



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON  
LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL SISTEMA  
INMUNE DE *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)  
EXPUESTO A UN FERTILIZANTE ENRIQUECIDO CON  
SILICIO ORGÁNICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

**ADRIÁN ESTEBAN VELÁZQUEZ LIZÁRRAGA**

La Paz Baja California Sur, octubre de 2016.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 4 del Mes de Octubre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DE *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) EXPUESTO A UN FERTILIZANTE ENRIQUECIDO CON SILICIO ORGÁNICO"**

Presentada por el alumno:

**Adrián Esteban Velázquez Lizárraga**

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

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

LA COMISIÓN REVISORA

  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
Director de Tesis

  
Dra. Gracia Alejandra Gómez Anduro  
Co-Tutor

  
Dr. Eduardo Romero Vivas  
Co-Tutor

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

## **COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR**

**Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle**, Director de tesis.  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro**, Co-tutora de tesis.  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

**Dr. Eduardo Romero Vivas**, Co-tutor de tesis.  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

## **JURADO DE EXAMÉN DE GRADO**

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dr. Eduardo Romero Vivas

## **SUPLENTE**

Dr. Carlos Angulo Valadez

## Resumen

*Litopenaeus vannamei* es el crustáceo decápodo más cultivado a nivel mundial. La camaronicultura es un área de la acuicultura que ha crecido de forma acelerada, desde los años 80'. Este exitoso crecimiento industrial se ha visto afectado por infecciones causadas por microorganismos generando millones de dólares en pérdidas anuales. Diversos grupos de investigación de todo el mundo trabajan para generar soluciones a estos problemas, utilizando para ello bases biotecnológicas, como el desarrollo de inmunoestimulantes de origen microbiano, y por otro lado dilucidar mecanismos moleculares básicos del sistema inmune innato. En este trabajo se planteó usar un fertilizante enriquecido en silicio orgánico (FESO) como suplemento inmunoestimulante, teniendo para ello el antecedente de que el FESO promueve la expresión de genes relacionados con el sistema inmune y parámetros inmunes significativos en camarón, como el conteo total de hemocitos y el aumento de anión superóxido. El objetivo fue identificar cuáles son los genes de las rutas de señalización que promueven la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune. Se utilizó la secuenciación masiva (pirosecuenciación 454), y el enfoque de la genómica funcional para realizar un primer screening a tejidos de camarón previamente expuestos por inmersión al FESO, con un mezcla de ARN de diferentes tejidos y utilizando un control. Se realizó un profundo análisis bioinformático y el enfoque del ensamble *de Novo* utilizando grafos *de Brujin* como algoritmo. Posteriormente, se realizó selección de genes de interés (genes relacionados a la respuesta inmune y rutas de señalización) y se evaluó la ubiquidad en tejidos de organismos sanos. 10 genes relacionados a la expresión de péptidos antimicrobianos AMPs, inhibidores de la cascada serin-proteasa, proteínas de reconocimiento de patrones, transducción de señales celulares, respuesta inmune de proteasas, respuesta antiviral, fueron los candidatos para evaluar ubiquidad en ganglio, corazón, hemocitos, estomago, musculo, branquias, hepatopáncreas y epidermis. Se encontró que los genes están distribuidos en diversos tejidos con distintos patrones de ubiquidad. En la parte final del trabajo se seleccionan 5 genes para evaluar su expresión relativa en hepatopáncreas, epidermis, y hemocitos de organismos tratados con el FESO; en los genes *LvTL3* y *LvDo* se observó una expresión significativa ( $P < 0.05$ ) respecto a hepatopáncreas. Lo que se sugiere en una estimulación de la ruta Toll con el FESO, los mismos patrones se observan en *LvALF*, *LvAMG* y *LvPNF*.

**Palabras clave:** *Sistema inmune, Péptidos Antimicrobianos, Rutas de señalización, Inmunoestimulantes, Respuesta inmune innata.*

Vo. Bo.

---

Dr. Felipe Ascencio  
Director de Tesis

## Abstract

*Litopenaeus vannamei* is one of the most farmed decapod crustaceans most worldwide. Shrimp farming is an area in aquaculture that has grown rapidly since the 80s. This successfully grown industry has been affected by microbial infections causing millions of dollars in annual losses. Research groups around the world are working to generate solutions to these problems, using biotechnology bases such as development of immunostimulants with microbial origin, and secondly elucidate basic molecular mechanisms of innate immune system. This research work used an organic silicon enriched-fertilizer (FESO) for immunostimulant purpose; background indicates that FESO promotes the expression of immune system related genes and immune parameters, such as, total circulate hemocyte count and increase of superoxide anion. The aim was to identify which genes are related with immune system signaling pathways and genes related to innate immune response. Next Generation Sequencing (Pyrosequencing 454) and functional genomics approach were used, two libraries (control and FESO treated) and pooled tissues; genes were identified with a bioinformatics analysis using *de Novo* assembly with the algorithm *de Bruijn* graphs. Afterwards, interest genes (innate immune system and signaling pathways of innate immune system related) were selected and evaluated by ubiquity analysis in tissues from healthy organisms; 10 genes related to antimicrobial peptides, cascade inhibitor serin-protease, pattern recognition proteins, cellular signal transduction, immune response of proteases, and antiviral response to evaluate ubiquity in ventral ganglion, heart, hemocytes, stomach, muscle, gills, hepatopancreas, and epidermis. It was found that the genes mentioned are distributed in distinct ubiquity patterns. In the last part five genes were selected to evaluate relative expression in hepatopancreas, epidermis, and hemocyte tissues from organisms treated with FESO; the genes *LvTLR3* and *LvDo* have a significant relative expression ( $P < 0.05$ ) with respect to hepatopancreas, suggesting stimulation in Toll pathway FESO-mediated; the same patterns were observed in *LvALF*, *LvAMG*, and *LvPNF*.

**Key words:** Immune system, Antimicrobial peptides, signaling pathways, immunostimulants, innate immune response.

Vo. Bo.

---

Dr. Felipe Ascencio  
Director de Tesis

## Dedicatoria

*Quiero dedicar esta tesis mis dos grandes ejemplos “mis padres”, gracias por su infinito amor:*

*Sergia Avelina Lizárraga Guerrero*

*Adrián Velázquez Villegas*

*A fructibus cognoscitur arbor...*

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., y al Programa de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 392141 otorgada para la realización de esta tesis.

Al Proyecto del Fiscal Patogénesis Microbiana AC0.3, por el financiamiento de esta tesis.

Al Director de esta tesis, el Dr. Felipe Ascencio Valle, le agradezco la confianza y todo el apoyo académico brindado para la realización de esta tesis y a sus comentarios de gran importancia.

A la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, muchas gracias por los comentarios, ideas y soporte metodológico a este trabajo.

Al Dr. Eduardo Romero Vivas, gracias por todos sus comentarios, su ayuda y soporte en el área de bioinformática, por sus tips para la instalación de scripts.

A la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Lic. Leticia Gonzáles Rubio Rivera, Lic Claudia Elizabeth Olachea León, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez y Lic. Horacio Sandoval Gómez. Gracias por su disponibilidad y por el apoyo respecto a cuestiones académicas.

A la M. C. Diana Dorantes por la edición de inglés en el resumen de esta tesis.

Al Dr. Fernando Von Borstel por la asistencia, uso y manejo del servidor para realización de ensamblajes.

A los técnicos del Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos acuáticos, M. C. Pablo Monsalvo Spencer, y M. C. Gabriel Robles Villegas, por su asistencia y valiosa ayuda para la realización de bioensayos.

A la Ing. Mayra de Fátima Vargas Mendieta, al Dr. Humberto Villarreal Colmenares, y al equipo de técnicos de BioHelis e INNOVA. Por la donación de organismos para la realización de bioensayos, y ayuda técnica

A la Dra. Martha Reyes-Becerril técnico del Laboratorio de Patogénesis Microbiana, por la asistencia técnica para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Angulo Valadez, por su gran apertura y comentarios.

A Marisol Arciga Plascencia por acompañarme en este camino, ser una buena amistad y por su apoyo en la realización de los bioensayos.

A la M. C. Delia Irene Rojas técnico del Laboratorio de Genética Molecular, por su ayuda técnica para la preparación de soluciones.

Al M. C. Julio Antonio Hernández Gonzáles técnico del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por la ayuda técnica aportada a este trabajo.

Al técnico del Laboratorio de Proteómica Arturo Sierra Beltrán, por su disponibilidad y ayuda técnica para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez y Dra. Cristina Escobedo del Laboratorio de Genómica y Bioinformática por otorgarnos el acceso y facilidad para el uso del servidor.

A la M. C. Patricia Carbajal, por sus valiosos consejos en el manejo de secuencias, ensamble y comandos en Linux.

A la Dra. Rosa María Morelos, por su asistencia en la técnica de qPCR.

A Germán Melendrés Carballo por su gran apoyo en la instalación de software Bioinformático, por su gran aporte para programación en Perl y Python.

A mis compañeros de maestría, en especial a, Isaac Camargo y Priscila Gallut, gracias por su amistad y consejos.

Al grupo de Patogénesis Microbiana y Biología Molecular de Plantas, gracias a todos los compañeros. En especial: Mario Rojas, Crystal Guluarte, Abel Ramos y Erika Alamillo.

A mi hermana América Velázquez y cuñado Julio Hernández. A mis sobrinos Diego y Saqqara. A mi hermano Samuel Velázquez y mis padres, Adrián y Sergia. Muchas gracias por estar siempre conmigo.

A mi hermana, Adriana Velázquez y mi cuñado Rosember Mark de Luna, muchas gracias por darme un espacio de relajación mientras realizaba esta tesis.

A la Sra. Norma Villarreal por su gran amistad y consejos personales.

A Christian Omar Ortega Rosas, necesitaría muchas palabras para agradecerte. Gracias por estar siempre ahí, en todo momento. A las señoras Rosa M. Rosas y María Ríos, por gran calidez humana.

A la familia Alonso Verdugo en especial a la bebé Karina, muchas gracias por todo tu apoyo amiga, sé que siempre estás conmigo en las buenas y las malas.

A mis amigos: Socorro Morales, Miguel Tirado, Enrique Valenzuela, Paulina Ortega, Karla López, Marco Villa, Seydi Meza y Bárbara Calderón.

A todas aquellas personas que no aparecen aquí pero que han aportado mucho en mi crecimiento profesional.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Generalidades del camarón blanco</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Biología.....	3
<b>2.2 Sistema inmunitario</b> .....	<b>4</b>
2.2.1 Reacciones de defensa y moléculas del sistema inmunitario .....	6
2.2.2 Inmunoestimulantes.....	10
<b>2.3 Rutas de señalización del sistema inmune</b> .....	<b>11</b>
2.3.1 Ruta Toll .....	12
2.3.2 Ruta IMD .....	14
2.3.3 Ruta JAK/STAT .....	16
<b>2.4 Fertilizante enriquecido en silicio orgánico (FESO)</b> .....	<b>18</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>4. HIPOTÉISIS</b> .....	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos .....	22
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
6.1 Obtención de organismos y mantenimiento .....	23
6.2 Extracción de ácido ribonucleico (ARN) y pirosecuenciación .....	24
6.3 Ensamble de Novo y anotación funcional .....	25

6.4	Análisis con términos de la ontología génica .....	27
6.5	Anotación funcional rutas metabólicas en KEGG .....	27
6.6	Selección de genes involucrados en las rutas de señalización .....	28
6.7	Redes de interacción proteína-proteína .....	28
6.8	Diseño de oligos a partir de la selección de genes .....	29
6.9	Validación de ubiquidad por PCR punto final .....	29
6.10	Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario .....	30
6.11	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	30
6.12	Selección de genes y diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real .....	31
6.13	Curvas de calibración y qPCR .....	31
6.14	Evaluación de la estabilidad: Gen de referencia .....	32
6.15	Análisis de expresión relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y análisis estadísticos .....	32
7.	RESULTADOS .....	33
7.1	Secuencias obtenidas por Pirosecuenciación 454 .....	33
7.2	Anotación funcional .....	34
7.2.1	Estadísticas de alineamiento local BlastX y BlastP .....	34
7.2.3	Estadísticas de anotación funcional ontología génica .....	38
7.2.3	Anotación funcional de rutas metabólicas en KEGG .....	42
7.3	Redes de interacción proteína-proteína .....	45
7.4	Selección de genes de interés.....	47
7.5	Diseño de oligonucleótidos a partir de la selección de genes .....	49
7.6	Ubiquidad de la selección de genes .....	50
7.7	Diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real (qPCR).....	51
7.8	Curvas de calibración y qPCR .....	52
7.9	Análisis de estabilidad .....	52
7.10	Análisis de expresión relativa.....	54
8.	DISCUSIÓN .....	55
8.1	Pirosecuenciación y análisis bioinformático .....	55
8.2	Ubiquidad de la selección de genes .....	63

8.3 Efecto del FESO y niveles de expresión relativa .....	66
9. CONCLUSION .....	71
10. LITERATURA CITADA.....	73
11. ANEXOS .....	83
11.1 Histogramas de distribución e-Value.....	83
11.2 Soporte de cada Contig, seleccionado. ....	85
11.3 Redes de interacción proteína-proteína .....	86
11.4 Diagramas de Venn.....	89

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema estructural de <i>Litopenaeus vannamei</i> .. .....	3
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del sistema inmunitario en crustáceos.. ...	5
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la ruta Toll. ....	13
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la ruta IMD .....	15
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la ruta JAK/STAT .....	17
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental.....	24
<b>Figura 7.</b> Nombre de las proteínas más abundantes.....	35
<b>Figura 8.</b> Grupo de taxas más abundantes de la librería control.....	36
<b>Figura 9.</b> Grupo de taxas más abundantes de la librería tratada.....	37
<b>Figura 10.</b> Distribución de anotación .....	38
<b>Figura 11.</b> Términos de la ontología génica representados en el nivel 2 .....	39
<b>Figura 12.</b> Términos de la ontología génica representados en el nivel 2 .....	40
<b>Figura 13.</b> Prueba exacta de Fischer ( $\alpha = 0.01$ ). .....	41
<b>Figura 14.</b> Ruta de señalización RAP1.....	43
<b>Figura 15.</b> Ruta metabólica del fagosoma en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	44
<b>Figura 16.</b> Redes de interacción proteína-proteína de genes.....	46
<b>Figura 17.</b> Ubiquidad de selección de genes.....	50
<b>Figura 18.</b> Análisis de estabilidad de genes de referencia .....	53
<b>Figura 19.</b> Expresión relativa en diversos tejidos .....	54
<b>Figura 20.</b> Distribución del valor de E (e-Value) en librería control .....	83
<b>Figura 21.</b> Distribución del valor de E (e-Value) en librería tratada. ....	84
<b>Figura 22.</b> Alineamiento del soporte del Contig.....	85
<b>Figura 23.</b> Redes de interacción proteína-proteína .....	86
<b>Figura 24.</b> Resultados de BLASTx librería control y tratada.....	89
<b>Figura 25.</b> Diagrama de Venn .....	90

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Características de los hemocitos en <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	6
<b>Tabla II.</b> Resumen y estadísticas de ensamble .....	33
<b>Tabla III.</b> Resultados de la anotación funcional de los contigos generados.....	34
<b>Tabla IV.</b> Contigos con términos de anotación procesos del sistema inmune. ....	41
<b>Tabla V.</b> Tabla de anotación jerarquías de módulos de BRITe en KEGG.....	42
<b>Tabla VI.</b> Selección de genes de interés. ....	48
<b>Tabla VII.</b> Diseño de oligonucleótidos para PCR .....	49
<b>Tabla VIII.</b> Diseño de oligonucleótidos para qPCR .....	51
<b>Tabla IX.</b> Eficiencia de los oligonucleótidos para qPCR .....	52
<b>Tabla X.</b> Procesos biológicos más relevantes de la red de interacción .....	87
<b>Tabla XI.</b> Procesos biológicos más relevantes de la red de interacción .....	87
<b>Tabla XII.</b> Procesos biológicos más relevantes de la red de interacción .....	88

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón a nivel mundial es una actividad muy importante, con una producción de 3.6 millones de toneladas en 2014, esta actividad ha ido aumentando significativamente desde los años 80's. Sin embargo, las infecciones virales y bacterianas son recurrentes en las granjas, lo cual causa pérdidas millonarias a nivel mundial. Para enfrentar estos problemas se han abordado distintos temas como el conocimiento de los mecanismos moleculares del sistema inmune, la búsqueda de compuestos inmunoestimulantes, y la mejora continua del uso y manejo de esta industria (Flegel *et al.*, 2008; FAO, 2016).

Los compuestos inmunoestimulantes son moléculas que ayudan alertar al sistema inmune, es una opción muy recurrente en el cultivo de *L. vannamei* debido a que no se ha realizado una definición del sistema inmune en crustáceos, considerándose *cuasi-específico*. Se han usado diversos inmunoestimulantes de diversas fuentes, generalmente paredes celulares de microorganismos, pero se ha observado un fenómeno conocido como desgaste inmunológico. Cuando el organismo es expuesto a un inmunoestimulante en repetidas ocasiones se disparan cascadas de señalización que conducen una respuesta inmune, por otra parte los organismos consumen ATP y reservas energética, esto genera el desgaste y cuando hay presencia de una infección sistémica no se puede combatir (Smith *et al.*, 2003).

En la actualidad se buscan compuestos inmunoestimulantes, que no generen desgaste inmunológico, que no comprometan el crecimiento del organismo y que no sean tóxicos para el consumo humano. En este trabajo se propone el uso de un Fertilizante Enriquecido con Silicio Orgánico (FESO) como potencial compuesto inmunoestimulante. Este compuesto es el resultado de solubilizar roca volcánica (Volcán Parícutín, Michoacán México), y su nombre se refiere a su alto contenido en Silicio (Si) respecto a otros fertilizantes. Este fertilizante ha sido ampliamente usado en agricultura, así como en *L. vannamei* por inmersión y combinación con el alimento, donde se observó un efecto al

incrementar sus parámetros inmunológicos (conteo de hemocitos circulantes, actividad de superóxido dismutasa) (Quero-Gutierrez, 2008; Espinoza, 2006).

En este trabajo se realizó un experimento donde se estudió la expresión relativa de genes en diversos tejidos, utilizando la secuenciación masiva (pirosecuenciación 454), el ensamble *de Novo* y la anotación funcional de genes. También se realizó una primera selección de genes para ubicar en tejidos de organismos sanos la expresión de genes relacionados con las rutas de señalización y la respuesta inmune de *L. vannamei*. Se identificaron nuevos transcritos aun no caracterizados en *L. vannamei* (pero si en otros crustáceos) y la expresión de nuevas isoformas de genes ya caracterizados. La comprobación científica del efecto inmunoestimulante del FESO debe estar soportada con retos de microorganismos que causan mortalidades en el cultivo de *L. vannamei* así como con el estudio de metabolismo energético.

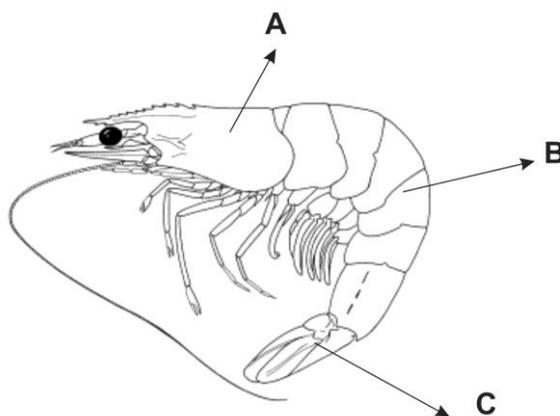
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del camarón blanco

#### 2.1.1 Biología

Los camarones son artrópodos mandibulados con antenas, caparazón y branquias. El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) fue descrito en 1931 por Lee Boone. Es un crustáceo decápodo de la familia *Penaeidae*. Esta ampliamente distribuido por el pacífico desde Sonora, México hasta Tumes, Perú, y es frecuente encontrarlo en los sistemas estuarinos-lagunarios; esta especie habita en fondos arcillosos entre 5 y 72 m (Dore y Frimodt, 1987; Hendrickx, 1996).

*L. vannamei* posee un rostro alargado con 8-9 dientes ventrales, caparazón sin sutura, cuerpo comprimido lateralmente, pedúnculos oculares y anténulas. El cuerpo se divide en tres regiones (Fig. 1): abdomen, telson, y cefalotórax. El abdomen está formado por seis segmentos y seis pares de pleópodos. En el telson se encuentran los urópodos, que sirven para la natación y en cefalotórax se encuentran las anténulas, antenas, mandíbulas (Hendrickx, 1996; Martínez Córdova, 1993).



**Figura 1.** Esquema estructural de *Litopenaeus vannamei*. Se muestran los 3 segmentos que lo componen, A: Cefalotórax, B: Abdomen, C: Telson (Dore y Frimodt, 1987).

Los órganos de funciones vitales se encuentran en el cefalotórax, el cerebro es trilobulado con un ganglio supraesofágico, el sistema nervioso es ventral mediante ganglios en el tórax y abdomen. El corazón es ventral está conectado a través de arterias abdominales, dorsal, y ventral. El sistema digestivo está compuesto por boca, estomago, hepatopáncreas, intestino, glándula intestinal, y ano. El aparato respiratorio está compuesto por dendobranquias situadas en las partes laterales del cefalotórax protegidos por una cámara, en este lugar se realiza el intercambio de gases de la hemolinfa, las tasas de consumo de oxígeno son directamente proporcional a la temperatura, salinidad, y peso del organismo (Martínez Córdova, 1993).

El ciclo de vida típico de los peneidos (incluyendo a *L. vannamei*) es el siguiente: la reproducción se realiza en aguas profundas las hembras, son fecundadas, ponen huevos (10,000-1'000,000), estos eclosionan y se convierten en larvas. Existen 4 etapas de estadios y subestadios larvales en el camarón, según sus necesidades nutricionales, características morfológicas, y comportamiento. El estado naupliar, protozoa con 3 subestadios, mysis con 4 subestadios y la post-larva (Fenucci, 1988).

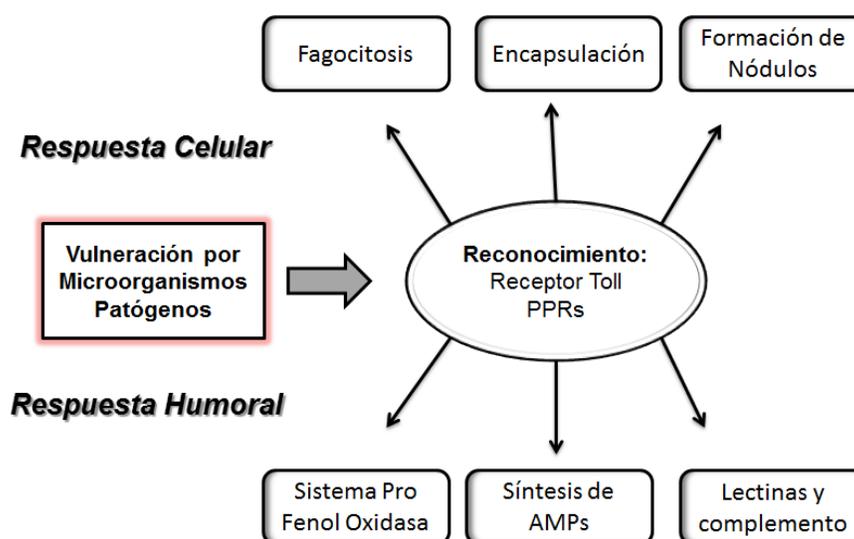
Las post-larvas tienen que emigrar hacia la costa o aguas menos profundas (ej. manglares, esteros, lagunas), en esta etapa pasan a ser juveniles, y al convertirse en adultos vuelven a aguas profundas para madurar, y reproducirse (Fenucci, 1988).

## **2.2 Sistema inmunitario**

El sistema inmunitario es el encargado de la defensa del organismo contra virus, bacterias y hongos. Se clasifica en dos categorías: sistema inmunitario innato (no específico) y sistema inmunitario adquirido (específico). El sistema inmunitario innato participa principalmente en el reconocimiento y eliminación de componentes extraños dentro del hospedero. Los organismos invertebrados poseen un sistema inmune específico aun no descrito, en donde se ha propuesto

que puede ser específico o *quasi* específico, debido a la complejidad a nivel molecular de los componentes del sistema inmune (reacción, unión, y reconocimiento) (Rowley y Powell, 2007; Saha, 2011).

El sistema inmunitario innato de los invertebrados, consta de la cutícula, los componentes celulares y humorales. En la cutícula de los crustáceos se encuentra un polímero muy similar a la celulosa, llamado quitina que combinado con minerales y otros compuestos le confieren dureza (Saha, 2011).



**Figura 2.** Representación esquemática del sistema inmunitario en crustáceos. En la figura se describen las diversas estrategias que poseen los crustáceos en el sistema inmune para enfrentar la vulneración de microorganismo (Rowley y Powell, 2007).

