

**análisis transcriptómico
de la respuesta inmunitaria
temprana en la trucha**

(Oncorhynchus mykiss, W.)

**Una interpretación ontológica
de la infección
en los Teleósteos**

Joan Carles Balasch Alemany

DIRECTORES

LLUÍS TORT I BARDOLET
SIMON A. MACKENZIE

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA
FACULTAT DE BIOCÈNCIES
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
2008

TESIS DOCTORAL

El que es veu, i el que no es veu
d'aquest treball està dedicat
a la Marta

al seu costat
no em cal buscar el sentit de la vida

Análisis transcriptómico de la respuesta inmunitaria temprana en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*)

Una interpretación ontológica de la infección

En este trabajo se evaluó la respuesta inmunitaria temprana, desencadenada por la exposición a diversos inmunógenos, en dos especies de teleósteos habituales en la práctica de la piscicultura en la península, la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), un salmóniforme protacantopterigio primitivo y la dorada (*Sparus aurata*), un perciforme moderno, mediante análisis estadístico de la expresión genética y ontológico de las categorías funcionales descriptivas de la expresión de los transcriptomas renal, hepático y branquial.

Para ello se utilizaron dos versiones de una plataforma de micromatriz de ADNc diseñada específicamente para salmónidos. Para la valoración de la respuesta defensiva en las truchas expuestas a infecciones virales y bacterianas se utilizó la plataforma de micromatriz SFM 1.0, enriquecida con genes implicados en las respuestas metabólicas e inmunitarias, empleada en análisis previos ecotoxicológicos y que aquí se validó desde el punto de vista de la eficiencia en la detección del transcriptoma inmunitario en condiciones de carga alostática patológica. Para el análisis de la respuesta de la dorada a una dieta inmunoestimulante se utilizó una variante de la misma, la plataforma SFA 2.0 enriquecida con un mayor número de genes relacionados con la respuesta inmunitaria, apoptosis y comunicación celular y cuya eficiencia en la valoración de los cambios transcriptómicos del inmunoma sometido a intrusión viral se ha validado recientemente en diversos estudios con salmónidos. En este caso la respuesta transcriptómica debida a la hibridación cruzada entre los transcritos de salmónido y dorada se analizó teniendo en cuenta el número de genes expresados diferencialmente, la intensidad de su expresión y la adscripción a categorías funcionales específicas mediante análisis ontológico.

La respuesta inmunitaria temprana (24-72 horas) de truchas expuestas a lipopolisacárido bacteriano (LPS) y formas atenuadas y activas del virus IHN, responsable de la necrosis hematopoyética infecciosa, se valoró en el riñón cefálico, el principal órgano hematopoyético de los teleósteos, y la respuesta de fase aguda debida a la exposición a LPS se analizó comparativamente entre el riñón cefálico y el hígado, el órgano responsable de la síntesis de proteínas de fase aguda en situaciones de inflamación. En ambos casos se utilizó un modelo, adaptado a la experimentación con teleósteos, análogo a la peritonitis murina causada por inoculación intraperitoneal de inmunógenos, debido a la descripción precisa que del mismo se tiene en la actualidad en los mamíferos, lo que facilita el estudio comparativo de la respuesta inmunitaria en los teleósteos.

El tono e intensidad de la respuesta inmunitaria en la dorada se evaluaron mediante la administración oral continuada durante cuatro semanas de una dieta inmunoestimulante enriquecida con extractos de levadura y vitaminas antioxidantes (C y E), y sus efectos se valoraron comparativamente en el riñón cefálico y las branquias, estas últimas de reconocida diversidad funcional e interfase preeminente entre los medios interno y externo al animal.

10

INTRODUCCIÓN GENERAL

- 11. La gnómica de la genómica
- 16. Filogenómica y acuicultura
- 30. El cínzel ontológico

36

LA MICROMATRIZ

- 37. Descripción de la plataforma
- 43. Validación de la plataforma

80

LA RESPUESTA DE FASE AGUDA

- 81. Respuesta hepática (RFA)
- 84. Metodo(logía)
- 86. Reactividad hepática general
- 89. Reactividad hepática humoral
- 96. Metabolismo hepático
- 97. Modelo transcriptómico de la RFA

34

OBJETIVOS

- 34. El gen como baliza

48

INFECCIÓN E INMUNIDAD TEMPRANA

- 49. Virus IHN y LPS
- 52. Metodo(logía)
- 55. Modelo inmunotranscriptómico
- 62. Respuestas específicas/comunes
- 66. Respuestas modales
- 75. Ontología de la respuesta

106

EL TRANSCRIPTOMA DE LA DORADA

- 107. Micromatrices interespecíficas
- 110. Metodo(logía): plataforma SFA 2.0
- 114. Dietas inmunoestimulantes
- 116. Hibridación cruzada en la SFA 2.0
- 118. Inmunotranscriptoma de la branquia
- 120. Inmunotranscriptoma del riñón

128**CONCLUSIONES GENERALES**

- 131.** Validación de la micromatriz
- 132.** Infecciones viral y bacteriana
- 133.** Respuesta de fase aguda
- 134.** Efectos de la dieta inmunoestimulante

166**AGRADECIMIENTOS****138****REFERENCIAS****170****MATERIAL ADICIONAL**

- 171.** Genes expresados en la trucha (riñón, atIHNV, 24h)
- 181.** Genes expresados en la trucha (riñón, atIHNV, 72h)
- 194.** Genes expresados en la trucha (riñón, IHNV, 24h)
- 207.** Genes expresados en la trucha (riñón, IHNV, 72h)
- 218.** Genes expresados en la trucha (riñón, LPS, 24h)
- 220.** Genes expresados en la trucha (riñón, LPS, 72h)
- 222.** Genes expresados en la trucha (hígado, LPS, 24h)
- 224.** Genes expresados en la trucha (hígado, LPS, 72h)
- 225.** Genes expresados en la dorada (branquias)
- 233.** Genes expresados en la dorada (riñón cefálico)
- 243.** RT-qPCR de genes selectos

 *The most exciting phrase to
hear in science, the one that
heralds new discoveries, is
not 'Eureka!' (I found it!)
but 'That's funny ...'*

Isaac Asimov

resumen

Una acepción reciente, y un tanto exótica, de los seres vivos¹ los considera agentes autónomos insertos en una biosfera cambiante, y reduce su definición a un “sistema autorreproductor capaz de desarrollar al menos un ciclo de trabajo termodinámico”. En esta concepción de especie, el acoplamiento entre genoma y su expresión macroscópica define la patología como alejamiento del estado alostático habitual originado por la disrupción informativa entre genoma y fenoma. A falta de una definición genómica precisa de las especies no acomodables a las condiciones de laboratorio, se discuten a continuación, de manera sucinta y a modo de introducción general a la investigación desarrollada en este trabajo, los problemas actuales de la investigación inmunómica comparada en organismos marinos, especialmente en especies de peces cultivables². Se sugieren, asimismo, las pautas generales a tener en cuenta en la acotación genómica de la diversidad de la respuesta inmunitaria y la validez del uso de plataformas de micromatriz diseñadas ad hoc para especies de escasa definición genómica.

Se defiende, por último, el necesario carácter empírico en el análisis de patologías en estas especies que a menudo limita la experimentación confirmatoria en beneficio de la formulación de hipótesis, y se reivindica para ello el análisis de la expresión genética mediante la evaluación estadística de las categorías ontológicas más representativas de un transcriptoma obtenido a partir de micromatrices acotadas para una función (inmunitaria, metabólica, ecotoxicológica) determinada, como el utilizado en este trabajo.

¹ Stuart Kauffman: *Investigaciones. Complejidad, autoorganización y nuevas leyes para una biología general*, 2003. Tusquets editores, col. Metatemas 76, Barcelona.

