

Expresión génica en peces a causa de infecciones causadas por *Aeromonas* spp.

Beaz-Hidalgo, R¹ Romalde, JL^{2*} & Figueras, MJ¹

¹Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV.
Universitat Rovira i Virgili. Reus, Spain.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS-Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, Spain.

Email: jesus.romalde@usc.es

Resumen

Las especies del género *Aeromonas* son bacterias autóctonas del medio acuático capaces de producir septicemias y enfermedades hemorrágicas y ulcerativas en peces, como la furunculosis, causada por *Aeromonas salmonicida*, que resultan en mortalidades masivas y grandes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura. La búsqueda e identificación de genes que participan activamente en el sistema inmune del pez nos permite reconocer marcadores para poblaciones de peces resistentes a infecciones bacterianas, así como nuevas dianas para el desarrollo de vacunas. La información sobre la respuesta inmune de peces (principalmente de salmonídeos y peces planos) frente a infecciones causadas por especies del género *Aeromonas* es muy escasa, basándose principalmente en estudios genómicos mediante la secuenciación masiva de pequeñas secuencias denominadas marcadores de secuencia expresada (acrónimo del inglés expressed sequence tags, EST) y uso de chips (o microarrays) de ADN. Algunos autores han investigado los genes involucrados en el sistema inmune de peces tras infecciones experimentales con los patógenos *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, así como en respuesta a la vacunación intraperitoneal y a sus efectos secundarios adversos como es la formación de granulomas. A lo largo de este artículo se analizan y se discuten estos estudios resaltando la importancia de identificar los genes implicados en la resistencia a infecciones microbianas lo que significaría un avance importante en la búsqueda de poblaciones resistentes, en la mejora genética de reproductores, así como en el desarrollo de nuevos métodos preventivos que mejoren la supervivencia y salud de los peces.

Palabras clave: *Aeromonas*, salmonídeos, peces, marcadores de secuencia expresada (ESTs), microarrays, respuesta inmune, vacuna, granuloma.

Summary

It is well known that among the group of bacteria that embrace the genus *Aeromonas*, which inhabit aquatic environments, there are some species that can produce septicemia, ulcerative and hemorrhagic fish diseases, including furunculosis, caused by *Aeromonas salmonicida*, which causes mass death and important economic losses in the aquaculture sector. The screening and identification of genes that participate in the fish immune response would allow to recognise gene markers that may lead to the selection of resistant fish populations against bacterial infections and to provide new targets to use in the development of more effective vaccines. Information on the immune response of fish (mainly salmonids and flatfish) against *Aeromonas* infections is limited and has mainly been gathered from genomic studies by massive sequencing of short sequences so called expressed sequence tags (ESTs) and the use of DNA microarrays. A number of studies have employed experimental infections with strains of *A. salmonicida* or *A. hydrophila* in order to investigate the genes involved in the immune system of the fish, and others have studied the fish response after intraperitoneal vaccination including its secondary adverse effects such as granuloma formation. This article will analyse and discuss these studies highlighting the importance of identifying those genes implicated in resistance against bacterial infections, which would mean a step ahead in the search for resistant populations, genetic improvement of broodstock and development of new preventive methods to improve the fish survival and health.

Key words: Aeromonas, salmonids, fish, expressed sequence tags (ESTs), microarrays, immune response, vaccine, granuloma.