Los componentes celulares (Fig. 2) son células especializadas (hemocitos) que circulan en la hemolinfa, capaces de realizar actividades inmunológicas como la agregación, coagulación, adhesión, fagocitosis, generación de moléculas citotóxicas, enzimas antioxidantes y reparación de heridas. Se han descrito 3 tipos de hemocitos: granulares, semi-granulares, y hialinos (Tabla I). Los componentes humorales (Fig. 2) comprenden la síntesis de proteínas del sistema inmune como:

péptidos antimicrobianos (AMPs), inhibidores de proteasas, proteínas similares a citoquinas, entre otros (Saha, 2011; Tassanakajon *et al.*, 2013).

**Tabla I.** Características de los hemocitos en *Litopenaeus vannamei*.

Hemocito	Longitud Promedio ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Porcentaje de Concentración <sup>1</sup>	Funciones <sup>2</sup>
Granular	12.51	16.1%	Sistema Pro Fenol Oxidasa, Citotoxicidad
Semi granular	10.78	58.1%	Encapsulación, fagocitosis, sistema Pro Fenol Oxidasa, Citotoxicidad,
Hialino	11.11	25.1%	Fagocitosis

<sup>1</sup>(Liu y Wang, 1998)

<sup>2</sup>(Johansson *et al.*, 2000)

### 2.2.1 Reacciones de defensa y moléculas del sistema inmunitario

#### *Péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas inglés)*

Los AMPs comprenden la primera barrera de defensa contra la invasión de microorganismos, estos péptidos son almacenados en los hemocitos y entre 150 a 200 aminoácidos, estructura anfipática con propiedades aniónicas o catiónicas. Los AMPs tienen amplia actividad contra bacterias, hongos, levaduras, virus y parásitos. Existen diversos tipos de péptidos antimicrobianos, que presentan isoformas estructurales que muestran notablemente el espectro de actividad y la especificidad. Los ejemplos para *L. vannamei* son las penaedinas, crustinas, lisozimas y factores anti-lipopolisacáridos (ALFs, por sus siglas inglés) (Hancock y Diamond, 2000; Rosa y Barracco, 2010).

Las penaedinas han mostrado los siguientes efectos antifúngico y bacteriano (Gram-positivas), rol de inmunomodulación con citoquinas promotoras de la adhesión mediada por integrinas, el aumento de la expresión de penaedinas cuando existe una herida. Por este motivo se ha sugerido que las penaedinas son pro-inflamatorias (Li y Song, 2010; Tassanakajon *et al.*, 2011).

Las crustinas están caracterizadas por su carácter catiónico, reportándose en su gran espectro antibacterial contra Gram-positivas pero no contra Gram-negativas, también se ha observado que son capaces de aglutinar células bacterianas, lo que podría explicar el mecanismo de acción antibacterial (Krusong *et al.*, 2012; Tassanakajon *et al.*, 2011).

Los ALFs poseen dos residuos de cisteína altamente conservados, de modo que la proteína es estabilizada por un puente disulfuro, además confiere un sitio de unión a lípidos conjugados con carbohidratos (ej. lipopolisácaridos) que se encuentran la pared celular de bacterias. Se ha demostrado que por silenciamiento génico dirigido a ciertas isoformas de ALFs, se aumenta la mortalidad acumulada en retos con patógenos como *Vibrio harveyi* y virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas inglés), estos experimentos revelan la asociación de los ALFs con los mecanismos de la respuesta inmune innata (Ponprateep *et al.*, 2012; Rosa y Barracco, 2010).

#### *Proteínas que reconocen patrones*

Los receptores de reconocimiento de patrones (PPRs, por sus siglas inglés) son moléculas que generan la unión entre los componentes estructurales de la pared celular de los patógenos, y de desencadenar respuestas inmunes mediante rutas de señalización (Akira *et al.*, 2006).

Las PPRs se han caracterizado en crustáceos peneidos y se han observado patrones de expresión similares entre especies. En hemocitos están los mayores niveles de expresión relativa, debido a que estas células son las encargadas del reconocimiento (Lee y Söderhäll, 2002).

Las lectinas contienen un dominio de unión/reconocimiento de carbohidratos, en crustáceos peneidos existen 7 tipos de lectinas, que han sido ampliamente estudiadas para analizar la funcionalidad y en el reconocimiento de virus y bacterias (Wei *et al.*, 2012).

### *Proteinasas e inhibidores de proteasas*

Las proteinasas y los inhibidores de proteinasas se encuentran en todos los organismos vivos, estas tienen diversas funciones a nivel biológico y fisiológico. En el sistema inmunitario tienen la función del control y la activación cascadas esenciales de señalización (Tassanakajon *et al.*, 2013).

El dominio proteico “Clip” y los homólogos son miembros de proteinasas relacionadas con la inmunidad de los crustáceos, la principal característica de dominio es el amino terminal de la estructura proteica y en el sitio activo existe una triada catalítica por los aminoácidos His, Asp, Ser. Otras funciones conocidas son las interacciones con metales, adhesión celular, y efector multifuncional del sistema inmunitario. La expresión relativa de estas se observa sobre regulada cuando el organismo tiene una infección viral o bacteriana (Jiang y Kanost, 2000).

En los crustáceos peneidos existen 3 tipos de inhibidores de proteasas: los del tipo Kazal, las serpinas, y las  $\alpha$ -macroglobulinas (A2M). El mecanismo de acción del tipo Kazal es situarse como análogo competitivo, formando un complejo. Estos inhibidores tienen actividad bacteriostática y antiviral. Las A2M tienen un amplio espectro de inhibición, son almacenados en los hemocitos granulares, en infección viral o fúngica son liberados y participan en la activación de la fagocitos. Las serpinas son inhibidores altamente conservados que funcionan como sustratos inhibitorios en el sitio activo de las proteasas formando complejos estables, están relacionadas con la activación del sistema pro-fenol oxidasa (proPO) (Tassanakajon *et al.*, 2013).

### *Melanización*

La melanización es un componente de defensa encontrado en insectos y crustáceos. El sistema proPO es el encargado del proceso de melanización. La melanina es un pigmento distribuido en diversos organismos, en el caso de los crustáceos tienen múltiples funciones como la inhibición de enzimas fúngicas y

bacterianas. El sistema proPO se encuentra en los hemocitos semi-granulares y es activado por un conjunto de PPRs y se activa por la cascada serin-proteasa. Se observó que el silenciamiento génico al sistema proPO hace más susceptibles a los crustáceos ante infecciones bacterianas (Tassanakajon *et al.*, 2013).

#### *Rutas de muerte celular programada (Apoptosis)*

La apoptosis es un proceso en el cual las células programan su muerte de una manera regulada, cuando están dañadas o tienen infección viral. La apoptosis realiza una función importante en los mecanismos antivirales de los crustáceos peneidos, las caspasas son los componentes efectores de la apoptosis ante la infección con WSSV. La apoptosis es activada en las infecciones virales, para evitar que aquellas células infectadas sean utilizadas como maquinaria de replicación viral (Koyama *et al.*, 2000).

#### *Sistema antioxidante*

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas por los organismos aerobios, algunas situaciones fisiológicas inducen el estrés y por tanto, se induce la producción de ROS, por ejemplo los cambios de temperatura, la hipoxia, cambios de pH, la exposición a compuestos tóxicos, y las infecciones patogénicas. El aumento de la concentración de las ROS causan daño celular, principalmente a biomoléculas como las proteínas, los lípidos, y los ácidos nucleicos. En una infección microbiana se demanda una alta tasa en el consumo de oxígeno, en consecuencia se producen las ROS, con la finalidad de eliminar microorganismos causantes de una infección, aunque esta situación pueda generar daños al propio hospedero. El anión Superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) son algunas formas de las ROS. Existen enzimas capaces de convertir las ROS en moléculas más estables como oxígeno ( $O_2$ ) y agua ( $H_2O$ ) por otro parte, existen moléculas como las vitaminas A, C, y E

con capacidad antioxidante. En crustáceos peneidos se ha observado que cuando existe una infección viral o bacteriana, hay una alta expresión relativa de genes codificantes para enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y glutatión transferasa (Bachère *et al.*, 2004; Castex *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Inmunoestimulantes

Los Inmunoestimulantes son compuestos químicos que activan el sistema inmune para aumentar la resistencia a infecciones causadas por microorganismos, se han definido como *“moléculas de alarma que activan el sistema inmune”*. La camaronicultura ha recurrido al uso de inmunoestimulantes, ya que estos pueden ser usados en etapas críticas para los organismos, y son considerados como una medida profiláctica para el control de enfermedades en el cultivo.(Raa, 2013).

La mayor parte de las sustancias inmunoestimulantes son extraídas de componentes de las paredes celulares de microorganismos, también se han utilizado diversos compuestos para lograr una inmunoestimulación, como el uso de minerales, y extractos de plantas (Roch, 1999).

### 2.3 Rutas de señalización del sistema inmune

Los seres vivos tienen una característica en común, la capacidad de coordinar su metabolismo y funciones fisiológicas con los cambios del entorno. Esta coordinación es lograda a través de redes de comunicación utilizando señales químicas que transducen señales del medio extracelular hasta la zona intracelular para alcanzar el equilibrio (*steady-state*). Las redes de comunicación celulares que participan en diferentes mecanismos moleculares, por ejemplo los receptores de la membrana son un complejo que ayudan a la célula interpretar mensajes de la zona extracelular hacia la zona intracelular, esto provoca potenciales modificación el interior celular para adaptarse a los cambios exteriores (Jordan *et al.*, 2000).

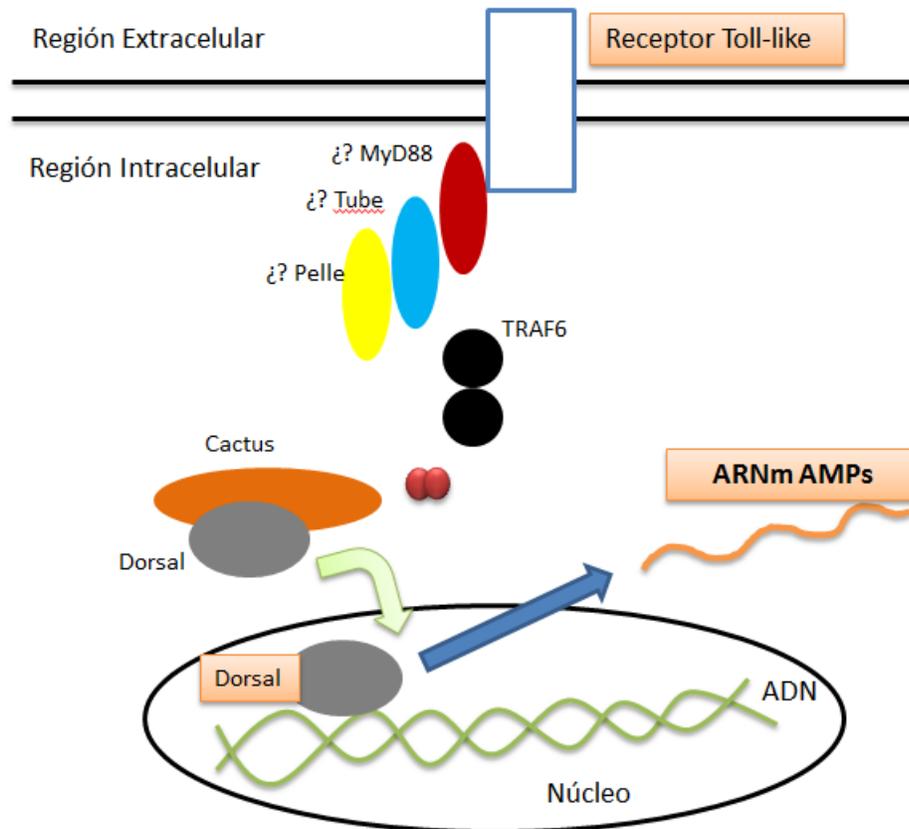
Las respuestas del sistema inmune innato de los invertebrados representan la primera línea de defensa ante la presencia de microorganismos, incluyen diversas funciones celulares y humorales, realizadas por un conjunto de transducciones de señales, por medio de la unión de ligandos-moléculas señalizadores de la membrana en forma receptores hasta disparar los eventos ocurridos dentro de la célula (crecimiento celular, metabolismo, cambios del citoesqueleto y expresión de genes). Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) activan los receptores en la superficie de la membrana y la célula realiza cambios a nivel intracelular, con la formación de mensajes químicos. Por otra parte dentro de la célula se encuentran los segundos mensajeros señalizando y promoviendo respuestas a nivel fisiológico, lo que marca una clara red de comunicación resumida en una combinación de mensajes y receptores, que van uno a uno hasta amplificar una señal (Hoffmann, 2003; Hultmark, 2003).

Las rutas de señalización del sistema inmune en *Drosophila melanogaster* son un modelo para comprender los mecanismos del sistema inmune innato, aunque el conocimiento sobre las rutas de señalización en la respuesta a virus es muy limitada (Hultmark, 2003).

### 2.3.1 Ruta Toll

La ruta de señalización de Toll (Fig. 3) en crustáceos está relacionada en la respuesta de bacterias Gram-positivas y hongos por la regulación de un conjunto de familia de genes que incluyen péptidos antimicrobianos, moléculas pequeñas de señalización sin función conocida, un ejemplo de las funciones conocidas son los componentes humorales (melanización) y las cascadas de coagulación. Los componentes proteicos de esta ruta son: los ligandos splätze, Toll, Pelle, Tube, MyD88, Cactus, Dorsal, y DIF (Aggarwal y Silverman, 2008).

Los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*) son proteínas que juegan un papel muy importante en la señalización de mensajes del sistema inmune innato en los invertebrados, no son catalíticos, poseen una estructura sencilla conservada que puede reconocer una gran variedad de patógenos. Se han reportado distintos receptores de tipo Toll en los crustáceos peneidos *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsopenaeus japonicus* y *L. vannamei*. Estos receptores tienen motivos y dominios proteicos como las repeticiones ricas en leucinas (LRRs, por sus siglas inglés), receptor citoplasmático Toll/interleucina-1 (TIR, por sus siglas inglés). Análisis filogenéticos con receptores de tipo Toll de crustáceos han demostrado que se encuentran en solo un clúster, evidenciando un mismo origen común (Arts *et al.*, 2007; Mekata *et al.*, 2008; P.-H. Wang *et al.*, 2012; C. Yang *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Representación esquemática de la ruta Toll. Muestran los componentes canónicos de la ruta Toll, en crustáceos peneidos. Los signos de interrogación denotan una probable localización celular (Li y Xiang, 2013).

Los spätzle son moléculas de origen proteico y ligandos específicos para los receptores de tipo Toll. En respuesta inmune y desarrollo embrionario no reconocen a los PAMPs directamente pero, utilizan estos como ligandos a moléculas de citoquinas. Los spätzle proceden de una cascada serin-proteasa. En *D. melanogaster* se conocen 6 ligandos spätzle pero las funciones moleculares no han sido esclarecidas, en crustáceos peneidos se han descrito los ligandos spätzle *F. chinensis*, y *L. vannamei* (Lemaitre *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012).

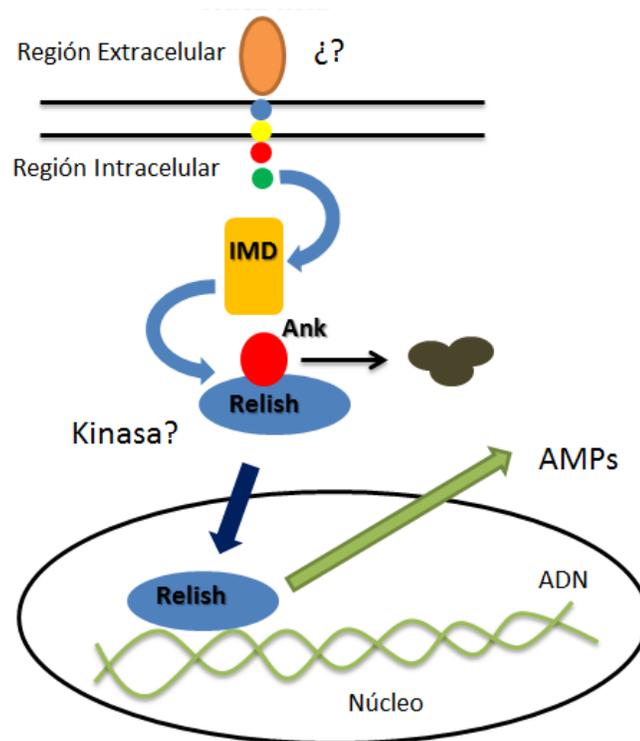
Para hacer funcional al receptor de tipo Toll otras proteínas tienen que ser recluidas en el complejo, MyD88/Tube son recluidos por Pelle y TRAF6 para dar la forma final y funcional al receptor. MyD88-Tube-Pelle forman un complejo heterotrimérico a través de los dominios intracelulares del receptor Toll (Aggarwal y Silverman, 2008)

TRAF6 es un adaptador clave para la señalización y está ubicado como un blanco de Pelle. En *L. vannamei* se encontró un transcrito que tiene 30% de identidad con *TRAF6* de otras especies, esta proteína contiene un dominio de dedos de zinc. TRAF6 puede activar promotores de los péptidos antimicrobianos AMPs y se ha observado que juega un papel importante en la regulación de la respuesta antibacteriana y antiviral, con la expresión de péptidos antimicrobianos (Dongdong *et al.*, 2012).

Dorsal es una proteína que fue identificada como el “proteína de polaridad” en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Dorsal es un miembro de la familia de los factores de transcripción Rel, Dorsal y Dif. Están presentes en el citosol formando un complejo. Cactus se degrada y libera a Dorsal haciéndolo activo como factor de transcripción que puede translocar al núcleo celular y transcribir genes de AMPs (Huang *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Ruta IMD

IMD es una ruta de señalización (Fig. 4) importante para regular la respuesta inmune en la expresión de péptidos antimicrobianos. En *Drosophila*, la ruta IMD reconoce patógenos Gram-negativos e incluye 9 proteínas canónicas de importancia IMD, receptor PGRP-LC, proteína quinasa 3 activada por mitogénos, TAK1, TAB2, DIAP2, señalosoma IKK, adaptador dFADD, caspasa Dredd, y el factor de transcripción Relish (Lemaitre y Hoffmann, 2007).



**Figura 4.** Representación esquemática de la ruta IMD. Muestran los componentes canónicos de la ruta IMD, en crustáceos peneidos. El signo de interrogación denota una probable localización celular (Li y Xiang, 2013).

El receptor IMD tiene un dominio RIP que es receptor de un factor de necrosis tumoral (TNF-R, por sus siglas inglés), la sobreexpresión del TNF-R induce la expresión de AMPs en la ausencia de infección. En *L. vannamei* ha sido reportado una secuencia de IMD y se demostró que la infección de bacterias Gram-negativas son responsables de inducir esta ruta, además se demostró que la peneidina 4 (AMPs) es regulada por IMD (Huang *et al.*, 2009).

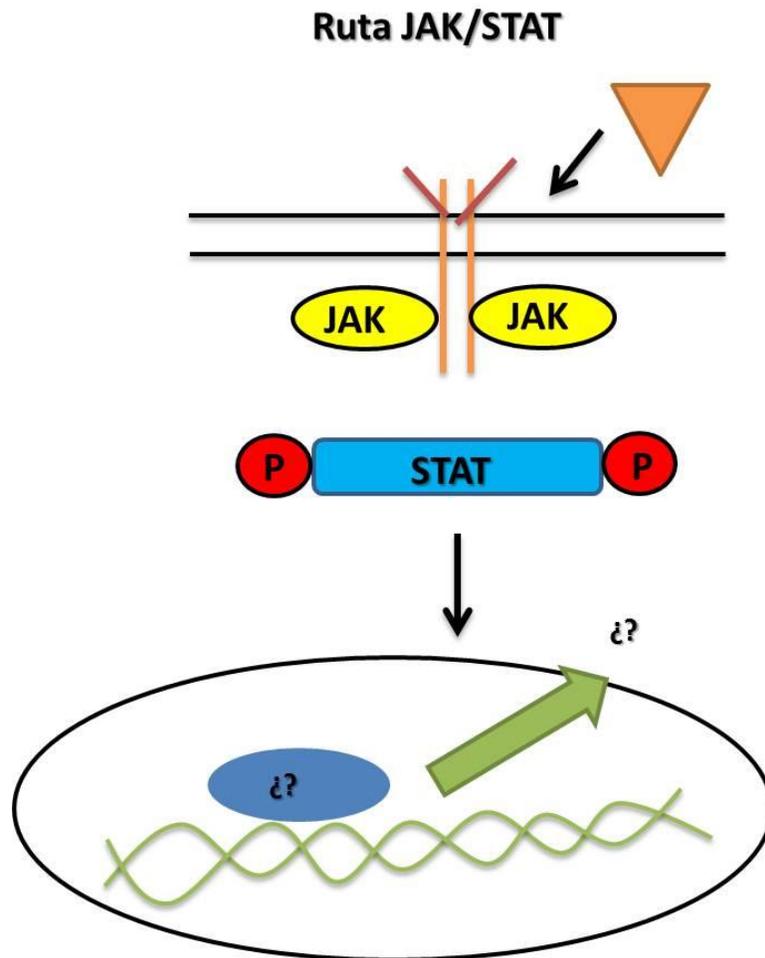
Relish es un factor de transcripción que desencadena por la ruta IMD en la respuesta a infecciones de bacterias Gram-negativas en *Drosophila*. En crustáceos peneidos se ha observado que también se estimula por la presencia de virus. En *F. chinensis* se encontró una proteína de 504 aminoácidos homóloga a Relish. Esta proteína tiene el dominio RHD (por sus siglas en inglés) dominio homólogo a Rel. El dominio IPT. En *L. vannamei* también fueron encontrados dos

transcritos homólogos, los cuales coinciden con dominios proteicos de otras Relish. La expresión más alta de Relish se encontró en órgano linfóide (oka) y hemocito. Se observó que el silenciamiento genético de Relish afecta la transcripción de Peneidina 5, crustina, y factor anti-lipopolisacárido (ALF) (Dongdong *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 1998, 2010; Yedery y Reddy, 2009).

Cuando se comparan las rutas IMD de *Drosophila* y de peneidos se observan diferencias significativas dado que no se ha esclarecido completamente la ruta IMD. Datos recientes sugieren que las proteínas canónicas de IMD y de Toll es muy probable que formen estructuras heterodiméricas e interactuar entre sí, formando una cooperación en la transducción de la señal. En el caso de peneidos se ha observado que la infección por WSSV está controlada por promotores de la ruta Toll e IMD, esta evidencia soporta las interacciones moleculares de estos componentes en *Drosophila* (Huang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011)

### 2.3.3 Ruta JAK/STAT

La ruta JAK/STAT tiene solo 3 componentes canónicos el receptor Domeless, el Hopscotch Janus quinasa, y el factor de transcripción STAT (Fig. 5), en los insectos esta ruta está implicada en la respuesta antiviral. Para *P. monodon* se reportó el primer transcrito con dominios muy similares a la encontrada en insectos. En *L. vannamei* se ha reportado que el factor de transcripción STAT es modulada después de la infección con WSSV, la ruta aún no está descrita y se necesita la descripción de más componentes de interacción (Agaisse *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Representación esquemática de la ruta JAK/STAT. Muestran los componentes canónicos de la ruta JAK/STAT, en crustáceos peneidos. Los signos de interrogación denotan una probable localización celular (Agaisse *et al.*, 2004).

## 2.4 Fertilizante enriquecido en silicio orgánico (FESO)

El fertilizante enriquecido en silicio orgánico se elabora con roca volcánica solubilizada con calor en condiciones ácidas. Esta mezcla contiene los siguientes valores porcentuales de minerales: calcio (Ca) 24–26%, magnesio (Mg) 10–14%, silicio (Si) 14–17, hierro (Fe) 2–3%, zinc (Zn) 3–5% y potasio (K) 1–2%. Este producto fue procesado y donado por el Dr. Edgar Quero del Instituto Tecnológico Superior de Uruapan (Michoacán, México) (Quero-Gutierrez, 2008).

Este fertilizante ha sido empleado usualmente en cultivos agrícolas. El concepto de fertilizante de acuerdo a Finck, 1982: *“Los fertilizantes son sustancias que se aplican directamente al suelo para promover el crecimiento”*. Existen diversos tipos de fertilizantes de origen orgánico o inorgánico. Los de origen inorgánico son todos aquellos extraídos de cenizas, y fuentes geológicas (mármol y rocas de fosfatos). Las rocas volcánicas convertidas en fertilizante son consideradas multi nutrientes y ricas en silicatos, principalmente por aportar los macro nutrientes más importantes para las plantas. Los fertilizantes basados en rocas volcánicas tienen un gran interés para el estudio de los suelos ya que ayudaría a comprender los procesos de mineralización y procesos geoquímicos de los suelos, se ha mostrado una tasa alta de intercambio catiónico, por lo cual se sugiere que ayuda al transporte de nutrientes y a la solubilización de estos compuestos (Van Straaten, 2006).

Los minerales amorfos ricos en silicio (FESO) han sido utilizados en la acuicultura del camarón en estanques con agua de mar en las regiones de Sinaloa. Se ha observado que el principal efecto está ligada a la producción primaria de fitoplancton un alimento natural del camarón, por tanto se estima un impacto positivo en el crecimiento y desarrollo que permite rendimientos superiores en las cosechas (Quero-Gutierrez, 2008).