² Diversas partes del texto descrito en este apartado se han publicado conjuntamente en forma de artículo: J.C. Balasch, N. Roher, L. Ribas, V. Mulero, L. Tort y S. Mackenzie: *Genómica funcional e Inmunología*, en P. Martínez y A. Figueras (coords.) *Genética y genómica en acuicultura*, 2007, pp. 661-688. Publicaciones científicas y tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura, CSIC, Madrid.

Gnómica y genómica naturalistas

La investigación aplicada en genómica comparada de metazoos adolece de una división artificiosa entre organismos pertenecientes a las llamadas especies modelo, fácilmente acomodables a las condiciones de laboratorio, y aquellos organismos de difícil ubicación experimental, logística e incluso, en ocasiones, taxonómica. Los primeros crecen, se reproducen y mueren convenientemente rápido, lo que facilita el análisis de la transmisión generacional de caracteres y fenotipos. Para los segundos, las generaciones pasan (si lo hacen) a menudo con una exasperante (para el investigador) lentitud. Paradójicamente, las especies modelo, adaptadas al medio artificial, y en modo alguno representativas de las vicisitudes que experimenta un genoma oculto tras un fenotipo carnal expuesto a las inclemencias del medio, se toman como referencia para estudios seminales que, sin transición semántica alguna, se aplican a las especies consideradas modales, que no modelos. El problema, en su moderna encarnación genómica, es tan antiguo como el conflicto decimonónico entre naturalistas y experimentalistas. Su resolución, en cambio, se aleja de la no menos añeja dicotomía positivista para adentrarse en el terreno resbaladizo de los estudios sobre la complejidad.

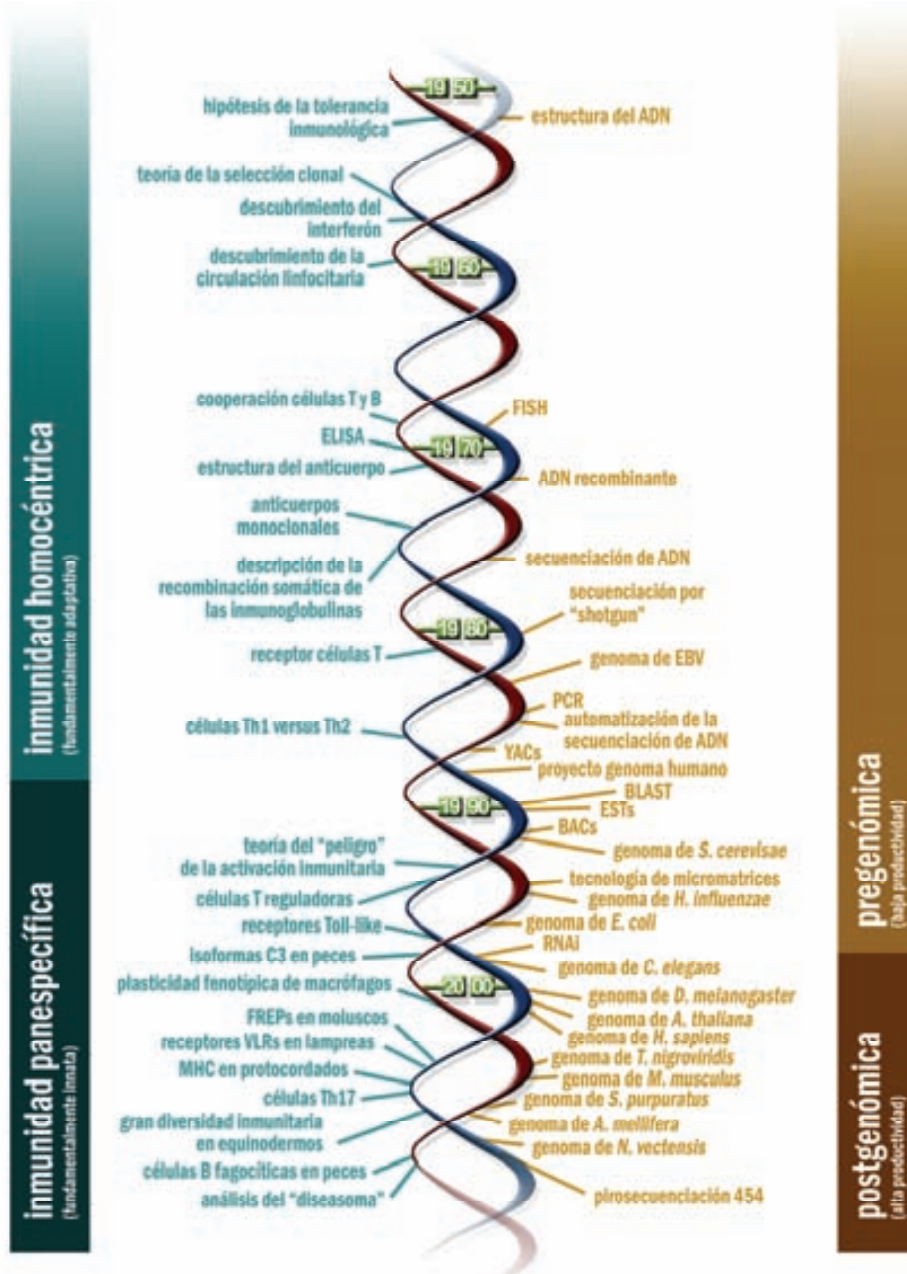
La descripción cronológica de la investigación inmunitaria (FIGURA 1) nos permite definir el sesgo filogenómico actual. El naturalismo holista de Metchnikoff y otros precursores de la inmunología, inspirado en la descripción de la excelencia natural que tan bien destila la icónica *Kunstformen der Natur* (1899) de Haeckel, pero construido sobre sólidas bases experimentales, dio paso a mediados del siglo pasado a una arrolladora revolución molecular que sentó las bases de un reduccionismo defendido a ultranza, ajeno a la concepción gaussiana del devenir ecológico. La reubicación neodarwinista, y su expansión a las ciencias de la salud en áreas antes vedadas a la especulación evolucionista fundamentada, como la evolución del cáncer o de la inmunidad innata, condujo a la redefinición de la, por otra parte necesaria, acotación de las condiciones experimentales, y por ende, del nivel de análisis biológico a escoger, imprescindibles para el estudio de las vías transcripcionales de expresión genética o la fenotipia celular. En la actualidad, tras el tsunami de la experimentación genómica, de la *reductio* experimental y epistemológica inicial quedan solamente los intentos de explicar el fenómeno como un desgarrado *ad absurdum* de componentes (in)conexos.

Los problemas de la biología molecular, y por ende, de la inmunología comparada, son ahora la escalabilidad, la complejidad y, especialmente, la diversidad genómicas dentro y entre las especies. O lo que es lo mismo:

- (a) La acotación formal y funcional de la *conectividad genética y/o transcriptómica libre de escala*, no gaussiana, esto es, fuertemente dependiente de la expresión normalizada o intempestiva de unos pocos genes o conjuntos de genes. La existencia de un selecto y minoritario conjunto de nodos favorecidos por un

número exorbitante de conexiones, en detrimento de la limitada conectividad de la mayoría constituye una característica compartida por redes transcriptómicas, bioquímicas e incluso sociales [1, 2].

FIGURA 1. EVENTOS DESTACADOS EN LA EXPLORACIÓN GENÓMICA E INMUNITARIA



- (b) El *cribado modular del tránsito de información (gen)ómica*. La complejidad de un sistema vivo a cualquier escala se define a partir de su contenido informativo (redundancia), estructural, relacional (conectividad) y particulado (asociación de componentes celulares, tisulares, etc.). La fragmentación modular de los actores principales (genes, ARNm, proteínas, orgánulos, tejidos, órganos) en grupos funcionales interconectados (genoma, ORFeoma, transcriptoma, “espliceosoma”, proteoma, proteosoma, glucoma, lipidoma, metaboloma, interactoma) parcela y reduce el análisis a un grupo selecto de componentes principales. La holística del proceso reside en la escala de la red de interacciones “ómicas”: la moderna biología de sistemas pretende diseccionar el interactoma, o conjunto de interacciones moleculares presentes en el organismo [3, 4] tanto como la ecotoxicología y la epidemiología confían en describir el exposoma, o colección de insultos ambientales que recibe un organismo [5].
- (c) El *parentesco de las redes reguladoras y directores genéticos del comportamiento celular y fisiológico*. La imprescindible interpretación filogenómica de un fenotipo arrastra, sin embargo, un sesgo igualmente necesario, en virtud de la inevitable incognoscibilidad histórica (evolutiva), dependiente de la imperfección del registro fósil morfológico y molecular, y de la voluntaria selección económica (comercial) y experimental (acomodaticia) de las especies a analizar. Todo ello es especialmente importante en los estudios inmunogenómicos.

