neutralización (Tris-HCl 2 M pH 8.5, NaCl 150 mM). La matriz de eSAAr-NHS-Sefarosa se lavó con TBS hasta alcanzar un pH 7.4, luego con agua ultrapura y finalmente se equilibró en etanol 20% (v/v) y conservó a 4°C. La concentración proteica en las fracciones eluidas se cuantificó midiendo la Abs_{280nm} en un equipo Nanodrop (ThermoScientific) y se preparó un pool con las fracciones que mostraron Abs_{280nm} mayor a 0.005 U/Abs. El pool obtenido se dializó contra PBS toda la noche a 4°C y se concentró utilizando centricones de corte 10 kDa (Pall, MCP010C41). Se cuantificó la proteína total utilizando el kit Micro BCA (ThermoScientific, #23235) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se añadió seroalbumina bovina (BSA) para alcanzar una concentración final de 1mg/mL proteína total con el fin de contribuir a la estabilidad de los anticuerpos. Finalmente, los anticuerpos purificados se congelaron a -20°C en alícuotas de 600ul conteniendo 430 µg/ml de anticuerpo anti-p58-eSAA o 380 µg/ml de anticuerpo anti-p88-eSAA.

Para controlar la reactividad de los anticuerpos anti-eSAA purificados se utilizó la técnica de *Western Blot* descrita en el punto 4.4.8, con pequeñas modificaciones. Brevemente, se sembraron 2µg de eSAAr en un carril del ancho del gel de poliacrilamida y se separó por SDS-PAGE tal como se describe en 4.4.7. Finalizada la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF (ThermoScientific, 88518). A continuación, la membrana de PVDF se cortó en tiras de aproximadamente 5 mm de ancho, que se incubaron con las siguientes fracciones obtenidas de la cromatografía de cada uno de los antisueros: suero inmune (diluido 1/1000 o (1/100), percolado (diluido 1/100 y 1/1000) y las fracciones eluidas con glicina (diluidas 1/1000 o 1/10000). Los siguientes pasos del *Western Blot* se realizaron como se describe en el punto 4.4.8.

4.3.2.3. Conjugación del anticuerpo anti-p88-eSAA a biotina

Se preparó un conjugado anti-p88-eSAA a biotina para su empleo como anticuerpo de detección en inmunoensayos. Se utilizó el reactivo EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (ThermoScientific, #21335) y la conjugación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se realizó un nuevo cambio del tampón a la solución de anticuerpos obtenida para eliminar posibles restos de Tris (punto 4.3.2.2) utilizando centricones de corte 10 kDa (Pall, #MCP010C41). A continuación, se adicionó 10.5 µl de una solución 10 mM de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin a 0.228 mg de dicho anticuerpo en un volumen final de 600 µl (correspondiente a un exceso molar de 70 veces de biotina respecto al anticuerpo). La reacción se dejó transcurrir 2 hs en hielo. El anticuerpo anti-p88-eSAA biotinilado se alícuotó a 380 µg/mL, se suplementó con BSA hasta alcanzar una concentración total de proteínas de 1 mg/ml y se congeló a -20 °C.

4.3.3. Puesta a punto y aplicación de un ELISA para la detección de la eSAA en muestras de suero.

4.3.3.1. Estabilidad de la eSAA del suero

Se estudió la estabilidad de la eSAA del suero de esturión ruso para validar la utilización de la seroteca construida desde el año 2014 y conservada a -80 °C. Se evaluó si la eSAA se degrada por los ciclos de congelado y descongelado de las muestras o por permanecer varias hs en hielo durante el transcurso de los experimentos. A tales efectos, se preparó un pool de suero a partir de 4 individuos infectados con *A. hydrophila*, a una alícuotas de este pool se le agregaron los siguientes inhibidores de proteasas PMSF 5mM, benzamidina 10 mM, EDTA 25mM (PBE) y a otra alícuota no se le agregaron inhibidores (control sin tratamiento, P). Además, cada alícuota se subdividió en dos, una incubada por 2 hs a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) o en hielo (0 - 4 °C). Por otro lado, una alícuota de P y otra de PBE se sometieron a 4 ciclos de congelado y descongelado. Este experimento se repitió con un tiempo de incubación de 24 hs. Todas las muestras se analizaron por SDS-PAGE y *Western Blot* como se describió en los puntos 4.4.7 y 4.4.8, respectivamente.

4.3.3.2. Condiciones generales del ELISA para la cuantificación de la eSAA en suero

Para detectar la eSAA en muestras de suero de esturión ruso mediante ELISA de formato sándwich, se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos y con alta capacidad de adsorción de proteínas (Nuck Maxisorp, ThermoScientific #44-2404-21) con 0.1 µg por pozo del anticuerpo de captura anti-p58-eSAA diluido en tampón carbonato 100 mM, pH 9.6. Las placas se incubaron en cámara húmeda toda la noche a 4°C para permitir la unión del anticuerpo al plástico. Posteriormente, se bloquearon los sitios libres de la placa con 300 µl por pozo de solución de bloqueo (PBS conteniendo BSA 0.5% (m/v)). A continuación, las placas se lavaron 4 veces con solución de lavado (PBS conteniendo Tween₂₀ 0.05% (v/v)) y secaron en papel absorbente para eliminar las proteínas no unidas. Luego se sembraron 100 µl de las muestras de suero de esturión previamente diluidas 1/200, 1/800 o 1/2400 en tampón de dilución (PBS conteniendo BSA al 0.05%, Tween₂₀ al 0.05%). Para construir la curva estándar, se preparó una solución de eSAAr 500 ng/mL a partir de la cual se obtuvieron 7 diluciones seriadas al tercio utilizando el tampón dilución (rango 0.69-500 ng/mL). Se

sembraron por duplicado 100 µl por pozo de cada dilución del estándar y del tampón de dilución (blanco). Se incubaron las muestras y el estándar durante 1 hr a 37°C, manteniendo la placa en una cámara húmeda, para permitir la unión de la eSAA y la eSAAr al anticuerpo de captura. A continuación, se realizaron lavados tal como se describió anteriormente y se sembraron 100 µl por pozo del anticuerpo secundario anti-p88-eSAA biotinilado diluido 1/2500 en tampón dilución y se incubó en cámara húmeda durante 1 hr a 37°C. Se realizó una nueva etapa de lavados. Para detectar la unión del anticuerpo secundario se adicionaron 100 µl por pozo de streptavidina conjugada a peroxidasa 1mg/mL (Sigma, S-5512) diluida 1/10000 en tampón de dilución y se incubó en cámara húmeda durante 45 min a 37°C. Se realizó una nueva etapa de lavados y se reveló el ensayo agregando 100 µl por pozo de solución de revelado (ácido cítrico 49 mM, Na₂HPO₄ 103 mM, tetrametilbenzamidina 100 µg/mL (AppliChem, A3840), H₂O₂ 0.006% v/v (Sigma, H1009)) y se incubaron las placas 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción agregando 50 µl por pozo de una solución de H₂SO₄ 0.3 M y se registró la Abs_{450nm} en un espectrofotómetro para placas (Multiskan Ms, Labsystems). Se construyó una curva de calibración graficando los valores de Abs_{450nm} obtenidos para el estándar en función de la concentración de eSAAr. Los datos se analizaron con el programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA), se ajustaron a una curva sigmoidea tipo Hill ($Abs=A*[SAAr]^n/(k^n+[SAAr]^n)$, en donde A, n y k son constantes determinadas por el ajuste) y se interpolaron los valores de Abs_{450nm} de las muestras de suero problema para determinar la concentración de SAA en las mismas. En la Figura 4.2 se muestra un esquema del ELISA desarrollado.

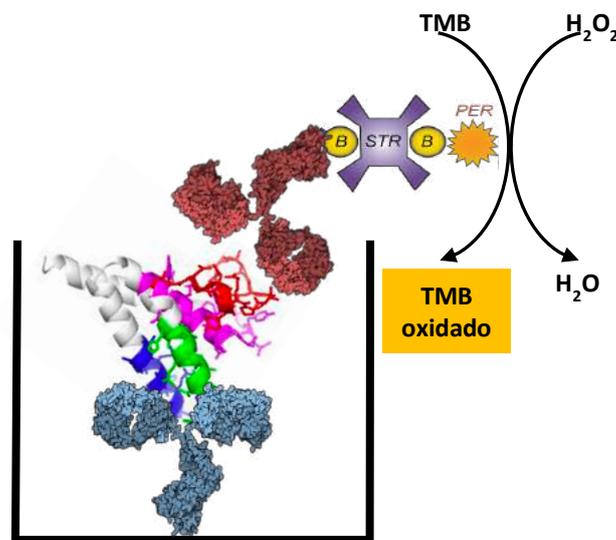


Figura 4.2. Esquema del ELISA para la detección y cuantificación de la eSAA y eSAAr

Se esquematiza el pozo de reacción correspondiente al inmunoensayo ELISA en formato *sándwich* donde se utiliza el anticuerpo anti-p58-eSAA (azul) para capturar la eSAA o eSAAr por la región conteniendo el péptido p58-eSAA (azul); el anticuerpo anti-p88-eSAA (rojo) biotinilado (B) y conjugado a la streptavidina - peroxidasa (STR, PER), el cual une la región de la eSAAr o eSAA conteniendo el péptido p88-eSAA (rojo) y permite revelar la interacción con dichas proteínas gracias a la oxidación del sustrato TMB por la peroxidasa (PER)

4.3.3.3. Puesta a punto del ELISA para la cuantificación de la eSAA en suero

La puesta a punto del ELISA en formato *sándwich* implicó determinar la cantidad óptima de anticuerpo de captura anti-p58-eSAA a utilizar por pozo para reconocer tanto la eSAAr como la eSAA con buena sensibilidad, estudiar el efecto matriz de las muestras de suero de esturión para poder

cuantificar la eSAA sin interferencias de otros componentes del mismo, determinar la concentración óptima del anticuerpo secundario anti-p88-eSAA biotinilado, determinar el tiempo óptimo de revelado del ensayo por la reacción de la peroxidasa y como último paso, luego de optimizados el ELISA, se determinó el límite de detección para el reconocimiento de la eSAAr y la eSAA.

Como primer paso de la optimización del ELISA se evaluó la capacidad de este inmunoensayo en reconocer un amplio rango de concentraciones de eSAAr (5 ng/mL, 50 ng/mL, 500 ng/mL y 1000 ng/mL) al sensibilizar las placas de microtitulación con 1 µg, 0.25 µg o 0.1 µg de anticuerpo anti-p58-eSAA a fin de decidir cuanto anticuerpo por pozo era necesario para capturar al antígeno con suficiente sensibilidad. El ensayo se realizó como se describe en punto 4.3.3.2 pero en este caso se utilizó el anticuerpo de revelado (anti-p88-eSAA) a una dilución 1/5000 y la reacción de revelado con el sustrato duró 8 min. A continuación, se estudió el efecto matriz de las muestras de suero, para esto se preparó un pool de sueros de esturión ruso (SEp) utilizando sueros sin niveles detectables de eSAA por *Western Blot*. Luego, se prepararon las diluciones de trabajo de eSAAr (empleadas para la construcción de la curva estándar en 4.3.3.2), utilizando como diluyente el tampón de dilución o el SEp previamente diluido 1/5, 1/20, 1/100, 1/200, 1/500 en dicho tampón. El ensayo se realizó como se describe en punto 4.3.3.2 pero en este caso la incubación con el sustrato duró 8 min. Por otro lado, se ajustó la concentración del anticuerpo de captura y el tiempo de reacción con la peroxidasa que definió las condiciones descritas en 3.3.2. Tomando en cuenta datos previos sobre la concentración de anticuerpo utilizada en ensayos de *Western Blot* se ensayaron diluciones 1/2500 o 1/5000 del anticuerpo anti-p88-eSAA biotinilado y se analizaron tiempos de revelado de 10 o 15 min.

Para determinar el límite de detección de la eSAAr se cuantificó el estándar en 5 ensayos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado. A continuación, se interpoló en cada una de estas 5 gráficas el valor de absorbancia a 450 nm correspondiente al promedio del blanco más 3 desvíos estándares. Los 5 valores interpolados se promediaron, se calculó el desvío estándar y se determinó y a partir de estos se determinó el límite de detección. Para estimar el límite de detección de la eSAA en las muestras de suero, se utilizó una dilución de un suero de esturión ruso, sin niveles detectables de eSAA por *Western Blot* y suplementado con concentraciones conocidas de eSAAr (0.69 y 500 ng/ml).

4.4. Cuarta Sección

En esta sección se describen las técnicas generales de biología molecular y bioquímica empleadas para llevar adelante los estudios.