Introducción

En todos los sistemas empleados en acuicultura, tanto tanques de cultivo en circuito abierto o en recirculación, estanques en tierra, o jaulas en el mar, aparte de complejas características físico-químicas, existen numerosas bacterias patógenas y oportunistas como las *Aeromonas* que pueden desarrollar infecciones, sobretodo en situaciones de estrés en las que los peces presentan su sistema inmune debilitado (Bernoth et al., 1997; Noga, 2010; Figueras et al., 2011; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012). Las especies del género *Aeromonas* son consideradas agentes etiológicos de numerosas patologías que afectan a los peces cultivados, causando infecciones que van en detrimento de la producción (Bernoth et al., 1997; Austin y Austin, 2007; Noga, 2010; Figueras et al., 2011; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012). Podemos destacar la especie *Aeromonas salmonicida* como el agente causal de la furunculosis, o septicemias causadas por *Aeromonas* móviles (como *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. bestiarum*, etc), que son consideradas un ejemplo claro de enfermedades inducidas por estrés (Austin y Austin, 2007; Noga, 2010; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012). Estas especies afectan a cultivos de salmónidos, anguila (*Anguilla anguilla*), pez gato (*Ictalurus punctatus*), carpa (*Cyprinus carpio*), lamprea (*Petromyzon marinus*), tilapia (*Oreochromis aureus*), etc (Bernoth et al., 1997; Austin y Austin, 2007; Figueras et al., 2011; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012). La reciente explotación de nuevas especies de peces de interés comercial cuya susceptibilidad a las infecciones es menos conocida puede significar que las estrategias de prevención y control establecidas hasta la fecha se queden obsoletas (Figueras et al., 2011). Hasta ahora la vacunación por inyección ha demostrado ser la estrategia de prevención más efectiva ya que normalmente se suministra con adyuvantes que estimulan y prolongan la respuesta inmune no específica de los peces (Gudmundsdóttir y Björnsdóttir, 2007; Austin y Austin, 2007; Magnadóttir, 2010; Figueras et al., 2011). Entre los efectos secundarios de las vacunas oleosas administradas contra las infecciones producidas por *A. salmonicida* y otros patógenos se han descrito importantes reacciones inflamatorias que pueden generar granulomas intra-abdominales (Mutoloki et al., 2010; Figueras et al., 2011; y trabajos referenciados).

La identificación de genes que participan en el sistema inmune del pez es importante para reconocer marcadores genéticos en poblaciones de peces resistentes a este tipo de enfermedades bacterianas, así como para el descubrimiento de nuevas dianas para su uso en el desarrollo de vacunas más eficaces. El escaso conocimiento sobre el sistema inmune de peces (principalmente de salmónidos y de peces planos) en respuesta a infecciones causadas por especies de *Aeromonas* se ha obtenido principalmente de la secuenciación masiva de pequeñas secuencias (de 200-800 nucleótidos) de ADN complementario (ADNc), denominadas ESTs (marcadores de secuencia expresada; acrónimo del inglés expressed sequence tags) (Tsoi et al., 2004; Park et al., 2005; Martin et al., 2006; Ewart et al., 2005; 2008; Pardo et al., 2008; Feng et al., 2009; Skugor et al., 2009; Millán et al., 2010; Mutoloki et al., 2010; Sahoo et al., 2011). Estos ESTs pueden posteriormente ser utilizados como dianas en el desarrollo de chips (o microarrays) de ADN o en otros estudios genómicos. En este artículo se revisan y discuten los resultados de estudios sobre los genes involucrados en el sistema inmune de peces tras infecciones experimentales con cepas de *A. salmonicida* o *A. hydrophila* (Tsoi et al., 2004; Ewart et al., 2005; 2008; Pardo et al., 2008; Millán et al., 2010; Sahoo et al., 2011), así como otros que han estudiado la

respuesta inmune en peces vacunados (Park et al., 2005; Martin et al., 2006; Feng et al., 2009; Skugor et al., 2009) o la aparición de efectos secundarios tras la vacunación intraperitoneal, como es la formación de granulomas (Mutoloki et al., 2010; Figueras et al., 2011).

Expresión génica frente a infecciones con *Aeromonas*

Tsoi y colaboradores (2004) identificaron diversos genes expresados en el salmón Atlántico (*Salmo salar*) tras ser infectados experimentalmente (por vía intraperitoneal) con una cepa de *A. salmonicida*. Se extrajo ARN a partir de 3 órganos (hígado, riñón y bazo) para construir genotecas de ADNc mediante la técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH) que permite la identificación de genes cuya expresión se induce o se reprime en los órganos de los salmónidos en respuesta a la infección. Se secuenciaron aproximadamente 200 clones de cada genoteca obteniéndose un total de 1.778 ESTs, que fueron depositadas y comparadas con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank. Se pudieron asignar categorías funcionales a numerosas ESTs que incluyeron genes implicados en la traducción de señales, inmunidad innata y otros procesos. Uno de los objetivos del trabajo fue identificar proteínas de fase aguda (PFA) implicadas en la inmunidad innata de salmones. Las PFA se producen generalmente en el hígado como respuesta temprana a un daño tisular sistémico. Algunas se incrementan de manera exponencial (proteínas de fase aguda positivas), y la producción de otras es interrumpida (proteínas de fase aguda negativas) (Tabla 1). La magnitud de la respuesta varía y depende de la severidad del daño. Tsoi et al. (2004) determinaron que el hígado no es el único órgano productor de PFA, también ocurre en el riñón y bazo y detectaron diversas clases de PFA entre las que destacan sueros amiloides, factores de coagulación, proteínas inhibitoras y transportadoras, sustancias antimicrobianas, componentes del complemento, lectinas, ect.