Desde esta perspectiva, el fenoma, o conjunto de fenotipos expresados de un organismo o sus variedades mutantes, sigue su trayectoria vital, ontogénica e histórica, enfrentado más que nunca a la influencia dual y complementaria del medio externo (proximal, social, ecológico, sistémico) e interno (genómico, transcriptómico, proteómico y metabolómico). Análogamente, la formulación clásica del inmunofenoma se ha venido redefiniendo en los últimos años desde una perspectiva modular y molecular que no rehúye, sin embargo, la conectividad historicista como telón de fondo conceptual para analizar la relación hospedador-patógeno.

Ordalías genéticas

Lejos de considerar el genoma como una caja negra de interacciones, la aproximación holística actual, fruto del maridaje entre las ciencias de la vida y la computación, aborda el estudio combinado de la causalidad próxima (genética-fenotípica) y última (evolutiva) de la fisiología sistémica, a costa de una artificiosa compartimentalización de módulos funcionales (v.g. transcriptoma, proteoma, inmunoma) producto de las limitaciones en el tratamiento conceptual (biológico) y práctico (cuantía y calidad de los datos obtenidos) de la información experimental [6]. Prueba de ello es la aplicabilidad del índice de entropía de Shannon, ampliamente utilizado en el análisis de proteínas y secuencias

nucleotídicas [7, 8], al ámbito de la inmunogenómica comparada. La reducción de la incertidumbre asociada a todo intercambio informativo entre los componentes de un sistema resulta especialmente problemática en el caso de la respuesta inmunitaria, proclive a definirse como una ley de los grandes números tanto por el número de componentes celulares y humorales implicados como por la complejidad de su activación jerárquica frente al repertorio de determinantes antigénicos: de los 3 Gigabytes de información que el genoma humano alberga a una densidad aproximada de 10^{21} bit/cm³, no menos del 10% regulan una respuesta inmunitaria que dedica un promedio de 10^{12} fenotipos celulares la tarea de reconocer, gracias a los procesos complementarios de tolerancia inmunológica y selección clonal, un universo potencial de más de 10^{15} antígenos. Tal vez por ello el análisis reciente de más de 20 poblaciones celulares inmunitarias humanas del proyecto conjunto IRIS Genetech-Joslin ImmGen [9] subraya una “preferencia” para expresarse en células inmunitarias del 8.8% de los 19.054 genes estudiados, aunque del 67% de genes expresados en las diversas poblaciones celulares, únicamente el 9.5% son exclusivos de un único tipo celular.

Incluso subestimándolos, estos y otros resultados sugieren que los perfiles de expresión genética inmunitaria carecen a menudo de una especificidad funcional definida, incluyen un considerable solapamiento funcional, originan comportamientos fenotípicos sumamente plásticos y describen un paisaje transcriptómico caracterizado por (a) una actividad generalizada de amplio espectro y escasa especificidad que confía en la *regulación local*, ya sea *extrínseca*, mediante redes celulares de comunicación causales o *intrínseca*, debida a eventos aleatorios de activación genética característicos de los niveles de ARNm [10], y (b) una diferenciación celular altamente específica (v.g. utilizando la nomenclatura CD al uso, en modo alguno específica de un único tipo celular) producto de una *minoría de perfiles transcriptómicos* especializados [11]. La arquitectura funcional inmunitaria se debe, por tanto, a un programa de investigación inmunómico que evalúe la evolución, escalabilidad y dimensionalidad de las redes transcripcionales y reguladoras de la dinámica inmunitaria considerando diversos requerimientos [12-14]:

- (1) *Elección del modelo experimental en función de su posición e importancia filogenética.* Las consideraciones de índole práctica (facilidad de cría y manipulación en condiciones controladas) y económica (importancia comercial de la especie), aunque de extrema importancia y a menudo motor de la experimentación básica, carecen del enfoque filogenómico que requiere un sistema complejo de regulación homeostática.
- (2) *Descifrado de la información contenida en el genoma desde una perspectiva comparada,* evaluando semejanzas interespecíficas de la interacción genotipo-fenotipo (local y poblacional) que definan patrones comunes de respuesta inmunitaria.
- (3) *Desarrollo de herramientas de integración, visualización y exploración de datos*

complejos, que permitan abordar los problemas de *dimensionalidad* (multiplicidad de datos de diferente contenido informativo) y *escalabilidad* (multiplicidad de datos en diferentes escalas temporales y espaciales) del análisis genómico, para la integración coherente de diferentes resultados experimentales derivados de metodologías diversas. Deben consolidarse las bases de datos que garanticen la descripción contextual de datos multidimensionales complejos (metadatos) en función de su *semántica* o significado (ontologías) y su *sintáctica* o expresión formal (estandarización) para su volcado e interpretación común.

- (4) *Descripción de las redes reguladoras y la coexpresión de grupos de genes implicados en la respuesta inmunitaria* mediante el análisis jerárquico de identidades transcriptómicas a nivel molecular (proteómica) y sistémico (e.g. estados patológicos *vs.* normales).
- (5) *Elaboración de un modelo conceptual teórico de la función inmunitaria* que aúne las definiciones operativas clásicas (teorías celular y humoral, tolerancia inmunológica, selección clonal, recombinación somática, modelos Th1/2/17 y Treg, regulación citoplasmática *vs.* sistémica) con el trasfondo evolutivo (origen, diversificación y diversidad filogenética de la respuesta inmunitaria, universalidad y adaptación de los receptores Toll, NOD y TREM) y funcional (promiscuidad e integración reguladora del sistema inmunitario con la respuesta endocrina y nerviosa). El estudio de la inmunidad en los diversos filos animales desde el punto de vista práctico (invertebrados *vs.* vertebrados) y factual (protostomados *vs.* deuterostomados) exige a su vez: (a) una definición precisa de los componentes de la respuesta inmunitaria (complejidad del sistema) y la significación evolutiva de cada tipo de respuesta (causalidad del sistema), y (b) la integración en un continuo coherente de la imprecisa separación entre inmunidad innata o germinal y adaptativa o específica.
- (6) *Integración cohesiva de las expectativas teóricas (5) y metodológicas (3) y (4)* para desarrollar el análisis computacional y estadístico de los mapas de redes estáticas de expresión genética, para *dinamizar* las redes genéticas relacionales a distintas escalas fisiológicas, y *reducir* la dimensionalidad informativa de los modelos, identificando los principios subyacentes de los modelos conceptuales teóricos.

Lamentablemente, los costes metodológicos e infraestructurales de la secuenciación genómica restringe su aplicación a un selecto número de especies [15] escogidas por su interés clínico (e.g. *Mus*, *Rattus*, *Canis*, *Anopheles*, numerosos microorganismos, patógenos, parásitos o simbioses), parentesco antropocéntrico (*Pan*), adecuación al laboratorio (e.g. *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Tribolium*, *Apis*, *Danio*) e interés comercial. Es por ello que, en el ámbito de la acuicultura y el estudio de las patologías de vertebrados e invertebrados acuáticos, resulta legítimo tanto el uso de modelos de análisis empírico

clásico (inductivos de abajo a arriba) basados en un número reducido de genes y constricciones experimentales como la utilización de un marco conceptual hipotético (y por tanto falsable) derivado del análisis estadístico asociado al ingente flujo de datos típico de las micromatrices genéticas y otras metodologías de procesamiento y análisis masivo de datos. La distinción entre experimentación guiada por hipótesis (constructiva/inductiva) y su contrapartida confirmatoria/clasificatoria (deconstructiva) resulta crucial en aquellas especies de limitada resolución genómica como las que nos ocupan en este trabajo de investigación.