Este fertilizante enriquecido en silicio orgánico, fue probado en 2007 en *L. vannamei* por inmersión y combinación con el alimento, en distintas concentraciones. En la cual se demostró que la dosis 1 mg/L en inmersión

aumentaba significativamente el conteo de hemocitos y la actividad de superóxido dismutasa, sugiriendo un efecto inmunomodulador, pero no como una medida profiláctica contra infección de WSSV y *Vibrio harveyi* (Espinoza León, 2006).

El efecto del FESO por inmersión fue evaluado con un experimento, utilizando microarreglos homólogos de *L. vannamei*. Se observaron genes expresados diferencialmente familias de genes relacionados con el sistema defensa. Se observó una expresión relativa significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) en hemocitos y epidermis de *LvFerritina* y *LvSOD* en organismos tratados con FESO (Velázquez Lizárraga, 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón blanco es una actividad comercial que se realiza en el noroeste de México con una tendencia de crecimiento del 21% anualmente, esta actividad ha sido afectada por patologías virales o bacterianas. Estos problemas han sido abordados con la mejora en los procesos de producción, utilizando las buenas prácticas de manejo. Por otra parte grupos de investigación a nivel mundial están enfocados en el estudio de los mecanismos moleculares que participan en el sistema inmune. El uso de inmunoestimulantes en camarón es una práctica común como medida profiláctica ante problemas de brotes virales y bacterianos, en este trabajo se utiliza al FESO para conocer el perfil transcriptómico del camarón blanco y analizar los genes relacionados con rutas de señalización y la respuesta inmune, con la inferencia que el FESO tiene propiedades inmunoestimulantes (CONAPESCA, 2015).

Las pérdidas económicas asociadas a infecciones virales y bacterianas ascienden a los mil millones de dólares anualmente en todo el mundo, este problema se ha tratado de abordar utilizando la profilaxis con el uso de inmunoestimulantes y antibióticos, estos últimos han sido fuertemente criticados por su impacto al medio ambiente.

Esta propuesta de trabajo se acota al análisis, identificación y perfiles de expresión relativa de genes relacionados con las rutas de señalización del sistema inmune de camarón blanco cuando es expuesto al FESO, como un primer paso para la demostración científica del efecto inmunoestimulante del FESO, aunque no abordará otros experimentos donde se involucren retos con microorganismos que comúnmente afectan a este.

El FESO es administrado por inmersión en el agua, esto quiere decir que no habrá que tener una manipulación directa con el organismo, si este producto con más estudios científicos se demuestra su efecto inmunoestimulante, la fase de las pruebas a gran escala serán de una complejidad mínima para la administración.

#### 4. HIPOTÉISIS

La exposición de *L. vannamei* al FESO ha mostrado un aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y actividad de SOD y CAT en músculo, hepatopáncreas y hemocitos, entonces en el transcriptoma de organismos expuestos al FESO habrá genes relacionados con las rutas de señalización del sistema inmune innato.

## 5. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Identificar genes de la rutas de señalización del sistema inmune innato de *Litopenaeus vannamei* expuesto a un fertilizante enriquecido en silicio orgánico.

### 4.2 Objetivos específicos

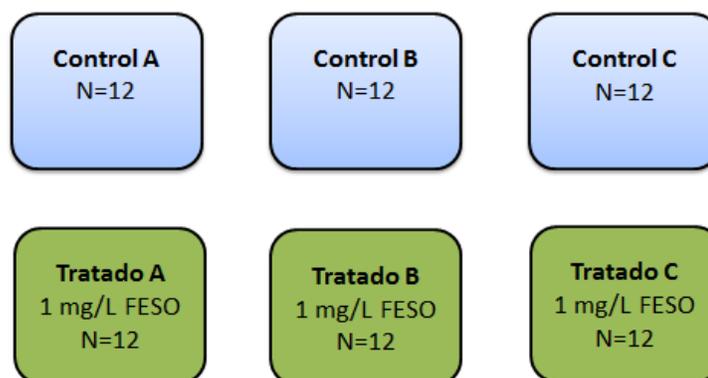
1. Analizar e identificar *in silico* los genes que participan en la ruta de señalización del sistema inmune.
2. Identificar la ubiquidad de los genes que participan en la respuesta inmune y rutas de señalización.
3. Identificar niveles de expresión de genes que participan en la respuesta inmune y rutas de señalización del sistema inmune.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de organismos y mantenimiento

Organismos juveniles de camarón blanco ( $5.38 \pm 1.73$  g) (*L. vannamei*) fueron obtenidos de la granjas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., y el mantenimiento se realizó en el Laboratorio de Mantenimiento y Aclimatación de Organismos acuáticos del CIBNOR, por semana en tanques de PVC de 1000 L con aireación continua utilizando filtros biológicos. Se mantuvieron a temperatura ambiente ( $27\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) con una salinidad de 35 ups (unidades prácticas de salinidad). Se utilizó agua de mar filtrada y bombeada desde la ensenada de La Paz.

Los organismos ( $n = 12$ ) fueron separados en tanques individuales de fibra de vidrio de 40 L, 3 tanques utilizados para la condición control y otros 3 tanques utilizados para el tratamiento. Los organismos se mantuvieron 72 horas para una nueva aclimatación. Se aplicó por inmersión 1 mg/L de FESO (Fig. 6). A las 48 horas de la administración del FESO fueron muestreados 100 mg de los siguientes tejidos ( $n = 9$ ): hepatopáncreas, músculo, branquias y hemocitos. Fueron colocados en 1 mL de TRIzol reagent (Invitrogen). Para la obtención de hemocitos, se utilizó solución anticoagulante (SSS: 450 nM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM HEPES), se obtuvo hemolinfa del seno ventral de los organismos, utilizando una jeringa de 1 mL con 1:1 (SSS: hemolinfa). La hemolinfa se centrifugó a 800 g por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de TRIzol® al pellet (Vargas-Albores *et al.*, 1993).



**Figura 6.** Diseño experimental. Distribución de la aplicación del tratamiento del fertilizante enriquecido en silicio orgánico.

## 6.2 Extracción de ácido ribonucleico (ARN) y pirosecuenciación

Los tejidos primeramente fueron homogenizados en TRIzol® utilizando perlas de vidrio 425-600  $\mu\text{m}$  y una perla de 400 mm de porcelana en el equipo homogeneizador *FastPrep®-24* (Mp-biomedicals), a una velocidad de 5.5 m/s por 40 s. Los tubos se dejaron 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación de complejos núcleo-proteicos, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo frío y se agitaron los tubos vigorosamente por 15 s. Se dejaron 2 min a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugarse a 12,000  $\times g$  por 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación quedaron 3 fases, se tomó la fase acuosa (transparente) y se pasó a un tubo de micro-centrifuga de 1.5 mL, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y se mezcló suavemente por inmersión 2 veces. Se reposaron 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se realizó una centrifugación a 12,000  $\times g$  por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol 75% con agua DEPC, se agito por inmersión el tubo 2 veces y se centrifugó a 7,500  $\times g$  por 5 min a 4 °C. Los pellets en el los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente por ~15 min. Se les agrego agua miliQ

tratada con DEPC de acuerdo al tamaño del pellet. El ARN se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermoscientific) a  $A_{260}$ , los parámetros de pureza fueron obtenidos con la relación  $A_{260/280}$ . Posteriormente se realizaron geles de agarosa desnaturalizados con formaldehído al 37% y corridos en Buffer MOPS 1X frío, para ver la verificación de la integridad del ARN total.

Una vez verificada la calidad y la cantidad del ARN se realizó una mezcla única de los diferentes tejidos obtenidos del control y el tratamiento, y se mandaron a la unidad de secuenciación del CINVESTAV Irapuato. Se aplicó la técnica Pirosecuenciación 454 (Roche, DNA Link), la librería control (muestras control) fue secuenciada con la plataforma *GS-Titanium* y la librería tratada (organismos con exposición al FESO por 48 h) con *GS-FLX*.

### 6.3 Ensamble de Novo y anotación funcional

Antes de iniciar el ensamble se realizó un análisis de las secuencias para identificar tamaño, longitud, adaptador y calidad con el software en línea [PRINSEQ](#) v0.20.4 (Schmieder y Edwards, 2011). Las secuencias fueron inicialmente convertidas del formato .SFF a texto (.Fasta) y calidad (.Qual), utilizando el software [Mothur](#) v1.35.0 (Schloss *et al.*, 2009).

Para en el ensamblaje *de Novo* se utilizó el software [Trinity v2.1.0](#). Las secuencias fueron ensambladas con los parámetros estándar del software (Grabherr *et al.*, 2011). La librería control se ensambló *de Novo* de manera independiente al igual que la librería tratada, posteriormente se ensambló la librería tratada con la librería control, se ensambló la librería control y la base de datos de EST y finalmente se ensambló la librería tratada con la base de datos de EST; se realizaron 5 ensambles con distintos datos, estos últimos dos ensambles se utilizaron para aumentar la cobertura de los contigos obtenidos en los ensambles, esto con el fin de aumentar la longitud de aquellos contigos que salgan <400 pb (pares de bases).

Los contigos fueron sometidos a un algoritmo para encontrar las regiones de marco de lectura abierto (ORF) con mayor longitud, esto se realizó con el software [TransDecoder v2.0.1](#). Utilizando las secuencias de nucleótidos se realizaron alineamientos locales utilizando la herramienta de BlastX y BlastP con las bases de datos [Swissprot](#) y [UniRef90](#), con los siguientes parámetros número de secuencias máximo 1, y la salida de resultados en una tabla. Usando las secuencias de proteínas obtenidas de los ORF de los contigos, se realizó el algoritmo BlastP con las bases de datos anteriormente mencionadas (The SwissProt Consortium, 2015; Altschul *et al.*, 1990).

Utilizando las secuencias de aminoácidos obtenidas se utilizó el software [HMMER v2.1.1b2](#) para identificar dominos proteicos utilizando la base de datos de [Pfam](#) (Finn *et al.*, 2011, 2014).

Para identificar péptido señales en los contigos se utilizaron las secuencias de aminoácidos y se procesaron en el software [SignalP 4.1 Server](#) (Petersen *et al.*, 2011).

Las regiones transmembranales fueron predichas por el software [TMHMM Server v2.0](#) utilizando las secuencias de aminoácidos de los contigos (Krogh *et al.*, 2001).

En la parte anotación funcional, se generó una hoja de cálculo que contiene la anotación funcional de los contigos y las secuencias ORF, esto para tener una base de datos, que contenga de caracterización de cada contigo para saber a qué corresponde cada secuencia de ORF y de nucleótidos, además viene información adicional relacionada con términos de ontológicos acerca de procesos biológicos, funciones moleculares y componente celular de cada contigo. Los análisis generados con las secuencias fueron cargadas en una base de datos SQLite mediante la aplicación [Trinotate](#), la cual contiene anotación de las base de datos EggNOG y la ontología génica (GO), basado en Swissprot y Uniref90, una vez cargados los datos se realizó una consulta para extraer los datos con todos los software anteriormente usados y tener una tabla de anotación funcional que

contenga todos los resultados de los software anteriormente utilizados (Ashburner *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 2014).

#### **6.4 Análisis con términos de la ontología génica**

Las anotaciones obtenidas de la base de datos de SQLite, fueron importados al software de anotación funcional [Blast2GO v2.8](#), el software generó las gráficas de pastel para cada librería (control y tratada). Posteriormente se aplicó un test exacto de Fischer con ( $\alpha = 0.05$ ), para conocer la relevancia de los términos en las dos librerías. Para conocer los contigos con función del sistema inmune, se realizó una búsqueda utilizando el término “proceso del sistema inmune” (GO: 0002376) en la librería tratada, posteriormente se extrajeron las secuencias con proceso en el sistema inmune (Conesa *et al.*, 2005).

#### **6.5 Anotación funcional rutas metabólicas en KEGG**

Las secuencias de los ORF obtenidas a partir de los contigos fueron analizadas en el software KAAS (Servidor automático de anotación de KEGG), las secuencias fueron alineadas con el algoritmo [GhostX v1.1](#) utilizando la agrupación de sub secuencias. Para conocer rutas metabólicas asociadas a cada contigo de los ensamblajes se utilizaron dos apartados una parte para la identificación de rutas metabólicas y la otra parte establecer jerarquías de las principales funciones celulares de manera resumida (Moriya *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2014).

## 6.6 Selección de genes involucrados en las rutas de señalización

Para seleccionar genes de interés involucrados en las rutas de señalización, primeramente se buscaron las secuencias de los componentes canónicos de la ruta: Toll-like, IMD y JAK/STAT, utilizando como filtro el taxID: *Crustracea* [6657]. Se descargaron las secuencias en formato Fasta, posteriormente las secuencias de proteínas de la librería tratada se formateó a base de datos con el algoritmo *makeblastdb* incluido en el programa BLAST. Con las secuencias ya filtradas se realizó un BlastP para buscar secuencias homologas. Se realizó la selección de genes en función a los componentes canónicos de las rutas de señalización. Posteriormente se buscaron genes con función inmune importante. Cada una de las secuencias seleccionadas fueron alineadas para determinar el número de lecturas que soporta a cada contig.

## 6.7 Redes de interacción proteína-proteína

Se utilizaron 452 contigos de la librería control y 206 de la librería tratada identificados en el ensamble *de Novo*. Las interacciones entre estas dos librerías fueron precedidas con el software [GeneMANIA](#) utilizando los términos de la ontología génica basados en procesos celulares. *Drosophila melanogaster* como fuente anotación funcional. Se crearon 3 redes de interacción utilizando los genes de la librería control, los de la librería tratada, y finalmente una combinación de la librería control y tratada. Las interacciones fueron evaluadas en términos de co-expresión, interacciones físicas y genéticas, rutas metabólicas, co-localización, similitud de dominios proteicos, e interacciones precedidas (Warde-Farley *et al.*, 2010).

En las redes de interacciones biológicas libres escala, se definen los genes eje, como aquellos que tienen un gran número de patrones de interacción dentro de la red. Los genes eje fueron calculados con la herramienta [Analizador de](#)

[Redes](#) utilizando el software de [Cytoscape v3.4.0](#) y tomando en cuenta el valor grado de distribución de nodos (Albert, 2005; Shannon *et al.*, 2003).

Se realizó un análisis funcional enriquecido basado en procesos biológicos de cada red de interacción generada utilizando la herramienta de [DAVID](#) (Huang *et al.*, 2008).

## 6.8 Diseño de oligos a partir de la selección de genes

De los genes seleccionaron se utilizaron las secuencias obtenidas en el ensamble *de Novo* para diseñar oligonucleótidos específicos para cada secuencia. Utilizando el software en línea [primer3plus](#) con los siguientes parámetros: 35–65% de GC, 56–62 °C la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ), un tamaño de producto esperado de 200–800 pb. Para evaluar la formación de estructuras secundarios se evaluaron las propiedades termodinámicas de los primers en el software en línea [OligoEvaluator](#) de SigmaAldrich®.

## 6.9 Validación de ubiquidad por PCR punto final

Los organismos juveniles *L. vannamei* fueron obtenidos ( $n = 50$ ) de las granjas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. Los organismos se dejaron aclimatar por una semana en un tanque de 2000 L de PVC, con agua de mar filtrada y aireación continua, los organismos se mantuvieron por una semana agregando el 1% de alimento comercial por peso diario. Posteriormente se obtuvieron por disección 100 mg de cada uno de los siguientes tejidos: ganglio ventral, corazón, estómago, epidermis, intestino medio, branquias, músculo y glándula digestiva. Los tejidos se colocaron en 1 mL de TRIzol® reagent. Para la obtención de la hemolinfa se utilizó solución SSS tratada con DEPC, un volumen de SSS fue colocada en un jeringa de 3 mL con 1 volumen de hemolinfa, esta mezcla se centrifugo a 800 g por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se desechó y al pellet se le agrego 1 mL de TRIzol® reagent.

## 6.10 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario

Las extracciones de ARN de los tejidos se llevaron a cabo como se describe en la sección 6.1.2. Para evaluar la calidad del ARN total se corrieron geles de agarosa al 1% tratados con 2% de hipoclorito de sodio comercial utilizando buffer TAE 1X. Se realizó una inspección visual tomando en cuenta los siguientes aspectos, las bandas 18s/28s del ARN ribosomal (ARNr) y la ausencia de ADN genómico (ADNg). Para evaluar la concentración de ARN total se utilizó un espectrofotómetro a  $A_{260}$ . Para evaluar la pureza se utilizaron las relaciones  $A_{260/280}$  y  $A_{230/280}$ . La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó usando la enzima SuperScript II (Invitrogen ®) siguiendo las instrucciones del fabricante usando oligo d(T) y 1.5 µg de ARN total.

## 6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADNc obtenido a partir del ARN total se diluyó 1:5 veces con agua desionizada (miliQ), para ser usado como hebra molde para PCR. La reacción de PCR se realizó a un volumen de 25 µL con los siguientes componentes: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.25 mM, dNTPs 0.2 mM de cada uno, oligonucleótidos sentido y antisentido 0.8 µM, DMSO al 5%, agua y 1.25 u de polimerasa *Go Taq Flexi* (Promega ®). Se utilizó el siguiente perfil de temperaturas: 95 °C por 2 min, ciclo de 35: 95 °C por 15 s, 60 °C por 20 s y 72 °C por 40 s y al terminar el ciclo una extensión final de 72 °C. Una vez terminada la reacción se realizó una electroforesis de agarosa al 1.5% (80 V por 50 min) utilizando buffer TAE 1X y Gel RED 10,000 X para teñir los ácidos nucleicos, se utilizó marcador molecular 1 kb plus. Los geles fueron analizados en un fotodocumentador de luz UV, los productos de PCR se mandaron secuenciar por el método de Sanger en un solo sentido (Zimmermann *et al.*, 1988).

## 6.12 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real

Se seleccionaron 5 genes para evaluar la expresión de la ruta Toll-like, esta selección fue hecha con base en los resultados del objetivo 2 y consulta de la literatura. Los genes seleccionados fueron: receptor de tipo Toll-like 3 (*LvTLR3*), factor de transcripción Dorsal (*LvDo*),  $\alpha$ -macroglobulina (*LvAMG*), factor anti-lipopolisácarido (*LvALF*) y profilina (*LvPNF*); para los genes de referencia se utilizaron: el factor de elongación 1- $\alpha$  (*LvEF1A*), la proteína ribosomal L7 (*RPL7*) y la proteína ribosomal L8 (*RPL8*). Los primers se diseñaron utilizando los siguientes parámetros: longitud del oligonucleótido 18 – 24 pb, 35 – 65% de contenido GC, temperatura de alineamiento (Tm) 60 °C, que no se formarán dímeros, estructuras secundarias y con abrazadera  $2 \leq GC$  (Wang *et al.*, 2007).

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el software en línea [Primer3Plus](#) con los parámetros anteriormente mencionados. La estabilidad termodinámica (formación de dímeros) fue evaluada en el software [OligoEvaluator](#). Finalmente se realizó un PCR *in silico* para evaluar las características finales de los oligonucleótidos.

## 6.13 Curvas de calibración y qPCR

Primeramente se elaboró un Supermix 2X en un solo lote para ser usado en todo el experimento, el cual contenía los siguientes componentes: 2X solución amortiguadora sin color GoTaq Flexi 5 mM MgCl<sub>2</sub> 0.4 mM dNTPs de cada uno, colorante 2X EvaGreen, 10% dimetilsulfóxido y 2.5 u ADN polimerasa GoTaq Flexi y ajuste con agua grado PCR. La mezcla maestra fue almacenada en tubos para microcentrifuga de 1.5 mL con protección a luz directa.

Las curvas de calibración se prepararon primeramente realizando un concentrado de todas las muestras tomando 2  $\mu\text{L}$  de ADNc. Una vez mezclado, se realizaron diluciones seriadas 1:5, 1:50, 1:500, 1:5,000, 1:50,000 y 1:500,000. Las reacciones para el PCR en tiempo real, se llevaron a un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  conteniendo lo siguiente: 1X mezcla maestra, 0.5  $\mu\text{M}$  de oligonucleótido sentido y antisentido, agua y 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de tiras de 4 de 0.1 mL en el equipo de Rotor Gene 6000 (Corbette Research). El programa de amplificación fue el siguiente: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 20 s y 72 °C por 25 s y finalmente un programa para curvas de disociación de (50 °C – 99 °C), tomando lectura cada grado centígrado. El ADNc fue cuantificado para partir de esa concentración y construir las curvas de calibración.

#### **6.14 Evaluación de la estabilidad: Gen de referencia**

Una vez obtenidas las curvas de calibración se eligió la concentración en las que se correrían todas las muestras (1:50). Se corrieron los 3 genes de referencia (*LvEF1a*, *LvRPL8* y *LvRPL7*). Las condiciones de reacción fueron idénticas a la sección 6.3.2. Una vez obtenidas las corridas de todas las muestras se cargaron las curvas estándar y se extrajeron los valores de  $C_T$  y se analizaron con la herramienta en línea [RefFinder](#) (Xie *et al.*, 2012).

#### **6.15 Análisis de expresión relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y análisis estadísticos**

Los valores de  $C_T$  de cada una de las corridas fueron ingresados en hojas de cálculo con la respectiva normalización de las curvas estándar realizada en el software Rotor-GeneQ-Pure Detection v1.7.94, se aplicó la fórmula de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando como gen de referencia a *LvRPL7* ya que fue el gen más estable. Los análisis estadísticos realizados fueron ANOVA ( $P < 0.05$ ) y Holm-Sidak ( $P < 0.05$ ) realizaron en el software [SigmaPlot v11](#) (Livak y Schmittgen, 2001).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Secuencias obtenidas por Pirosecuenciación 454

Los resultados de la Pirosecuenciación 454, en  $\frac{1}{4}$  de placa fueron de 68 Mb y con un promedio de longitud de 321.84 pb. En la tabla II, se muestra en resumen las estadísticas obtenidas en la secuenciación y del ensamble *de Novo* de las librerías control, tratada y el ensamble realizado utilizando las dos librerías, Los otros dos ensambles no se muestran, porque como se comentó en la sección 7.2 estos ensambles se realizaron para soportar los contigos.

**Tabla II.** Resumen y estadísticas de ensamble de la pirosecuenciación 454 de *L. vannamei*.

<b>Pirosecuenciación generación de datos</b>	
Número total de lecturas	393,537
Número total de bases secuenciadas	68,413,664
Promedio de longitud de lectura (pb)	321.83
<b>Estadísticas de ensamblaje <i>de Novo</i></b>	
<b>Librería Control</b>	
Numero de contigos	3,391
Total de bases ensambladas	1,691,228
Promedio de la longitud de cóntigo	582.34
N50 longitud cóntigo	612
<b>Librería Tratada</b>	
Numero de contigos	2,202
Total de bases ensambladas	823,367
Promedio de la longitud de cóntigo	373.92
N50 longitud cóntigo	427
<b>Librería Control y Tratada</b>	
Numero de contigos	5,100
Total de bases ensambladas	2,245,960
Promedio de la longitud de cóntigo	507.80
N50 longitud cóntigo	531

## 7.2 Anotación funcional

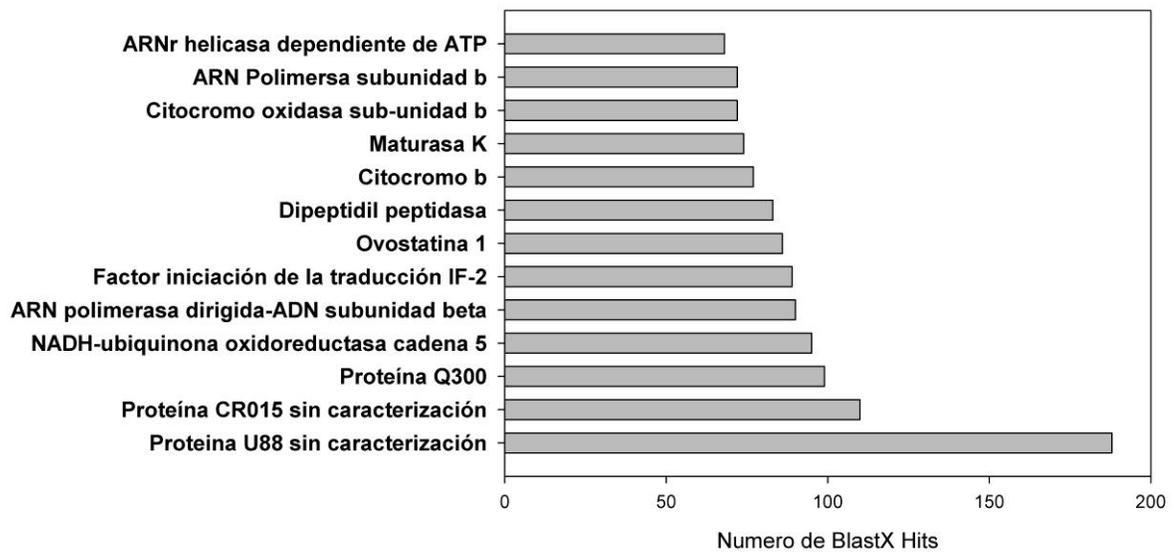
La anotación funcional de los transcritos ensamblados en las distintas librerías se presenta en la tabla III, donde se muestra el número de secuencias que se encontraron en cada base de datos.