4.4.1. Preparación y obtención de células de *E. coli* quimio-competentes

Se prepararon células *E.coli* DH5α y células *E coli* BL21 (DE3) Star quimiocompetentes utilizando el método de CaCl₂²⁴⁴. Se inoculó un tubo de 3 mL de medio LB (Tryptona 1% m/v, extracto de levadura 0.5% m/v, NaCl 1% m/v) con una colonia fresca de la cepa *E.coli* DH5α o *E coli* BL21 (DE3) Star. Se dejó crecer toda la noche a 37°C y 200 rpm de agitación. Al día siguiente se inocularon 250 mL de LB en un matraz de 1 L, con 2.5 mL (1/100) del precultivo. Se creció el cultivo a 37°C hasta alcanzar una turbidez a 600nm igual a 0.3. Se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. A partir de ese momento las células y reactivos se mantuvieron en hielo. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 100 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril, agregando de a poco hasta resuspender el pellet. Posteriormente

se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 mL de CaCl₂ 0.1 M. Se incubó 1 hr a 4°C en la solución de CaCl₂ 0.1 M. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendió el pellet en 3 mL de CaCl₂ con glicerol estéril 20% (m/v). Finalmente, se prepararon alícuotas (50 µL) de la suspensión de bacterias quimiocompetentes en tubos eppendorf pre-enfriados en hielo, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

4.4.2. Transformación química de *E. coli* con los vectores de interés

Se transformaron bacterias *E. coli* quimiocompetentes de la cepa DH5α o de la cepa BL21 (DE3) Star con los distintos vectores de interés, por shock térmico²⁴⁵. A tales efectos se descongeló en hielo una alícuota de *E. Coli* DH5α o BL21 (DE3) Star quimiocompetentes, se agregó el vector de interés (5 µL del producto de clonado digerido con la enzima DpnI o 1 µL de los correspondientes plásmidos purificados conteniendo del orden de 30-100 ng/µL de ADN) y se incubaron las células durante 30 min en hielo. A continuación, se realizó un shock térmico a 42°C en baño de agua durante 90 s. Finalizada esta incubación, las bacterias se enfriaron en hielo durante 2 min. Inmediatamente después se agregaron 500 µL de medio de cultivo líquido LB y se recuperó a las bacterias incubándolas a 37°C durante 1 hr y bajo 200 rpm de agitación. Pasado este tiempo, se sembraron 150 µL de la suspensión bacteriana en placas de LB agar (medio LB + agar 1.5% m/v) conteniendo ampicilina 100 µg/mL. Las placas se incubaron 24 hs en estufa a 37°C y posteriormente se evaluó el crecimiento de las colonias transformantes.

4.4.3. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se realizó de acuerdo a²⁴⁵. Los geles se prepararon con agarosa al 1 o 1.5% en tampón TAE 1X (Tris-Base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 45 Volts durante 45 min y a temperatura ambiente utilizando un sistema horizontal (Bio-Rad, 1704405). Los productos correspondientes a la PCR, PCR cuantitativa o a las extracciones de ARN total se disolvieron en solución amortiguadora de muestra 6X (Tris-HCl 10mM, pH 7.6, azul de bromofenol 0.030%; xileno cianol FF 0.030%; glicerol 60% y EDTA 60mM). Cuando fue pertinente, las muestras analizadas se corrieron junto al patrón de tamaño molecular GeneRuler 1kb (ThermoScientific #SM0311) o Hyperladder II (Bioline BIO-33039). Los geles se tiñeron con el agente intercalante GoodView (Sbs HGV-2) y se visualizaron en UV con la cámara fotográfica gbox (Syngene) o, cuando se quiso extraer y purificar una banda del gel, con luz led azul en un transiluminador (FastGene GelPic LED, NIPPON Genetics). Alternativamente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (ThermoScientific, 15585011) y se visualizaron al UV en un transiluminador (BioRad). Los geles se fotografiaron con cámara de celular (modelo iPhone 6)

4.4.4. Extracción y purificación de ARN total

La extracción y purificación de ARN total de hígado, bazo, riñón anterior, cerebro y branquias de esturión ruso se realizó utilizando el reactivo comercial RNeasy mini kit (Qiagen, #74106), que provee todos los tampones y las microcolumnas de sílica necesarias para la purificación siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, los tejidos congelados en RNAlater a -80°C (punto 4.1.4.4)

se descongelaron, cortaron en pequeños trozos y pesaron en balanza analítica hasta alcanzar unos 15-30 mg de tejido por muestra. A continuación, se agregaron 700 μl del tampón de lisis y los tejidos se disgregaron y homogenizaron utilizando un homogenizador eléctrico (Qiagen, 9002755). Posteriormente, el ARN total se purificó por adsorción sobre microcolumnas de sílica. La muestra obtenida se analizó por electroforesis en geles de agarosa (punto 4.4.3) para verificar la integridad y pureza del ARN total en base a la presencia de las bandas correspondientes a las subunidades 18s y 28s del ARN ribosomal y a la ausencia de manchas (en inglés descritas como *smears*) compatibles con productos de degradación. Además, se verificó que no hubiese contaminación significativa con ADN genómico. En aquellos casos en que el análisis electroforético mostró una significativa contaminación con ADN genómico, las muestras se adsorbieron a microcolumnas de sílica y trataron con ADNasa I (Qiagen, #79254) durante 15 minutos. Luego del tratamiento se realizaron varios pasos de lavado y se eluyó el ARN total con agua ultrapura. En todos los casos el ARN total obtenido se cuantificó en el equipo Nanodrop (ThermoScientific) y se determinó el grado de contaminación de proteínas y moléculas orgánicas pequeñas mediante los cocientes $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ y $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{230\text{nm}}$, respectivamente.

4.4.5. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó a partir de las muestras de ARN total obtenidas en el punto anterior. Para ésta y todas las reacciones que incluyeron ARN o ADNc se utilizó agua ultrapura libre de ADNasas y ARNasas (Gibco). Para eliminar cualquier resto de ADN genómico de las muestras, se trató 1 μg de ARN total con 0.4 μl de ADNasa I 1U/ μl (ThermoScientific, #EN0521) en el tampón de reacción de la ADNasa suministrado por el reactivo comercial. La enzima se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente y se finalizó la reacción agregando 1 μl de EDTA 50 mM e inactivando la enzima a 65°C durante 10 min en un termociclador (Bioer, LifeECO). A continuación, para sintetizar ADNc de hebra simple, las muestras de ARN total tratadas con ADNasa I se retrotranscribieron con la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen, #28025-021). A tales efectos, a la mezcla de reacción anterior se le agregaron los siguientes reactivos: 1 μl de dNTPs 10 μM (SBS, EN-2), 1 μl de cebadores aleatorios hexaméricos 100 μM (Macrogen), 4 μl de tampón primera hebra 5X, 2 μl de DTT 0.1 M, 1 μl de inhibidor recombinante de ribonucleasas 40 U/ μl (Invitrogen, #10777-019) y 1 μl de la retrotranscriptasa M-MLV 200U/ μl . La síntesis de ADNc se realizó en el mismo termociclador con el siguiente programa: 10 min a 25°C para permitir la unión de los cebadores, luego 50 min a 37°C para permitir la síntesis de la primera hebra de ADNc y un último paso de 15 min a 70°C para inactivar la retrotranscriptasa. Finalizada la síntesis de ADNc, las muestras se llevaron a un volumen final de 100 μl con agua ultrapura. Para controlar si el tratamiento con ADNasa I fue efectivo en eliminar posibles contaminantes de ADN genómico, una muestra representativa de ARN total (punto 4.4.4) se sometió a los siguientes tratamientos: Tratada con ADNasa I y retrotranscriptasa (A+RT+), sólo con retrotranscriptasa (A-RT+), sólo con ADNasa (A+RT-), ni con ADNasa ni con retrotranscriptasa (A-RT-). En cada una de estas 4 reacciones, se analizó la expresión del gen *saa* para el cual se determinó que los cebadores diseñados permiten, en caso que lo hubiera, amplificar ADN genómico.

4.4.6. Electroforesis utilizando el sistema Tris-Tricina-SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes, con SDS y Tricina (Tris-Tricina-SDS-PAGE) se realizó de acuerdo a²⁴⁶. Brevemente, se emplearon geles concentradores y separadores de acrilamida de 1 mm de espesor al 4% (m/v) y 16% (m/v), respectivamente. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en el sistema *Mini Protean Tetra Cell* (Bio-Rad), aplicando voltajes constantes de 35 y 200 Volts para el gel concentrador y separador, respectivamente. Para la corrida electroforética se empleó amortiguador cátodo (Tris-HCl 100 mM, Tricina 100 mM, pH 8.25, SDS 0.1% m/v) y amortiguador ánodo (Tris-HCl 100 mM, HCl 22.5 mM pH 8.9) los cuales se depositaron en la cámara pequeña (contiene al gel) y grande de la cuba de electroforesis, respectivamente. Las muestras se disolvieron directamente en el tampón muestra utilizando un stock 4x (Tris-HCl 150 mM pH 7.0, SDS 12%, DTT 50 mM, glicerol 30% m/v, Coomassie blue G-250 0.05%), se calentaron a 95°C durante 5 min y se dejaron enfriar hasta ser sembradas en el gel junto a un patrón de peso molecular (Sigma, #S8445 o ThermoScientific, #26619). Finalizada la electroforesis se fijaron las proteínas en solución de fijación (ácido acético 10% v/v, etanol 40% v/v), durante 30 min a temperatura ambiente. Las proteínas se tiñeron en solución de Coomassie coloidal (sulfato de amonio 8%, ácido fosfórico 0.8%, azul de Coomassie G-250 0.08%, etanol 20%) durante 24-72 hs. Finalizada la incubación se removieron los restos de colorante utilizando lavados sucesivos con agua destilada y se fotografió el gel con la cámara fotográfica del celular (modelo iPhone 6).

4.4.7. Electroforesis utilizando el sistema Laemmli SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes, con SDS (SDS-PAGE) se realizó como fue descrito en²⁴⁷. Brevemente, se emplearon geles de acrilamida concentradores y separadores de 1.5 mm de espesor al 4% (m/v) y 15% (m/v), respectivamente. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en el sistema *Mini Protean Tetra Cell* (Bio-Rad), aplicando un voltaje constante de 60 y 180 Volts para el gel concentrador y separador, respectivamente. Para la corrida electroforética se empleó el tampón de electroforesis (Tris-Base 25mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1%) en ambas cámaras del sistema. Las muestras se disolvieron en tampón de muestra utilizando tapón de muestra stock 6X (Tris-HCl 200 mM pH 8, urea 8 M, SDS al 0.2 %, DTT 50 mM, conteniendo azul de bromofenol), se calentaron a 85°C durante 7 min y se corrieron junto a un marcador de peso molecular (ThermoScientific, #26616). Los geles de SDS-PAGE se utilizaron para el análisis por *Western Blot* tal como se describe a continuación.

4.4.8. Western Blots

Las muestras a analizar por *Western Blot* se separaron por SDS-PAGE según se describió arriba, al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a membranas de PVDF (Millipore, #IPVH00010). Para esto, primero se incubaron las membranas de PVDF con metanol absoluto durante 10 min. Luego el gel de poliacrilamida obtenido y las membranas de PVDF se equilibraron con solución de transferencia (Tris base 48 mM, glicina 39 mM y metanol al 20% v/v) y se dispusieron en el *cassette* de transferencia entre papeles de filtro embebidos en la misma solución. Las transferencias se realizaron utilizando el equipo *Mini Protean Tetra Cell and Blot Module* (Bio-Rad) a razón de 56 Volts constantes durante toda la noche y a 4°C. Una vez finalizado el proceso, se incubaron las membranas en solución de bloqueo (PBS conteniendo Tween₂₀ al 0.05% m/v y BSA al 0.2% m/v) durante 1 hr a temperatura ambiente. A continuación, las membranas bloqueadas se lavaron 4 veces con 50 mL de

solución de lavado (PBS conteniendo Tween₂₀ al 0.05% m/v) durante 5 min con agitación. Luego, se incubaron con 2 mL del anticuerpo primario anti-p58-eSAA (1/5000 en solución de bloqueo) o anti-p88-eSAA (1/2500 en solución de bloqueo) o anti-p88-eSAA biotinilado (1/3000 en solución de bloqueo), durante 1 hr a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, se lavaron las membranas 4 veces con solución de lavado. Para detectar la unión del anticuerpo primario anti-p58-eSAA y anti-p88-eSAA o anti-p88-eSAA biotina, las membranas se incubaron con 2 mL de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401393, 1/2000 en solución de bloqueo) o streptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma, #S-5512, 0.2 µg/mL en solución de bloqueo), respectivamente. En ambos casos la incubación se realizó durante 1 hr a temperatura ambiente, siempre con agitación. Luego se realizaron 4 lavados en condiciones iguales a las anteriores y se reveló mediante el agregado de sustrato quimioluminiscente (*ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate*, ThermoScientific Pierce, #34078). Los *Western Blot* se visualizaron y fotografiaron en un equipo Gbox (Syngene) registrando la señal de luz proveniente del sustrato cada 30 s durante 5 min. Cuando correspondió las bandas de interés se cuantificaron por densitometría utilizando el programa ImageJ²⁴⁸.