Filogenómica inmunitaria en la acuicultura

Más de cien años separan la descripción naturalista de la teoría celular de la inmunidad, formulada por Ilya Metchnikoff (1891) a partir de larvas del asteroideo *Bipinnaria*, de la secuenciación completa del genoma de un pariente cercano, el equinoideo *Strongylocentrotus purpuratus* [16], un habitual de la maricultura mundial y componente clave en la ecología marina subtidal. La utilidad como especie modelo de un deuterostomado basal como el descrito radica no sólo en su privilegiada posición filogenética como invertebrado *rara avis* emparentado embriológicamente con los vertebrados, sino también por su particular ecofisiología. Algunas características de su ciclo vital (bifasia íntegramente acuática, longevidad y relaciones simbióticas) le asemejan a otros invertebrados acuáticos emparentados con el linaje vertebrado cuyo inmunoma se ha investigado parcialmente, como los urocordados coloniales *Botryllus schlosseri* y *Ciona intestinalis* y el cefalocordado *Branchiostoma floridae* (véase el apartado *El invertebrado modal*). El concepto de “invertebrado”, no obstante, se utiliza aquí y en general de manera imprecisa para definir un trazado complejo de trayectorias evolutivas dispares seguidas por la práctica totalidad de los poco más de 30 filos descritos, obedeciendo a un tempo paleogenómico exclusivo de cada grupo de organismos. La tan a menudo convulsa redefinición filogenética de los grandes filos no excluye, sin embargo, lugares comunes imprescindibles para una correcta definición inmunitaria que interesa, en virtud de la conectividad de las redes tróficas y patogénicas, por igual a vertebrados e invertebrados:

- (1) todos los grandes linajes animales (Protostomados, Deuterostomados, Ecdysozoos y Lophotrochozoos) incluyen una mayoría de grupos cuyo desarrollo se produce total o parcialmente en un medio acuático con elevada carga bacteriana [17] y condiciones micro y macrobióticas altamente variables.
- (2) El ciclo vital de la mayoría de los invertebrados acuáticos incluye complejas relaciones simbióticas, parasitarias y otras variantes de comensalismo trófico, formas coloniales o solitarias, libres o sésiles, pelágicas o bentónicas y ciclos multifásicos en los que el defensoma madura o se modifica a lo largo de la ontogenia. Aunque los casos de quimerismo o mosaicismo son más comunes en especies coloniales, la reactividad a los aloinjertos es un fenómeno generalizado

incluso en grupos, como los hidroides, que carecen de un sistema de comunicación defensiva estructurado [18].

- (3) La inmunidad de los grupos de invertebrados acuáticos estudiados se define por: (a) mecanismos *innatos* (inespecíficos) de reconocimiento antigénico de amplio espectro comunes a todos los linajes animales y (b) un extenso repertorio de mecanismos combinatorios *específicos* dirigidos a aumentar la variación de los receptores encargados de detectar patrones moleculares ajenos al organismo y (c) la presencia de componentes activadores, inhibidores y reguladores homólogos a los presentes en la inmunidad adaptativa de los vertebrados [19, 20].
- (4) Los vertebrados gnatostomados mantienen un inmunoma común cuya unidad funcional mínima incluye mecanismos de reconocimiento antigénico basados en la diversidad de receptores celulares (TCR, BCR), y humores (superfamilia Ig), constructos de presentación antigénica (MHC-I/II) y la batería genética (genes RAG1/RAG2 y AID) asociada a la recombinación de los segmentos génicos variables (V), diversos (D) y de unión (J) de los receptores de unión al antígeno en los receptores TCR y BCR. Las principales diferencias filogenéticas entre las distintas aproximaciones a la inmunidad vertebrada radican en: (a) la estructuración genómica de los componentes y (b) la presencia y grado de compartimentalización/especialización de los órganos primarios y secundarios implicados en la maduración, diferenciación y proliferación de la respuesta celular [21, 22].
- (5) Los vertebrados basales agnatos (lampreas y mixines) comparten la mayoría de los factores de transcripción y transducción de la información inmunitaria involucrados en el desarrollo fenotípico de los linajes celulares descritos (entre otros, IKAROS, GATA, BACH2, vías de señalización NF- κ B y STAT, factores de comunicación IL-8, IL-17). Aunque carecen del mecanismo recombinatorio gnatostomado descrito en (4), utilizan un mecanismo alternativo para la generación de diversidad inmunitaria basado en el ensamblaje combinatorio de módulos genéticos ricos en leucinas (LRR) capaces de diversificar el repertorio de receptores linfocitarios (VLR) e igualar la potencial de reconocimiento antigénico de la inmunidad adaptativa presente en el resto de vertebrados [23].

La infructuosa búsqueda de la fuente de diversidad inmunitaria típica de gnatostomados en la lamprea desarrollada a lo largo de los últimos decenios, y la feliz resolución alternativa derivada de su minado genómico [23] ejemplifica no sólo la potencia del análisis inmunómico comparado, sino también su utilidad como herramienta de diagnóstico y tratamiento efectivo de patologías. Es recomendable, por tanto, el abandono de la dicotomía germinal (innatismo defensivo) *vs.* somática (adaptabilidad recombinatorial) en los estudios inmunitarios, en favor de una visión jerárquica e integrada de los mecanismos *convencionales* y *alternativos* de reconocimiento antigénico

que tenga en cuenta la diversidad, en sentido funcional y comparado, de la respuesta inmunitaria a lo largo de la filogenia, especialmente en aquellas áreas de conocimiento, como la maricultura y piscicultura, proclives a la evaluación y prognosis de la disfunción inmune. Valga como ejemplo un resumen somero de dos modelos seminales en el análisis genómico comparado de la intensidad de la respuesta inmunitaria.

El invertebrado modal

El inmunoma de *S. purpuratus* alberga una inusitada diversidad de receptores de reconocimiento (PRRs) de patrones moleculares característicos de patógenos (PAMPs) integrados en un defensoma de amplio espectro extremadamente diversificado [24], que incluye no menos de 222 genes que codifican receptores Toll-like (TLR), un conjunto de 203 proteínas NACHT y proteínas con motivos repetitivos de leucina (NLR) similares a los más de 20 receptores PAMP citoplasmáticos NOD/NALP descritos en los vertebrados [25], y 218 modelos genéticos que codifican múltiples genes SRCR implicados en el reconocimiento inmunitario. A esta extraordinaria expansión del potencial de reconocimiento tipificado en las reacciones inmunitarias innatas contribuye la expresión de numerosos genes implicados en la producción de proteínas antimicrobianas (lectinas de tipo C, galectinas), estimulados por la presencia de LPS y otros derivados bacterianos [24]. El sistema del complemento de *S. purpuratus*, asociado a la considerada vía primitiva (alternativa) de opsonización y lisis celular [26] y formado por componentes Sp-C3/Sp-C3-2 y Sp-Bf homólogos de los genes C3/4/5 y Bf vertebrados, resulta ser sorprendentemente limitado, lo que contrasta con la diversidad de isoformas de C3 exclusivas de algunas especies de teleosteos [27]. *Strongylocentrotus* carece de un sistema de reconocimiento antigénico homólogo al complejo MHC vertebrado, del que únicamente se reconocen modelos similares en algunos protocordados: en el caso de tunicado colonial *Botryllus schlosseri*, su organización modular en fase adulta le expone a un ciclo complejo de reconocimiento, anastomosis tisular y quimerismo y parasitismo ocasionales con otros miembros (zooides) de la colonia, controlado gracias a la expresión de un haplotipo altamente polimórfico de múltiples alelos codominantes, el locus de fusión/histocompatibilidad (Fu/HC), sin homología con el MHC vertebrado, aunque con algunas similitudes estructurales, como la presencia de numerosos dominios Ig extracelulares [28].