**Tabla III.** Resultados de la anotación funcional de los contigos generados después del ensamble *de Novo*.

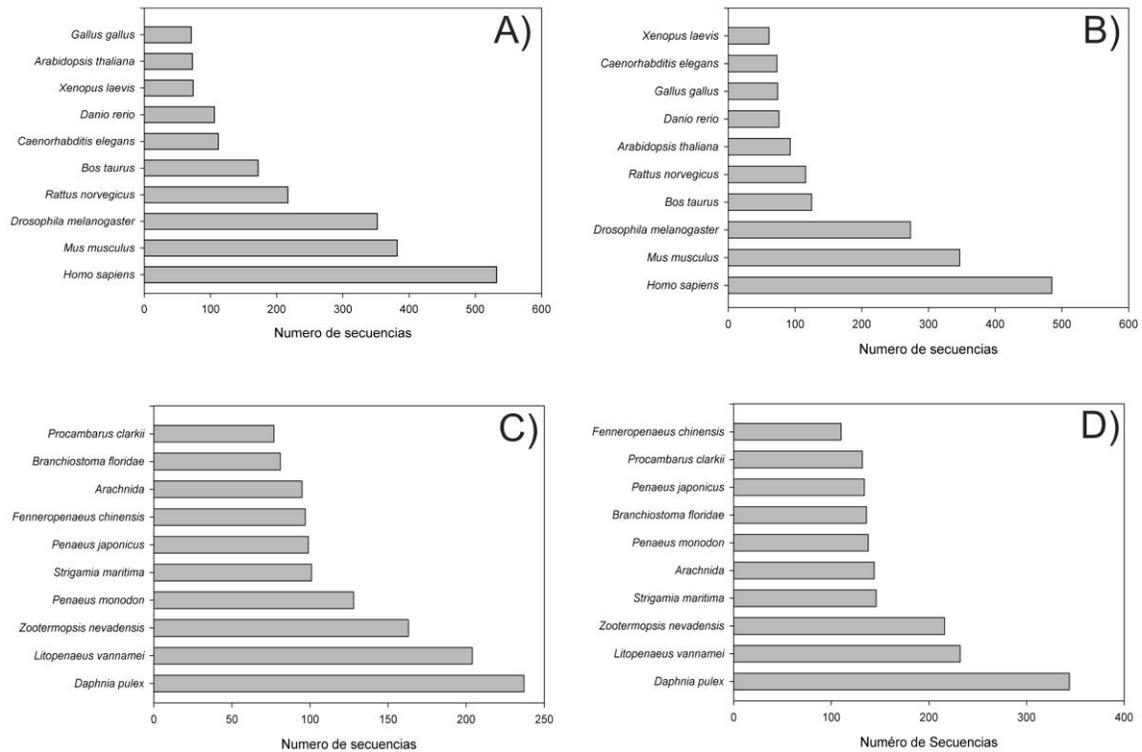
	<b>Control</b>	<b>Tratada</b>	<b>Control-tratada</b>
BlastX – SwissProt	2,422	396	2,558
BlastP – SwissProt	1,362	169	1,414
BlastX – UniRef90	2,835	507	3,051
BlastP – UniRef90	1,670	232	1,737
Pfam	1,283	162	1,329
SignalP	251	46	274
TMHmm	442	165	564
Anotación GO	761	283	808
Anotación EggNOG	1,617	121	1,715

### 7.2.1 Estadísticas de alineamiento local BlastX y BlastP

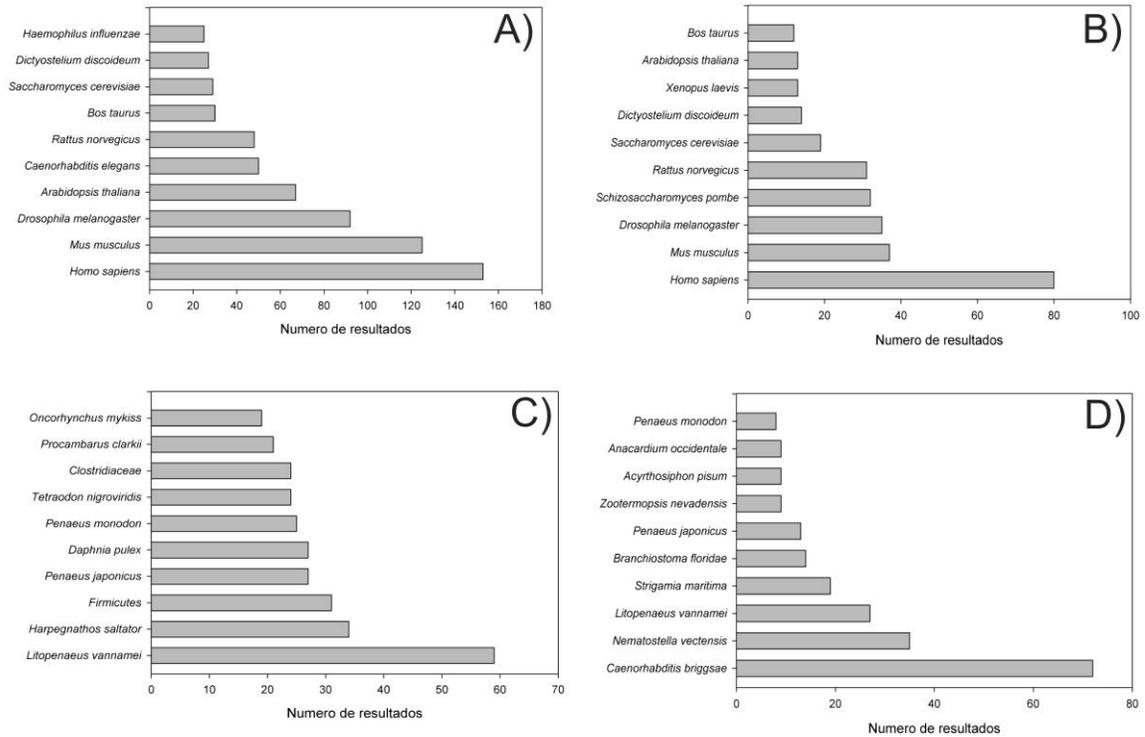
Las proteínas con mayor similitud al aplicar el algoritmo BlastX se muestran en la figura 7. Los resultados de BlastX y BlastP fueron plasmados en la figura 8b donde se observa para cada librería la cantidad de resultados por cada ensamblaje, en la sección 11.4 se muestra un diagrama de Venn donde se observan las diferencias en los resultados de BlastX. En las figuras 8 y 9, se observan las gráficas con mayor similitud de las especies con secuencias homologas para la librería control, para cada uno de los algoritmos (BlastX y BlastP) contra las bases de datos correspondientes. Para ver el valor de probabilidad que maneja el algoritmo y cuál fue la significancia en cada alineamiento (sección 11.1 de anexos), donde se observan histogramas de distribución para el valor de e (e-Value), este valor representa la probabilidad de que el alineamiento realizado no sea al azar.



**Figura 7.** Nombre de las proteínas más abundantes. En el eje de las y se muestran el nombre de las proteínas, en el eje de las x se muestran el número de resultados al aplicar el algoritmo BlastX a la librería control-tratada.



**Figura 8.** Grupo de taxas más abundantes de la librería control. Muestra el número de contigos con las 10 especies con más resultados, en el algoritmo BlastX y BlastP. **A)** Muestra el resultado de BlastX contra la base de datos de SwissProt, **B)** muestra el resultado de BlastP contra la base de datos de Swissprot, **C)** muestra el resultado de BlastX contra la base de datos UniRef90, **D)** muestra el resultado de BlastP contra la base de datos UniRef90.

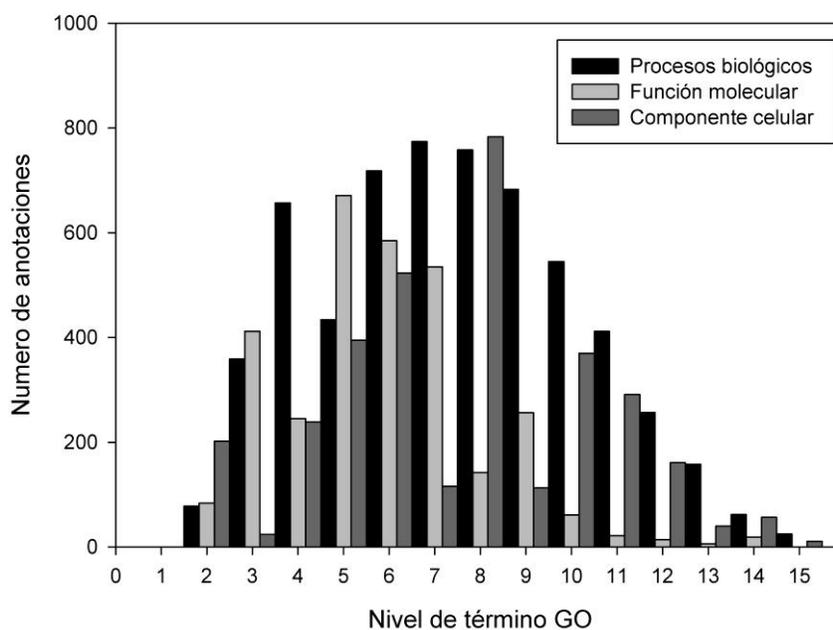


**Figura 9.** Grupo de taxas más abundantes de la librería tratada. Muestra el número de contigos con las 10 especies con más resultados, en el algoritmo BlastX y BlastP. A) Muestra el resultado de BlastX contra la base de datos de SwissProt, B) muestra el resultado de BlastP contra la base de datos de Swissprot, C) muestra el resultado de BlastX contra la base de datos UniRef90, D) muestra el resultado de BlastP contra la base de datos UniRef90.

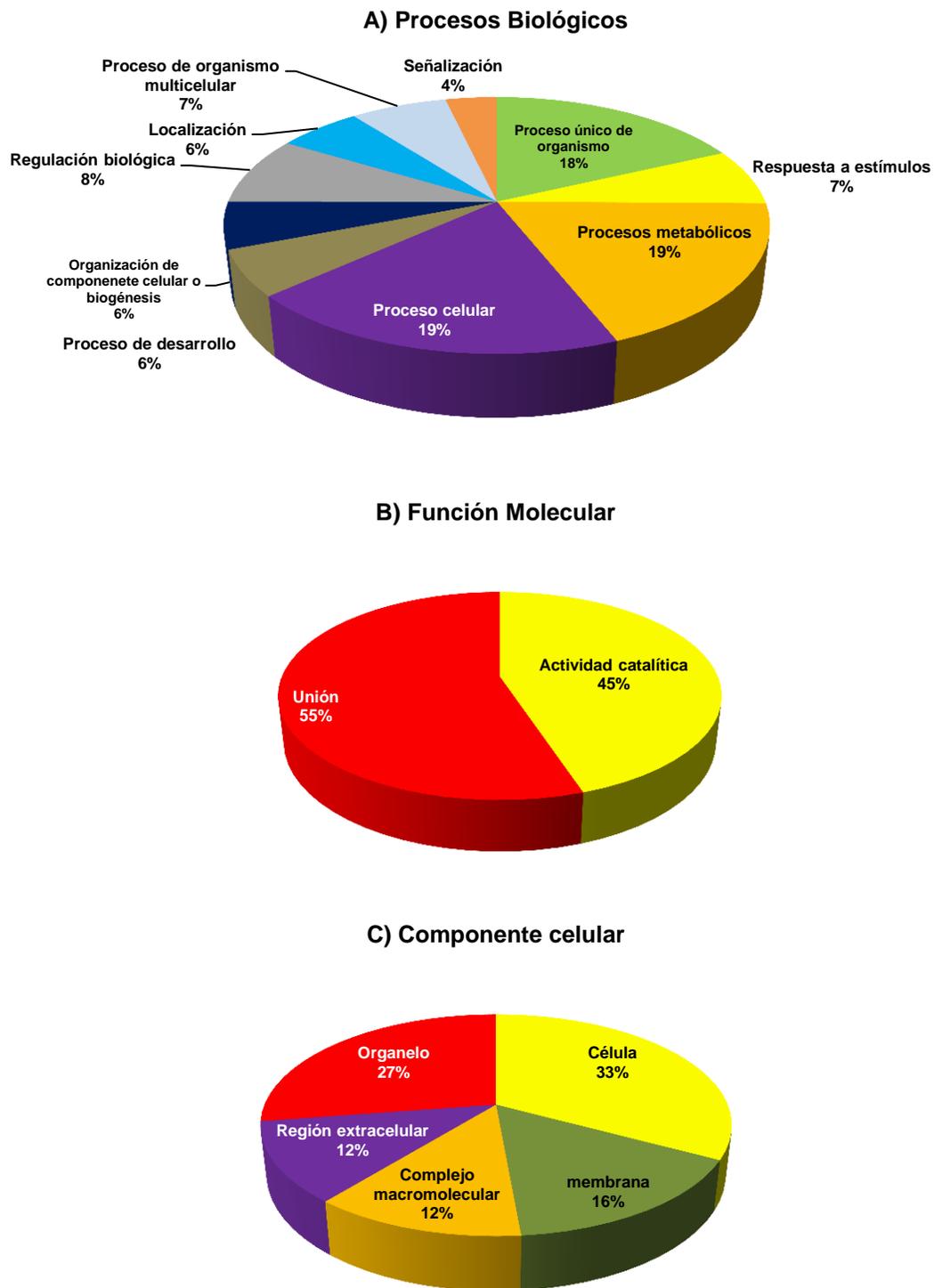
### 7.2.3 Estadísticas de anotación funcional ontología génica

Sumando las dos librerías (control y tratada) se obtuvieron 14,445 términos de anotación y 1,715 secuencias con anotación, la distribución de las anotaciones y de las 3 ontologías fue representada por el nivel de anotación (1-15) y número de anotaciones por ontología (Fig. 10). Las anotaciones de cada librería fueron resumidas al nivel 2 y mostradas en gráficos de pastel en las figuras 11 y 12. La prueba exacta de Fischer control vs tratada (FESO 1 mg/L) se muestra en la figura 13.

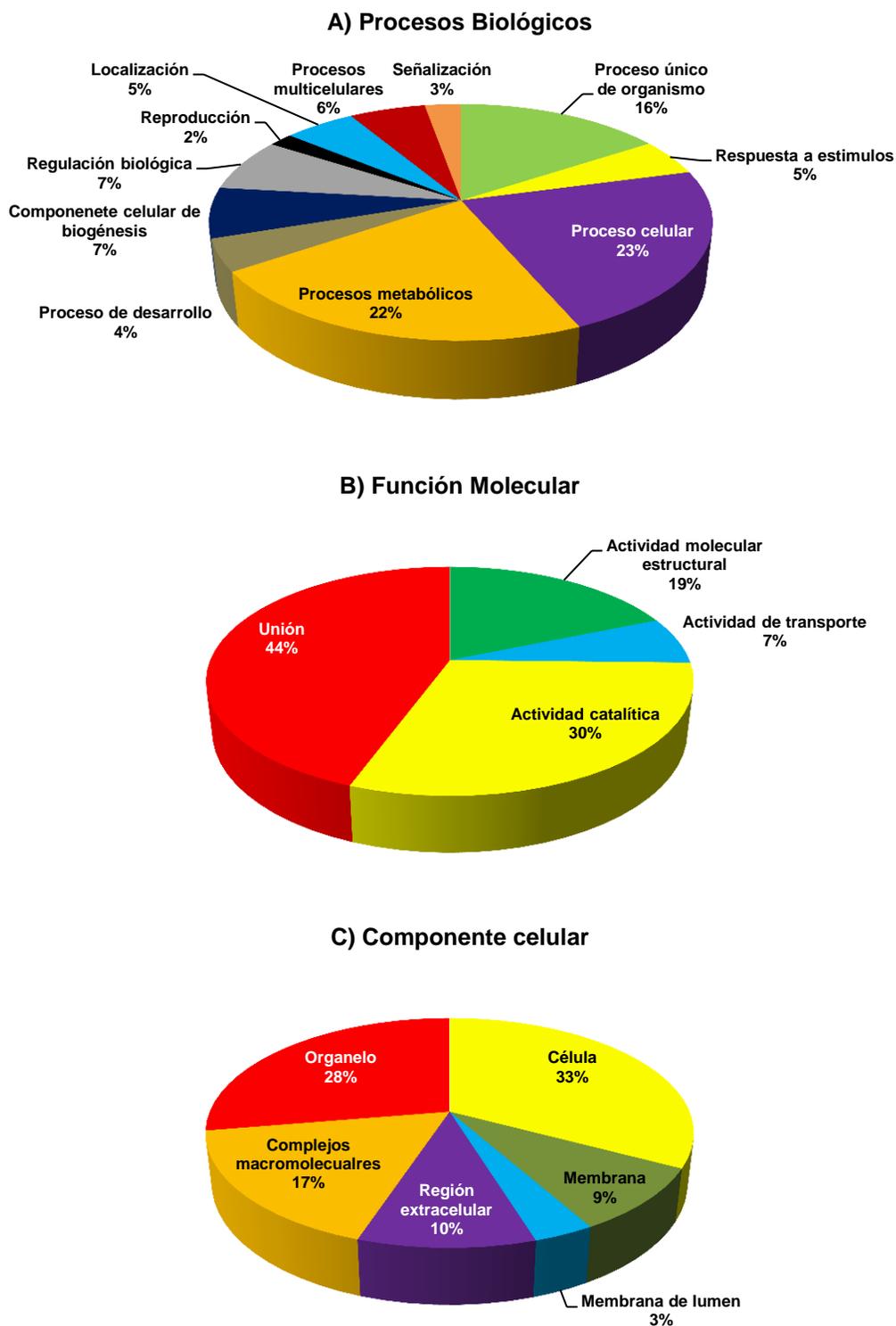
Se utilizó el término de anotación proceso del sistema inmune, para buscar en la librería tratada, secuencias (contigos) relacionados. En la tabla IV se resumen las secuencias con la anotación anteriormente mencionada.



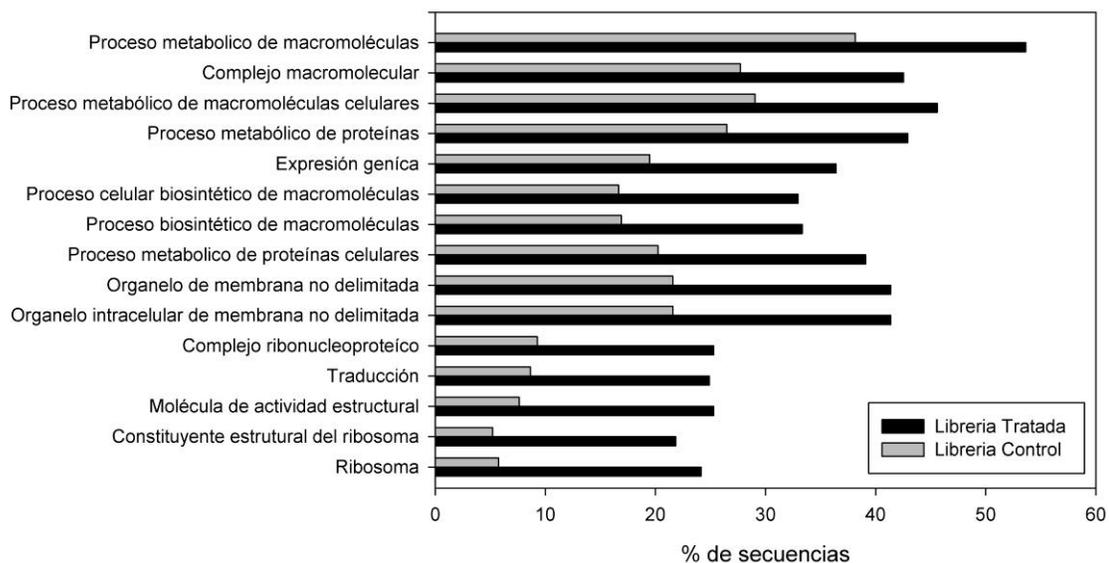
**Figura 10.** Distribución de anotación por nivel y ontología para librería control y tratada. Se muestra el nivel de anotación y el número de anotaciones por nivel, en las 3 ontologías. Media por nivel = 6.02, desviación estándar = 2.73.



**Figura 11.** Términos de la ontología génica representados en el nivel 2, para la librería control. Los números representan el porcentaje de los términos, con un valor de umbral de 160 secuencias.



**Figura 12.** Términos de la ontología génica representados en el nivel 2, para la librería tratada. Los números representan el porcentaje de los términos, con un valor de umbral de 13 secuencias.



**Figura 13.** Prueba exacta de Fischer ( $\alpha = 0.01$ ). Se observa la relevancia estadística con el porcentaje de secuencias entre los términos de anotación de las librerías.

**Tabla IV.** Contigos con términos de anotación procesos del sistema inmune para librería tratada.

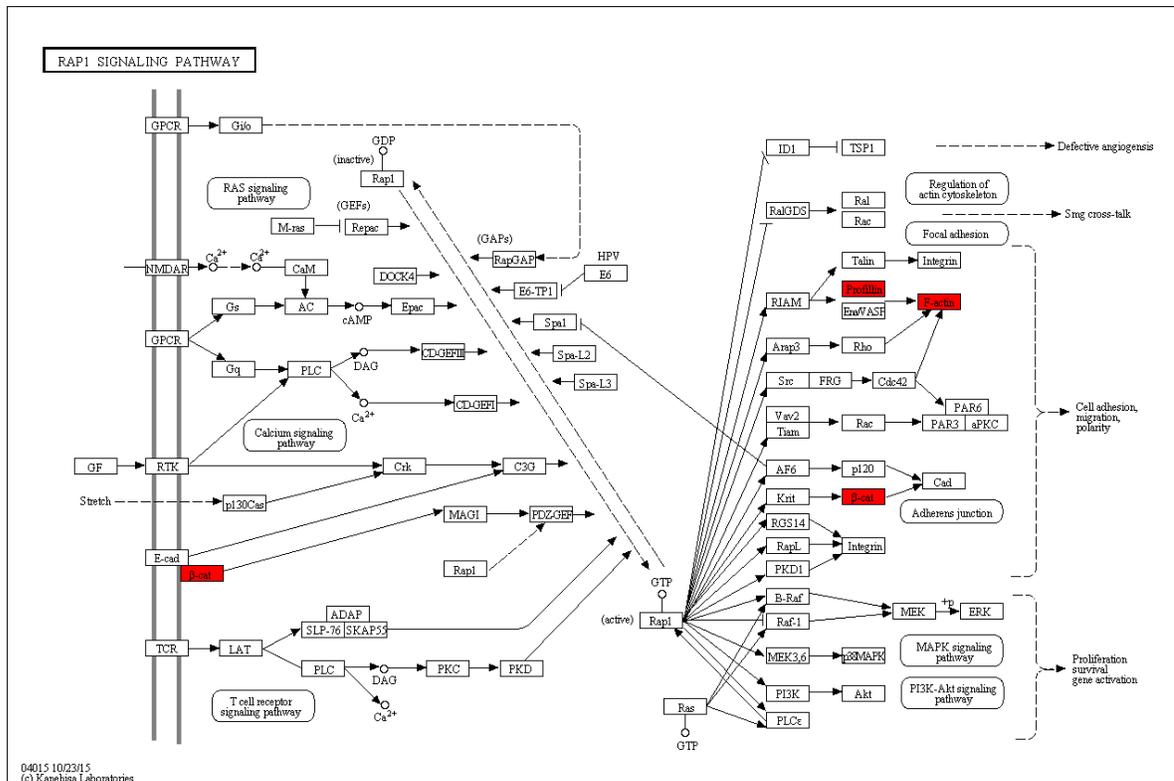
ID secuencia	Nombre proteína BlastX	Numero de términos GO
comp12979_c0	Apolipoproteína-D	198
comp13094_c0	Factor de coagulación-D	34
comp13213_c0	Proteína de unión GA	157
comp13306_c0	Proteína quinasa	153
comp14127_c0	Proteína alinila	70
comp4589_c0	Ubiquitina tioesterasa	124
comp5582_c0	Domino de cromo helicasa	223
comp692_c0	Crustacianina	210
comp8417_c0	Superóxido dismutasa	285
comp9167_c0	Proteosoma subunidad alfa	221

### 7.2.3 Anotación funcional de rutas metabólicas en KEGG

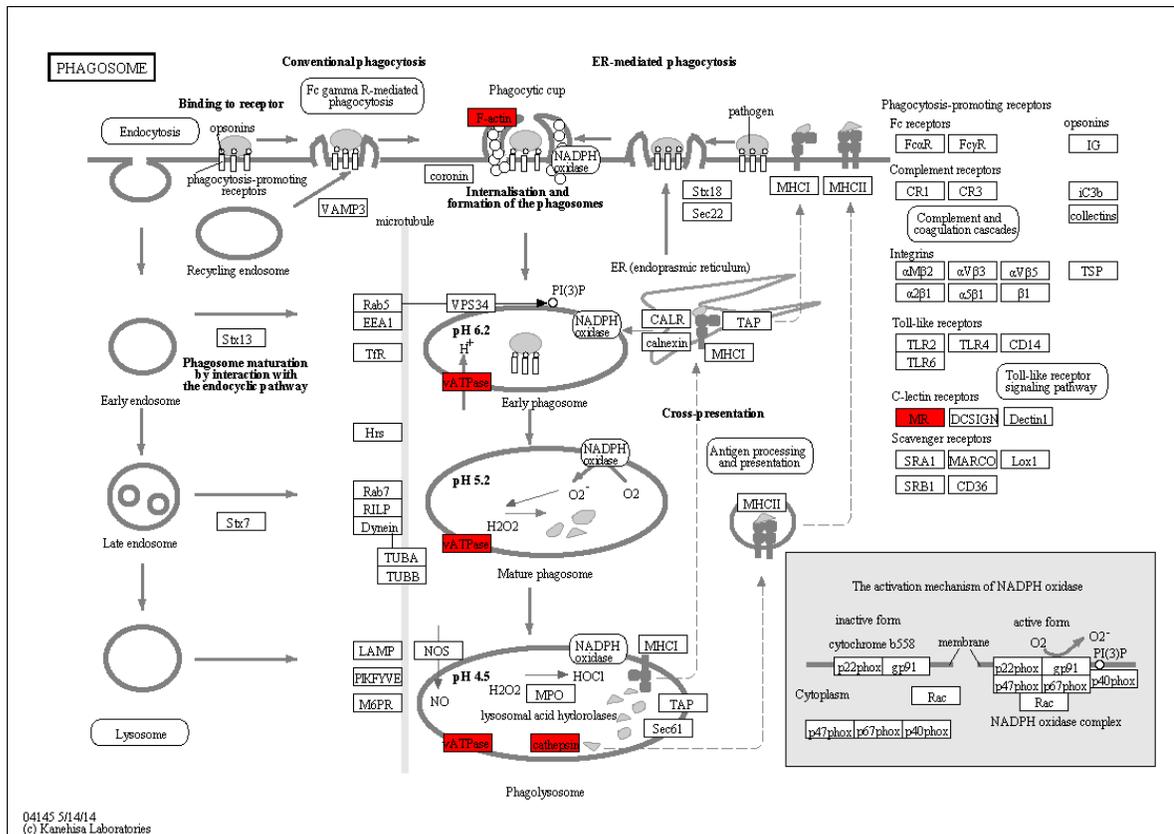
Los resultados de KEGG fueron clasificados por jerarquías en su función. En la tabla V se enlistan los resultados de las rutas metabólicas de KEGG para la librería tratada clasificados por familias de proteínas. En las figuras 14 y 15 se muestran dos rutas metabólicas de interés utilizando como modelo a *Drosophila melanogaster*, en las cuales se observan dos rutas metabólicas de interés relacionadas con rutas de señalización (Fig. 14) y el fagosoma (Fig. 15).