4.4.9. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford²⁴⁹ adaptado a placas de microtitulación de 96 pocillos. Las muestras problema y las diluciones del estándar de BSA (rango de 50 µg/mL a 1000 µg/mL) se analizaron por triplicado. A 10 µL de cada muestra se le agregaron 200 µL del reactivo de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 10% m/v disuelto en una mezcla de etanol 95%, ácido fosfórico 85% y agua miliQ a una relación 5:10:85, respectivamente). Se dejó reaccionar 5 min y se registró la Abs_{595nm} utilizando un lector para placas de microtitulación (ThermoScientific, VariosKan). Se graficaron los valores de Abs_{595nm} de las muestras del estándar de BSA en función de la concentración de BSA respectiva y se ajustó la curva a una ecuación cuadrática de $Abs = a[BSA]^2 + b[BSA] + c$ (siendo a, b y c constantes) utilizando el programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA)²⁵⁰. A partir del ajuste anterior se determinó la concentración de proteínas en las muestras problema.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Bemis, W. E. & Kynard, B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Environ Biol Fish* **48**, 167–183 (1997).
2. Billard, R., Fisheries, G. L. R. I. F. B. A. 2000. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Springer* doi:10.1023/A:1012231526151
3. Bemis, W. E., Findeis, E. K. & Grande, L. An overview of Acipenseriformes. *Sturgeon biodiversity and conservation* **17**, 25–71 (1997).
4. Near, T. J. *et al.* Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 13698–13703 (2012).
5. Sallan, L. C. Major issues in the origins of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity. *Biol Rev Camb Philos Soc* **89**, 950–971 (2014).
6. fossils, B. G. L. 1984. Sturgeons as living fossils. *Springer* doi:10.1641/0006-3568(2003)053[0265:lfolba]2.0.co;2?ref=search-gateway:443b299b503f10e45a2878eb30d91857
7. Krieger, J. & Fuerst, P. A. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order acipenseriformes. *Mol Biol Evol* **19**, 891–897 (2002).
8. Peng, Z. *et al.* Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* **42**, 854–862 (2007).
9. Hilton, E. J., Paleontology, L. G. J. O. 2006. Review of the fossil record of sturgeons, family Acipenseridae (Actinopterygii: Acipenseriformes), from North America. *cambridge.org* doi:10.1666/0022-3360(2006)80%5B672:ROTFRO%5D2.0.CO;2
10. Jarić, I. & Gessner, J. Analysis of publications on sturgeon research between 1996 and 2010. *Scientometrics* **90**, 715–735 (2011).
11. Krieger, J., Hett, A. K., Fuerst, P. A., Artyukhin, E. & Ludwig, A. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 36–45 (2008).
12. Fontana, F. A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. *Journal of Applied Ichthyology* **18**, 226–233 (2002).
13. Kim, D. S., Nam, Y. K., Noh, J. K., Park, C. H. & Chapman, F. A. Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes. *Ichthyol Res* **52**, 94–97 (2005).
14. Rajkov, J., Shao, Z. & Berrebi, P. Evolution of Polyploidy and Functional Diploidization in Sturgeons: Microsatellite Analysis in 10 Sturgeon Species. *Journal of Heredity* (2014). doi:10.1093/jhered/esu027
15. Vasil'ev, V. P. in *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* **29**, 97–117 (Springer, Dordrecht, 2009).
16. Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C. & Genthon, C. De novo transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **268**, 96–109 (2018).

17. Chen, Y. *et al.* Gonadal transcriptome sequencing of the critically endangered *Acipenser dabryanus* to discover candidate sex-related genes. *PeerJ* **6**, e5389 (2018).
18. Chen, Y. *et al.* Discovery and identification of candidate sex-related genes based on transcriptome sequencing of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) gonads. *Physiol Genomics* **48**, 464–476 (2016).
19. Song, W., Jiang, K., Zhang, F., Lin, Y. & Ma, L. RNA-sequencing of the sturgeon *Acipenser baeri* provides insights into expression dynamics of morphogenic differentiation and developmental regulatory genes in early versus late developmental stages. *BMC Genomics* **17**, 564 (2016).
20. Jin, S. B. *et al.* Comparative transcriptome analysis of testes and ovaries for the discovery of novel genes from Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Genet. Mol. Res.* **14**, 18913–18927 (2015).
21. Yue, H., Li, C., Du, H., Zhang, S. & Wei, Q. Sequencing and De Novo Assembly of the Gonadal Transcriptome of the Endangered Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*). *PLoS ONE* **10**, e0127332–e0127332 (2015).
22. Vidotto, M. *et al.* Transcriptome sequencing and de novo annotation of the critically endangered Adriatic sturgeon. *BMC Genomics* **14**, 407–407 (2013).
23. Song, W., Jiang, K., Zhang, F., Lin, Y. & Ma, L. Transcriptome Sequencing, De Novo Assembly and Differential Gene Expression Analysis of the Early Development of *Acipenser baeri*. *PLoS ONE* **10**, e0137450 (2015).
24. Luo, K. *et al.* Transcriptome analysis of the critically endangered Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) head kidney response to *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* **83**, 249–261 (2018).
25. Li, S. *et al.* Transcriptome profile of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) liver provides insights into immune modulation in response to *Yersinia ruckeri* infection. *Aquaculture* **492**, 137–146 (2018).
26. Li, S. *et al.* Transcriptome profiles of Amur sturgeon spleen in response to *Yersinia ruckeri* infection. *Fish and Shellfish Immunology* **70**, 451–460 (2017).
27. Zhu, R. *et al.* De novo annotation of the immune-enriched transcriptome provides insights into immune system genes of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Fish and Shellfish Immunology* **55**, 699–716 (2016).
28. Pikitch, E. K., Doukakis, P., and, L. L. F. 2005. Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Wiley Online Library*
29. Bronzi, P., Rosenthal, H. & Gessner, J. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology* **27**, 169–175 (2011).
30. Bronzi, P. & Rosenthal, H. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview. *Journal of Applied Ichthyology* **30**, 1536–1546 (2014).
31. Sicuro, B. The future of caviar production on the light of social changes: a new dawn for caviar? *Rev Aquacult* **58**, 5276–16 (2018).
32. Secombes, C. J. & Wang, T. in *Infectious Disease in Aquaculture* 3–68 (Elsevier, 2012). doi:10.1533/9780857095732.1.3
33. Flajnik, M. F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics* **11**, 47–59 (2010).
34. Buchmann, K. Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front Immunol* **5**, 459–459 (2014).
35. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–298 (1997).
36. Li, Y., Li, Y., Cao, X., Jin, X. & Jin, T. Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. **14**, 80–89 (2016).

37. Magor, B. G. & Magor, K. E. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 651–682 (2001).
38. Plouffe, D. A., Hanington, P. C., Walsh, J. G., Wilson, E. C. & Belosevic, M. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. **12**, 266–277 (2005).
39. Gabay, C. & Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**, 448–454 (1999).
40. Cooper, M. D. & Alder, M. N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815–822 (2006).
41. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575–581 (1983).
42. Ahmed, R. & Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**, 54–60 (1996).
43. Raida, M. K. & Buchmann, K. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Developmental and Comparative Immunology* **33**, 35–45 (2009).
44. Lund, H. *et al.* A time-course study of gene expression and antibody repertoire at early time post vaccination of Atlantic salmon. *Molecular Immunology* **106**, 99–107 (2019).
45. Sunyer, J. O. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat Immunol* **14**, 320–326 (2013).
46. Magadan, S., Sunyer, O. J. & Boudinot, P. Unique Features of Fish Immune Repertoires: Particularities of Adaptive Immunity Within the Largest Group of Vertebrates. *Results Probl Cell Differ* **57**, 235–264 (2015).
47. Wienholds, E., Schulte-Merker, S., Walderich, B. & Plasterk, R. H. A. Target-selected inactivation of the zebrafish rag1 gene. *Science* **297**, 99–102 (2002).
48. Jima, D. D. *et al.* Enhanced transcription of complement and coagulation genes in the absence of adaptive immunity. *Molecular Immunology* **46**, 1505–1516 (2009).
49. Swaim, L. E. *et al.* Mycobacterium marinum infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect. Immun.* **74**, 6108–6117 (2006).
50. Palti, Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Developmental and Comparative Immunology* **35**, 1263–1272 (2011).
51. Magnadóttir, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 137–151 (2006).
52. Nakao, M. *et al.* Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol.* **177**, 5471–5479 (2006).
53. Sunyer, J. O., Zarkadis, I. K., Sahu, A. & Lambris, J. D. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8546–8551 (1996).
54. Callewaert, L. & Michiels, C. W. Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* **35**, 127–160 (2010).
55. Ragland, S. A. & Criss, A. K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* **13**, e1006512 (2017).
56. Zerbino, D. R. *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
57. Samy, J. K. A. *et al.* SalmoBase: an integrated molecular data resource for Salmonid species. *BMC Genomics* **18**, 482 (2017).
58. Saurabh, S. & Sahoo, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* **39**, 223–239 (2008).
59. Wang, R. *et al.* Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology* **35**, 136–145 (2013).

60. Gao, F.-Y. *et al.* Identification and expression analysis of three c-type lysozymes in *Oreochromis aureus*. *Fish and Shellfish Immunology* **32**, 779–788 (2012).
61. SHUGAR, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 302–309 (1952).
62. Castellano, M. *Estudio de dos componentes de las defensas innatas del esturión cultivado en un establecimiento de piscicultura en Uruguay*. 1–69 (2015).
63. Ricklin, D. & Lambris, J. D. Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1265–1275 (2007).
64. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* **11**, 785–797 (2010).
65. Trouw, L. A. & Daha, M. R. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol. Lett.* **138**, 35–37 (2011).
66. Sarma, J. V. & Ward, P. A. The complement system. *Cell Tissue Res.* **343**, 227–235 (2011).
67. Gros, P., Milder, F. J. & Janssen, B. J. C. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* **8**, 48–58 (2008).
68. Janssen, B. J. C., Christodoulidou, A., McCarthy, A., Lambris, J. D. & Gros, P. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* **444**, 213–216 (2006).
69. Law, S. K. & Dodds, A. W. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* **6**, 263–274 (1997).
70. Tegla, C. A. *et al.* Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res* **51**, 45–60 (2011).
71. Kazatchkine, M., Hauptmann, G. & Nydegger, U. *Techniques du complément*. (1985).
72. Haas, P.-J. & van Strijp, J. Anaphylatoxins. *Immunol Res* **37**, 161–175 (2007).
73. Degn, S. E. & Thiel, S. Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand. J. Immunol.* **78**, 181–193 (2013).
74. Pangburn, M. K., Schreiber, R. D. & Müller-Eberhard, H. J. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* **154**, 856–867 (1981).
75. Zhang, S. & Cui, P. Complement system in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology* **46**, 3–10 (2014).
76. Nakao, M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T. K. & Somamoto, T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental and Comparative Immunology* **35**, 1296–1308 (2011).
77. Abelseh, T. K. *et al.* The spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) complement component C3: isolation, characterisation and tissue distribution. *Fish and Shellfish Immunology* **15**, 13–27 (2003).
78. Sunyer, J. O., Tort, L. & Lambris, J. D. Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochem. J.* **326 (Pt 3)**, 877–881 (1997).
79. Løvoll, M., Dalmo, R. A. & Børgwald, J. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* **23**, 721–731 (2007).
80. Kumar, R., Sahoo, P. K. & Barat, A. Transcriptome profiling and expression analysis of immune responsive genes in the liver of Golden mahseer (*Tor putitora*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* **67**, 655–666 (2017).
81. Causey, D. R. *et al.* High-throughput proteomic profiling of the fish liver following bacterial infection. *BMC Genomics* **19**, 719 (2018).