Hasta la fecha, el resto de protocordados estudiados (*Ciona intestinalis*, *Branchiostoma floridae*) también carecen de un sistema de histocompatibilidad semejante al modelo MHC [29, 30] y receptores de respuesta celular (TCR), lo que parece restringir la eclosión del aloreconocimiento combinatorio mediado por la expresión de genes RAG al linaje gnatostomado. Sin embargo, tanto el genoma de *S. purpuratus* como el de *B. floridae* contienen clusters RAG-like organizados de manera similar al modelo RAG1/2 vertebrado [24, 29], acompañados de una plétora de mecanismos genéticos y somáticos de diversificación alternativa de los receptores de reconocimiento inmunitario presentes

también en otros invertebrados, protovertebrados y vertebrados agnatos [20, 21, 31]. No obstante, en la mayoría de invertebrados las estrategias de diagnóstico inmunómico y evaluación del estado de salud se resienten de

- (1) lagunas en el conocimiento de la función inmunitaria y hematopoyética debido al reducido número de modelos experimentales invertebrados y el estudio excesivamente centrado en el calco del análisis de la actividad biológica y caracterización bioquímica de efectores inmunológicos de vertebrados de inmunoma conocido, descuidando al mismo tiempo la evaluación funcional de la respuesta inmunitaria,
- (2) disparidad en el *bauplan*, organización interna y fisiológica y ciclo vital de cada especie, que dificulta un estudio integrado del sistema inmunitario y sus patologías,
- (3) los escasos cultivos primarios disponibles de hemocitos, considerados los principales efectores celulares de la respuesta inmunitaria, y la falta de líneas celulares que permitan un estudio detallado de las relaciones parasíticas y patologías en condiciones salvajes y de cultivo.

El pez oncogénico

Las aproximadamente 23.600 especies de teleósteos actuales (FIGURA 2), que dan cuenta de la mitad de las especies de vertebrados, han experimentado una radiación evolutiva sin precedentes desde su aparición hace 230 millones de años, probablemente como consecuencia de al menos dos episodios de duplicación genómica y diversos eventos independientes de duplicación genética ocurridos a lo largo de la expansión del grupo [32]. La poliploidía resultante, común a numerosos teleósteos, explica no sólo la radiación de algunas especies como los Salmonidae y Catostomidae [33], sino también la diversidad funcional y estructural en la expresión y tasa de sustitución genéticas que responden, con la abundancia de elementos móviles transponibles en los teleósteos [34] de la “plasticidad” inmunómica atribuida al grupo. La diversidad se constituye así en terreno abonado para la inmunología comparada, pero el análisis de su significación funcional exige un razonamiento filogenético *a priori* para la elección del modelo experimental y un considerable esfuerzo metodológico en el procesado de los datos.

Un indicador fidedigno de la persistencia y validez de un modelo experimental es la progresiva sustitución de su identificador binomial linneano por el nombre vernacular. El pez cebra (*Danio rerio*) comparte con el clásico ratón de laboratorio la idoneidad como modelo debido a su reducido tamaño, facilidad de cría controlada, fecundidad, breve tiempo de generación, producción de mutantes y líneas transgénicas y un conocimiento detallado del genoma [35]. El parentesco lejano con la especie humana queda compensado por una característica única: la transparencia de las fases juveniles que

permite el estudio exhaustivo por marcaje en individuos transgénicos de procesos oncogénicos y la regulación ontogénica y funcional de la hematopoyesis y organogénesis [36, 37]. La traslación al pez cebra de las metodologías genómicas desarrolladas por y para el estudio funcional de la inmunidad en mamíferos revela, una vez secuenciado poco más del 70% de sus aproximadamente 1.7 Gb, un defensoma construido siguiendo el molde recombinatorial gnatostomado (véase http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/ y la discusión precedente).

La expresión temprana de factores de transcripción típicos del desarrollo linfocitario (IKAROS, GATA, etc.) y la recombinación de segmentos V(D)J durante el desarrollo larvario de *D. rerio* preceden a la maduración del sistema inmunitario durante la transición larva/juvenil [38], acompañada de la expresión de genes RAG1 en el principal órgano hematopoyético de los peces, el riñón cefálico, la regionalización funcional del timo y el bazo, la proliferación de linajes linfocitarios [22] y la expresión de varios isotipos de la cadena H de las Ig, IgM e IgZ [39], diversificados bajo la forma de IgD e IgT en algunas especies de teleósteos [40-43] aunque no en otras [44]. La transparencia del pez cebra ha permitido el estudio in vivo de la ontogenia de los linfocitos T así como el desarrollo de linfomas mediante el uso de marcadores fluorescentes expresados bajo el control de promotores específicos de estas células [45]. Este modelo ofrece unas ventajas inigualables para la identificación a gran escala tanto de drogas como de genes que afecten a la respuesta inmunitaria y al desarrollo del cáncer [46].

Aunque con variaciones, referidas al número de componentes y no tanto a la calidad de la respuesta inmune, el genoma de *Danio rerio* incluye una respuesta antiviral orquestada por la expresión de interferones de tipo I y gamma y las vías de transducción JAK-STAT asociadas a la respuesta celular de los linfocitos T colaboradores (Th) y citotóxicos [47]. Los complejos genéticos determinantes de los receptores de las células citolíticas (NK) y la familia de receptores intracelulares de motivos antigénicos NOD (NLR) dedicadas a la erradicación de patógenos intracelulares también están presentes en el genoma del pez cebra y en otras especies [48, 49], los primeros bajo la forma de grupos multigénicos NITR que codifican dominios Ig y lectinas de tipo C [48] y receptores *illrs* [50] cuyos motivos reguladores apuntan a la conservación, en los peces, del modelo inhibidor/activador de la respuesta intracelular mediada por células NK [51]. La interacción entre los sensores intracelulares NLR y los receptores TLR de reconocimiento de PAMPs (fundamentalmente lipopéptidos, LPS, flagelina, ARNdc y ácidos nucleicos) completa la respuesta sinérgica innata del pez cebra, que cuenta con homólogos de los receptores TLR2/3/5/7/9, dos miembros similares a TLR8, cinco miembros estrechamente emparentados con el TLR21 de Fugu y dos receptores homólogos al TLR4 [52], cuya presencia, sin embargo, parece ser variable en las distintas especies de peces [53]. Asimismo, se han descrito en el pez cebra ortólogos de la familia de receptores TREM implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria y la diferenciación funcional de células mieloides [54].

El modelo emergente de la respuesta inmunitaria de *D. rerio*, y por extensión, la de la mayoría de gnatostomados acuáticos, se construye por tanto a partir de la *interacción* entre un amplio repertorio somático combinatorio de receptores citoplasmáticos, de membrana y sistémicos y un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones ajenos al organismo heredados por la vía germinal [55-58]. La *información* del estado de homeostasis interna resultante conduce a la *integración de las vías de transducción y regulación*, dependiente de las condiciones del medio, las constricciones de la especie y la historia coevolutiva entre patógeno, hospedador y microbiota asociada, de ambos tipos de señales. En este sentido, estudios recientes con ejemplares de *Danio rerio* gnotobióticos, expuestos a un microbioma característico de la flora intestinal de teleósteos [59], demuestran la conservación de la respuesta transcripcional típica de mamíferos frente a la agresión patogénica. La aproximación “infectogenómica” de las patologías microbianas [60] se beneficia, así, de la utilización de un teleósteo para el análisis inmunómico del remodelado mutuo de los genomas de hospedador y parásito.