**Tabla V.** Tabla de anotación jerarquías de módulos de BRITe en KEGG. Muestra las familias de proteínas involucradas en cada jerarquía encontradas en la librería tratada.

<b>Familia de proteínas: metabolismo</b>
Proteínas fosfatasas y proteínas asociadas
Peptidasas
Glicosil transferasas
Biosíntesis de lípidos
Enzimas relacionadas con aminoácidos
<b>Familias de proteínas: procesamiento de información genética</b>
Factores de transcripción
Maquinaria de transcripción
Biogénesis de ARN mensajero
Spliciosoma
Ribosoma
Biogénesis de ARN de transferencia
Factores de traducción
Biogénesis mitocondrial
<b>Familias de proteínas: señalización y procesos celulares</b>
Proteínas del sistema de excreción
Exosoma
Receptores de proteínas G acoplados



**Figura 14.** Ruta de señalización RAP1. *RAP1* es una proteína GTPasa que controla diversos procesos: adhesión celular, unión célula-célula, una gran variedad de señales extracelulares controlan el ciclo a través de la regulación de la activación de la GTPasa, *RAP1* también regula la actividad de la ruta de señalización MAPK (MAP quinasa). Rectángulos marcados en rojo representan los genes involucrados en esta Ruta *Profilina*, *F-actina* y *β-catenina*, que se encontraron en la librería tratada (Modificado de KEGG Pathways, [hsa04015](https://www.ebi.ac.uk/kegg/pathway/hsa04015)).

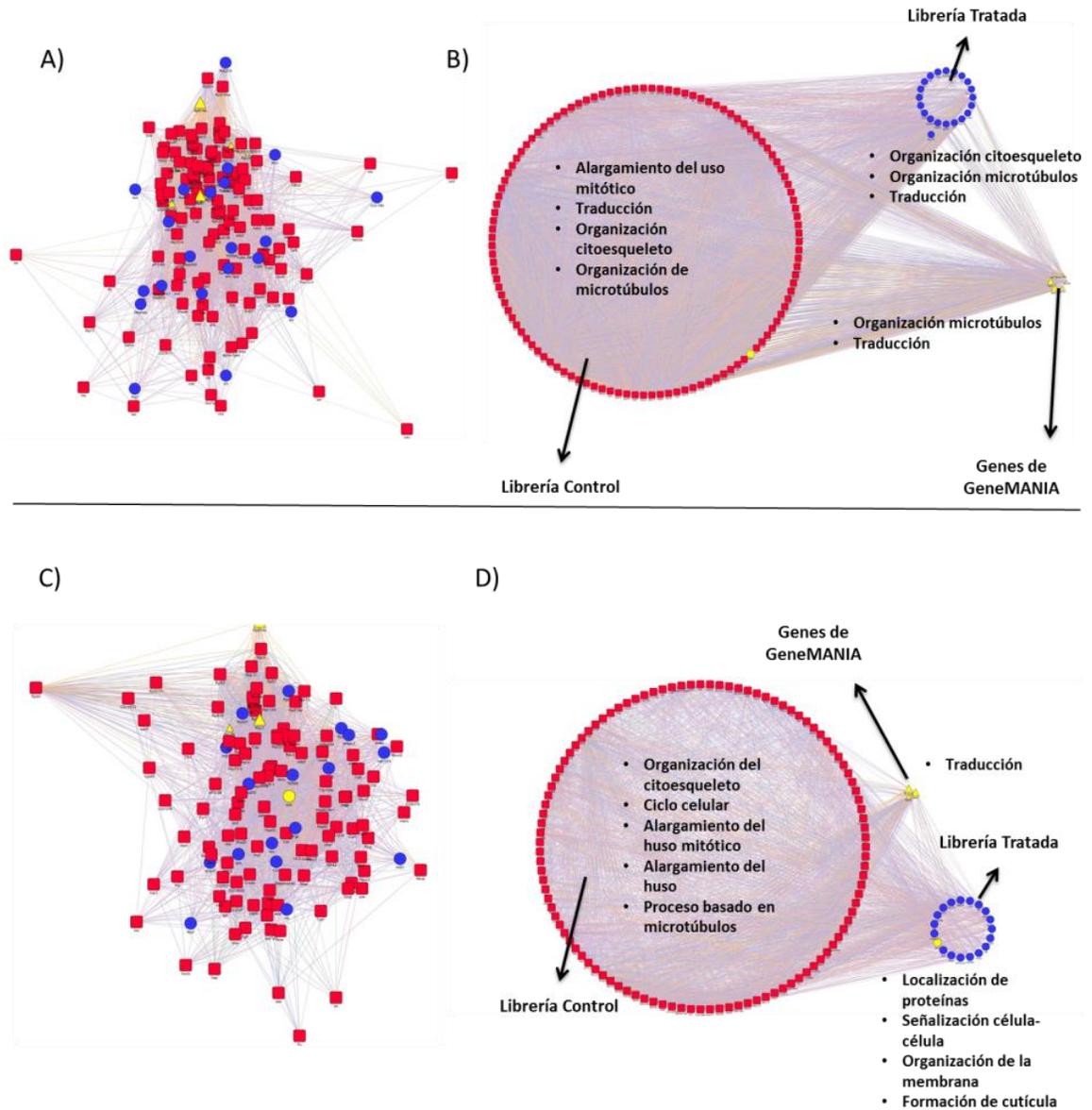


**Figura 15.** Ruta metabólica del fagosoma en *Drosophila melanogaster*. La fagocitosis es el proceso en cual la célula toma grandes partículas, el mecanismo central es la regulación de la inflamación y la remodelación del tejido. El fagosoma está compuesto por receptores específicos. Los rectángulos rojos muestran los genes encontrados en la librería tratada (Modificado de KEGG Pathways, [ko04145](http://ko04145)).

### 7.3 Redes de interacción proteína-proteína

Un total de 452 contigos de la librería control y 206 de la librería tratada identificados en el ensamble *de Novo* fueron utilizadas para la construcción de las redes de interacción. El software de GeneMANIA detectó 440 proteínas de la librería control, 206 proteínas de la librería tratada y 544 de la combinación de las dos librerías, de tal forma que se obtuvieron 3 redes de interacción (Fig. 23, anexo). Los términos de la ontología génica basada en procesos biológicos se muestran en las tablas X, XI, y XII (Anexos).

La identificación de genes eje fue realizada en función del valor grado de distribución de nodos, fue ubicado para la librería control la proteína RACK1 (Fig. 16A) y para la librería tratada la proteína ARM (Fig. 16C).



**Figura 16.** Redes de interacción proteína-proteína de genes. A) muestra la red de interacción de la proteína eje RACK1. B) muestra la red de interacción de la proteína RACK1 y su análisis funcional enriquecido. C) muestra la red de interacción de la proteína eje ARM. D) muestra la interacción de proteína de la proteína eje ARM y su análisis funcional enriquecido. Las proteínas en cuadros rojos son de la librería control, las proteínas en círculos azules son de la librería tratada, y las proteínas en triángulos amarillos son genes predichos por GeneMANIA.

#### **7.4 Selección de genes de interés**

La selección de genes se realizó utilizando la base de datos de la librería tratada a partir de la extracción y búsqueda manual utilizando como soporte las herramientas anteriormente descritas y el soporte bibliográfico necesario, la selección se basa en genes de las rutas de señalización del sistema inmune innato (Tabla VI).

El soporte de la construcción del contigo se muestra en la sección 11.2 de anexos para cada gen.

**Tabla VI.** Selección de genes de interés. Relación con las rutas de señalización, obtenidos en la librería tratada. La tabla muestra el nombre del gen, el ID asignado a la secuencia, la especie del resultado de BLAST y el e-Value (Sección 11.2).

Nombre del gen	ID	Función	Homología e-Value	Numero de lecturas
Factor anti-LPS	Comp3 18	Respuesta inmune, péptido antimicrobiano	<i>Litopenaeus stylirostris</i> 6e-23	29
$\alpha$ -macroglobulina	Comp4 684	Respuesta inmune, inhibidor serin/proteasa	<i>Zootermopsis nevadensis</i> 5e-24	96
Lipoproteína de reconocimiento de glucano	Comp3 788	Proteína de PPR, activación del sistema pro-fenol oxidasa	<i>Fenneropenaeus chinensis</i> 0.0	53
Proteína de ligación a $\beta$ -glucano	Comp1 447	Activación del sistema pro-fenol oxidasa	<i>Astacus astacus</i> 0.0	16
Receptor Toll-Like 13	Comp1 9901	Transducción de señales	<i>Apis florea</i> 2e-21	8
Profilina	Comp1 350	Respuesta inmune remodelación del citoesqueleto	<i>Fenneropenaeus chinensis</i> 5e-68	315
Receptor de activación de kinasa 1	Comp4 027	Transducción de señales	<i>Penaeus monodon</i> 0.0	115
Legumain	Comp3 76	Respuesta inmune proteasa	<i>Drosophila melanogaster</i>	339
Proteína RAN	Comp3 974	Respuesta antiviral	<i>Penaeus monodon</i> 4e-171	153
Metal-Endopeptidasa	Comp3 145	Respuesta inmune proteasa	<i>Pogonomyrmex barbatus</i> 4e-77	69
Dorsal	Comp6 51	Factor de transcripción, genes relacionados con la ruta Toll-like	<i>Drosophila melanogaster</i> 3e-122	2

## 7.5 Diseño de oligonucleótidos a partir de la selección de genes

A partir de la selección de genes de la sección 7.4 se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla VII).

**Tabla VII.** Diseño de oligonucleótidos para PCR, basados en la selección de genes de la sección 7.4.

Nombre	Secuencia (5' – 3')		Nombre proteína	Amplicón (pb)
	sentido	antisentido		
<i>LvRPL8</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Proteína ribosomal L8	586
<i>LvRPL7</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Proteína ribosomal L7	328
<i>LvEF1A</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Factor de elongación 1- $\alpha$	575
<i>LvALF</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Factor anti-lipopolisacárido	313
<i>LvMPZ</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Metal peptidasa	555
<i>LvPNF</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Profilina	470
<i>LvRACK1</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Receptor para quinasa-c activada	576
<i>LvRAN</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Proteína ran	660
<i>LvAMG</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	$\alpha$ -macro globulina	369
<i>LvPPRBG</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Proteína de ligación a $\beta$ -glucano	683
<i>LvBBG</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Proteína de ligación a $\beta$ -glucano 2	508
<i>LvDOR</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Factor de transcripción Dorsal	364
<i>LvLGM</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Legumain	428
<i>LvTLR3</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	Receptor Toll	418

## 7.6 Ubiquidad de la selección de genes

La localización de la expresión de los genes enlistados en la Tabla VII se muestra en la figura 17, la intensidad de las bandas puede ser comparada con el gen *LvRPL8*, gen ribosomal y de referencia.

Ganglio	Corazón	Hemocitos	Estómago	Epidermis	Intestino	Branquias	Músculo	Hepatopáncreas	NTC
									<i>LvRPL8</i>
									<b><i>LvTLR3</i></b>
									<b><i>LvDOR</i></b>
									<i>LvRACK1</i>
									<i>LvBBG</i>
									<i>LvPPRBG</i>
									<b><i>LvALF</i></b>
									<b><i>LvAMG</i></b>
									<b><i>LvPNF</i></b>
									<i>LvLGM</i>
									<i>LvMPZ</i>

**Figura 17.** Ubiquidad de selección de genes. Esta evaluación fue realizada en organismos juveniles sanos las filas representa a cada gen las columnas al tejido específico. NTC es el control negativo incluido. En negritas se indica la selección para qPCR. Lo marcado en negritas representa genes y tejidos utilizados para evaluación de expresión relativa por PCR en tiempo real.

### 7.7 Diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real (qPCR)

En la tabla VIII se enlistan los genes seleccionados para ser evaluados por qPCR y posteriormente medir la expresión relativa en aquellos organismos que se expusieron a 1 mg/L de FESO por 48 h. Los genes principalmente seleccionados son los de la ruta Toll (Fig. 3) los componentes canónicos fueron: el receptor de tipo Toll 3 y el factor de transcripción Dorsal.

**Tabla VIII.** Diseño de oligonucleótidos para qPCR.

Nombre	Secuencia (5' – 3')		Amplicón (pb)
	sentido	anti-sentido	
<i>LvRPL8</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	206
<i>LvRPL7</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	161
<i>LvEF1A</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	218
<i>LvALF</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	186
<i>LvPNF</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	222
<i>LvAMG</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	226
<i>LvDOR</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	163
<i>LvTLR3</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXX	244

## 7.8 Curvas de calibración y qPCR

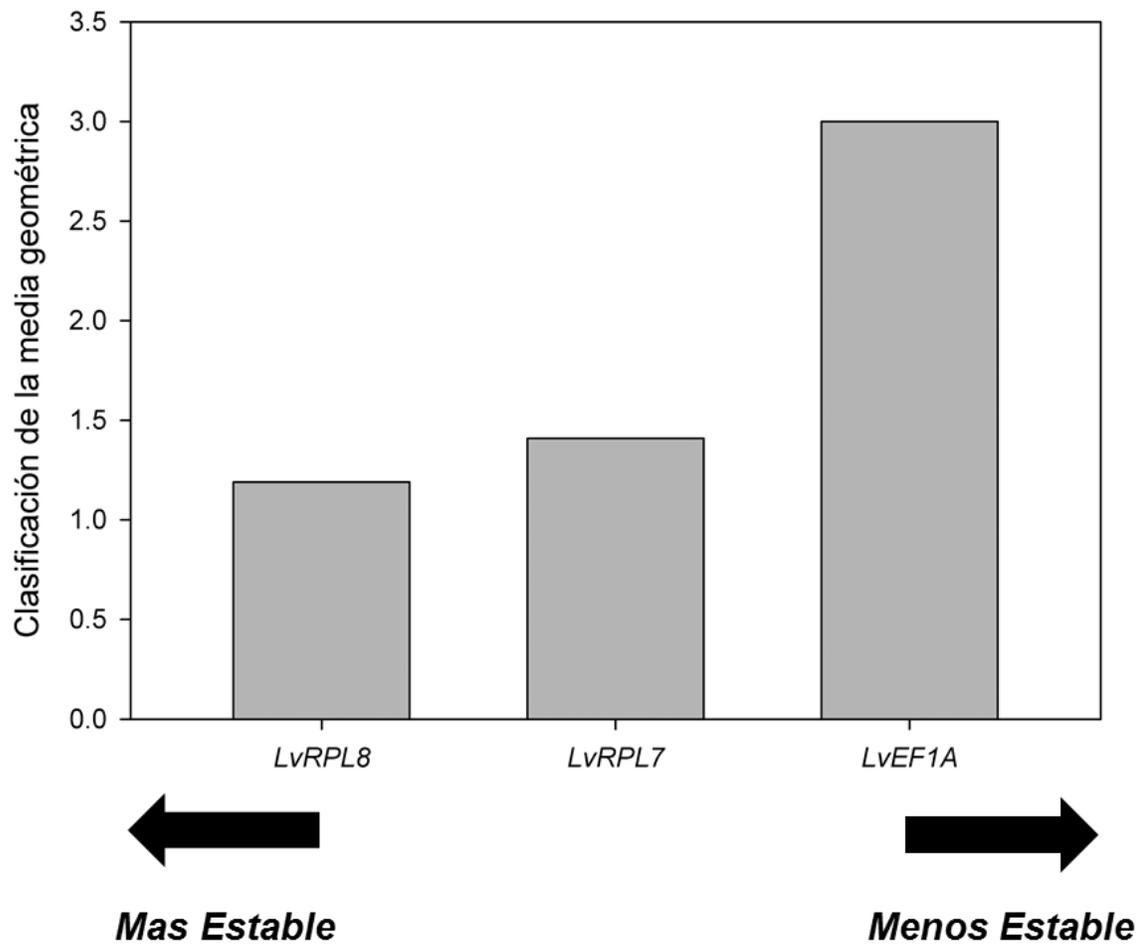
Las curvas de calibración se realizaron para medir la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos diseñados, en esta curva se realizó la evaluación de los picos de las curvas de disociación (Tabla IX).

**Tabla IX.** Eficiencia de los oligonucleótidos para qPCR. La tabla muestra los valores de correlación de Pearson (R), el valor de la eficiencia, el valor de la pendiente (M), la ordenada al origen (B) y la temperatura de disociación (media  $\pm$  desviación estándar).

Oligonucleótido	R	R <sup>2</sup>	Eficiencia	M	B	Curva disociación (°C)
<i>LvRPL8</i>	0.98	0.96	91%	-3.552	26.99	85.15 $\pm$ 0.12
<i>LvRPL7</i>	0.98	0.96	94%	-3.472	28.068	81.30 $\pm$ 0.12
<i>LvEF1A</i>	0.98	0.97	92%	-3.538	27.442	87.40 $\pm$ 1.66
<i>LvALF</i>	0.99	0.99	94%	-3.485	28.395	84.62 $\pm$ 0.09
<i>LvPNF</i>	0.97	0.95	89%	-3.603	28.353	84.21 $\pm$ 0.29
<i>LvAMG</i>	0.96	0.93	106%	-3.179	30.647	86.90 $\pm$ 0.23
<i>LvDOR</i>	0.97	0.95	87%	-3.676	34.655	80.01 $\pm$ 0.25
<i>LvTLR3</i>	0.99	0.98	90%	-3.598	26.969	84.05 $\pm$ 0.32

## 7.9 Análisis de estabilidad

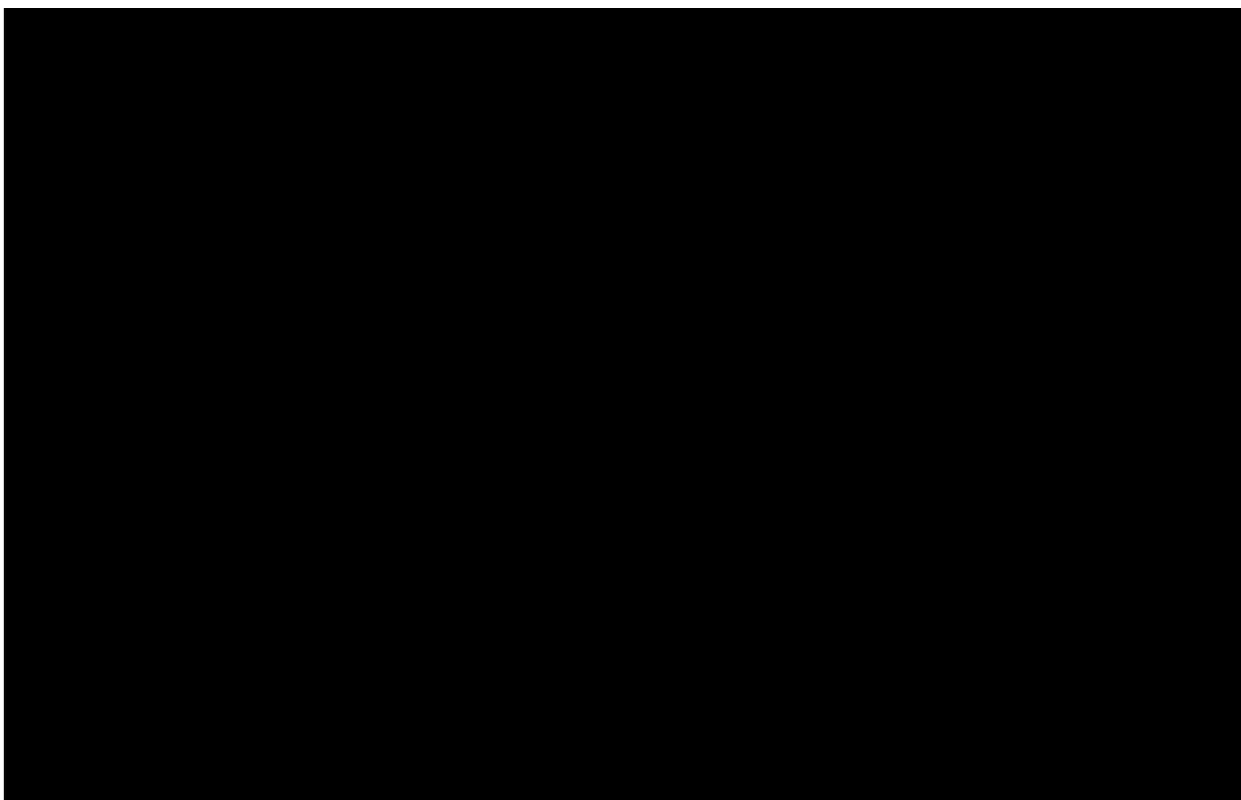
El análisis de estabilidad se muestra en la figura 18 que los genes *LvRPL8* y *LvRPL7* son los más estables en los tejidos hepatopáncreas, epidermis y hemocitos, con una pequeña variación mientras que *EFA1* sobrepasa el nivel de estabilidad  $M > 1.5$  (Vandesompele *et al.*, 2002)



**Figura 18.** Análisis de estabilidad de genes de referencia. La figura se apoya de dos flechas para indicar hacia donde tiende la estabilidad en el experimento de qPCR, para la elección del gen de referencia correcto evaluado en los tejidos (hepatopáncreas, epidermis y hemocitos) y los dos tratamientos (Fig. 6).

### 7.10 Análisis de expresión relativa

La expresión relativa fue calculada con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , donde el control se normaliza a valor de 1, el gen de referencia utilizado fue *LvRPL7* como se observa en la figura 18. En la figura 19 se muestran los 5 genes evaluados por qPCR seleccionados en la tabla VIII.