Las ESTs obtenidas en este estudio a partir de salmones infectados por *A. salmonicida*, junto con las de otros estudios enfocados en la infección por otros patógenos bacterianos, y los disponibles en genotecas de acceso público fueron utilizados por Rise y colaboradores (2004) para construir un chip (o microarray) de ADNc que permite reconocer genes involucrados en la respuesta del salmón frente a infecciones bacterianas de una forma rápida y simple (Tabla 1). Estudios posteriores (Ewart et al., 2005) utilizaron este microarray en un experimento de cohabitación para estudiar más a fondo la respuesta del salmón Atlántico frente a una infección de furunculosis. Los experimentos de cohabitación se basan en mantener en los mismos tanques peces infectados experimentalmente y peces no infectados. Entre los genes que se expresaron, algunos coincidieron con los descritos por Tsoi et al. (2004) mediante la técnica de SSH, pero otros se detectaron por primera vez sin mostrar ninguna homología en la base de datos del GenBank.

Estos estudios se pueden considerar pioneros y supusieron un avance en el conocimiento de la respuesta del salmón Atlántico frente a infecciones causadas por *A. salmonicida*. Sin embargo, se conocía muy poco sobre la posible respuesta inmune temprana del pez. Para solventar este problema, Ewart et al. (2008) realizaron otro estudio en el que infectaban cultivos celulares de macrófagos obtenidos de riñón de salmón con *A. salmonicida* y observaban la expresión génica utilizando el microarray de ADNc de salmón previamente diseñado (Rise et al., 2004). Se analizaron los macrófagos a los 30 min, 1 y 2 h tras la infección y se observaron cambios en la expresión génica mediante un análisis con el microarray a las 2 h de la infección. Además mediante la técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa con

transcriptasa inversa (qRT-PCR) dirigida al factor de necrosis tumoral TNF- y al factor de inhibición I-kappa se observó que ambos se sobreexpresaban a las 0.5-1h post-infección demostrando una respuesta inmune temprana del salmón Atlántico.

En otro estudio, Pardo et al. (2008) obtuvieron 9.256 ESTs de las cuales 3.482 eran nuevas secuencias obtenidas a partir de un rodaballo sano y otro infectado vía intraperitoneal con una cepa de *A. salmonicida* (Tabla 1). En los peces infectados se observaron varios genes con sobreexpresión relacionándolos con el metabolismo del hierro lo que indicaba una respuesta del hospedador contra esta bacteria que requiere capturar hierro para realizar su proceso de infección. Los 3.482 nuevos marcadores (o EST) obtenidos en este estudio fueron utilizados más tarde por Millán et al. (2010) para desarrollar un microarray específico de rodaballo para identificar los genes candidatos que confieren resistencia contra *A. salmonicida*. Estos autores evaluaron el microarray utilizando secuencias de ADNc obtenidas a partir de bazos de rodaballo a los 3 días de ser infectados (vía intraperitoneal) con *A. salmonicida* y los resultados se compararon con los de peces control (rodaballos no infectados). Así fueron capaces de detectar 50 genes expresados e involucrados en el mecanismo de defensa y funciones relacionadas con la inmunidad del pez contra *A. salmonicida*, lo que podría suponer una información relevante para la mejora genética en búsqueda de reproductores resistentes.