Infectogenómica y defensoma en la acuicultura

La tendencia actual en el estudio de los patrones de expresión génica involucrados en la respuesta inmunitaria opta por un meta-análisis jerárquico de complejidad creciente que evalúa la conectividad funcional entre:

- (1) *módulos reguladores intrínsecos* integrados por grupos de genes de funcionalidad diversa, definidos *ad hoc* por el propio conjunto de datos experimentales [61],
- (2) conjuntos de genes sometidos a condiciones experimentales clásicas (v.g. control *versus* tratamiento) o variaciones ontogénicas y agrupados a partir de su *identidad transcripcional* en categorías definidas de manera laxa, lo que permite una considerable maleabilidad analítica pero dificulta su anotación precisa [62],
- (3) *redes de coexpresión y regulación transcriptómica* que permiten la elucidación relacional y la adscripción en grupos funcionales y/o reguladores de la expresión genética intra e interespecífica a partir de grandes conjuntos de datos [63]. La conservación de correlaciones genéticas entre especies resulta así indicadora de la importancia de una vía transcripcional o reguladora de la expresión genética y posibilita un enfoque filogenético de la evolución de la respuesta fisiológica [64]

En los vertebrados, a la panoplia de metodologías habituales en la caracterización funcional de la expresión genómica (FIGURA 2) y el progreso en la problemática estandarización del análisis estadístico y diseño experimental de las plataformas de micromatriz [13, 65] se le ha sumado recientemente un enfoque computacional integrado que combina el minado de bases de datos anotadas y la producción de micromatrices destinados a la medición del perfil proteómico de anticuerpos para

FIGURA 2. ESTRATEGIAS HABITUALES EN EL ANÁLISIS INMUNÓMICO DE LAS ESPECIES ACUÍCOLAS DE CULTIVO HABITUAL.

La evaluación y adscripción funcional de genes implicados en la respuesta inmunitaria constituye el principal paso previo para la descripción funcional, habitualmente mediante la construcción de plataformas de micromatrices específicas (inmunitarias) o generalistas (metabólicas, comportamentales, etc.), de la expresión genética diferencial en distintos tejidos y órganos, una vez sometido el animal a condiciones experimentales de infección y agresión inmunitaria, puntuales o dispuestas a lo largo de su desarrollo ontogénico. Para su análisis, los resultados, susceptibles de ser utilizados en estudios a gran escala de cartografía genómica comparativa, deben estructurarse formalmente para su inclusión en las bases de datos y clasificarse para su análisis categorizado en conjuntos relacionales (ontologías) de similitud funcional.

cartografiar los epítomos procesados por el MHC y los linfocitos B y T mediante ELISAs (ELISPOT) de alto nivel [66-68]. La metodología inmunómica no elude, si embargo los requerimientos computacionales del análisis estadístico de los datos, condicionados por la complejidad recombinacional, somática y germinal del diseño inmunitario.

De echo, las redes de expresión génica de las poblaciones celulares inmunitarias consideradas a priori funcionalmente dispares, se revelan como una agrupación difusa de linajes solapados [11] producto de la elevada plasticidad fenotípica tanto de poblaciones celulares inmaduras como diferenciadas [69].

En el ámbito de la acuicultura, y a la espera de la compleción de los proyectos de secuenciación genómica actuales, el refinamiento de la metodología inmunómica se restringe a un reducido número de especies (FIGURA 3) y aborda la adscripción de funcionalidad genética mediante proyectos a gran escala de secuenciación de ESTs en condiciones de infección, salubridad comprometida o variación ontogénica.

A todo ello se añaden la búsqueda y comparación de homologías en las bases de datos y la elucidación de las diferencias tisulares y celulares en la expresión de genes relevantes en la respuesta inmunitaria mediante la construcción de micromatrices de ADNc elaborados a partir de secuencias EST y librerías obtenidas por SSH y, en menor medida, al desarrollo de mapas genéticos [65, 70-79].

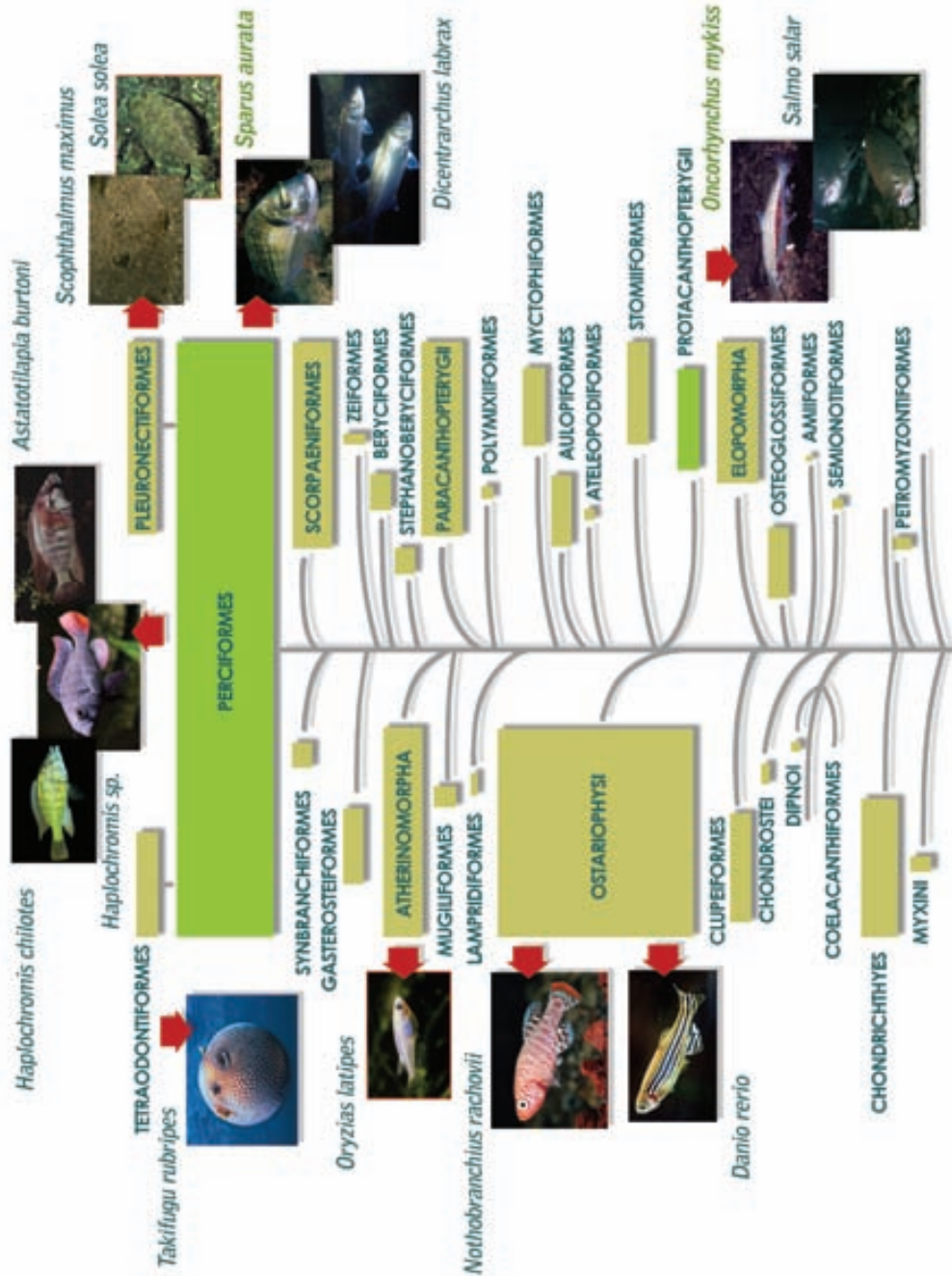
En la mayoría de **invertebrados** cultivados, los hemocitos constituyen la principal población, funcional y estructuralmente heterogénea, de la respuesta defensiva humoral y celular [80]. En las especies de bivalvos filtradores cultivados (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *Mytilus* spp., *Argopecten irradians*), el análisis inmunómico tisular y hemocitario ecotoxicológico mediante plataformas de micromatriz específicas destaca la expresión génica diferencial de proteínas antimicrobianas (AMP), de adhesión, reconocimiento antigénico, opsonización y encapsulación, proteasas, inhibidores de las proteasas, miembros de las proteínas HSP, diversas familias de metalotioneínas y componentes homólogos de la vía de señalización kB retículoendotelial característica de mamíferos [81-85].