82. Pionnier, N. *et al.* C-reactive protein and complement as acute phase reactants in common carp *Cyprinus carpio* during CyHV-3 infection. *Dis. Aquat. Org.* **109**, 187–199 (2014).
83. Yadav, M. K. *et al.* Innate immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* infected with oomycete pathogen *Aphanomyces invadans*. *Fish and Shellfish Immunology* **39**, 524–531 (2014).
84. Pionnier, N. *et al.* Dietary β -glucan stimulate complement and C-reactive protein acute phase responses in common carp (*Cyprinus carpio*) during an *Aeromonas salmonicida* infection. *Fish and Shellfish Immunology* **34**, 819–831 (2013).
85. Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A. & Koopmans, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* **6**, 1045–1056 (2005).
86. Koj, A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1317**, 84–94 (1996).
87. Cray, C., Zaias, J. & Altman, N. H. Acute phase response in animals: a review. *Comp. Med.* **59**, 517–526 (2009).
88. Crispe, I. N. Hepatocytes as Immunological Agents. *J Immunol* **196**, 17–21 (2016).
89. Eckersall, P. D. & Bell, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* **185**, 23–27 (2010).
90. Jain, S., Gautam, V. & Naseem, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci* **3**, 118–127 (2011).
91. Bayne, C. J. & Gerwick, L. The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 725–743 (2001).
92. Coetzee, G. A. *et al.* Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J. Biol. Chem.* **261**, 9644–9651 (1986).
93. Sack, G. H. Serum amyloid A - a review. *Mol. Med.* **24**, 46 (2018).
94. Derebe, M. G. *et al.* Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection. *Elife* **3**, e03206–e03206 (2014).
95. Linke, R. P., Meinel, A., Chalcraft, J. P. & Urieli-Shoval, S. Serum amyloid A (SAA) treatment enhances the recovery of aggravated polymicrobial sepsis in mice, whereas blocking SAA's invariant peptide results in early death. *Amyloid* **24**, 149–150 (2017).
96. Badolato, R. *et al.* Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* **180**, 203–209 (1994).
97. Shah, C., Hari-Dass, R. & Raynes, J. G. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* **108**, 1751–1757 (2006).
98. Sandri, S. *et al.* Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1174–1180 (2008).
99. Kebir, El, D. *et al.* Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation. *J. Immunol.* **179**, 616–622 (2007).
100. Frame, N. M., Jayaraman, S., Gantz, D. L. & Gursky, O. Serum amyloid A self-assembles with phospholipids to form stable protein-rich nanoparticles with a distinct structure: A hypothetical function of SAA as a 'molecular mop' in immune response. *J. Struct. Biol.* **200**, 293–302 (2017).
101. Yu, J. *et al.* Cloning, expression analysis, and antibacterial properties of three serum amyloid A in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology* **65**, 267–277 (2017).
102. Revathy, K. S. *et al.* A novel acute phase reactant, serum amyloid A-like 1, from *Oplegnathus fasciatus*: Genomic and molecular characterization and transcriptional expression analysis. *Developmental and Comparative Immunology* **37**, 294–305 (2012).

103. Jensen, L. E. *et al.* Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *J. Immunol.* **158**, 384–392 (1997).
104. Lin, B. *et al.* Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. *Molecular Immunology* **44**, 295–301 (2007).
105. Deban, L., Jaillon, S., Garlanda, C., Bottazzi, B. & Mantovani, A. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res.* **343**, 237–249 (2011).
106. Mantovani, A., Garlanda, C., Doni, A. & Bottazzi, B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J. Clin. Immunol.* **28**, 1–13 (2008).
107. Sproston, N. R. & Ashworth, J. J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* **9**, 754 (2018).
108. Szalai, A. J., VanCott, J. L., McGhee, J. R., Volanakis, J. E. & Benjamin, W. H. Human C-reactive protein is protective against fatal *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in transgenic mice. *Infect. Immun.* **68**, 5652–5656 (2000).
109. Mold, C., Nakayama, S., Holzer, T. J., Gewurz, H. & Clos, Du, T. W. C-reactive protein is protective against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Exp Med* **154**, 1703–1708 (1981).
110. Lee, P. T., Bird, S., Zou, J. & Martin, S. A. M. Phylogeny and expression analysis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-P (SAP) like genes reveal two distinct groups in fish. *Fish and Shellfish Immunology* **65**, 42–51 (2017).
111. Hwang, S. D. *et al.* Gene expression and functional characterization of serum amyloid P component 2 in rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Fish and Shellfish Immunology* **47**, 521–527 (2015).
112. Wang, T. & Sun, L. CsSAP, a teleost serum amyloid P component, interacts with bacteria, promotes phagocytosis, and enhances host resistance against bacterial and viral infection. *Developmental and Comparative Immunology* **55**, 12–20 (2016).
113. Smith, A. & McCulloh, R. J. Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Front Physiol* **6**, 187 (2015).
114. Cassat, J. E. & Skaar, E. P. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* **13**, 509–519 (2013).
115. Wicher, K. B. & Fries, E. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 4168–4173 (2006).
116. Cordero, H., Li, C.-H., Chaves-Pozo, E., Esteban, M. Á. & Cuesta, A. Molecular identification and characterization of haptoglobin in teleosts revealed an important role on fish viral infections. *Developmental and Comparative Immunology* **76**, 189–199 (2017).
117. Jayasinghe, J. D. H. E., Elvitigala, D. A. S., Whang, I., Nam, B.-H. & Lee, J. Molecular characterization of two immunity-related acute-phase proteins: Haptoglobin and serum amyloid A from black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Fish and Shellfish Immunology* **45**, 680–688 (2015).
118. Machado, J. P., Vasconcelos, V. & Antunes, A. Adaptive functional divergence of the warm temperature acclimation-related protein (WAP65) in fishes and the ortholog hemopexin (HPX) in mammals. *J. Hered.* **105**, 237–252 (2014).
119. Sha, Z. *et al.* The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacterial infections. *Molecular Immunology* **45**, 1458–1469 (2008).
120. Cho, Y. S., Kim, B. S., Kim, D. S. & Nam, Y. K. Modulation of warm-temperature-acclimation-associated 65-kDa protein genes (Wap65-1 and Wap65-2) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments. *Fish and Shellfish Immunology* **32**, 662–669 (2012).

121. Michels, K., Nemeth, E., Ganz, T. & Mehrad, B. Hepcidin and Host Defense against Infectious Diseases. *PLoS Pathog.* **11**, e1004998 (2015).
122. Ganz, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* **117**, 4425–4433 (2011).
123. Nemeth, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090–2093 (2004).
124. Drakesmith, H. & Prentice, A. M. Hepcidin and the iron-infection axis. *Science* **338**, 768–772 (2012).
125. Arezes, J. *et al.* Hepcidin-induced hypoferrremia is a critical host defense mechanism against the siderophilic bacterium *Vibrio vulnificus*. *Cell Host Microbe* **17**, 47–57 (2015).
126. Hilton, K. B. & Lambert, L. A. Molecular evolution and characterization of hepcidin gene products in vertebrates. *Gene* **415**, 40–48 (2008).
127. Neves, J. V., Caldas, C., Vieira, I., Ramos, M. F. & Rodrigues, P. N. S. Multiple Hepcidins in a Teleost Fish, *Dicentrarchus labrax*: Different Hepcidins for Different Roles. *J Immunol* **195**, 2696–2709 (2015).
128. Li, H. *et al.* Molecular characterization of hepcidin gene in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and its expression pattern responding to bacterial challenge. *Fish and Shellfish Immunology* **35**, 1030–1038 (2013).
129. Santana, P. A., Álvarez, C. A., Guzmán, F. & Mercado, L. Development of a sandwich ELISA for quantifying hepcidin in Rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* **35**, 748–755 (2013).
130. Álvarez, C. A., Santana, P. A., Guzmán, F., Marshall, S. & Mercado, L. Detection of the hepcidin prepropeptide and mature peptide in liver of rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology* **41**, 77–81 (2013).
131. Wei, X. *et al.* Hepcidin protects grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) against *Flavobacterium columnare* infection via regulating iron distribution and immune gene expression. *Fish and Shellfish Immunology* **75**, 274–283 (2018).
132. Tsuji, S. *et al.* Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **276**, 23456–23463 (2001).
133. Wesener, D. A. *et al.* Recognition of microbial glycans by human intelectin-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 603–610 (2015).
134. Stelzer, G. *et al.* The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics* **54**, 1.30.1–1.30.33 (2016).
135. Finger, J. H. *et al.* The mouse Gene Expression Database (GXD): 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **45**, D730–D736 (2017).
136. Uhlén, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419–1260419 (2015).
137. Bin Lin *et al.* Characterization and comparative analyses of zebrafish intelectins: Highly conserved sequences, diversified structures and functions. *Fish and Shellfish Immunology* **26**, 396–405 (2009).
138. Peatman, E. *et al.* Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium. *Developmental and Comparative Immunology* **31**, 1183–1196 (2007).
139. RUSSELL, S., Young, K. M., Smith, M., Hayes, M. A. & Lumsden, J. S. Identification, cloning and tissue localization of a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intelectin-like protein that binds bacteria and chitin. *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 91–105 (2008).
140. RUSSELL, S., Hayes, M. A. & Lumsden, J. S. Immunohistochemical localization of rainbow trout ladderlectin and intelectin in healthy and infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* **26**, 154–163 (2009).
141. Gomme, P. T., McCann, K. B. & Bertolini, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today* **10**, 267–273 (2005).

142. Gkouvatso, K., Papanikolaou, G. & Pantopoulos, K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *BBA - General Subjects* **1820**, 188–202 (2012).
143. Liu, H. *et al.* Structure and expression of transferrin gene of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish and Shellfish Immunology* **28**, 159–166 (2010).
144. Poochai, W., Choowongkomon, K., Srisapoom, P., Unajak, S. & Areechon, N. Characterization and expression analysis of the transferrin gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its upregulation in response to *Streptococcus agalactiae* infection. *Fish Physiology and Biochemistry* **40**, 1473–1485 (2014).
145. Yin, X. *et al.* Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology* **74**, 530–539 (2018).
146. Braceland, M. *et al.* The serum proteome of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during pancreas disease (PD) following infection with salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3). *J Proteomics* **94**, 423–436 (2013).
147. Neves, J. V., Wilson, J. M. & Rodrigues, P. N. S. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. *Developmental and Comparative Immunology* **33**, 848–857 (2009).
148. Wang, L. *et al.* Proteome profiling reveals immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Edwardsiella tarda* by iTRAQ analysis. *Fish and Shellfish Immunology* **66**, 325–333 (2017).
149. Samygina, V. R. *et al.* Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins. *PLoS ONE* **8**, e67145–e67145 (2013).
150. Linder, M. C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics* **8**, 887–905 (2016).
151. chemistry, J. G. J. O. B. 1988. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *ASBMB*
152. Gutteridge, J. M. C. & Stocks, J. Caeruloplasmin: Physiological and Pathological Perspectives. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **14**, 257–329 (2008).
153. Das, S. & Sahoo, P. K. Ceruloplasmin, a moonlighting protein in fish. *Fish and Shellfish Immunology* **82**, 460–468 (2018).
154. Sunderman, F. W. & Nomoto, S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin. Chem.* **16**, 903–910 (1970).
155. Castellano, M. *et al.* Aquaculture of russian sturgeon in uruguay: Decrease of the innate defenses in summer and its association with high temperatures. *Fish and Shellfish Immunology* **53**, 88–89 (2016).
156. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *2018 The State of World Fisheries and Aquaculture*. (Food & Agriculture Org., 2018).
157. Perretta, A., Antúnez, K. & Zunino, P. Phenotypic, molecular and pathological characterization of motile aeromonads isolated from diseased fishes cultured in Uruguay. *Journal of Fish Diseases* **41**, 1559–1569 (2018).
158. Hurvitz, A., Jackson, K., Yom-Din, S. & Degani, G. Sexual development in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstadtii*) grown in aquaculture. *Cybium* **32**, 283–285 (2008).
159. Castellano, M. *et al.* Russian sturgeon cultured in a subtropical climate shows weakened innate defences and a chronic stress response. *Fish and Shellfish Immunology* **68**, 443–451 (2017).
160. Sokolova, I. M. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr. Comp. Biol.* **53**, 597–608 (2013).
161. Van Weerd, J. H., Molecular, J. K. B. A. P. P. A. 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Elsevier* doi:10.1016/S1095-6433(98)10017-X
162. Chebanov, M. S. & Galich, E. V. Sturgeon hatchery manual. *FAO* (2011). doi:10.2307/1941826?ref=no-x-route:7f9aa9398f3c0a8e55f63d5aa32159f7

163. Tort, L. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology* **35**, 1366–1375 (2011).
164. Schulte, P. M. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J Exp Biol* **217**, 23–34 (2014).
165. Khoshbavar-Rostami, H. A., Soltani, M. & Hassan, H. M. D. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. *Journal of Fish Biology* **70**, 1931–1938 (2007).
166. Jiang, N. *et al.* Transcriptome analysis of *Aeromonas hydrophila* infected hybrid sturgeon (*Huso dauricus*×*Acipenser schrenckii*). *Sci Rep* **8**, 17925 (2018).
167. Reyes-Cerpa, S. *et al.* in *New Advances and Contributions to Fish Biology* (InTech, 2012). doi:10.5772/53504
168. Valore, E. V. & Ganz, T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol. Dis.* **40**, 132–138 (2008).
169. van den Ent, F. & Löwe, J. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **67**, 67–74 (2006).
170. Correa, A. *et al.* Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Front Microbiol* **5**, 67–67 (2014).
171. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
172. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* **3**, 1101–1108 (2008).
173. Dang, W. & Sun, L. Determination of internal controls for quantitative real time RT-PCR analysis of the effect of *Edwardsiella tarda* infection on gene expression in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology* **30**, 720–728 (2011).
174. Yang, C. G. *et al.* Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene* **527**, 183–192 (2013).
175. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
176. Malle, E. *et al.* Mapping of antigenic determinants of purified, lipid-free human serum amyloid A proteins. *Scand. J. Immunol.* **48**, 557–561 (1998).
177. Larsen, J., Lund, O. & Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. (2006). doi:10.1186/1745-7580-2-2
178. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
179. Ko, J., Park, H., Heo, L. & Seok, C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic Acids Res.* **40**, W294–7 (2012).
180. Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 343–350 (2011).
181. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's Immunobiology, 9th edition.* (Garland Science, 2016).
182. Lu, J., Yu, Y., Zhu, I., Cheng, Y. & Sun, P. D. Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 5189–5194 (2014).
183. Kania, P. W., Chettri, J. K. & Buchmann, K. Characterization of serum amyloid A (SAA) in rainbow trout using a new monoclonal antibody. *Fish and Shellfish Immunology* **40**, 648–658 (2014).
184. Wei, J., Guo, M., Ji, H. & Qin, Q. Molecular cloning, characterization of one key molecule of teleost innate immunity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): serum amyloid A. *Fish and Shellfish Immunology* **34**, 296–304 (2013).

185. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. & Pedersen, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **48**, 1–13 (2006).
186. Young, C. L., Britton, Z. T. & Robinson, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J* **7**, 620–634 (2012).
187. Correa, A. & Oppezzo, P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: advantages of high-throughput screening. *Biotechnol J* **6**, 715–730 (2011).
188. Pattenden, L. K. & Thomas, W. G. Amylose affinity chromatography of maltose-binding protein: purification by both native and novel matrix-assisted dialysis refolding methods. *Methods Mol. Biol.* **421**, 169–189 (2008).
189. Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528–1535 (2007).
190. Bausserman, L. L. & Herbert, P. N. Degradation of serum amyloid A and apolipoproteins by serum proteases. *Biochemistry* **23**, 2241–2245 (1984).
191. Wilkins, J. *et al.* Rapid automated enzyme immunoassay of serum amyloid A. *Clin. Chem.* **40**, 1284–1290 (1994).
192. Zhu, R. *et al.* De novo annotation of the immune-enriched transcriptome provides insights into immune system genes of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Fish and Shellfish Immunology* **55**, 699–716 (2016).
193. Campbell, L. K., Knox, K. W. & Wicken, A. J. Extractability of cell wall polysaccharide from lactobacilli and streptococci by autoclaving and by dilue acid. *Infect. Immun.* **22**, 842–851 (1978).
194. Long, M. *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of splenic immune mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Proteomics* **122**, 41–54 (2015).
195. RUSSELL, S., Hayes, M. A., SIMKO, E. & Lumsden, J. S. Plasma proteomic analysis of the acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to intraperitoneal inflammation and LPS injection. *Developmental and Comparative Immunology* **30**, 393–406 (2006).
196. Villarroel, F. *et al.* Serum amyloid A: a typical acute-phase reactant in rainbow trout? *Developmental and Comparative Immunology* **32**, 1160–1169 (2008).
197. Barton, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 517–525 (2002).
198. Science, F. C. A. A. B.2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Elsevier* doi:10.2307/j.ctv3t5qmj?refreqid=search-gateway:4923a6f91f21996d213bede6e1bd0875
199. Nardocci, G. *et al.* Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish and Shellfish Immunology* **40**, 531–538 (2014).
200. Yin, Z., Lam, T. J. & Sin, Y. M. The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology* **5**, 519–529 (1995).
201. Sun, P., Bao, P. & Tang, B. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under high stocking density stress. *Fish and Shellfish Immunology* **68**, 332–340 (2017).
202. Eissa, N., Wang, H.-P., Yao, H. & Abou-ElGheit, E. Mixed *Bacillus* Species Enhance the Innate Immune Response and Stress Tolerance in Yellow Perch Subjected to Hypoxia and Air-Exposure Stress. *Sci Rep* **8**, 6891 (2018).

203. Philip, A. M., Daniel Kim, S. & Vijayan, M. M. Cortisol modulates the expression of cytokines and suppressors of cytokine signaling (SOCS) in rainbow trout hepatocytes. *Developmental and Comparative Immunology* **38**, 360–367 (2012).
204. Aversa, M. Estudio de la respuesta inmune innata inducida por estrés térmico o componentes bacterianos en el esturión ruso.
205. Arrigucci, R. *et al.* FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of mRNA and protein in single cells using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nat Protoc* **12**, 1245–1260 (2017).
206. Zexia, G. *et al.* Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish Physiology and Biochemistry* **33**, 213–222 (2007).
207. Zhang, D., Xu, D.-H. & Shoemaker, C. Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports* **3**, 18–23 (2016).
208. Nuez-Ortín, W. G., Carter, C. G., Nichols, P. D., Cooke, I. R. & Wilson, R. Liver proteome response of pre-harvest Atlantic salmon following exposure to elevated temperature. *BMC Genomics* **19**, 133 (2018).
209. Szwejsjer, E., Verburg-van Kemenade, B. M. L., Maciuszek, M. & Chadzinska, M. Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. *Hormones and Behavior* **88**, 15–24 (2017).
210. Sajid, M., Kawde, A.-N. & Daud, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* **19**, 689–705 (2015).
211. Brooks, C. L., Rossotti, M. A. & Henry, K. A. Immunological Functions and Evolutionary Emergence of Heavy-Chain Antibodies. *Trends in Immunology* **39**, 956–960 (2018).
212. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
213. Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M. A. & Tabares-da Rosa, S. Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications. *Front Immunol* **8**, 977 (2017).
214. Rossotti, M. A. *et al.* Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays. *Anal. Chem.* **87**, 11907–11914 (2015).
215. Doerflinger, S. Y. *et al.* Development of a Nanobody-Based Lateral Flow Immunoassay for Detection of Human Norovirus. *mSphere* **1**, (2016).
216. Pinto Torres, J. E. *et al.* Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections. *Sci Rep* **8**, 9019 (2018).
217. van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D. & Thermes, C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* **34**, 666–681 (2018).
218. Solden, L., Lloyd, K. & Wrighton, K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Curr. Opin. Microbiol.* **31**, 217–226 (2016).
219. Mason, O. U. *et al.* Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J* **6**, 1715–1727 (2012).
220. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, E63 (2000).
221. Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. & Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* **53**, 1–5 (2015).
222. Wang, Y. *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification Label-Based Gold Nanoparticles Lateral Flow Biosensor for Detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* **8**, 192 (2017).
223. Zhang, J., Cao, J., Zhu, M., Xu, M. & Shi, F. Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Mycoplasma ovipneumoniae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 31 (2019).

224. Afgan, E. *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, W537–W544 (2018).
225. Blankenberg, D. *et al.* A framework for collaborative analysis of ENCODE data: making large-scale analyses biologist-friendly. *Genome Res.* **17**, 960–964 (2007).
226. Cock, P. J. A., Chilton, J. M., Grüning, B., Johnson, J. E. & Soranzo, N. NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *Gigascience* **4**, 39 (2015).
227. Jones, P. *et al.* InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30**, 1236–1240 (2014).
228. Letunic, I. & Bork, P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **46**, D493–D496 (2018).
229. Petersen, T. N., Brunak, S., Heijne, von, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**, 785–786 (2011).
230. Duckert, P., Brunak, S. & Blom, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering, Design and Selection* **17**, 107–112 (2004).
231. Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539–539 (2011).
232. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191 (2009).
233. Bond, S. R. & Naus, C. C. RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Res.* **40**, W209–13 (2012).
234. Owczarzy, R. *et al.* IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* **36**, W163–9 (2008).
235. Bergkessel, M. & Guthrie, C. Colony PCR. *Methods in Enzymology* **529**, 299–309 (2013).
236. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
237. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**, 611–622 (2009).
238. Javahery, S., Nekoubin, H. & Moradlu, A. H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 1545–1552 (2012).
239. Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A. & Söding, J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature Methods* **9**, 173–175 (2011).
240. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* **5**, 172 (2014).
241. van den Berg, S., Löfdahl, P.-Å., Härd, T. & Berglund, H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *Journal of Biotechnology* **121**, 291–298 (2006).
242. Voller, A., Bartlett, A. & Bidwell, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Pathol.* **31**, 507–520 (1978).
243. Pullen, G. R., Fitzgerald, M. G. & Hosking, C. S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *Journal of Immunological Methods* **86**, 83–87 (1986).
244. Mandel, M. & Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* **53**, 159–162 (1970).
245. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning*. (CSHL Press, 2001).
246. Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**, 16–22 (2006).
247. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
248. Rueden, C. T. *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 529 (2017).
249. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).

250. Olson, B. J. S. C. Assays for Determination of Protein Concentration. *Curr Protoc Pharmacol* **73**, A.3A.1–A.3A.32 (2016).

6. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

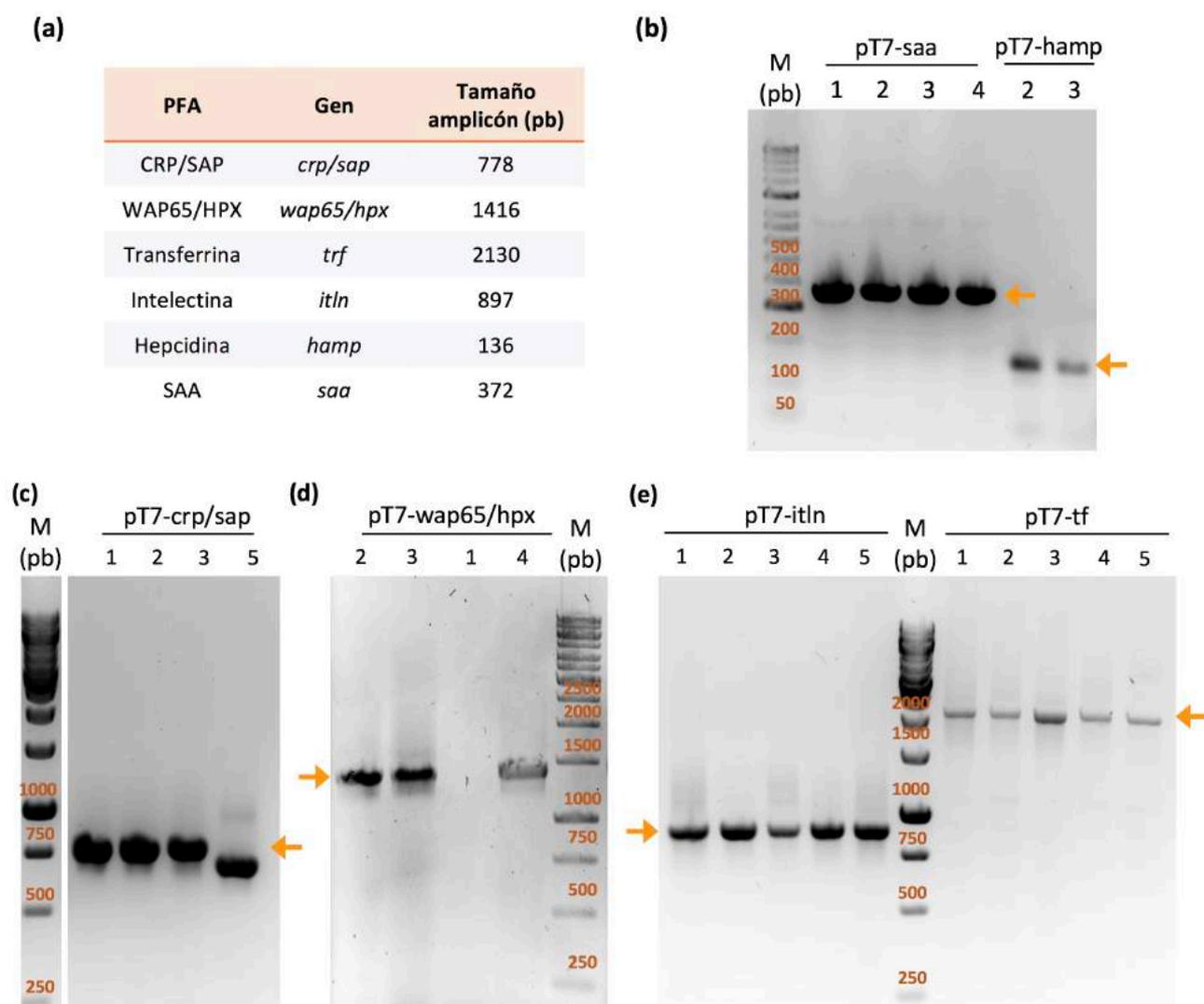


Figura Suplementaria 2.S1. Amplificación por PCR de las PFA de esturión ruso clonadas en el vector pT7