En un estudio reciente Sahoo et al. (2011) infectaron al pez rohu (*Labeo rohita*) con una cepa de *A. hydrophila* y cuantificaron diversos parámetros del sistema inmune innato, como el estallido respiratorio (en inglés, respiratory burst activity) de los fagocitos, la actividad mieloperoxidasa del suero (ambos implicados en la fagocitosis) y los niveles de ceruloplasmina (involucrado en la reparación de tejidos dañados y en la destrucción de microbios) y evaluaron en paralelo la expresión de los genes de la respuesta inmune. Para ello, compararon los resultados obtenidos de 2 poblaciones de peces rohu, una resistente a las infecciones de *A. hydrophila* y otra susceptible, tras haber sido infectados por vía intraperitoneal con esta bacteria. Observaron que todos los niveles de los parámetros inmunes analizados eran significativamente más altos en la población resistente en comparación con la susceptible. Por tanto consideraron que estos parámetros podrían utilizarse como marcadores asociados a la función inmune en busca de poblaciones de peces rohu resistentes a infecciones causadas por *Aeromonas* móviles (como *A. hydrophila*). Con respecto a la expresión de genes no encontraron diferencias significativas en los genes que codifican la lisozima tipo G (que protege contra infecciones microbianas) o en los receptores tipo-toll 22 (involucrados en la traducción de señales en la respuesta inflamatoria). Los niveles de la microglobulina 2 (una glicoproteína esencial) eran ligeramente más altos en la población susceptible y la expresión de la transferrina (que priva al microbio del hierro disponible) y del componente del complemento C3 (involucrado en la formación de complejos membranosos para eliminar patógenos) fueron significativamente más altos en la población susceptible en comparación con la resistente. Dado que algunos de estos parámetros inmunológicos eran más altos en la población susceptible en comparación con la resistente, Sahoo et al. (2011) sugirieron que podrían no tener una función principal en el mecanismo de defensa del hospedador en la protección contra infecciones causadas por *Aeromonas* spp. A pesar de ello consideraron que el estudio de los perfiles de genes expresados involucrados en los mecanismos de defensa supone una ventaja para los estudios de selección genética en busca de poblaciones de peces resistentes a estas infecciones (Sahoo et al., 2011).

Expresión génica tras la vacunación

Otros estudios han examinado la expresión de genes en peces tras ser vacunados contra la furunculosis. En este sentido Park et al. (2005) investigaron la expresión de genes en juveniles de halibut Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) vacunados vía intraperitoneal con una vacuna comercial contra los patógenos *A. salmonicida* y *Vibrio anguillarum*. Extrajeron ARN a partir de hígado, bazo y riñón de 3 peces en intervalos de tiempo diferentes (1, 2, 7 y 14 días post-vacunación) para poder construir una genoteca de ADNc. A partir de la genoteca se obtuvieron 1.072 ESTs, de las cuales el 17% (182) se asoció con el mecanismo de defensa del hospedador (Tabla 1). Entre las proteínas relacionadas con la respuesta inmune del pez que se descubrieron resalta una proteína tipo quimiocina (MIP-1beta) que se sobreexpresó en hígado y bazo, lo que sugería su implicación en la respuesta inmune del pez. Park et al. (2005) concluyeron que la genoteca de ADNc construida aporta información importante para el estudio de las funciones de genes desconocidos así como la respuesta del halibut Atlántico tras su vacunación.

En otro estudio, Martin et al. (2006) analizaron los cambios en la expresión de genes en diferentes órganos de salmones (riñón, hígado y agallas) que previamente habían sido vacunados vía intraperitoneal con una vacuna viva de una cepa de *A. salmonicida* genéticamente atenuada. Utilizaron las técnicas genómicas de SSH y el microarray específico de salmón desarrollado por Rise et al. (2004) para estudiar la expresión génica de los peces a las 24 y 48 h post-infección. La mayor expresión se observó en un péptido antibacteriano del hígado denominado hepcidina, cuya expresión se incrementó 11 veces tras el ensayo de vacunación. También utilizaron ensayos de RT-PCR para evaluar la expresión de 7 genes a las 6, 12, 24 y 48 h post-infección. Se secuenciaron un total de 1.486 clones de ADNc, de los cuales el 71% tenían homología con proteínas conocidas (Tabla 1). Se observó que los 7 genes que se analizaron mediante la RT-PCR se activaron en todos los intervalos de tiempo estudiados demostrando que la respuesta antibacteriana en los peces ocurre muy pronto tras la infección. Además se observó en 6 de estos genes (4 de ellos conocidos: el antipéptido bacteriano hepcidina, una lectina, una metaloproteasa y una proteína reguladora conocida de trucha; así como dos nuevos genes el péptido antibacteriano catelicidina y una citoquina) una expresión temporal diferente en los distintos tejidos analizados (Tabla 1). También observaron que los peces vacunados mostraron 1.5 veces más de genes expresados en comparación con los peces control. El mayor número de genes (51%) relacionados con la respuesta inmune de los salmones se obtuvieron a partir del hígado y el 20% de las agallas y del riñón, lo que demostró que estos órganos están activos durante la respuesta contra la furunculosis. Martin et al. (2006) concluyeron que la identificación de genes involucrados en la respuesta inmune temprana del pez contra la furunculosis podría conducir al desarrollo de nuevos métodos para la mejora de la salud de los peces en la acuicultura.