En condiciones de agresión patogénica e infección, el análisis de ESTs de las librerías de ADNc derivadas de hemocitos, hepatopáncreas y branquias en algunos crustáceos penaeidos de interés comercial (*Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*, *L. setiferus*, *Penaeus monodon*, y *P. japonicus*) revela una respuesta similar, basada en la activación de los sistemas de la profenoloxidasas (pro-PO), lectinas/aglutininas, TLR y AMP común a la mayoría de invertebrados y una considerable representación de genes implicados en la respuesta inmunitaria marcada, en este caso por la expresión de factores de reconocimiento ALFPM3 de LPS, numerosas AMP (penaedinas) implicadas en procesos de eliminación, opsonización y fagocitosis y componentes de las vías reguladoras NFkB y antiviral mediada por ARNi [79, 86-89].

La inmunómica de los **teleósteos** de interés comercial se asume, por similitud, estructurada según el modelo descrito para *Danio rerio*. El reto de los escasos proyectos de secuenciación genómica iniciados en la pasada década radica en la *definición funcional de la intensidad* y componentes de la respuesta inmunitaria para cada especie, ya sea en un escenario evo-devo, sujeto a los problemas analíticos del agitado historial genómico de los peces, o en el ámbito de la salud y susceptibilidad a patologías.

FIGURA 3. ESPECIES DE TELEOSTEOS DE INTERÉS GENÓMICO.

Árbol familiar de algunas de las especies de peces que cuentan con proyectos genómicos o catálogos de ESTs. La ordenación jerárquica sigue de manera aproximada el surgimiento de los grupos representados en la figura, pero no debe asumirse como una filogenia anotada. El tamaño de los cuadros representa el número aproximado de especies descritas o estimadas hasta la fecha (modificado de Nelson, *Fishes of the World*, 1994).



Las todavía escasas plataformas de micromatriz construidas *ad hoc* a partir de ESTs, para la evaluación de la expresión genética diferencial en teleósteos sometidos a condiciones de ecotoxicidad y/o carga patogénica [65, 72, 73, 90-93] confirman la diversidad del repertorio de receptores de reconocimiento antigénico del grupo, el menoscabo de la función inmune adaptativa debida a la ausencia, limitaciones o peculiaridades ontogénicas de componentes celulares, humorales u organográficos en algunas especies [94-96], y la presencia de múltiples isoformas y variantes de mediadores y citoquinas de comunicación y activación inmunitaria [56, 58, 97]. En el ámbito de la prognosis y diagnóstico patológico, se han copiado con éxito modelos de inflamación experimental murinos adaptados a la particular organografía inmunitaria de los teleósteos, perfilando la modulación de la respuesta defensiva immunoendocrina frente a epítomos (LPS, beta-glucanos, CpGs) i patógenos de probada eficacia en la estimulación inmunitaria [73, 75-77, 98-100] y confirmando una vez más el peso de la diversidad filogenética en la intensidad de la respuesta inmune. La redefinición de la disfunción inmunitaria en las especies acuícolas cultivadas necesita más que nunca integrarse en un marco conceptual más amplio que incluya las formulaciones recientes de la dinámica y sentido inmunitarios: efectos pleiotrópicos, patrones de daño tisular y regulación de la respuesta innata dependiente del órgano afectado [101-103], en un contexto jerárquico de interacciones interespecíficas que tenga en cuenta el historial genómico de cada especie.

La representación de especies piscícolas en las bases de datos de ESTs sigue claramente una distribución polinomial sesgada (ley de potencias) hacia un grupo de especies selectas (FIGURA 3 y TABLA 1). Así, en lugar de la deseable distribución normalizada, tanto estadística como racionalmente, basada en la ponderación filogeográfica de cada especie, los proyectos de secuenciación dedicados a peces se centran en un heterogéneo ensamblaje de especies de teleósteos ordenados por los ya reiterados criterios de importancia económica, peculiaridades genómicas y usabilidad experimental.

En términos de arquitectura de redes informativas, los recursos genómicos para las especies marinas o dulceacuícolas se describen fácilmente siguiendo la conocida “regla” de Pareto (o de la “larga cola” en su versión socioeconómica más reciente): el 80% de la tierra apropiable la posee el 20% de la población. Una observación que, aplicada al ámbito de la genómica comparativa, significa que en las bases de datos coexisten un puñado de nexos sobresalientes (especie modelo, patógenas o económicamente relevantes) cuya elevada conectividad (unidas a numerosos recursos y aplicaciones bioinformáticas) oscurece un gran número de nodos menores (especies no modelos, a menudo modales, poco infecciosas o poco conocidas) de escaso etiquetado bioinformático. Lo que conduce naturalmente al crecimiento competitivo de bases de datos genómicas unidas a las especies nexo en detrimento de las menos favorecidas. Así, ee 80% de la computación anotada se dedica a poco más del 20% de las especies albergadas en las bases de datos.

TABLA 1. ESTs SECUENCIADOS Y TAMAÑO DEL GENOMA EN ALGUNAS ESPECIES RELEVANTES EN EL ÁMBITO DE LA ACUICULTURA.

Grupo	Especie	Genoma (Mb) ¹	ESTs ²	Proyectos genómicos
Crustáceos				
Penaeidos	<i>Penaeus monodon</i>	2000	7330	http://pmonodon.biotech.or.th/
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	2100	10446	
	<i>Litopenaeus vannamei</i>	2450	7429	http://www.shrimp.ufscar.br/
Nefropípidos	<i>Homarus americanus</i>	4160	12365	http://www.marinegenomics.org
Moluscos				
Portunidos	<i>Callinectes sapidus</i>	2000	10563	http://www.marinegenomics.org
Mytilidos	<i>Mytilus spp.</i>		3986	
Ostreidos	<i>Crassostrea virginica</i>	675	9018	http://www.marinegenomics.org
	<i>Crassostrea gigas</i>	890	4046	http://www.marinegenomics.org
Pectinidos	<i>Argopecten irradians</i>	1170	7057	http://www.mbl.edu/aquaculture/EST/
Teleosteos				
Salmónidos	<i>Salmo salar</i>	3100	430426	http://grasp.mbb.sfu.ca/
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2700	260886	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/
Perciformes	<i>Thunnus thynnus</i>	780	7149	
	<i>Sparus aurata</i>	930	2034	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	765	2356	
	<i>Perca fluviatilis</i>	1190	2226	
	<i>Oreochromis niloticus</i> ³	1100	294	http://hcgs.unh.edu/cichlid/
Pleuronectiformes	<i>Paralichthys olivaceus</i>	695	8803	
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	715	17603	
Gadiformes	<i>Gadus morhua</i>	910	19875	
Cypriniformes	<i>Rutilus rutilus</i>	1270	18470	
	<i>Cyprinus carpio</i>	1860	19265	
Siluriformes	<i>Ictalurus punctatus</i>	980	46294	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/
Condrossteos				
Acipenseriformes	<i>Acipenser transmontanus</i>	4600	2704	

¹Estimaciones del tamaño genómico tomadas de Gregory, T.R. (2007). Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com> y Shiao-Wei Huang, Tze-Tze Liu, Hung-Yu Shu, Keh-Ming Wu, Shih-Feng Tsai, You-Yu Lin, Hon-Tsen Yu (2007) A First Glimpse Into The Genome Of A Marine Shrimp *Penaeus monodon* By Way Of Fosmid End Sequencing. Plant & Animal Genomes XV Conference

² Datos tomados de la base de datos dbEST (rel. 010507) de GenBank. Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM. (1993) dbEST--database for expressed sequence tags. Nat Genet. 4(4):332-3.

³ Aunque únicamente se ha incluido una de las especies de mayor importancia económica, otras especies del diversificado grupo de los cíclidos son objeto de intensa investigación genómica, con más de 63000 ESTs descritos hasta la fecha (<http://hcgs.unh.edu/cichlid/>).