**Figura 19.** Expresión relativa en diversos tejidos. En la figura se muestran los códigos de colores de los genes y los tejidos en los que se evaluó, la expresión relativa es respecto al gen de referencia *LvRPL7*. Existen diferencia significativas en el análisis de varianza ( $P < 0.05$ ), las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con el método de Holm-Sidak, (n=9).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Pirosecuenciación y análisis bioinformático

Las estadísticas de los 3 ensamblajes generados de la librería control, la librería tratada, y la combinación de estas, muestran diferencias en el número de contigos obtenidos (Tabla II). Estas diferencias están basadas directamente en la química de la secuenciación, para la librería control se utilizó *GS-Titanium* y para la librería tratada se utilizó *GS-FLX*, esto indica que primera género lecturas más largas en pares de bases que la librería tratada. La combinación del ensamblaje de la librería control y tratada resultó en 5,100 contigos. Estas lecturas provienen de material genético (ARN total) extraído de diferentes tejidos (sección 6.1), con el fin de obtener una variedad contigos con diversos patrones de ubicuidad. Un aspecto importante es el número de contigos obtenidos en cada una de las librerías separadas lo que nos indica un bajo índice de cobertura, en referencia al genoma de *L. vannamei* que se aproxima a 2.64 Gpb. Con lo anterior se generaron otros dos ensamblajes (resultados no mostrados), uno con la librería control más la base de datos EST, y la librería tratada más la base de datos EST, esto para aumentar la cobertura y partir con el supuesto los singletons (secuencias no ensambladas) y las secuencias de la base de datos de EST generaran nuevos contigos, estos datos fueron usados como bases de datos auxiliares para la búsqueda de secuencias, esperando una longitud mayor, no fueron anotados ni procesados por el software de blast (Yu *et al.*, 2015).

La figura 7, muestra las proteínas más abundantes con mayor similitud y frecuencia encontradas en la base de datos SwissProt, se observa que la proteína U88 es la que tuvo más Hits, en segundo lugar se encuentra la proteína CR015 y la proteína Q300. La proteína U88 pertenece a los Herpes Virus humano 6A, el material genético con el que se partió fue ARN de camarón, esta situación podría estar relacionada con la contaminación cruzada en la síntesis de librerías a nivel de soluciones y reactivos (Salter *et al.*, 2014)

La proteína CR015 es una proteína sin caracterizar pero con algunas particularidades estructurales que indican su probable localización y función molecular, con una estructura helicoidal y localizada en la membrana celular con la aparente forma de una proteína de membrana de simple paso, esta proteína es de *H. sapiens*, aunque no está completa la caracterización es muy probable que en *L. vannamei* exista una proteína similar que también se desconozca sus principales funciones. En el caso de la proteína Q300 tiene homología con *M. musculus*, esta proteína se sobre expresa ante la infección del virus SV40 en células de *Rattus norvegicus* y *M. musculus (in vitro)*; las características estructurales de esta proteína son, un poli-péptido de 77 aminoácidos, un N-termina extremadamente hidrofóbico, y un C-terminal extremadamente hidrofílico. Estas características, <100 residuos de aminoácidos, y las propiedades fisicoquímicas indican que se pudiera hablar de péptidos antimicrobianos no descritos en *Homo sapiens* con alguna probable homología en *L. vannamei*, aunque se necesita realizar una caracterización molecular (Rosa y Barracco, 2010; Wagner *et al.*, 1991)

En la distribución de especies, obtenida del alineamiento local en la librería control, en el caso de BlastX y BlastP en la base de SwissProt (Fig. 8A y B) , se puede ver representado *Homo sapiens* (14.22 %,14.83) y *M. musculus* (10.21%, 10.61%), estos resultados también se comparan con la cantidad de datos que existen de estos dos organismos en la base datos de SwissProt, esta base de datos contiene anotaciones manualmente realizadas, a partir de diversos experimentos realizados a nivel biológico (Bairoch y Apweiler, 2000). Para la base datos UniRef90 (Fig. 8C y D) existen un conjunto de datos donde a mayor porcentaje fue en función de *Daphnia pulex* (0.6% y 0.5%), esta base de datos contiene proteínas aun sin anotación con evidencia biológica, si no con asignación, esta base de datos se utiliza para ampliar la distribución de información de especies en las bases de datos; UniRef90 es generada por la agrupación de secuencias de UniRef90. Existe muchísima información de *D. pulex* debido a que su genoma ya fue secuenciado y este organismo es uno de los más usados para estudios de ecotoxicidad, además de pertenecer a los artrópodos y

ser un crustáceo, esto sugiere que existen genes en las librerías que aún no están caracterizados en *L. vannamei* (Colbourne *et al.*, 2011; Suzek *et al.*, 2015).

En el caso de la librería tratada para el algoritmo de BlastX y BlastP (Figura 9C y 9D) contra la base de datos SwissProt, la distribución de especies mostro que *H. sapiens* (9.50% y 13.4%) y *M. musculus* (7.84% y 6.82%), en el caso de la base de datos de UniRef90 se muestra que *L. vannamei* (3.7%) es la especie principal para el algoritmo de BlastX y *Caernohabditis briggsae* (11.8%). En esta última sección vemos que no hay una congruencia concreta entre los resultados de la figura 9C y 9D. En principio observamos que la mayor parte las especies no coinciden entre los dos algoritmos y la base de datos UniRef90. Para poder comparar los resultados de los dos algoritmos se debe revisar que los resultados sean las mismas proteínas, que los valores de probabilidad e (e-Value) sean similares, y que las proteínas tengan la misma posición en inicio/final. En el caso anterior vemos que no existen los mismos resultados con las especies por tanto, no son los mismos resultados, esto podría indicar que los marcos de lectura abiertos (+1, +2, y +3) de BlastX podrían ser más de uno por contigo, lo que da mayor número de resultados y al evaluar las especies más abundantes este resultado, no es similar entre los dos algoritmos.

Gráficos de pastel fueron utilizados para la descripción de anotaciones funcionales nivel 2 de la ontología génica, esto con la finalidad de interpretar los resultados de manera más general, debido a que los niveles más altos, son más específicos y frecuentemente están relacionados con la variabilidad topológica y la organización no óptima de una rama más específica de un nivel mayor (Fig. 10). Para ver los principales procesos en los contigos de la librería control y la librería, para tratar de generalizar los principales procesos. En la figura 11 podemos observar de manera resumida en las tres categorías del GO: procesos celulares, función molecular y componente celular. Para procesos celulares (Fig. 11A) proceso celular (19%), procesos metabólicos (19%) y proceso simple de solo organismo (18%) fueron las categorías más representadas, lo que nos indica una alta actividad celular donde pueden estar envueltos procesos relacionados con la

homeostasis celular. Para funciones moleculares (Fig. 11B) solo hubo dos únicas categorías unión (55%) y actividad catalítica (45%), estos resultados podrían estar relacionados con procesos del metabolismo sistémico, en el balance energético del organismo. Para componente celular las categorías: células (33%), organelos (27%) fueron las localizaciones celulares con más actividad, esto resume la localización de la actividad molecular y los procesos celulares, donde se observa que los procesos anteriormente mencionados son localizados dentro de la misma célula (Blake *et al.*, 2013).

En el caso de la categorías para procesos celulares (Fig. 12A) se encontró que procesos metabólicos (22%) y procesos celulares (23%) fueron las de mayor porcentaje, aunque encontramos una categoría baja de reproducción estos resultados pueden ser relacionados con la alta actividad metabólica para alcanzar la homeostasis. En el caso de las funciones moleculares (Fig. 12B) encontramos al igual que el control las categorías de unión (44%) y actividad catalítica (30%) y dos funciones más actividad molecular estructural (19%) y actividad de transporte (7%), esto nos indica que hay una actividad de transporte y formación de complejos macromoleculares, por lo que se infiere que además de la actividad metabólica, existen mecanismos de transporte. En el caso de la categorías de componente celular (Fig. 12C) se encontró célula (33%), organelo (28%), y una nueva categoría de región extracelular (10%). A diferencia de la librería control (Fig. 11C), estos resultados nos indican que la actividad de transporte se está dando hacia el exterior celular y que existen complejos macromoleculares relacionados con la actividad catalítica, metabólica, y de unión. En resumen de estos dos resultados entre las anotaciones de la librería control y tratada, encontramos la similitud en las dos de actividad metabólica proceso que está ligado a las funciones moleculares de actividad catalítica y unión, la diferencia se encontró en la librería tratada en actividad de transporte, y actividad molecular estructural relacionado con la actividad de formación de complejos macromoleculares (17%) (ej. complejo ribosomal). En los componentes celulares

se vio que la localización celular está ubicada en región extracelular (10%), esto explica la actividad de transporte (7%) (Blake *et al.*, 2013).

En las figuras 11 y 12, se observan anotaciones idénticas que no permiten visualizar de manera significativa las diferencias a nivel de anotación entre las dos librerías. La prueba exacta de Fischer nos permite visualizar la diferencia significativa entre anotaciones de las dos librerías (control y tratada).

En la figura 13 se observan diferencias significativas ( $\alpha < 0.01$ ) entre los categorías de anotación, se observa expresión génica, complejos ribonucleoproteicos, traducción, constituyente estructural del ribosoma, y el ribosoma. Esto nos indica que existe una mayor actividad de transcripción y traducción de proteínas en la librería tratada. Las señalizaciones celulares tienden a utilizar mensajeros para producir proteínas que ayudan a transcribir ciertos genes relacionados con un tipo de respuesta, puede ser a estrés, por una señal del sistema inmune, por tanto estas actividades están relacionadas los procesos de transcripción y traducción de genes. Estos resultados tienen términos de anotación más específicos (> nivel 3) pero pertenecen en a los términos de los resultados obtenidos en las figuras 11 y 12 (términos generales), a diferencia en los mostrados en la figura 13 donde se ven términos más específicos (Carbon *et al.*, 2009; The Gene Ontology Consortium, 2000; Ewbank, 2006; The GeneOntology Consortium, 2004).

Se utilizó el enfoque de minería de datos para encontrar genes relacionados con la función inmune (GO: 0009987, Immune system process) mostrada en la tabla IV. Las apolipoproteínas están relacionados con el metabolismo de lípidos y el transporte de colesterol, particularmente con las proteínas de alta densidad. En los crustáceos solo se ha definido que estas apolipoproteínas son encargadas del almacenamiento de colesterol. Estudios en el pez *Cyprinus carpio* se produce mucus con alta concentración de apolipoproteínas de alta densidad, donde se demostró *in vitro* su acción bactericida contra *Escherichia coli*, probablemente este tipo de proteínas aún no se han estudiado a fondo en los crustáceos y solo se conoce su función de transporte de lípidos y colesterol (Concha *et al.*, 2003; Yepiz-

Plascencia *et al.*, 2000). Los factores de coagulación son proteínas que participan para encapsular y formar nódulos ante una infección bacteriana (Tassanakajon *et al.*, 2013).

KEGG BRITE es una colección de jerarquías utilizadas para representar un grupo de proteínas en familias de acuerdo su función específica a nivel celular. La librería tratada fue sometida al análisis de KEGG BRITE (Tabla V). Los resultados están en función de familias de proteínas, metabolismo, procesamiento de la información genética, señalización y procesos celulares (Tabla V). En el metabolismo se encontraron proteínas envueltas en procesos catabólicos y anabólicos, estos resultados están relacionados con el alto porcentaje de los procesos metabólicos (22%) encontrados en el análisis funcional a nivel 2 (Fig. 12A). Por otra parte el procesamiento de la información genética explica el alto porcentaje de los procesos celulares (23%) encontrados en la figura 12A, ya que la transcripción, y la traducción de genes son procesos celulares dentro de la estructuración de la ontología de procesos biológicos. Finalmente encontramos una familia relacionada con la señalización y procesos celulares, aunque esta información no se puede ligar específicamente a un término en específico, podemos observar en la figura 12C un porcentaje del 10% para la actividad extracelular y 9% para membrana. En las jerarquías se visualiza proteínas del sistema de excreción, exosoma y receptores de proteínas G acoplados (Tabla V). Lo que resume que la información encontrada en el análisis de ontologías a nivel 2 y los resultados del KEGG BRITE tienen las siguientes ligas, proteínas del sistema de excreción con actividad de transporte (Fig. 12B), el exosoma con la región extracelular (Fig. 12C) y receptores de proteínas G acoplados con señalización (Fig. 12A) (Carbon *et al.*, 2009; Garrington y Johnson, 1999; Mathivanan *et al.*, 2010).

Las Rutas metabólicas de la señalización RAP1 y el fagosoma de *D. melanogaster* están relacionadas con rutas de señalización y mensajes intracelulares (Fig. 14). En el caso de RAP1 intervienen los procesos de fosforilación, estas rutas controlan diversos procesos como: la adhesión, la unión

célula-célula que pueden ser activados por un conjunto de señales extracelulares; las proteínas Profilina, F-actina y  $\beta$ -Catenina fueron identificados fragmentos homólogos en la librería tratada (Fig. 14). Existe una evidencia indirecta de como la profilina está relacionada con la respuesta inmune innata en invertebrados, en *F. chinensis* fue caracterizada una profilina y se observó una sobre regulación del transcrito después de 6 h post-infección con WSSV, por lo cual se ha propuesto como un mecanismo de defensa ante infecciones virales (Kong *et al.*, 2009). La fagocitosis (Fig. 15) es un proceso donde la célula toma grandes partículas la interacción de proteínas que controlan la inflamación y la remodelación del citoesqueleto debido a al momento de fagocitar alguna partícula la célula tendrá que modificar de manera significativa su tamaño, estos resultados sugieren que el proceso de fagocitosis es un proceso controlado por vías de señalización, directamente con el reconocimiento de patógenos o partes estructurales de ellos (Bos *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2007).

Las proteínas encontradas para estas rutas metabólicas, la RAP1, y el fagosoma fueron seleccionadas a través de los módulos KEGG BRITe (Tabla V), se encontraba categorizada como exosoma celular, estos procesos están directamente ligados a los siguientes términos de ontología, señalización (3%), complejos macromoleculares (17%), región extracelular (10%), membrana (9%), y actividad de transporte (7%) (Fig. 12).

Las redes de interacción proteína-proteínas son utilizadas para predecir diversos tipos de interacción en las proteínas (Fig. 23). La forma más fácil de visualizar estas interacción es conociendo las funciones enriquecidas basadas en la ontología de procesos biológicos. En las tablas X, XI y XII, los mismos términos, pero con diferente valor de probabilidad según la red de interacción. Para la interacción de la librería control, tratada, y la combinación de ambas (Fig. 23A, B y C) los términos con mayor significancia fueron ( $P < 0.05$ ), ribosoma citosólico, parte citosólica, y subunidad ribosomal. Esto indica que las interacciones principales de las proteínas están relacionadas con el citosol celular, y las subunidades ribosomales, estos datos están ligados a la alta actividad de

procesos celulares encontrados en la librería control (19%) y tratada (23%) en el análisis de las figuras 11 y 12, donde no se pueden detectar diferencias significativas entre los procesos enriquecidos de las 3 redes de interacción proteína-proteína generados.

El análisis de los genes eje fue realizado para detectar genes encontrados en la librería control y en la librería tratada de manera independiente y observar los patrones de interacción entre ellas mismas. El RACK1 fue seleccionado como proteína eje en función del valor grado de distribución de nodos (250), esta proteína pertenece a la librería control (Fig. 16A), el análisis funcional enriquecido para esta proteína eje, en la librería control y tratada mostro una actividad en modificación del citoesqueleto ligada a la mitosis celular (Fig. 16B). Esto indica que los procesos de reacomodo del citoesqueleto están directamente relacionados con la proteína RACK1 y sus interacciones. También se ha reportado que RACK1 funciona como una plataforma para la señalización de moléculas de los ribosomas, esto se puede ligar a que el término de traducción aparece en el análisis funcional enriquecido (Fig. 16B) (Nilsson *et al.*, 2004).

La proteína ARM es un eje con valor de grado de distribución de 141, pertenece a la librería tratada (Fig. 16C). El análisis funcional enriquecido (Fig. 16D) muestra los siguientes, términos señalización célula-célula, localización de proteínas, organización de la membrana, y formación de la cutícula. Esta proteína está catalogada como clave para la formación de ciertos tipos de tejidos en *D. melanogaster*, es homóloga al gen de polaridad *Dorsal*, factor de transcripción clave en la ruta Toll en crustáceos (Li y Xiang, 2013; McCrea *et al.*, 1991).

## 8.2 Ubiquidad de la selección de genes

Los genes seleccionados fueron evaluados en tejidos de organismos sanos, en la figura 17 se muestra la ubiquidad de los genes. Los genes de referencia fueron *LvRPL7*, *LvEF1A*, y *LvRPL8* (últimos 2 no mostrados). El gen *LvTL3* se expresa en todos los tejidos y comparado con el gen de referencia se puede inferir que la expresión del gen es constitutiva para todos los tejidos (Fig. 17). En *D. melanogaster* las rutas Toll e IMD son las principales rutas de regulación de la respuesta inmune. Estudios de esta ruta esta han atribuido a la expresión de péptidos antimicrobianos mediados por la familia de factores de transcripción Dorsal. Este gen que codifica al receptor de tipo Toll, esta expresado en todos los tejidos. La localización celular de este receptor en crustáceos peneidos es desconocida, pero en *D. melanogaster* se encuentran ubicados en las membranas celulares y citoplasmáticas. Estos receptores llevan un rol potencial en las rutas de señalización de la respuesta inmune. El factor de transcripción dorsal está directamente relacionado con la ruta de señalización Toll, en la figura 17 se observan bandas tenues respecto a *LvRPL8* en ganglio, corazón, epidermis, intestino, branquias, y hepatopáncreas. Estos productos de PCR fueron detectados al ciclo 35. La técnica de PCR punto final es una técnica menos sensible que el PCR en tiempo real (qPCR). Estos resultado comparados a los obtenidos por Huang *et al.*, 2009, demuestran que si hay una expresión en los tejidos anteriormente mencionados a diferencia del que se muestra en la figura 17 que no se observa expresión en hemocitos. Cabe mencionar que la expresión relativa de este gen es significativamente alta ( $P < 0.05$ ) ante la infección con WSSV y con *Vibrio anguillarum* en *F. chinensis*. Esto demuestra que la expresión de estos factores de transcripción son claves para el control de la respuesta del sistema inmune innato ante una infección en crustáceos (De Gregorio *et al.*, 2002; Lemaitre y Hoffmann, 2007; Li *et al.*, 2009).

La expresión del gen *LvRACK* tiene el mismo patrón de ubiquidad que *LvToll*. Los estudios de este gen en *L. vannamei* son nulos. En *D. melanogaster* no

existe información relacionada con la expresión en las respuestas a nivel inmunológico, pero sí con la transducción de señales célula-célula. Este gen se seleccionó porque es clave para la transducción de señales y en las redes de interacción proteína-proteína denota señalización de procesos ligados a la modificación de los túbulos del citoesqueleto y la traducción de genes (Fig. 16B). La expresión constitutiva de este gen denota la importancia en a nivel funcional para la célula, es probable que este gen sea parte de los procesos de homeostasis celular más básicos (ej. el mantenimiento del citoesqueleto) (Nishizuka, 1986).

El gen *LvPPRBG* es una lipoproteína de alta densidad relacionada con la el reconocimiento de microorganismos. Es una proteína que reconoce patrones y la llaman “proteína de unión a beta glucano”. En una isoforma descrita en *L. vannamei* se determinó que esta proteína se expresa en glándula digestiva, músculo, pleópodos, y branquias, pero no en hemocitos (Fig. 17). Es probable que este contiguo corresponda a una isoforma nueva, encontrada en la librería tratada. La ubiquidad se encuentra en, ganglio, corazón, epidermis, estómago, músculo, y hepatopáncreas. Los resultados de alineamientos de proteínas muestran una alta identidad con la isoforma descrita en *L. vannamei*, pero los resultados de nucleótidos no muestran identidad alguna, este es el principal elemento para inferir que se habla de una nueva isoforma (Romo-Figueroa *et al.*, 2004).

El gen que codifica a la proteína precursora de unión al  $\beta$ -glucano (*LvBBG*), solo se ubica en hepatopáncreas (Fig. 17). Estos resultados pueden ser explicados debido a que esta proteína interactúa únicamente cuando hay una infección bacteriana, sobre todo en estado agudo. Existe la posibilidad de una fuerte interacción con patrones moleculares de bacterias (Su *et al.*, 2004).

*LvALF* es un gen que codifica para el factor anti-lipolisácarido clasificado dentro de los péptidos antimicrobianos. Este se encuentra distribuido en todos los tejidos, pero no de manera constitutiva. Se demostró que en hemocitos la expresión relativa es 27 veces más que estómago y el resto de los tejidos. Este péptido fue encontrado en la librería tratada y se caracterizó, demostrando ser una nueva isoforma con nuevas características estructurales (datos no mostrados).

Este péptido antimicrobiano no se ha demostrado que su expresión este regulada por la ruta Toll, pero se sabe que las demás isoformas que existen en *L. vannamei* son reguladas mediante esta ruta y que existe un efecto anti-bacteriano y anti-viral para en neutralización de toxinas bacterianas (Tassanakajon *et al.*, 2013).

Las  $\alpha$ -macroglobulinas (AMGs) son proteínas que se encuentran en el plasma de invertebrados y participan en los procesos de inhibición de proteasas. Este proceso está altamente relacionado con la coagulación. El gen *LvAMG* es probablemente una nueva isoforma de una AMG encontrada en la librería tratada. La ubiquidad de *LvAMG* se muestra en la figura 17 con bandas muy tenues a excepción de la glándula digestiva. Es común que algunas proteínas sean expresadas en ciertos tejidos (hepatopáncreas) y posteriormente sean exportadas a otros (hemolinfa). En hemolinfa se han purificado dos AMGs, esto explicaría el hecho que las AMGs se encuentran libremente en el plasma como parte del sistema de coagulación (Gollas-Galván *et al.*, 2003).

Las profilinas son proteínas pequeñas que se unen a la actina y son esenciales para dinámica del citoesqueleto. Tienen función controlar el tráfico membranal, señalización mediada por GTP. La profilina es esencial para la proliferación celular, y la diferenciación. En la figura 17 se puede observar que la profilina tiene ubiquidad constitutiva en todos los tejidos evaluados debido a su función celular básica e indispensable para la homeostasis celular (Kong *et al.*, 2009; Rawe *et al.*, 2006).

### 8.3 Efecto del FESO y niveles de expresión relativa

El FESO es un producto proveniente de roca volcánica solubilizada con calor en condiciones ácidas para ser ajustado a pH neutro. Esta mezcla compleja fue donada por el Dr. Edgar Quero. Fue administrado por inmersión a organismos durante 48 h, diversos experimentos realizados indican un efecto en la producción de moléculas relacionadas al sistema inmune cuando se realizaba la exposición por inmersión. La pregunta científica planteada fue: ¿Cuáles son los genes y las rutas de señalización que activan la respuesta inmune de *Litopenaeus vannamei*, cuando es tratado por inmersión con FESO?. Los resultados de la figura 19 indican que este producto tiene un efecto sobre dos tejidos importantes para inmunidad en *L. vannamei*, epidermis, y hemocitos, debido a que se observa que existe una tendencia en la expresión relativa de los genes relacionados a las rutas de señalización, *LvTLR3*, y *LvDo*. Además los genes relacionados con la respuesta inmune *LvAMG*, *LvALF*, y *LvPNF*. Diversos estudios indican que el hepatopáncreas es un tejido clave cuando existen infecciones de tipo viral y bacterianas debido a que es el tejido que controla el metabolismo sistémico en *L. vannamei*. Es probable que el efecto del FESO, simplemente sea a nivel de la primera barrera de defensa (epidermis) y al sistema que de reconocimiento (hemocitos), no se habla de una infección, pero si de un posible efecto a nivel de inmunoestimulación a nivel molecular, según los resultados obtenidos (Fig. 19). Conocer a fondo el efecto anteriormente mencionado, es necesario complementar con estudios de a nivel energético-celular el efecto a corto plazo y largo plazo del FESO, determinando el periodo de inmunoestimulación. El FESO cambia las concentraciones de sales y minerales en el agua. La epidermis al estar en contacto con agua con diferentes concentraciones de sales y minerales, es probable que cambie su estructura celular, para adaptarse a la nueva presión osmótica. Esto lo podemos verificar con el patrón de expresión relativa del gen *LvPNF* (Fig. 19), ya que la expresión es significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) respecto a hemocitos y hepatopancreas. Una vez en contacto el agua con

diferente concentración de sales/minerales, y la epidermis, los hemocitos circulantes de la hemolinfa inician procesos y las cascadas de señalización y se observa el efecto a nivel transcripcional de los genes *LvALF*, *LvAMG* y *LvPNF* (Lee y Söderhäll, 2002; Li y Song, 2010; Raa, 2013; Schopf, 2006).

Los genes seleccionados para medir su expresión relativa por la técnica de qPCR se muestran en la tabla VIII. Fueron seleccionados 5 genes, según el diseño experimental (Fig. 6). La expresión relativa está en función del gen de referencia *LvRPL7* (Fig. 19). El análisis estadístico esta realizado de manera individual para cada gen respecto a cada tejido.