Recientemente, en otro estudio Skugol y colaboradores también analizaron la expresión génica en el salmón Atlántico tras administrar una vacuna adjuvanteda intraperitoneal. Realizaron el ensayo de infección en peces vacunados y no vacunados a los que denominaron altamente resistentes y poco resistentes respectivamente. Se muestrearon varios órganos (hígado, bazo y corazón) de los peces muertos y al final del experimento (a los 20 días para los peces no vacunados y a los 60 días para los peces vacunados). La expresión génica se analizó mediante un microarray comercial (SFA2.0 immunochip) y mediante una PCR cuantitativa (qPCR). Skugor et al. (2009) encontraron que los genes relacionados con la inhibición de proteasas, regulación del

complemento, metabolismo de lípidos y eliminación de compuestos tóxicos se expresaron más en los salmones altamente resistentes y sugirió que podrían considerarse marcadores candidatos para la protección contra la furunculosis. Los autores consideraron que los genes con una diferencia en la expresión génica entre los peces altamente y poco resistentes podría correlacionarse con los efectos positivos o negativos de la protección de la vacuna contra la furunculosis.

En otro estudio reciente, Feng et al. (2009) construyeron genotecas de ADNc basándose en los genes expresados en el bazo e hígado en salmones juveniles tras la estimulación de una vacuna intraperitoneal de una cepa de *A. salmonicida* atípica inactivada con formalina. De los 4.154 ESTs secuenciados se seleccionaron 10 genes implicados en funciones inmunológicas para analizar su expresión mediante una qRT-PCR a distintos intervalos de tiempo entre las 2 y 72 h post-inyección (Tabla 1). A las 24 h de la inyección se confirmó la sobreexpresión de varios genes incluyendo el factor regulador del interferón (IRF1), la catelicina, la hepcidina y una citoquina pequeña en los tejidos del hígado y bazo. A las 6 h post inyección los genes que se expresaron fueron los que codifican para las interleucinas 1 y 8 en ambos órganos. Este trabajo identificó un gran número de genes como parte de la investigación para el proyecto Genómica del bacalao Atlántico y desarrollo de reproductores (Atlantic Cod Genomics and Broodstock Development Project, CGP, <http://codgene.ca>) que tiene como objetivo el estudio y comprensión de los genes y procesos moleculares involucrados en la respuesta del bacalao Atlántico frente a patógenos para la selección de reproductores resistentes a enfermedades causados por microbios y para el desarrollo de nuevas vacunas para prevenir enfermedades como la furunculosis.

Posteriormente, Feng y colaboradores (2009) estudiaron la expresión de genes en diversos tejidos (bazo, sangre, cerebro, agallas y ciegos pilóricos) de juveniles de bacalao del Atlántico también vacunados con una cepa atípica de *A. salmonicida* inactivada con formalina (Feng y Rise, 2010; Browne et al., 2011). En estos estudios utilizaron la base de datos de ESTs que habían desarrollado previamente (Feng et al., 2009) para la identificación de secuencias de ADNc y utilizaron una qRT-PCR para estudiar la expresión génica en los tejidos de los peces vacunados, en peces vacunados solo con un buffer fosfato salino (PBS) como controles y en peces no vacunados. Feng y Rise (2010) identificaron cuatro proteínas anti-apoptóticas (NR-13, Mcl-1, Bcl-X1, Bcl-X2) que inhiben la muerte celular y observaron que en los peces juveniles no vacunados las proteínas NR-13 y Bcl-X2 fueron las que más se expresaron en las agallas y las proteínas Mcl-1 y Bcl-X1 en la sangre. En los juveniles vacunados vía intraperitoneal, solo la proteína NR-13 se expresó significativamente en el bazo en respuesta a la presencia de restos celulares de la bacteria. Browne et al. (2011) identificaron 2 péptidos antimicrobianos (GAD-1 y GAD-2) en el bacalao Atlántico a los que denominaron gaduscidinas que se expresaron con gran intensidad en tejidos asociados con la respuesta inmune (hígado y bazo) en los juveniles no vacunados pero muy levemente y solo en el bazo de los juveniles vacunados. En ambos estudios (Browne et al., 2011; Feng y Rise, 2010) se obtuvo una expresión débil de las proteínas anti-apoptóticas y de un péptido antimicrobiano lo que indicaba que algunas de estas proteínas no se expresaban específicamente por la presencia de *A. salmonicida*. Sin embargo, todas estas proteínas se expresaban con gran intensidad en la sangre o en algunos órganos de los peces juveniles no vacunados, por lo que los autores consideraron que podrían ser componentes importantes de la inmunidad innata del bacalao Atlántico.