Se amplificaron por PCR de colonia las secuencias de esturión ruso correspondientes a los homólogos de PFA, clonados en el vector pT7. En la tabla (a) se muestra el tamaño esperado de los productos de PCR correspondientes a dichos amplicones. En (b), (c), (d) y (e) se muestra el análisis por electroforesis en geles de agarosa correspondiente a la PCR de varias colonias de *E. coli* (se indica el número de la colonia seleccionada) transformadas con los vectores pT7-saa y pT7-hamp, pT7-crp/sap, pT7-wap65/hpx, pT7-itln y pT7-tf, respectivamente. Las flechas naranjas indican los productos principales de tamaño esperado. Los geles y la electroforesis se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

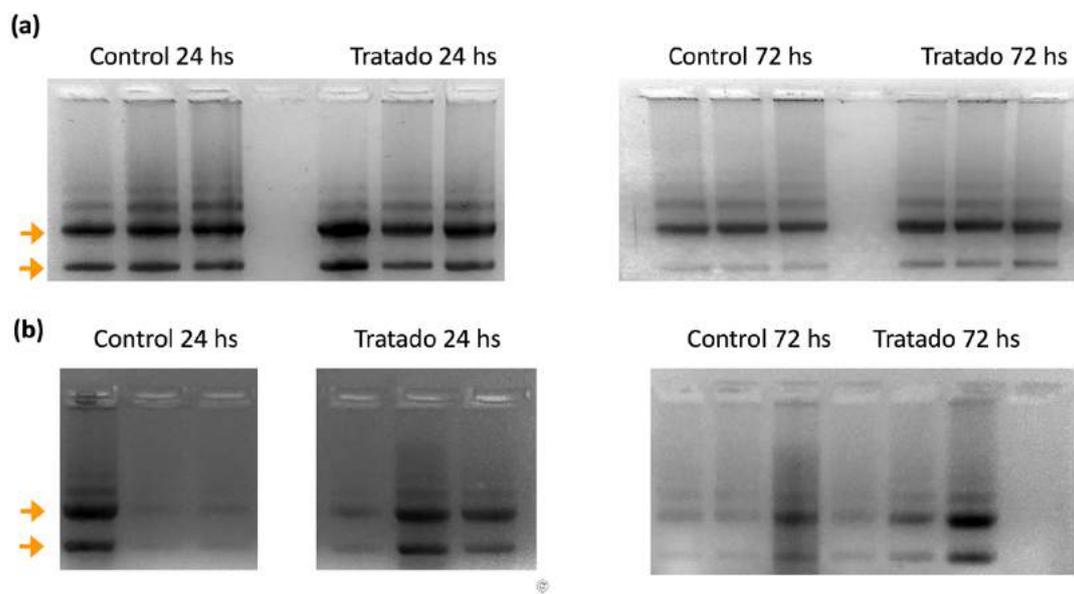


Figura 2.S2. Control de la calidad del ARN total extraído del hígado de esturiones rusos (experimento 1)

Se preparó el ARN total a partir del hígado **(a)** o bazo **(b)** de los peces y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% tal como se describe en Materiales y Métodos. La figura muestra el patrón de bandas obtenidos para las muestras de ARN total de los esturiones inoculados con 10^9 ufc/ml de *A. hydrophila* o PBS estéril como control, obtenidas a las 24 hs y 72 hs post-inoculación. Las flechas naranjas indican la subunidad mayor y menor del ARN ribosomal. Todas las muestras de bazo fueron tratadas con ADNasa I para eliminar la contaminación con ADN genómico previo al análisis por electroforesis. A su vez, las muestras de hígado como las de bazo fueron tratadas con ADNasa I previo a la síntesis de ADNc.

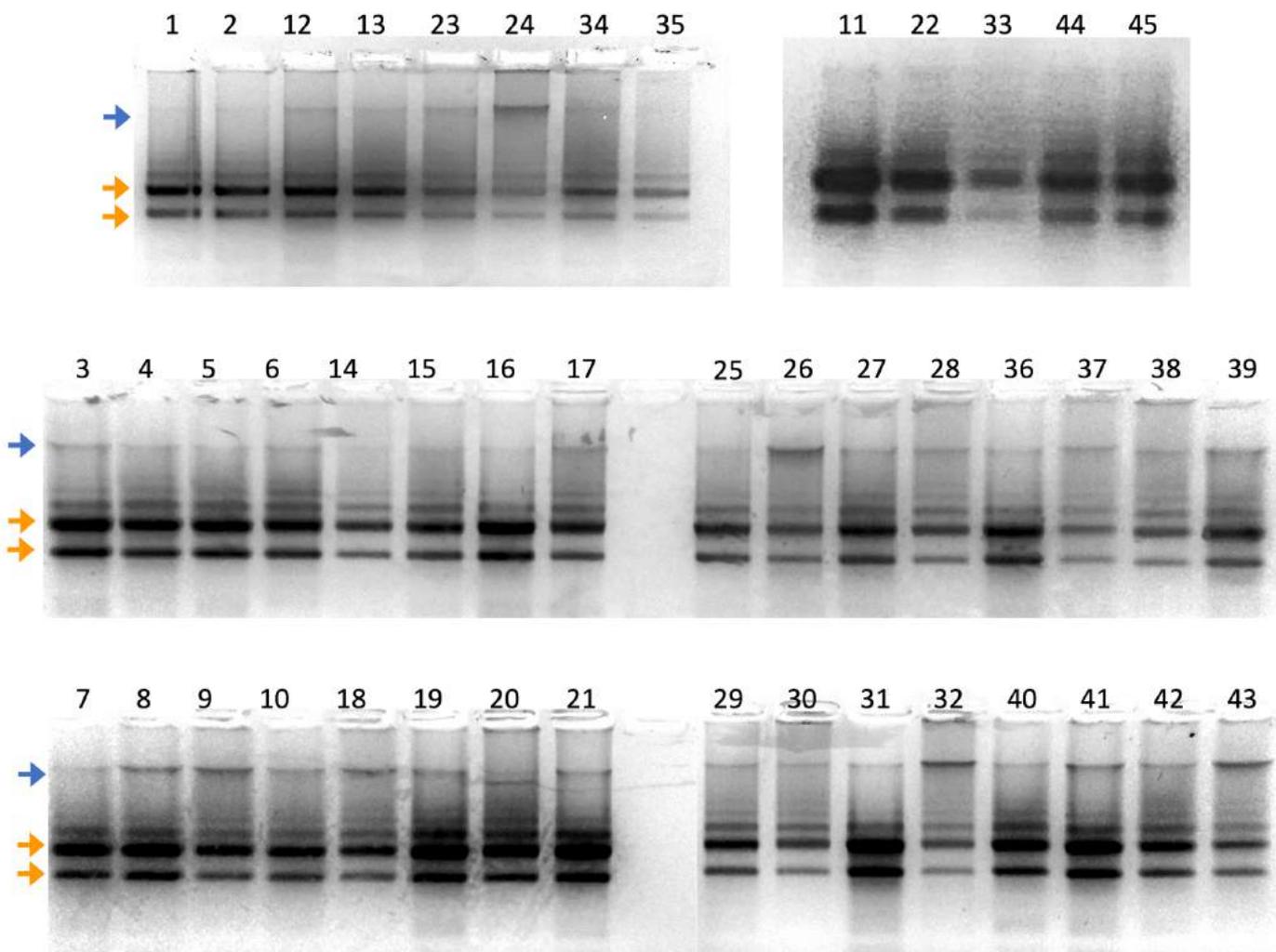


Figura 2.S3. Control de la calidad del ARN total extraído del hígado de esturiones rusos (experimento 2)

Se preparó el ARN total a partir del hígado de los peces y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% tal como se describe en Materiales y Métodos. La figura muestra el patrón de bandas obtenidos para las muestras de ARN total de los individuos 1-11 (inoculados con PBS y sacrificados a las 24 hs), 12-22 (inoculados con *A. hydrophila* y sacrificados a las 24 hs), 23-33 (inoculado con PBS estéril y sacrificados a las 72 hs), 34-45 (inoculado con *A. hydrophila* y sacrificados a las 72 hs). Las flechas naranjas indican la subunidad mayor y menor del ARN ribosomal. En las muestras de hígado generalmente se observó una banda tenue de mayor tamaño que se interpretó como contaminación con ADN genómico (flecha azul). Por lo tanto, para asegurar una correcta cuantificación de los transcritos de interés todas las muestras de ARN total se trataron con ADNasa I previo a la síntesis de ADNc.

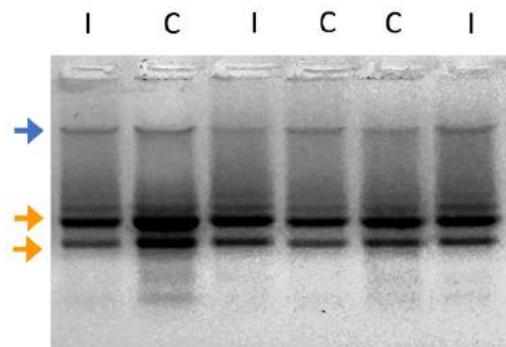


Figura 2.S4. Control de la calidad del ARN total extraído del hígado de esturiones rusos (experimento 3)

Se preparó el ARN total a partir del hígado de los peces y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% tal como se describe en Materiales y Métodos. La figura muestra el patrón de bandas obtenidos para las muestras de ARN total de los esturiones infectados con *A. hydrophila* (I) o inoculados con PBS como control (C), colectadas a las 72 hs de la inoculación. Las flechas naranjas indican las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal. En las muestras de hígado generalmente se observó una banda tenue de mayor tamaño que se interpretó como contaminación con ADN genómico (flecha azul). Por lo tanto, para asegurar una correcta cuantificación de los transcritos de interés todas las muestras de ARN total se trataron con ADNasa I previo a la síntesis de ADNc.