La expresión de *LvTLR3* en hepatopáncreas se aproxima a la línea punteada que refiere a la condición control (normalización). El hepatopáncreas es el tejido responsable de la digestión y del metabolismo sistémico del organismo. Se observa el patrón de expresión muy cerca a la condición control, lo que podría estar indicando, que el hepatopáncreas está realizando funciones para el mantenimiento del organismo (Wang *et al.*, 2012). En epidermis y hemocitos se puede ver una expresión significativa ( $P < 0.05$ ) respecto a hepatopáncreas. Los niveles de expresión relativa de todos los genes mantienen el mismo patrón de expresión relativa, donde el hepatopáncreas es el tejido con menos nivel de expresión relativa, en hemocitos, y epitelio, Existe un patrón parecido. Se puede observar que hay una expresión relativa alta en epidermis y hemocitos en respuesta al tratamiento con el FESO. La epidermis es la primer barrera de defensa, es probable que la el efecto del FESO tenga una interacción directa con la epidermis y la segunda termino en los hemocitos, estos pueden viajar por todo el organismo a través de un sistema de circulación abierto, estas células son especializadas para en el reconocimiento. La expresión relativa de *LvTLR3* en hemocitos, y epidermis, es significativamente alta. En estos tejidos existen moléculas de interaccionar intra- y extra-celularmente. La expresión fue 6 veces más que en la condición control en epidermis, y 11 veces más en hemocitos (Figura 19) (Caceci *et al.*, 1988; Muhammad *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012).

La expresión relativa de Dorsal en hepatopáncreas es inferior al control en epidermis 2 veces más que la condición control y en los hemocitos 18 veces (Figura 19). *LvDOR* es de la familia de los factores de transcripción y está asociada a la regulación de la expresión génica de péptidos anti microbianos. La expresión más alta fue en hemocitos porque quizá el efecto del FESO primeramente es reconocido en la epidermis y posteriormente en los hemocitos, estos al estar expuestos al FESO inician su maquinaria de síntesis de moléculas de defensa y péptidos anti microbianos debido a que en los hemocitos granulares y semi-granulares existen gránulos donde se pueden encontrar diversos tipos de moléculas tanto de reserva de energía como de defensa, esto explicaría el patrón de expresión de *LvALF*, una expresión alta en epidermis y baja en hemocitos, esto explicaría que la respuesta del FESO va más allá de la síntesis de péptidos antimicrobianos, debido que pudiera existir una regulación de tipo feed back en la producción de *LvALF*, es decir que los hemocitos ya tengan almacenado este péptido en sus gránulos, en cambio en epidermis se expresa porque no hay estructuras celulares que soporten el almacenamiento de estos péptidos catiónicos, además como este tejido es la principal barrera de defensa y es estimulado por el FESO, se espera que aumente la expresión de genes relacionados la respuesta inmune como el caso de *LvALF* (Jimenez-Vega y Vargas-Albores, 2007; Liu y Wang, 1998a; Yang *et al.*, 2009).

Las alfa-2 macroglobulinas (A2M) son glicoproteínas encontradas en varios grupos taxonómicos de animales y actúan como inhibidores de proteasas (Armstrong y Quigley, 1999). La expresión relativa de *LvAMG* en hepatopáncreas es significativamente alta ( $P < 0.05$ ) en epidermis y hemocitos, en los tratamientos con FESO. En *D. melanogaster* se ha observado que la expresión de este tipo de familias proteicas esta mediado por la ruta Toll o IMD, se observa que *LvTLR3* y *LvAMG* tienen el mismo patrón de expresión en los distintos tejidos (Lagueux *et al.*, 2000). El otro patrón que se ha observado es el aumento de la expresión de ante la infección con WSSV y *Vibrio*. Esta *LvAMG* evaluada es probablemente una nueva isoforma encontrada en la librería tratada, lo que se ha observado con este

tipo de proteínas que su función pudiera llegar a ser redundante entre las isoformas evaluados en *Fenneropenaeus chinensis* (Ma *et al.*, 2010). Generalmente las A2M se expresan y posteriormente se sintetizan y exportadas al plasma, pero cuando se utiliza FESO la expresión de *LvAMG* aumenta significativamente en los hemocitos respecto al control, y también aumentan en la primer barrera de defensa del organismo. Esto indica que el primer contacto del FESO en el agua por inmersión puede ser la piel y posteriormente el segundo contacto son las células especializadas en reconocimiento y la expresión se dispara, el mismo patrón sucede cuando hay retos con WSSV y *Vibrio*.

La expresión con profilina (*LvPNF*) en hepatopáncreas es ligeramente inferior al control, en epidermis es 10 veces por encima del control y en hemocitos el patrón de expresión parece ser el mismo que en hepatopáncreas (Figura 19). Estos resultados pudieran resumirse en el efecto del FESO hace que el citoesqueleto de epidermis tenga que sufrir una modificación estructural para realizar el contacto con las moléculas del FESO. En una infección con WSSV se observó que la profilina aumenta sus niveles de expresión, esto indica su ligada función a procesos inmunes relacionados con cambios estructurales en el citoesqueleto, como la célula huésped tiene que modular el citoesqueleto celular para hacer frente a una situación que implique cambios dinámicos (Kong *et al.*, 2009).

Existe una tendencia en la expresión de los genes relacionados a las rutas de señalización *LvTLR3* y *LvDo* y a los genes relacionados con la respuesta inmune *LvAMG*, *LvALF* y *LvPNF*. El hepatopáncreas es un tejido clave cuando existen infecciones de tipo viral y bacterianas debido al control del metabolismo sistémico. Es probable que el efecto del FESO, simplemente sea a nivel de la primera barrera de defensa y al sistema que de reconocimiento a nivel de hemocitos, no estamos hablando de una infección, pero se habla de un efecto a nivel de inmunoestimulación, según los resultados.

Los receptores de tipo Toll, son activados por PPRs y ligandos específicos capaces de inducir la señal al interior celular, estos patrones se encuentran a en

moléculas de los microorganismos como bacterias y virus, pero hablando en términos estructurales el FESO proviene de roca volcánica, por esta razón se ha tratado de hipotetizar que en estas rocas volcánicas pudieran existir microorganismos en fosilizados y algunas de las estructuras que reconocen los PPRs pudiesen sobrevivir a la solubilización ácida a la cual es sometida el FESO y probablemente con esto se podría inferir este probable efecto inmunomodulador del FESO; en estudios donde se utilizan inmunoestimulantes se utilizan estos compuestos de las paredes celulares para inducir estimulación del sistema inmune, el claro ejemplo han sido los  $\beta$ -glucanos y los lipopolisácaridos.

Otra de las hipótesis para la explicación del efecto del FESO, está basado en que promueve el crecimiento de microorganismos asociados de *L. vannamei*, tanto del organismo como las del medio acuático. El aumento de microorganismos, pudiera estar generando respuestas a nivel inmunológico, con esto se soporta adicionalmente que el FESO causa un efecto en el agua, este promueve el crecimiento de microorganismos, y estos despiertan la respuesta inmune. Es necesario complementar este estudio utilizando isotopos estables para conocer qué es lo que sucede, además realizar retos con bacterias y virus, para evaluar la supervivencia, y determinar si el FESO confiere alguna protección.

## 9. CONCLUSION

En otros trabajos que antecedieron a este (sección 2.4), se había observado una notable expresión de genes relacionados con el sistema inmune innato de *L. vannamei* por tanto se propuso como pregunta científica Cuáles eran los genes de las rutas de señalización que activaban esta respuesta inmune, esta pregunta es compleja de contestar ya que se puede considerar que los mecanismos celulares están gobernados por muchos procesos biológicos, pero encontramos una estrecha relación entre la ruta Toll y la expresión de genes relacionados a esta ruta. Hubo algunos genes como en el caso de *LvPNF* que no se tiene el sustento bibliográfico ni metodológico para decir que es expresado mediante la vía Toll. Se concluye de manera importante es el patrón de expresión que tienen los dos componentes canónicos de esta ruta evaluado en aquellos tratamientos tratados con FESO. Se puede mencionar que la exposición de 1 mg/L de FESO genera una respuesta a nivel transcripcional del *LvTLR3*, *LvDo*, *LvALF*, *LvAMG* y *LvPNF*. Estos *LvTLR3* y *LvDo* son componentes canónicos de la ruta Toll (sección 2.4.1), el primero es la proteína transductor de señales hacia el interior de la célula y el segundo es un factor de transcripción de los genes *LvALF*, *LvAMG* y *LvPNF*.

En la hipótesis planteada se menciona que la exposición al FESO habrá genes relacionados con rutas de señalización, esto se pudo observar en el área de resultados que hubo una respuesta transcripcional de *LvTLR3* y *LvDo* componentes canónicos de la ruta Toll, pero la falta de cobertura y profundidad de la técnica utilizada (pirosecuenciación) solo nos aproximó a unas familias de genes, se puede mencionar que la hipótesis no se rechaza, aunque faltaría la generación de datos e investigación para ser no rechazada completamente.

En el sentido más práctico, para qué usar FESO en estanques de camarón, aparte de utilizarlo como fertilizante para aumentar la productividad primaria de los estanques de cultivo de camarón, porque hay que seguir estudiándolo. Este trabajo se demostró que falta un soporte experimental basado más a nivel

fisiológico, celular e histológico, lo cual daría más soporte científico para direccionar al FESO como una nueva familia de compuestos inmunoestimulantes con grandes ventajas sobre otros que existen actualmente (ej. Forma de administración).

En función de los objetivos se puede mencionar la identificación de genes relacionados con las rutas de señalización, incluso isoformas (no caracterizadas) y los niveles de expresión de estos cuando son tratados con FESO. Se identificaron por medio de herramientas bioinformáticas, genes relacionados con el sistema inmune y algunos que participan en la ruta de señalización. Utilizando pirosecuenciación 454 y el enfoque del ensamblaje *de Novo*, con el alineamiento local de secuencias (BLAST) se pudieron determinar secuencias homologas y posteriormente anotaciones (GO y KEGG) lo cual nos permitió hacer una minería de datos en el análisis y la identificación de genes que participan en rutas de señalización y la respuesta inmune en *L. vannamei* expuesto al FESO. Mediante el uso de organismos sanos se logró identificar en que tejidos se expresan genes seleccionados en la parte del objetivo específico 1, lo cual nos daría una inferencia directa en la selección de los tejidos y además tratar de explicar por qué suceden los patrones de expresión (Figura 19). Conjuntamente se logró identificar en hepatopáncreas, epidermis y hemocitos los patrones de expresión de 2 genes relacionados con la ruta de señalización Toll (*LvTLR3* y *LvDo*) y 3 genes relacionados con la respuesta inmune (*LvALF*, *LvAMG* y *LvPNF*). Esto genera nuevos paradigmas que resolver ante el uso del FESO como potencial inmunoestimulante.

## 10. LITERATURA CITADA

- Agaisse, H., N. Perrimon, H. Agaisse, N. Perrimon. 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev.* 198(1): 72–82.
- Aggarwal, K., N. Silverman. 2008. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB Report.* 41(4):267–277.
- Akira, S., S. Uematsu, O. Takeuchi. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell.* 124(4):783–801.
- Albert, R. 2005. Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci.* 118(21):4947–4957.
- Armstrong, P.B., J.P. Quigley. 1999. Alpha2-macrogobulin: an evolutionary conserved arm of the innate immune system. *Dev Comp Immunol.* 23(99):375–390.
- Arts, J. A. J., F. H. J. Cornelissen, T. Cijssouw, T. Hermsen, H.F.J. Savelkoul, R. J. M. Stet (2007). Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immun.* 23(3):504–513.
- Ashburner, M., C. Ball, J. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, G. Sherlock *et al.* 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 25(1):25–29.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. De Lorgeril, J. Garnier, B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev.* 198:149–168.
- Bairoch, A., R. Apweiler. 2000. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* 28(1):45–48.
- Blake, J.A., M. Dolan, H. Drabkin, D. P. Hill, L. Ni, D. Sitnikov, M. Westerfield *et al.* 2013. Gene ontology annotations and resources. *Nucleic Acids Res.* 41(1):530–535.
- Bos, J.L., J. de Rooij, K. Reedquist. 2001. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell.* 2(5):369–377.
- Briggs, M. 2006. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es)]. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Roma. [Citado 29 Marzo 2016].

- Caceci, T., K. Neck, D. Lewis, R. Sis. 1988. Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda). J Mar Biol Assoc UK. 68(2): 323–337.
- Carbon, S., A. Ireland, C. J. Mungall, S. Shu, B. Marshall, S. Lewis, P. Gaudet *et al.* 2009. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. Bioinformatics. 25(2):288–289.
- Castex, M., P. Lemaire, N. Wabete, L. Chim. 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. Fish Shellfish Immun. 28(4): 622–631.
- Colbourne, J.K., M. E. Pfrender, D. Gilbert, W. K. Thomas, A. Tucker, T. H. Oakley, J. L. Boore *et al.* 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. Science. 331(6017):555–561.
- CONAPESCA. 2014. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Disponible en: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/anuarios/BASE\\_DE\\_DATOS\\_DE\\_PRODUCCION\\_ANUARIO\\_2014.zip](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/anuarios/BASE_DE_DATOS_DE_PRODUCCION_ANUARIO_2014.zip). Última fecha de acceso: 29 Marzo 2016.
- Concha, M. I., S. Molina, C. Oyarzún, J. Villanueva, R. Amthauer. 2003. Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in primary defence in the carp skin. Fish Shellfish Immun. 14(3):259–273.
- Conesa, A., S. Gotz, J. M. Garcia-Gomez, J. Terol, M. Talon, M. Robles. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics. 21(18):3674–3676.
- De Gregorio, E., P. T. Spellman, P. Tzou, G. M. Rubin, B. Lemaitre. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. Embo J. 21(11):2568–2579.
- Dongdong, W., L. Fuhua, L. Shihao, W. Rong, J. Xiang. (2012). Expression profiles of antimicrobial peptides (AMPs) and their regulation by Relish\*. Chinese J Oceanol Limnol. 30(4):611–619.
- Dore, I., Frimodt, C. 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Van Nostrand Reinhold. Primera edición. New York, USA. 174p.
- Espinoza León, M. 2006. Efecto Del Silicio Organico Sobre La Respuesta Inmune Del Camaron Blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

- Ewbank, J. J. 2006. Signaling in the immune response. *WormBook*. 23(1):1–12.
- FAO; Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2012. *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. FAO. Primera Edición. Roma, Italia. 252p.
- Finn, R. D., A. Bateman, J. Clements, P. Coggill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy *et al.* 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 42(1):222–230.
- Finn, R. D., J. Clements, S. R. Eddy. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* 39(1):29–37.
- Flegel, T. W., D. V. Lightner, C. F. Lo, L. Owens. 2008. Shrimp Disease Control: Past, Present and Future. *Diseases in Asian Aquaculture VI*. 1(1):334–378.
- Garrington, T. P., G. L. Johnson. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 11(2):211–218.
- Ghosh, S., M. J. May, E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 16:225–60.
- Gollas-Galván, T., R. R. Sotelo-Mundo, G. Yepiz-Plascencia, C. Vargas-Requena, F. Vargas-Albores. 2003. Purification and characterization of alpha 2-macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp Biochem Phys C*. 134(4):431–438.
- Gouy, M., S. Guindon, O. Gascuel. 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol Biol Evol*. 27(2):221–224.
- Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A., Thompson, I. Amit *et al.* 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnol*. 29(7):52–64.
- Hendrickx, M. E. 1996. *Los camarones Penaeoidea Bentónicos (Crustacea:Decapoda:Dendrobranchiata) del Pacífico Mexicano*. CONABIO, UNAM. Primera edición. Mazatlán, México. 45p.
- Hoffmann, J. A. 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426(6962):33–38.
- Huang, D.W., B. T. Sherman, R. A. Lempicki. 2008. Systematic and integrative

- analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 4(1):44–57.
- Huang, X. D., Z. X. Yin, X. T. Jia, J. P. Liang, H. S. Ai, L. S. Yang, J. G. He. 2010. Identification and functional study of a shrimp Dorsal homologue. *Dev Comp Immunol.* 34(2):107–113.
- Huang, X. D., Z. X. Yin, J. X. Liao, P. H. Wang, L. S. Yang, H. S. Ai, J. G. He. 2009. Identification and functional study of a shrimp Relish homologue. *Fish Shellfish Immun.* 27(2):230–238.
- Hultmark, D. 2003. *Drosophila* immunity: Paths and patterns. *Curr Opin Immunol.* 15(1):12–19.
- Jiang, H., M. R. Kanost. 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem Molec.* 30(2):95–105.
- Jimenez-Vega, F., F. Vargas-Albores. 2007. Isoforms of *Litopenaeus vannamei* Anti-Lipopolysaccharide and Its Expression by Bacterial Challenge. *J Shellfish Res.* 26(4):1169–1175.
- Johansson, M. W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture.* 191(3):45–52.
- Jordan, J.D., E. M. Landau, R. Iyengar. 2000. Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell.* 103(2):193–200.
- Kong, H. J., G. E. Hong, H. K. Cho, B. H. Nam, Y. O. Kim, W. J. Kim, K. K. Kim. 2009. Cloning of profilin (FcPFN) from the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*, a highly expressed protein in white spot syndrome virus (WSSV)-infected shrimp. *J Appl Genet.* 50(3):245–50.
- Koyama, A. H., T. Fukumori, M. Fujita, H. Irie, A. Adachi. 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect.* 2(9):1111–1117.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, E. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305(3):567–580.
- Krusong, K., P. Poolpipat, P. Supungul, A. Tassanakajon. 2012. A comparative study of antimicrobial properties of crustinPm1 and crustinPm7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.* 36(1):208–215.
- Lagueux, M., E. Perrodou, E. Levashina, M. Capovilla, J. Hoffmann. 2000.

- Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *P Natl Acad Sci USA*. 97(21):11427–11432.
- Lee, S. Y., K. Söderhäll. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immun*. 12(5):421–437.
- Lemaitre, B., J. Hoffmann. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 25:697–743.
- Lemaitre, B., J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann. 1997. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Immunology*. 94:14614–14619.
- Li, C. Y., Y. L. Song. 2010. Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced inflammatory site. *Fish Shellfish Immun*. 29(6):1044–1052.
- Li, F., J. Xiang. 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immun*. 34(4):80–97.
- Li, F., H. Yan, D. Wang, T. A. J. Priya, S. Li, B. Wang, J. Xiang. 2009. Identification of a novel relish homolog in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and its function in regulating the transcription of antimicrobial peptides. *Dev Comp Immunol*. 33(10):1093–1101.
- Liu, H., L. Wang. 1998. On the ultrastructure and classification of the hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Chinese J Oceanol Limnol*. 16(4): 333–338.
- Livak, K. J., T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*. 25:402–408.
- Ma, H., B. Wang, J. Zhang, F. Li, J. Xiang. 2010. Multiple forms of alpha-2 macroglobulin in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and their transcriptional response to WSSV or *Vibrio* pathogen infection. *Dev Comp Immunol*. 34(6): 677–684.
- Martínez Córdova, L. R. 1993. Camaronicultura: Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. AGT Editor, S. A. Primera Edición. México, D. F. 1-20, 27p.
- Mathivanan, S., H. Ji, R. J. Simpson. 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 73(10):1907–1920.
- McCrea, P. D., C. W. Turck, B. Gumbiner. 1991. A Homolog of the *armadillo*

- Protein in *Drosophila* (Plakoglobin) Associated with E-Cadherin. *Science* 254(5036):1359.
- Mekata, T., T. Kono, T. Yoshida, M. Sakai, T. Itami. 2008. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immun.* 24(1):122–133.
- Moriya, Y., M. Itoh, S. Okuda, A. C. Yoshizawa, M. Kanehisa. 2007. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.* 35(2):182–185.
- Muhammad, F., Z. F. Zhang, M. Y. Shao, X. L. Shi, M. Shafi. 2013. Genesis of hematopoietic tissue and its relation with hemocytes of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (crustacea:Decapoda). *Pak Vet J.* 33(1):91–95.
- Nilsson, J., J. Sengupta, J. Frank, P. Nissen. 2004. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep.* 5(12):1137–1141.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 233(4761):5–12.
- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methdos.* 8(10):785–786.
- Ponprateep, S., S. Tharntada, K. Somboonwiwat, A. Tassanakajon. 2012. Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. *Fish Shellfish Immun.* 32(1):26–34.
- Powell, S., K. Forslund, D. Szklarczyk, K. Trachana, A. Roth, J. Huerta-Cepas *et al.* 2014. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res.* 42(1):231–239.
- Quero-Gutierrez, E. 2008. La biosilificación en sistemas acuáticos. *deRiego: Protección y Nutrición de Hortalizas y Frutas.* 6(39):72–76.
- Raa, J. 2013. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev Fish Sci.* 4(3):229–228.
- Rawe, V. Y., C. Payne, G. Schatten. 2006. Profilin and actin-related proteins regulate microfilament dynamics during early mammalian embryogenesis. *Hum Reprod.* 21(5):1143–1153.

- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*. 172(2):125–145.
- Romo-Figueroa, M.G., C. Vargas-Requena, R. R. Sotelo-Mundo, F. Vargas-Albores, I. Higuera-Ciapara, K. Söderhäll, G. Yepiz-Plascencia. 2004. Molecular cloning of a  $\beta$ -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: Correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev Comp Immunol*. 28(8):713–726.
- Rosa, R. D., M. Barracco. 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Surviv J*. 7: 262–284.
- Rowley, A. F., A. Powell, 2007. Invertebrate Immune Systems-Specific, *Quasi-Specific*, or Nonspecific?. *J Immunol*. 179(11):7209–7214.
- Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-410.
- Saha, S. 2011. Innate Immune Source and Functional Machinery in Decapods of Crustacea. *Ind J Fund Appl Life Sci*. 1(3):311–324.
- Salter, S.J., M. J. Cox, E. M. Turek, S. T. Calus, W. O. Cookson, M. F. Moffatt, A. W. Walker. 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol*.12(87):1–12.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, C. F. Weber. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microb*. 75(23):7537–7541.
- Schmieder, R., R. Edwards. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 27(6):863–864.
- Schopf, J. W. 2006. Fossil evidence of Archaean life. *Philos Trans R Soc London Biol*. 361(1470):869–885.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage *et al.* 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. (13):2498–2504.
- Smith, V. J., J. H. Brown, C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: Does it really protect against infection?. *Fish Shellfish Immun*. 15(1):71–90.
- Stuart, L. M., J. Boulais, G. M. Charriere, E. J. Hennessy, S. Brunet, I. Jutras, R. B.