Tabla 1. Estudios que han generado bases de datos de marcadores de secuencia expresada (ESTs) relacionados con infección o con respuesta a la vacunación contra *A. salmonicida* en peces.

Referencia	Especie de pez ^a (n)	Nº ESTs	Resultados/observaciones
Experimentos de infección			
Tsoi et al., 2004	Salmón Atlántico (6)	1.778	Identifican proteínas de fase aguda (PFA) en el riñón, hígado y bazo implicadas en la inmunidad innata de salmones.
Rise et al., 2004	Salmón Atlántico (23) Trucha arco iris (6) Salmón chinook (2) Salmón sockeye (2) Corégono de lago (2)	61.819 14.544 1.317 1.243 1.465	Describen un microarray de ADN de 3.557 cDNAs para la detección de genes implicados en la inmunidad de salmónidos. Los ciegos pilóricos del tracto digestivo actúan como barrera frente a los xenobióticos y controla las reacciones oxido-reducción.
Pardo et al., 2008 ^b	Rodaballo (20)	3.482 ^c	2.582 secuencias se asociaron a una función conocida, y 203 representan nuevas proteínas relacionadas con la inmunidad y defensa del rodaballo. Se identificaron un total de 1.158 polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) ^d .
Experimentos de vacunación intraperitoneal			
Park et al., 2005 ^e	Halibut Atlántico (15)	1.072	Se descubrieron 182 genes relacionados con la respuesta inmune del halibut Atlántico de los cuales 9 nunca habían sido reportados en los Pleuronectiformes. Se detectaron 13 PFA positivas y 4 PFA negativas y se observó una sobreexpresión de una quimiocina a los 1, 2, 7 y 14 días post vacunación.
Martin et al., 2006 ^f	Salmón Atlántico (10)	1.486	Identifican nuevas secuencias de ADNc relacionadas con la respuesta temprana del pez, a las 6h de la infección bacteriana. En la respuesta inmune, el mismo gen puede tener una respuesta temporal diferente en distintos tejidos.
Feng et al., 2009	Bacalao Atlántico (42)	4.154	Primer estudio que caracteriza y demuestra la sobreexpresión del factor regulador interferón 1 en respuesta a la estimulación de antígenos en peces.

^aNombres científicos: Salmon Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), Salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), Salmón sockeye (*Oncorhynchus nerka*), corégono de lago (*Coregonus clupeaformis*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), halibut Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), bacalao Atlántico (*Gadus morhua*).

^b El estudio también se realizó con otro lote de 20 peces infectados con el protozoo *Philasterides dicentrarchi*.

^c Los 3.482 ESTs se utilizaron para el posterior desarrollo de un microarray específico de rodaballo (Millán et al., 2010).

^d Los SNP son marcadores para estudios de mapeo genético y análisis de genómica comparativa útiles en programas de selección asistida y para la identificación de genes relacionados con características determinadas.

^e Utilizaron una vacuna comercial contra *Vibrio anguillarum* además de *A. salmonicida*.

^f El estudio utiliza el microarray de ADN de salmón diseñado por Rise et al. (2004).