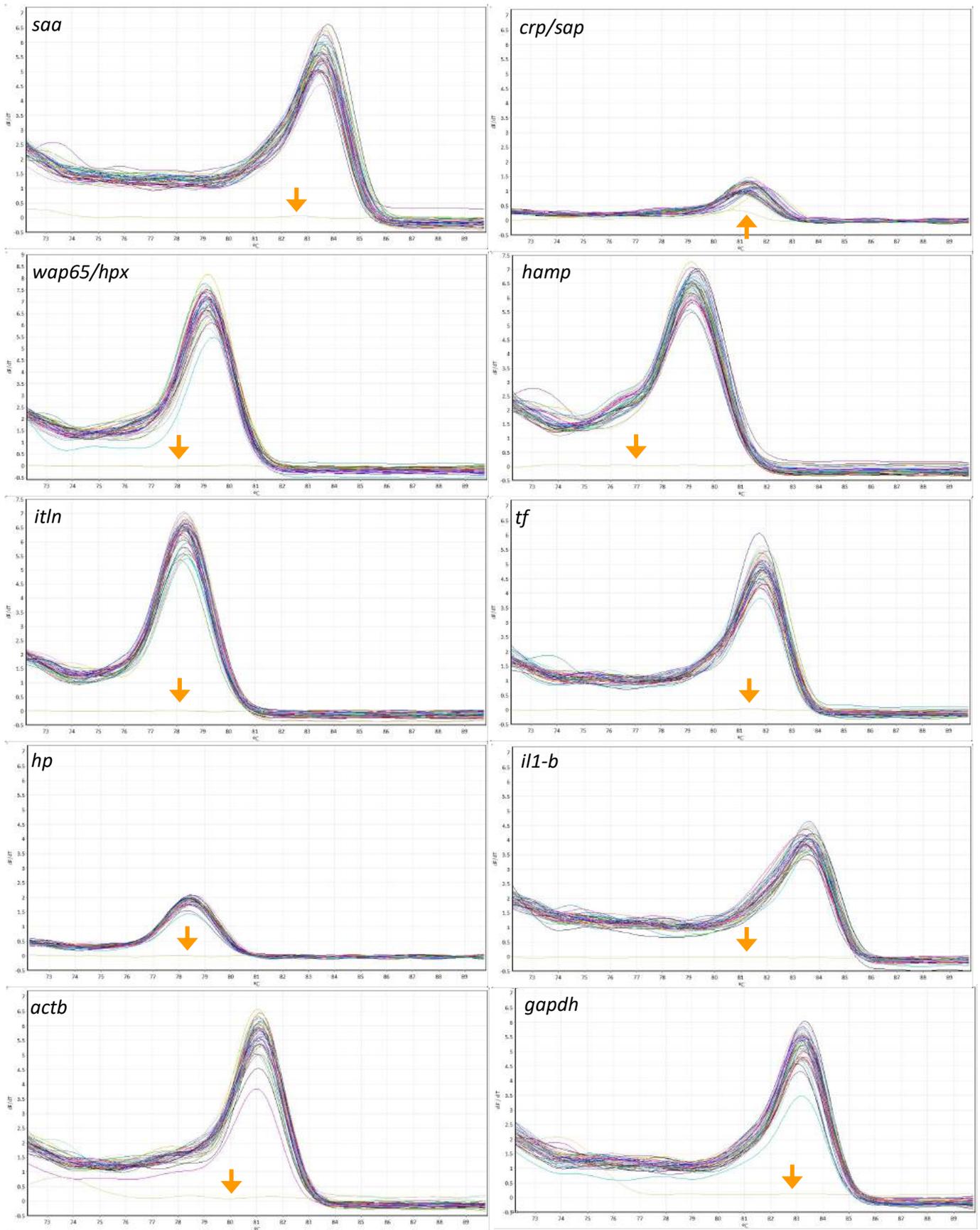
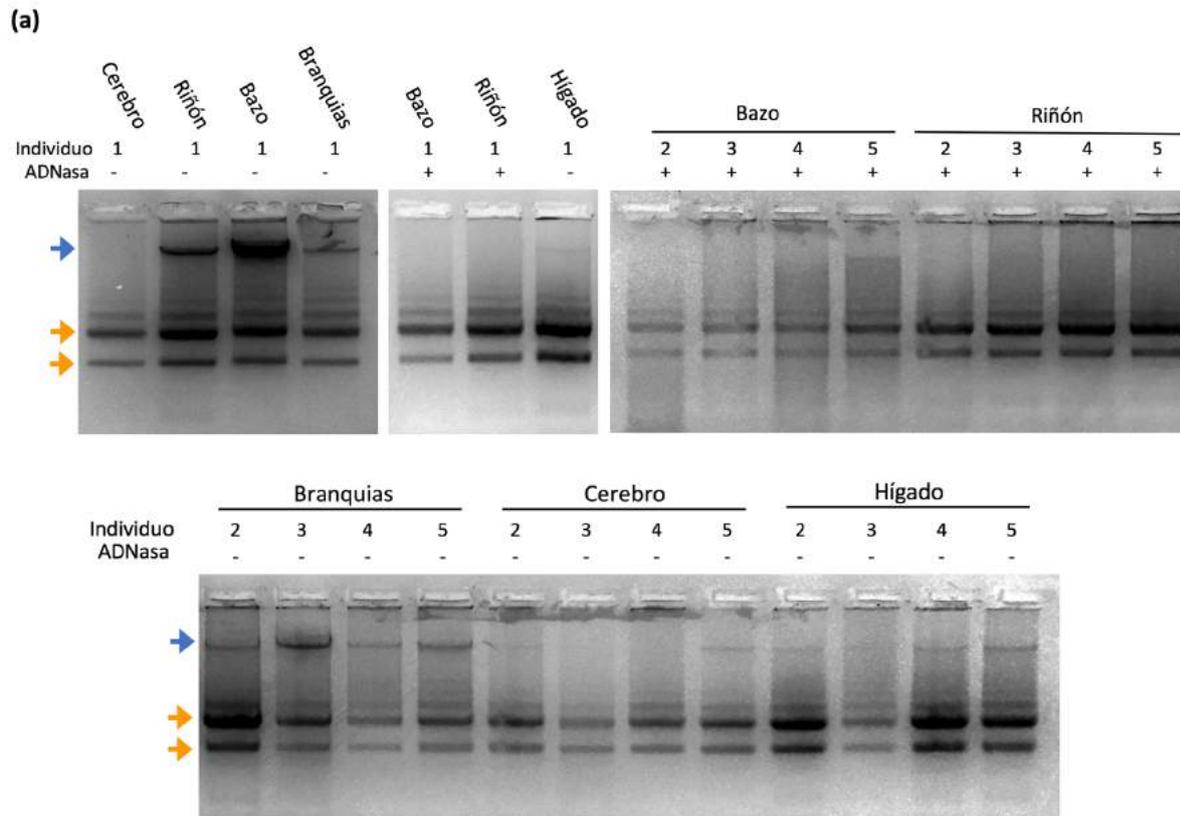


Figura 2.S5. Análisis de la especificidad de los cebadores diseñados para qPCR: curvas de desnaturalización de los amplicones

Se muestran las curvas de desnaturalización (dF/dT vs T) de los amplicones correspondientes a la amplificación de *saa*, *crp/sap*, *wap65/hpx*, *hamp*, *itln*, *tf*, *hp*, *il1-b*, *actb* y *gapdh* por qPCR utilizando como molde ADNc de hígado de esturiones rusos estimulados con bacterias muertas o con PBS como control de vehículo (experimento 2), según se describe en Materiales y Métodos. La flecha naranja señala el blanco del experimento (reacción de qPCR sin molde).



(b)

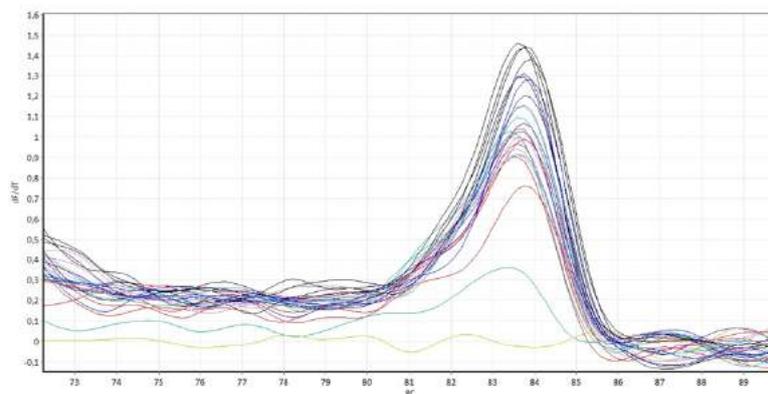


Figura 2.S6. Extracción de ARN total de bazo, riñón, branquias, cerebro e hígado de esturión ruso para el estudio de la expresión tejido específica de la *saa*

(a) Se preparó el ARN total a partir de 5 muestras de bazo, riñón, branquias, cerebro e hígado de los peces y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% tal como se describe en Materiales y Métodos. Se indica el número de cada individuo, el órgano del cual se extrajo el ARN total y si se realizó o no tratamiento con ADNasa durante la extracción del mismo. Las flechas naranjas indican la subunidad mayor y menor del ARN ribosomal y la flecha negra ADN genómico contaminante.

(b) Curva de desnaturalización (dF/dT vs T) del amplicón de la *saa* para las muestras de bazo (rojo), riñón anterior (violeta), branquias (azul), cerebro (verde) e hígado (negro) y el blanco de la reacción (amarillo).

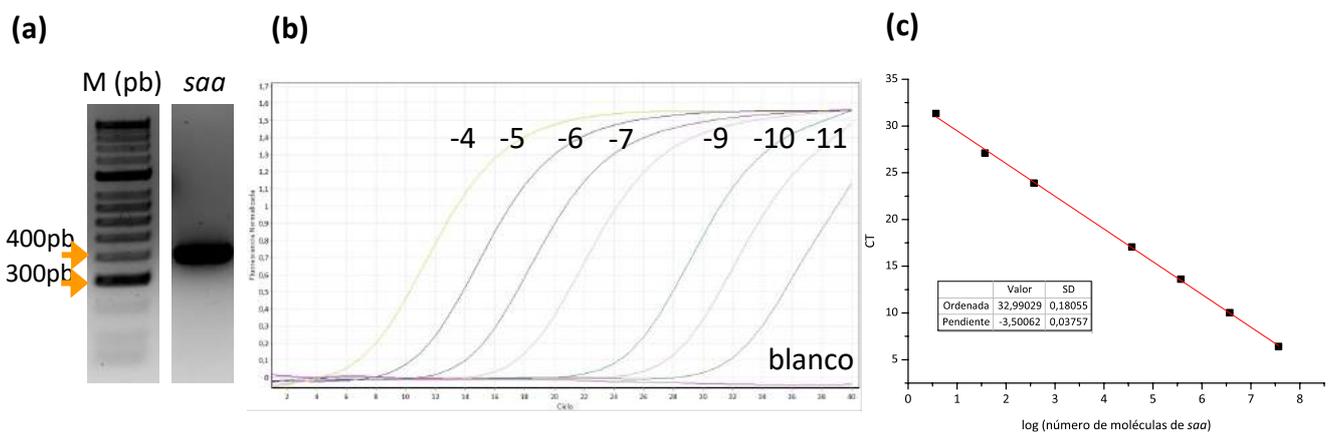


Figura 2.S7. Cuantificación absoluta de la expresión de *saa* por qPCR

(a) Se amplificó por qPCR el transcripto de la *saa* a partir de vector pT7-SAA, se lo purificó, cuantificó (70 ng/ μ l) y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% tal como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas naranjas indican el tamaño de las bandas de 400 pb y 300 pb del marcador de peso molecular.

(b) Curvas de amplificación por qPCR para 7 diluciones seriadas al décimo del una solución del amplicón puro correspondiente al ARNm de *saa* (70 ng/ μ l). Se indica el factor de cada dilución.

(c) Curva estándar CT en función de logaritmo del número de moléculas de *saa* en la reacción para cada una de las diluciones realizada anteriormente. Los datos se ajustaron a una recta y que permitió interpolar los valores de CT obtenidos para la expresión de la *saa* en distintos órganos y determinar la expresión absoluta de la *saa* en cada órgano.

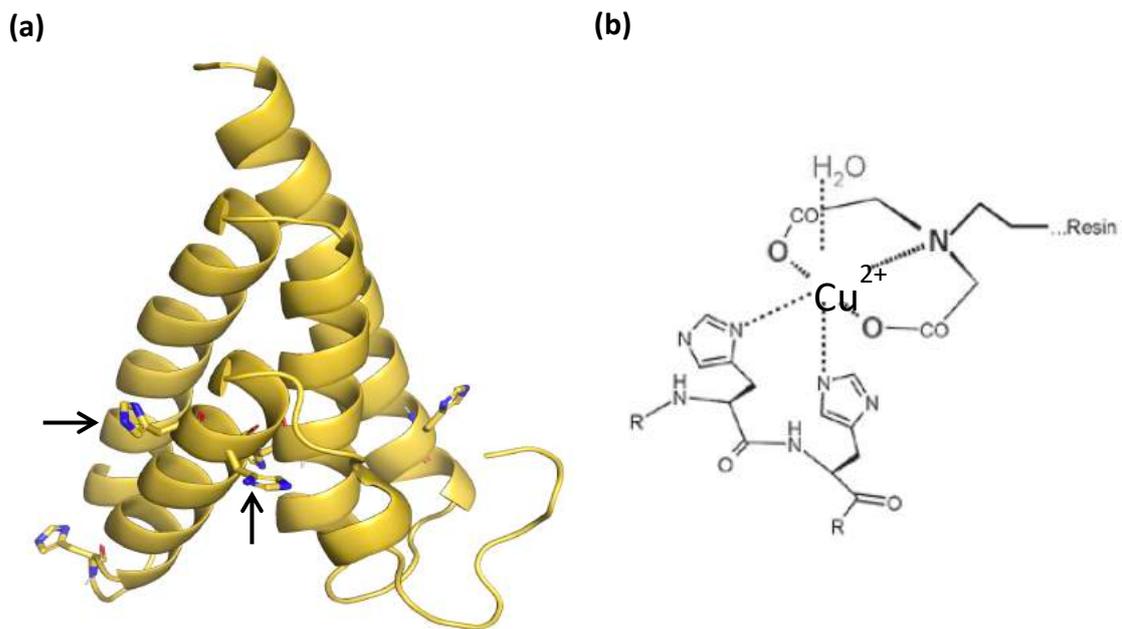


Figura 2.S8. Localización espacial de las histidinas en la eSAA

(a) Modelo estructural de la eSAA mostrando la localización superficial de las 4 histidinas. Las flechas negras indican dos histidinas consecutivas que podrían participar en la coordinación de un átomo de Cu^{++} del grupo iminodiacético de la matriz de afinidad IMAC.

(b) Esquema mostrando la interacción entre dos histidinas de una proteína con el grupo iminodiacético de la resina o matriz comercial IMAC cargada con iones cobre (*Chelating Sepharosa fast flow*, Sigma) utilizada.