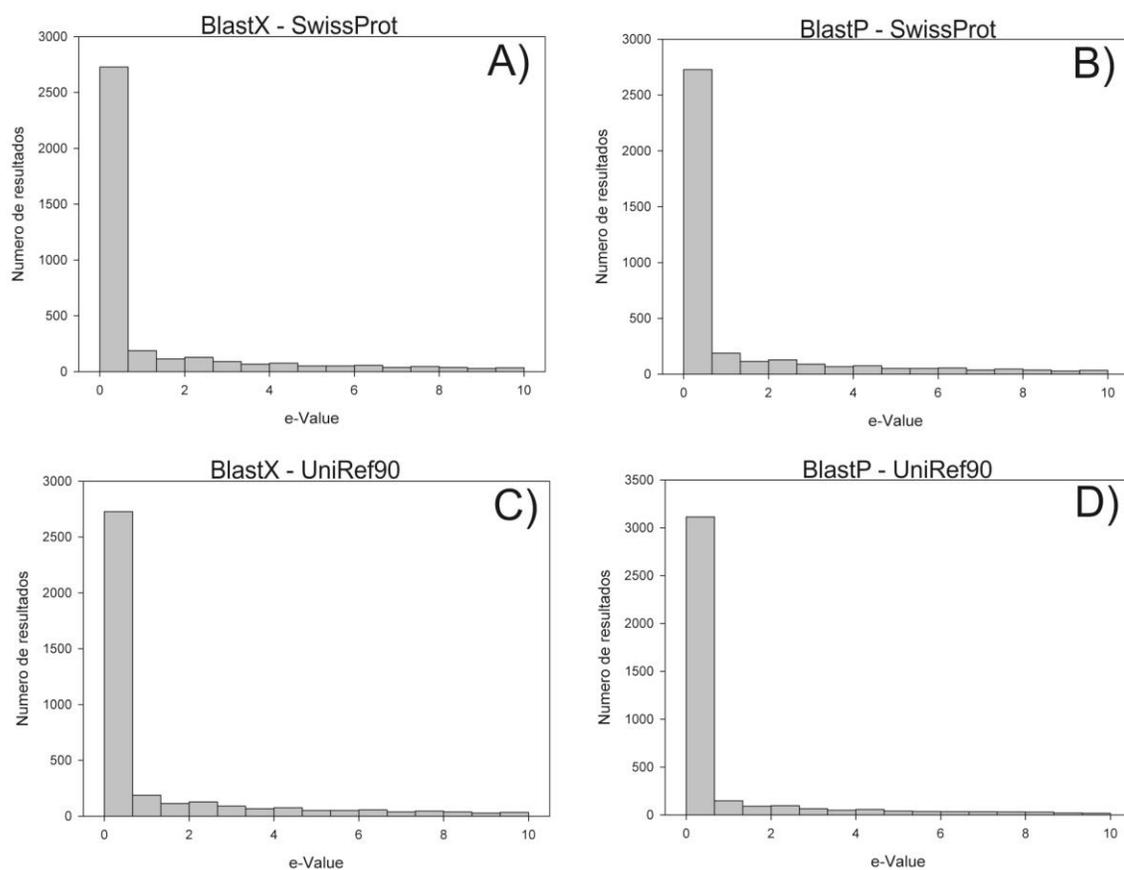
- Ezekowitz. 2007. A systems biology analysis of the *Drosophila* phagosome. *Nature*. 445(7123):95–101.
- Su, J., L. Song, W. Xu, L. Wu, H. Li, J. Xiang. 2004. CDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri*. *Aquaculture*. 239(4):69–80.
- Suzek, B. E., Y. Wang, H. Huang, P. B. McGarvey, C. H. Wu. 2015. UniRef clusters: A comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches. *Bioinformatics*. 31(6):926–932.
- Suzuki, S., M. Kakuta, T. Ishida, Y. Akiyama. 2014. GHOSTX: An improved sequence homology search algorithm using a query suffix array and a database suffix array. *PLoS ONE*. 9(8):1–8.
- Tassanakajon, A., P. Amparyup, K. Somboonwiwat, P. Supungul. 2011. Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. *Mar Biotechnol*. 13(4):639–657.
- Tassanakajon, A., K. Somboonwiwat, P. Supungul, S. Tang. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immun*. 34(4):954–967.
- The Gene Ontology Consortium. 2000. Gene ontology: Tool for the identification of biology. *Nat Genet*. 25:25–29.
- The Gene Ontology Consortium. 2004. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*. 32:258–261.
- The Gene Ontology Consortium. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 43(1):204–212.
- Van Straaten, P. 2006. Farming with rocks and minerals: Challenges and opportunities. *An Acad Bras Cienc*. 78(4):731–747.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 3(7):1–12.
- Vargas-Albores, F., M. A. Guzmán, J. L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp Biochem Phys A*. 106(2):299–303.
- Velázquez Lizárraga A. 2014. Expresión de genes relacionados con proteínas de cutícula y del sistema inmunitario en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*,

- Boone 1931) expuesto a un fertilizante enriquecido con silicio orgánico. Tesis Licenciatura.
- Wagner, S., G. Cullmann, R. Knippers. 1991. The Q300 Gene: a Novel Transcription Unit Induced in Simian Virus 40-Infected and -Transformed Mouse Cells. *J Virol.* 65(6):3259–3267.
- Wang, P. H., J. P. Liang, Z. H. Gu, D. H. Wan, S. P. Weng, X. Q. Yu, J. G. He. 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1–3) from *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol.* 36(2):359–371.
- Wang, P. H., D. H. Wan, Z. H. Gu, X. X. Deng, S. P. Weng, X. Q. Yu, J. G. He. 2011. *Litopenaeus vannamei* tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) responds to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection and activates antimicrobial peptide genes. *Dev Comp Immunol.* 35(1):105–114.
- Warde-Farley, D., S. L. Donaldson, O. Comes, K. Zuberi, R. Badrawi, P. Chao, Q. Morris. 2010. The GeneMANIA prediction server: Biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 38(2):214–220.
- Wei, X., X. Liu, J. Yang, J. Fang, H. Qiao, Y. Zhang, J. Yang. 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish Shellfish Immun.* 32(1):132–140.
- Xie, F., P. Xiao, D. Chen, L. Xu, B. Zhang. 2012. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* 80(1):75–84.
- Yang, C., J. Zhang, F. Li, H. Ma, Q. Zhang, T. A. Priya, J. Xiang. 2008. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Shellfish Immun.* 24(5):564–574.
- Yang, Y., H. Boze, P. Chemardin, A. Padilla, G. Moulin, A. Tassanakajon, A. Aumelas. 2009. NMR structure of r ALF-Pm3, an anti-lipopolysaccharide factor from shrimp. Model of the possible lipid A-binding site. *Biopolymers.* 91(3):207–220.
- Yedery, R. D., K. V. R. Reddy. 2009. Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolysaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immun.* 27(2):275–284.

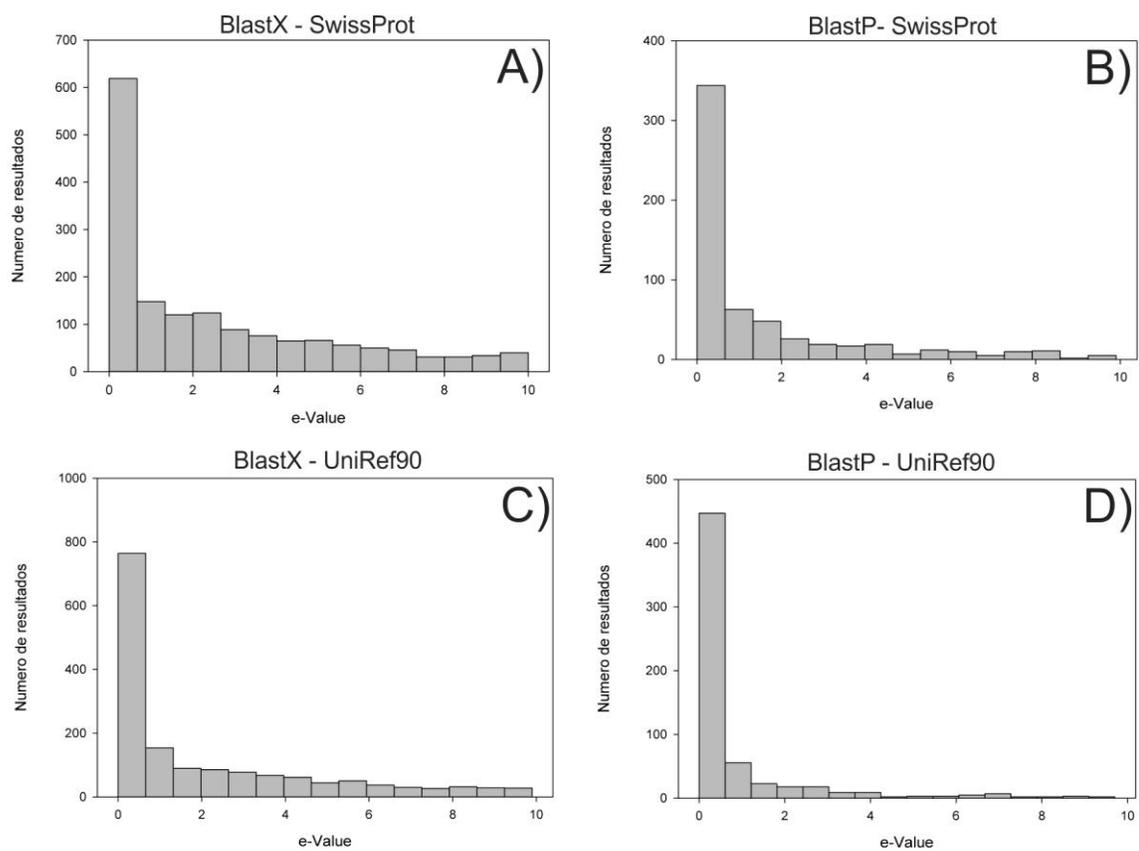
- Yepiz-Plascencia, G., F. Vargas-Albores, I. Higuera-Ciapara. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture*. 191:177–189.
- Yu, Y., X. Zhang, J. Yuan, F. Li, X. Chen, Y. Zhao, J. Xiang. 2015. Genome survey and high-density genetic map construction provide genomic and genetic resources for the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Sci Rep*. 5(15612):1–14.
- Zimmermann, J., H. Voss, C. Schwager, J. Stegemann, W. Ansorge. 1988. Automated Sanger dideoxy sequencing reaction protocol. *FEBS Lett*. 233(2):432–436.

## 11. ANEXOS

### 11.1 Histogramas de distribución e-Value

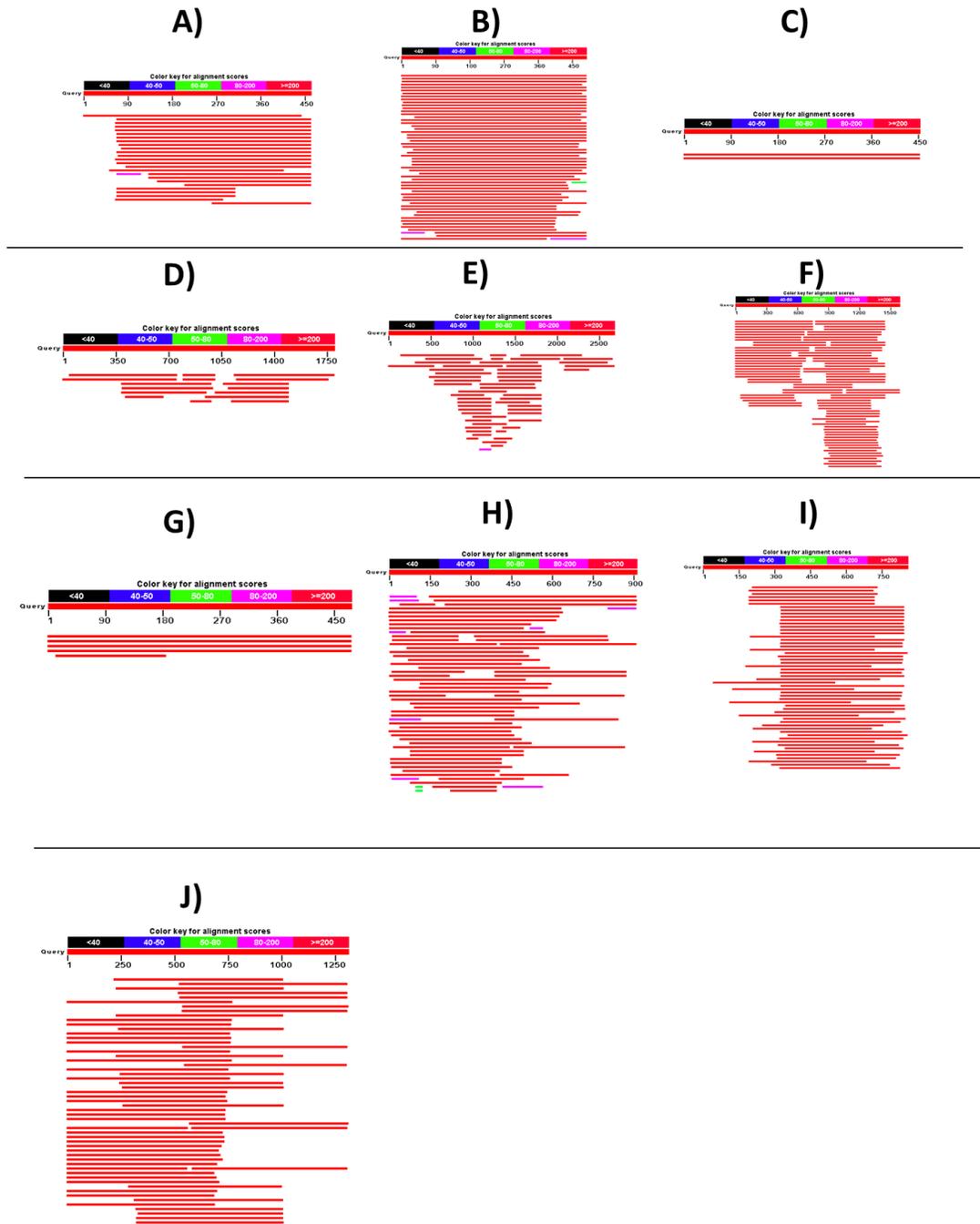


**Figura 20.** Distribución del valor de E (e-Value) en librería control. Histogramas de la distribución de valores de E, para la librería control. **A)** histograma de distribución (e-Value) BlastX contra la base de datos SwissProt, **B)** histograma de distribución BlastP (e-Value) contra la base de datos de SwissProt, **C)** histograma de distribución (e-Value) BlastX contra la base de datos UniRef90, **D)** histograma de distribución (e-Value) BlastP contra la base de datos UniRef90.



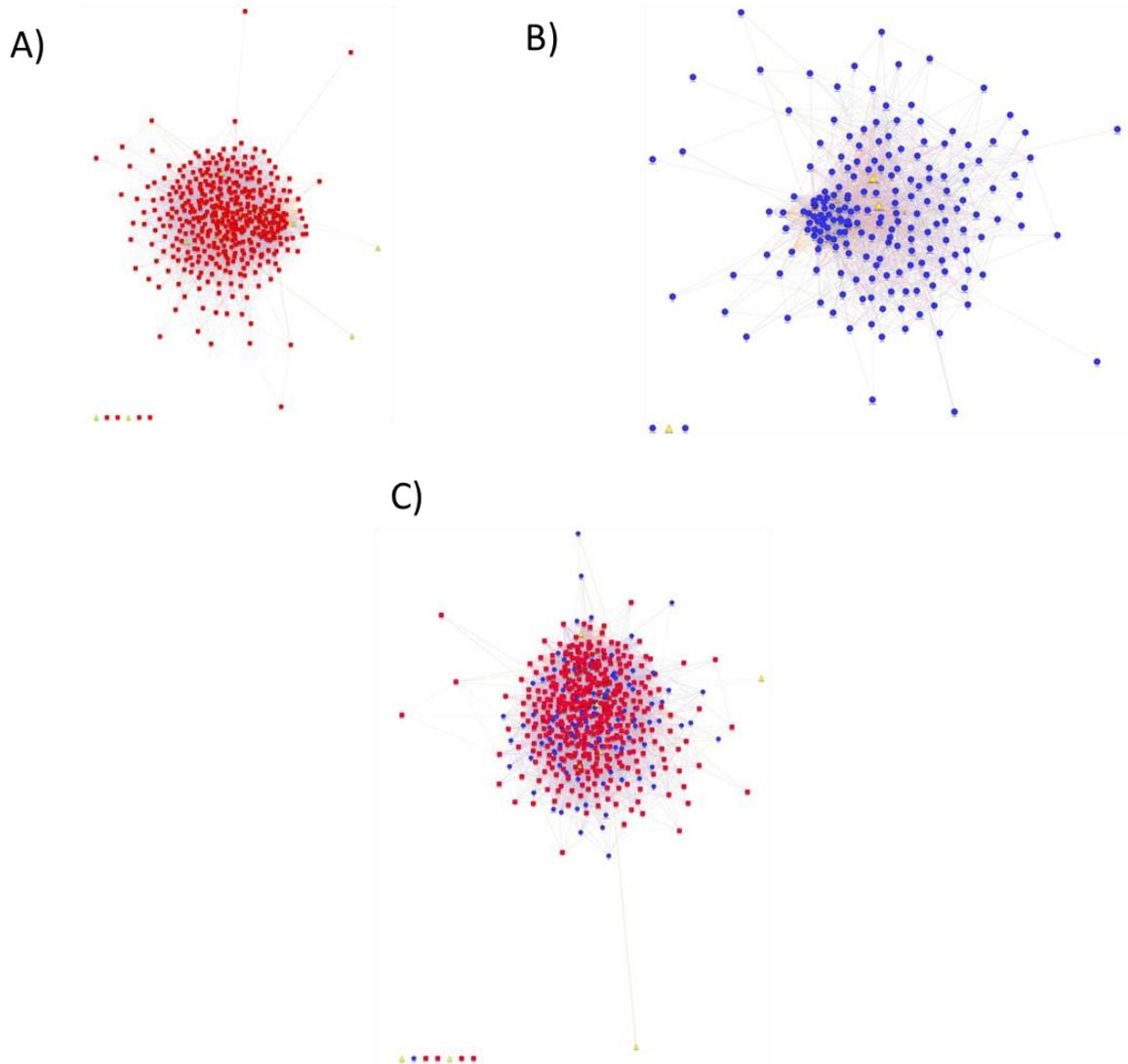
**Figura 21.** Distribución del valor de E (e-Value) en librería tratada. Histogramas de la distribución de valores de E, para la librería control. A) histograma de distribución (e-Value) BlastX contra la base de datos SwissProt, B) histograma de distribución BlastP (e-Value) contra la base de datos de SwissProt, C) histograma de distribución (e-Value) BlastX contra la base de datos UniRef90, D) histograma de distribución (e-Value) BlastP contra la base de datos UniRef90.

## 11.2 Soporte de cada contig seleccionado



**Figura 22.** Alineamiento del soporte del Contig. A) *LvALF*, B) *LvAMG*, C) *LvBBG*, D) *LvPPRBG*, E) *LvLGM*, F) *LvTL3* y G) *LvMPPZ*. Las figuras muestran las lecturas con la que fue seleccionado cada contig, trabajado en la sección 7.2

### 11.3 Redes de interacción proteína-proteína



**Figura 23.** Redes de interacción proteína-proteína. A) Representación de proteínas relacionada con la librería control. B) Representación relacionada con la librería tratada. C) Representación de proteínas en una combinación de la librería control y tratada.

**Tabla X.** Procesos biológicos más relevantes de la red de interacción predichos por GeneMANIA (Fig. 23A).

<b>Identificación GO</b>	<b>Descripción</b>	<b>Valor q</b>
GO:0022626	Ribosoma citosólico	1.62E-66
GO:0044445	Parte citosólica	2.49E-64
GO:0044391	Subunidad ribosomal	6.44E-63
GO:0003735	Constituyente estructural de ribosoma	1.51E-62
GO:0005840	Ribosoma	6.43E-62
GO:0005829	Citosol	1.33E-54
GO:0022625	Subunidad ribosomal grande del citosol	1.42E-38
GO:0000022	Alargamiento del huso mitótico	2.99E-35
GO:0051231	Elongación del huso mitótico	1.07E-34
GO:0015934	Subunidad grande del ribosoma	2.12E-33
GO:0022626	Parte grande del ribosoma en citosol	1.62E-66

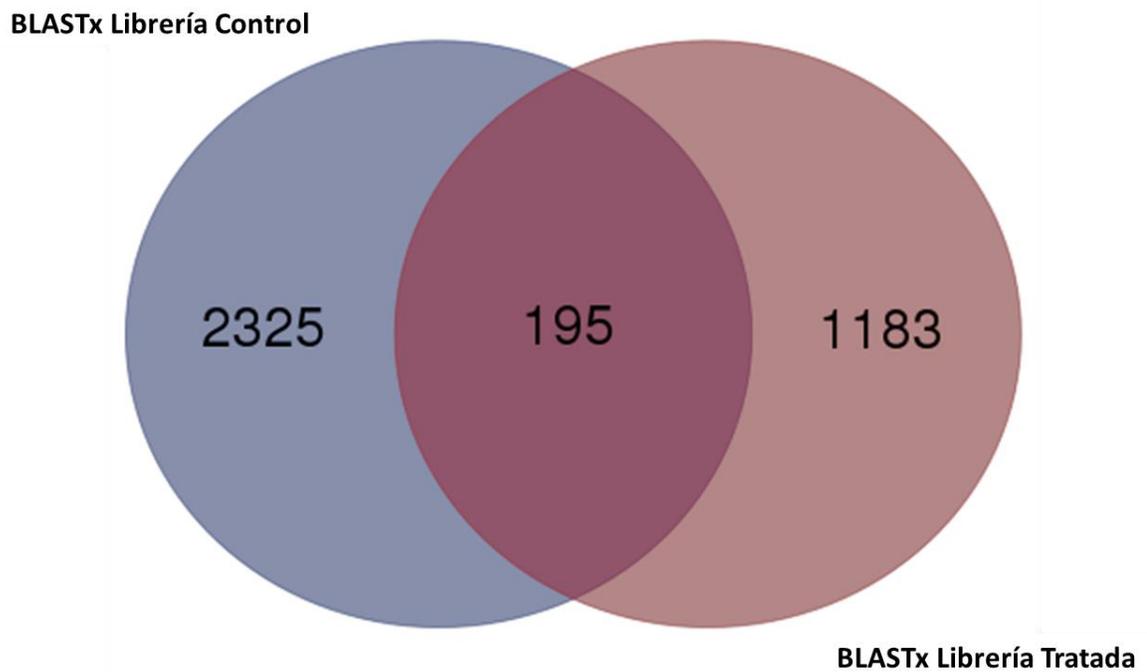
**Tabla XI.** Procesos biológicos más relevantes de la red de interacción predichos por GeneMANIA (Fig. 23B).

<b>Identificación GO</b>	<b>Descripción</b>	<b>Valor q</b>
GO:0022626	Ribosoma citosólico	1.06E-80
GO:0044445	Parte citosólica	8.15E-76
GO:0044391	Subunidad ribosomal	2.74E-65
GO:0003735	Constituyente estructural de ribosoma	4.98E-65
GO:0005840	Ribosoma	1.47E-64
GO:0005829	Citosol	1.81E-59
GO:0000022	Alargamiento del huso mitótico	4.36E-45
GO:0022625	Parte grande del ribosoma en citosol	7.93E-45
GO:0051231	Elongación del huso mitótico	1.27E-44
GO:0015934	Subunidad grande del ribosoma	1.53E-34
GO:0022626	Parte ribosomal citosólica	1.06E-80

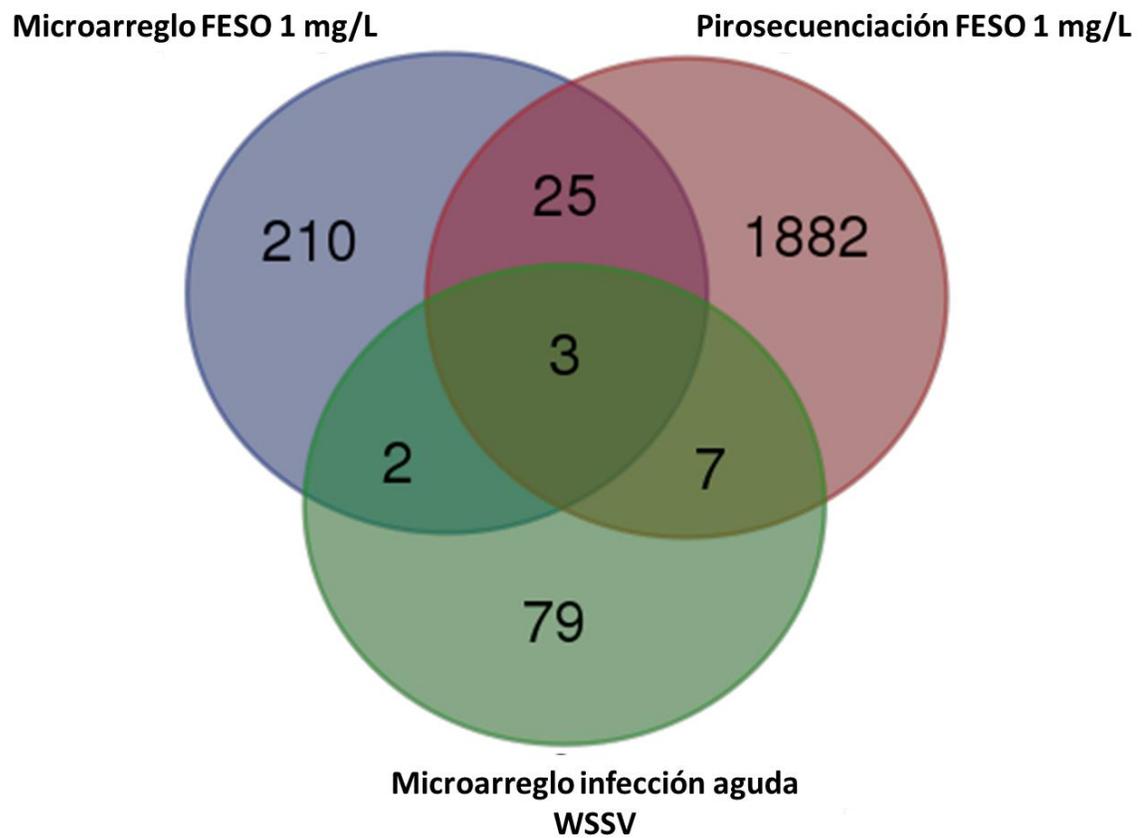
**Tabla XII.** Procesos biológicos más relevantes de la red de interacción predichos por GeneMANIA (Fig. 23C).

<b>Identificación GO</b>	<b>Descripción</b>	<b>Valor q</b>
GO:0022626	Ribosoma citosólico	1.48E-73
GO:0044445	Parte citosólica	1.17E-70
GO:0044391	Subunidad ribosomal	2.03E-67
GO:0003735	Constituyente estructural de ribosoma	5.63E-67
GO:0005840	Ribosoma	3.08E-66
GO:0005829	Citosol	3.87E-60
GO:0022625	Subunidad ribosomal grande del citosol	1.26E-44
GO:0000022	Alargamiento del huso mitótico	8.09E-38
GO:0015934	Subunidad grande del ribosoma	9.56E-38
GO:0051231	Elongación del huso mitótico	3.24E-37
GO:0007051	Organización del huso mitótico	1.28E-31

## 11.4 Diagramas de Venn



**Figura 24.** Resultados de BLASTx librería control y tratada. La figura muestra el número de resultados que coinciden entre las dos librerías y los que difieren.



**Figura 25.** Diagrama de Venn. Muestra las intersecciones de genes encontrados en el experimento de microarreglos con el tratamiento de FESO, la librería tratada analizada en este trabajo y un trabajo de microarreglos con infección aguda de WSSV en hepatopáncreas, los genes de los microarreglos son sobre-regulados.