Estudio genético sobre los efectos secundarios de la vacunación

Las vacunas oleosas intraperitoneales pueden causar efectos adversos en peces como son las reacciones inflamatorias o inmunológicas que se manifiestan como granulomas intra-abdominales en el lugar de la inyección de la vacuna intraperitoneal (Mutoloki et al., 2010; Figueras et al., 2011). Sin embargo, los mecanismos que producen estas reacciones aún se desconocen y hasta ahora solo conocemos el estudio de Mutoloki et al. (2010) en el

que se estudian estas reacciones a nivel genético. Estos autores utilizaron un microarray de ADNc en salmón Atlántico diseñado previamente por von Schalburg et al. (2005) para estudiar la expresión génica de células de la parte superior del riñón en salmones que presentaban granulomas severos a los 3 meses de haber sido vacunados con concentraciones diferentes de antígeno. Detectaron la expresión de un gran número de genes involucrados en la inmunidad innata y adaptada, procesamiento de fagocitos, señales intercelulares, diferenciación celular, factores complementarios, estrés antioxidativo e indicadores adicionales de procesos inflamatorios y reacciones granulomatosas. También observaron que la concentración de antígeno suministrado en la vacuna afectaba la respuesta inmune del pez. Una concentración alta de antígeno causaba una reacción severa en el sitio de inyección con un incremento en la cuantificación de transcritos del gen de la inmunoglobulina lo que sugería una gran respuesta humoral. Sin embargo se observó que en peces vacunados con una concentración baja de antígeno las reacciones en el sitio de inyección eran más leves y los macrófagos eran abundantes asociándose con la curación de la herida e inflamación. En este estudio, el microarray de ADNc del salmón Atlántico desarrollado por von Schalburg et al. (2005) permitió descubrir los mecanismos celulares y las moléculas señal implicadas en el desarrollo de las reacciones autoinmunes y mecanismos de inflamación causados por el suministro de vacunas oleosas vía inyección intraperitoneal. Se considera que estos hallazgos constituyen el primer paso para la mejora de este tipo de vacunas (Mutoloki et al., 2010).

Conclusiones y futuras perspectivas

A lo largo de esta revisión hemos presentado la información más actual sobre los estudios que evalúan la expresión génica en peces en respuesta a una infección o vacunación relacionadas con especies del género *Aeromonas*. Nuevas técnicas, como la pirosecuenciación que permite la secuenciación de genomas completos de especies de *Aeromonas* así como de especies de peces hospedadores, permitirán un conocimiento más completo del comportamiento de estos microorganismos así como de la interacción hospedador-parásito.

La eficiencia de la vacunación contra la furunculosis depende de la habilidad del hospedador para neutralizar, mediante su respuesta inmune los impactos negativos de las cepas infectivas antes de que causen daños irreversibles en las células de los tejidos. Estos procesos son complejos y regulados por una serie de genes funcionales y reguladores, muchos de los cuales están ahora disponibles en bases de datos públicas, y otros están en proceso de ser descritos utilizando técnicas genómicas como son los ESTs y los microarrays. La identificación de los mecanismos clave que el pez utiliza para resistir una infección microbiana puede significar un gran paso en la búsqueda de individuos reproductores resistentes mediante mejora genética, así como en el desarrollo de nuevos métodos para mejorar la salud y minimizar la mortalidad de los peces en la acuicultura. Los efectos adversos de las vacunas oleosas intraperitoneales contra la furunculosis como es la formación de granulomas también están siendo estudiados a nivel genómico y es de esperar que esta información sea de ayuda para evitar o minimizar estos efectos secundarios nocivos.

Bibliografía

1. Austin B. y Austin D.A. (2007). Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish (4th edition) Springer-Praxis, ISBN 978-1-4020-6068-7, Chichester, UK.
2. Bernoth E.M., Ellis A., Midtlyng P., Olivier G. y Smith P. (1997). Furunculosis Multidisciplinary Fish Disease Research (1st