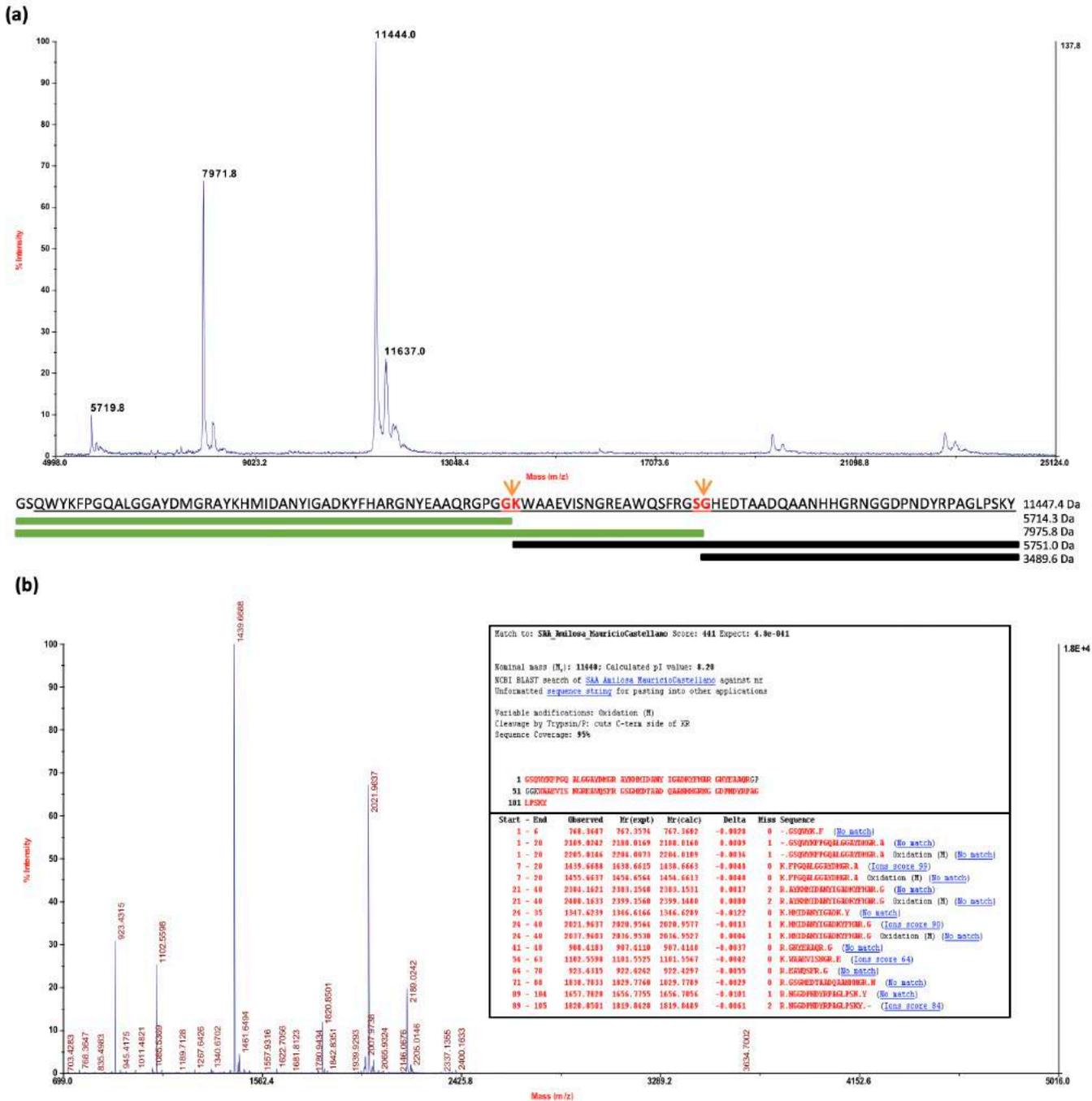


Figura 2.S9. Análisis de la eSAAr por espectrometría de masas

(a) Espectro de masa (m/z) correspondiente a la eSAAr purificada adquirido en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Abi Sciex). Se observan picos correspondientes a una masa de 11637 Da, 11440 Da, 7971.8 Da y 5719.8 Da. Se muestra la secuencia aminoacídica de la eSAAr cuyo peso teórico de (11447.4 Da) coincide con el pico mayoritario de 11444 Da observado en (a), los residuos subrayados corresponden a la SAA madura de esturión, la S y G restantes fueron agregadas debido al clonado y corte de la proteasa TEV, respectivamente. Los aminoácidos marcados en rojo y las flechas naranjas indican los sitios de corte que darían lugar (al ocurrir un solo corte por molécula de eSAAr) a los fragmentos que abarcan los aminoácidos 1 al 52, 1 al 72 (barras verdes), 53 al 105 y 73 al 105 (barras negras) cuyos pesos moleculares teóricos corresponden a 5714.3 Da, 7975.8 Da, 5751.0 Da y 3489.6 Da, respectivamente. Las barras verdes corresponden a los fragmentos resultantes de la proteólisis anteriormente mencionados que fueron identificados en el espectro mientras que las barras negras corresponde a los que no lo fueron. El pico de 11637 Da correspondería a eSAAr unida a fragmentos de la matriz del MALDI

(b) Espectro de masa (m/z) de la eSAAr digerida con tripsina adquirido en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Abi Sciex). Para confirmar la identidad de la eSAAr, se realizaron búsquedas a partir de las masas correspondientes a los péptidos digeridos empleando el programa Mascot y utilizando como base de datos para la búsqueda a los transcriptomas traducidos de esturión chino y siberiano.

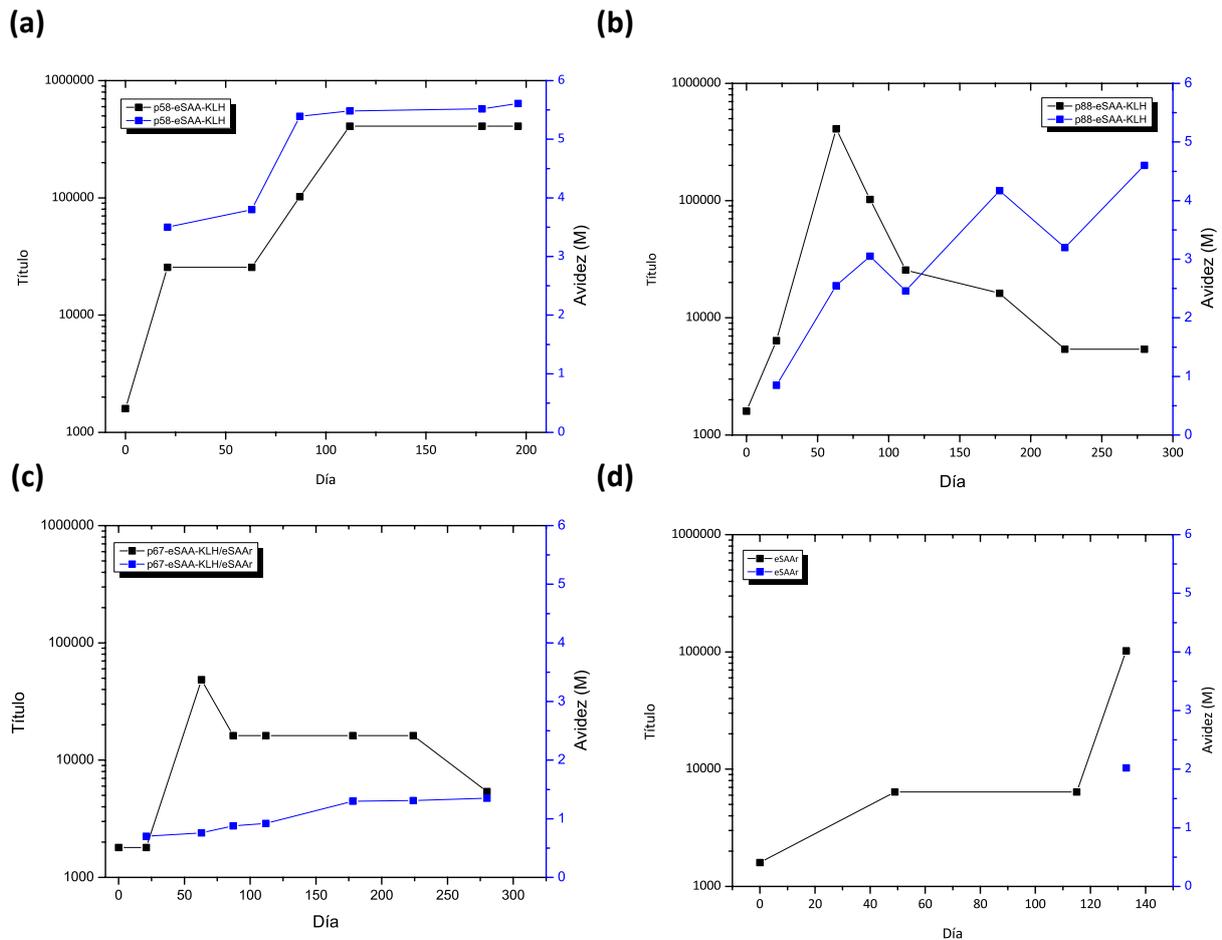


Figura 2.S10. Análisis de la respuesta inmune de los conejos inoculados con los péptidos acoplados a KLH o la eSAAr
 Título y avidéz de los anticuerpos en los antiseros de los conejos inmunizados con (a) p58-eSAA-KLH, (b) p88-eSAA-KLH, (c) p67-eSAA-KLH, y (d) la eSAAr. El título y la avidéz se determinó por ELISA utilizando a la eSAAr como antígeno tal como se describe en Materiales y Métodos.

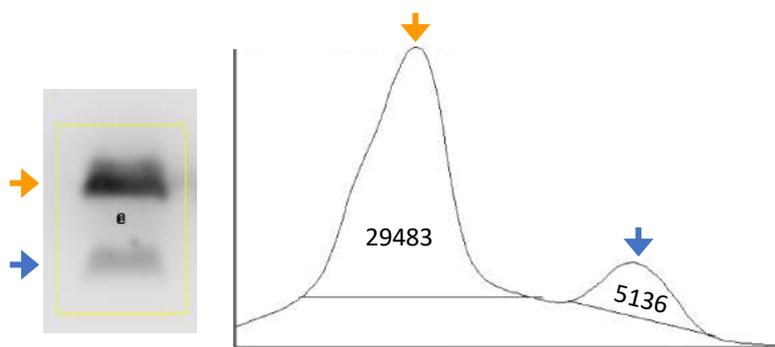


Figura 2.S11. Densitometría de la eSAAr

Se separaron 200 ng de eSAAr por SDS-PAGE y se detectó la proteína por *Western Blot* con el anticuerpo anti-p58-eSAA como se describe en Materiales y Métodos. La banda correspondiente a la eSAAr entera (flecha naranja) y al producto de degradación de 7971.8 Da (flecha azul) se cuantificaron por densitometría utilizando el software ImageJ obteniéndose dos picos de área 29483 y 5136, respectivamente. Esto permitió estimar que un 85% de la muestra corresponde a eSAAr entera y un 15% al fragmento de degradación de 7971.8 Da.

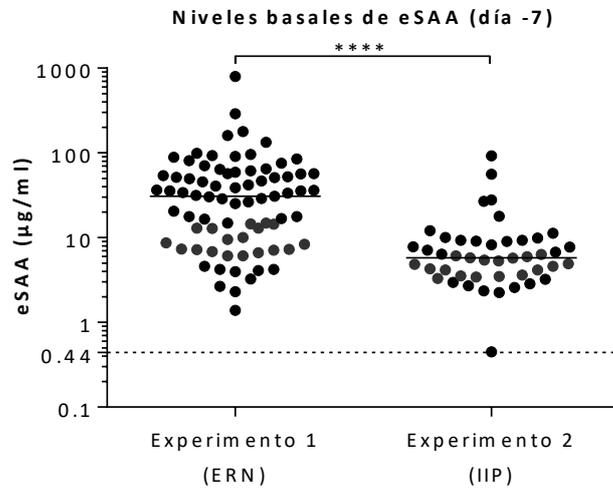


Figura 2.S12. Niveles basales de eSAA (día -7) en el suero de los esturiones rusos del experimento 1 y del experimento 2 previo a la estimulación con bacterias *A. hydrophila* muertas

Se muestran los niveles basales de eSAA (µg/ml) correspondientes al día -7 del experimento 1 y del experimento 2, previo a la estimulación de los esturiones rusos con bacterias *A. hydrophila* muertas. Para el experimento 1 realizado en ERN se muestran 80 valores de eSAA al día -7 que corresponden a la totalidad de los peces distribuidos en 4 piscinas diferentes (20 peces por piscina) tal como se indica en Materiales y Métodos o en la Figura 2.20a. Para el experimento 2 realizado en el IIP se muestran 45 valores de eSAA al día -7 que corresponden a la totalidad de los peces distribuidos en 4 piscinas diferentes (11 o 12 peces por piscina) tal como se indica en Materiales y Métodos o en la Figura 2.20b. Los datos no mostraron distribución normal, por lo cual se indica la mediana de cada grupo con una línea horizontal. Los niveles de eSAA de los dos grupos se compararon con el test no paramétrico Mann-Whitney, indicándose con **** las diferencias significativas con $p < 0.0001$. La línea punteada indica el límite de detección de eSAA por ELISA, los puntos negros y rojos corresponden a los valores de eSAA por encima o por debajo del límite de detección del ensayo, respectivamente.