- edition), Academic Press, ISBN 0-12-093040-4.
3. Beaz Hidalgo R. y Figueras M.J. (2012). Molecular Detection and Characterization of Furunculosis and Other Aeromonas Fish Infections, Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/updated-information-of-aeromonas-infections-and-furunculosis-derived-from-molecular-methods>
 4. Browne M.J., Feng C.Y., Booth V. y Rise M.L. (2011). Characterization and expression studies of Gaduscidin-1 and Gaduscidin-2; paralogous antimicrobial peptide-like transcripts from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Developmental and Comparative Immunology* 35: 399-408.
 5. Ewart K.V., Belanger J.C., Williams J., Karakach T., Penny S., Tsoi S.C., Richards R.C. y Douglas S.E. (2005). Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology. *Developmental and Comparative Immunology* 29: 333-347.
 6. Ewart K., Williams J., Richards R.C., Gallant J.W., Melville K. y Douglas S.E. (2008). The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed in vitro to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 380-390.
 7. Feng C.Y., Johnson S.C., Hori T.S., Rise M., Hall J.R., Gamperl A.K., Hubert S., Kimball J., Bowman S. y Rise M.L. (2009). Identification and analysis of differentially expressed genes in immune tissues of Atlantic cod stimulated with formalin-killed, atypical *Aeromonas salmonicida*. *Physiological Genomics* 37: 149-63.
 8. Feng C.Y. y Rise M.L. (2010). Characterization and expression analyses of anti-apoptotic Bcl-2-like genes NR-13, Mcl-1, Bcl-X1, and Bcl-X2 in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Molecular Immunology* 47: 763-84.
 9. Figueras, M.J. Beaz-Hidalgo R. y Paredes K. (2011). Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. En *Enfermedades infecciosas del cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo*. Avendaño-Herrera, R. (ed). Niva Chile S.A. Chile, pp. 285-374.
 10. Gudmundsdóttir B.K. y Björnsdóttir B. (2007). Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. *Vaccine* 25: 5512-5523.
 11. Magnadóttir B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology* 12: 361-379.
 12. Martin S.A., Blaney S.C., Houlihan D.F. y Secombes C.J. (2006). Transcriptome response following administration of a live bacterial vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Immunology* 43: 1900-1911.
 13. Millán A., Gómez-Tato A., Fernández C., Pardo B.G., Alvarez-Dios J.A., Calaza M., Bouza C., Vázquez M., Cabaleiro S. y Martínez P. (2010). Design and performance of a turbot (*Scophthalmus maximus*) oligo-microarray based on ESTs from immune tissues. *Marine Biotechnology*: 12, 452-65.
 14. Mutoloki S., Cooper G.A., Marjara I.S., Koop B.F. y Evensen O. (2010). High gene expression of inflammatory markers and IL-17A correlates with severity of injection site reactions of Atlantic salmon vaccinated with oil-adjuvanted vaccines. *BMC Genomics* 11: 336.
 15. Noga E.J. (2010). *Fish Diseases* (2nd edition) Wiley-Blackwell, ISBN 978-0-8138-0697-6, Singapore.
 16. Pardo B.G., Fernández C., Millán A., Bouza C., Vázquez-López A., Vera M., Alvarez-Dios J.A., Calaza M., Gómez-Tato A., Vázquez M., Cabaleiro S., Magariños B., Lemos M.L., Leiro J.M. y Martínez P. (2008). Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC Veterinary Research* 4: 37.
 17. Park K.C., Osborne J.A., Tsoi S.C., Brown L.L. y Johnson S.C. (2005). Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 18: 393-415.
 18. Rise M.L., von Schalburg K.R., Brown G.D., Mawer M.A., Devlin R.H., Kuipers N., Busby M., Beetz-Sargent M., Alberto R., Gibbs A.R., Hunt P., Shukin R., Zeznik J.A., Nelson C., Jones S.R., Smailus D.E., Jones S.J., Schein J.E., Marra M.A., Butterfield Y.S., Stott J.M., Ng S.H., Davidson W.S. y Koop B.F. (2004). Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Research* 14: 478-490.
 19. Sahoo P.K., Rauta P.R., Mohanty B.R., Mahapatra K.D., Saha J.N., Rye M. y Eknath A.E. (2011). Selection for improved resistance to *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp *Labeo rohita*, Survival and innate immune responses in first generation of resistant and susceptible lines. *Fish and Shellfish Immunology* 31: 432-438.
 20. Skugor S., Jørgensen S.M., Gjerde B. y Krasnov A. (2009). Hepatic gene expression profiling reveals protective responses in

- Atlantic salmon vaccinated against furunculosis. *BMC Genomics* 10: 503.
21. Tsoi S.C., Ewart K.V., Penny S., Melville K., Liebscher R.S., Brown L.L. y Douglas S.E. (2004). Identification of immune-relevant genes from atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. *Marine Biotechnology* 6: 199-214.
22. von Schalburg K.R., Rise M.L., Cooper G.A., Brown G.D., Gibbs A.R., Nelson C.C., Davidson W.S. y Koop B.F. (2005). Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. *BMC Genomics* 6: 126.