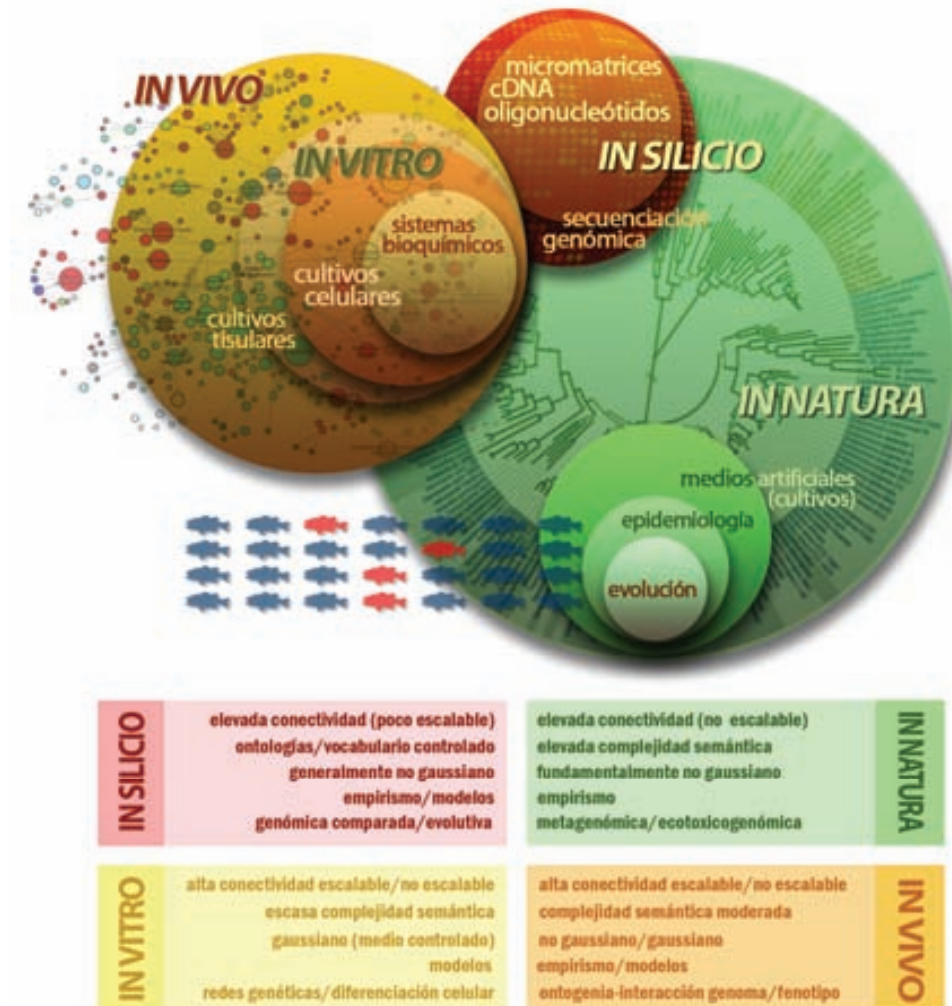
La QWERTYzación del genoma

Es conocida, por extemporánea, la razón de la ineficiente distribución de las letras en el teclado de los modernos ordenadores. En el diseño reformado de Christopher Sholes (1868), la disposición de la primera fila de letras que da origen al nombre del teclado (QWERTY) obedecía a la necesidad de dificultar la mecanografía en una máquina analógica cuyas teclas, una vez presionadas, llevaban al martillo impresor a la página y de vuelta a su posición original más lentamente de lo que permitía la rapidez manual del mecanógrafo. Un diseño más eficiente, acompasado a la rapidez de tecleo del usuario, que utilizara la frecuencia de aparición de las distintas letras en el idioma de escritura como criterio para su ubicación en el teclado (o la ordenación alfabética original ideada por Sholes), originaría un atasco de martillos que impediría la escritura rápida de caracteres impresos que prometía una máquina accesible a todos los bolsillos. La ineficaz (pero rentable para los organizadores de cursos de mecanografía rápida) configuración se extendió, en virtud de la especialización de los profesionales de la mecanografía, a los teclados de las computadoras digitales, aún cuando el bloqueo de martillos perdió todo sentido.

La *qwertyzación* de la maquinaria digital moderna constituye por tanto un carácter vestigial del acervo alfabético a considerar en la evolución artificial de los teclados, de manera análoga a como la librería genómica de todo organismo contiene erratas virales, transposómicas, pseudogenéticas y fragmentaciones de secuencias antiguas incorporadas a lo largo de la evolución natural de los organismos. Llevando la analogía un poco más lejos, la criba tecnológica que supone una micromatriz de ADN acotada (*focused* en su denominación anglosajona), como la expuesta en este y otros trabajos para especies no modelos, no es si no la *qwertyzación*, artificiosa pero operacional y conveniente, en tanto que ordenación ontológica estructurada de genes selectos por su funcionalidad previamente demostrada en organismos de genoma conocido, de un transcrito genómico. La *qwertyzación* transcriptómica de las micromatrices y otros medios de modelado de porciones genómicas difiere, sin embargo, de su contrapartida natural, en la presencia de una fe de erratas anotada en aquellas, que excluye la complejidad de esta, reduciéndola y aumentado, por simplificación de la repetitibilidad funcional, el balance entre señal y ruido en la interpretación transcriptómica.

El análisis in silicio de expresión genética reúne, así, lo mejor de tres mundos (FIGURA 4): la complejidad intratable de la experimentación in natura, la tratabilidad de la evaluación in vitro y la no gaussianidad, esto es, la desviación de la normalidad estadística, terriblemente común en la experimentación in vivo de la reactividad fenomica a un medio cambiante o predecible. Por otro lado, la necesidad de una estructura ordenada (ontología) que atribuye características definidas a componentes y procesos moleculares, restringe su aplicación a la definición precisa en términos de experimentación, elección del modelo experimental y del conjunto transcriptómico a analizar. Todo ello es

FIGURA 4. COMPARACIÓN DE LAS METOLOGÍAS AL USO EN EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA.



Se destacan algunas interacciones y características relevantes entre los análisis in vivo, in vivo, in natura y el modelado in silicio de la expresión genética, en términos de complejidad de las redes moleculares (conectividad) y su definición precisa (complejidad semántica, ontología), expresión genética alejada de la normalidad (no gaussiana), uso del razonamiento analítico (empírico, hipotético) y ejemplo de utilización experimental.

especialmente relevante en las micromatrices acotadas de ADN, y, en menor grado, en la exploración territorial del genoma completo de una especie.

El muestreo a gran escala de la expresión genética mediante técnicas de hibridación en plataformas de micromatriz constituye una herramienta molecular (y popular) para el análisis de la dialéctica genética subyacente al fenoma expresado. El enfoque in silicio

amplía y complementa el análisis tradicional de muestras biológicas *in vivo* e *in vitro* bajo condiciones experimentales diferentes y/o escalas temporales variables, ya sea para evaluar la respuesta inmediata a la carga bacteriana o vírica o la capacidad adaptativa de reacción inmunitaria frente a un medio fluctuante e imprevisible [104]. La circuitería genética identificada mediante el análisis transcriptómico evaluado con micromatrices, permite la construcción ulterior de un “mapa de carreteras” acotado que conecte la fenomenología genómica, bioquímica, fisiológica y, en definitiva, comportamental. La utilización y análisis de micromatrices debe considerarse, por tanto, tanto una estrategia derivativa para la elucidación cuantitativa de la compleja conectividad genética como una estrategia cualitativa *reductiva*, orientada a una descripción libre de escala del perfil transcriptómico celular o tisular.

La valoración completa de los perfiles de expresión globales característicos de una red activa de genes necesita de:

- (a) una descripción concisa, en términos de tasa de expresión y actuación bajo definida del comportamiento transcripcional, esto es, tasa de expresión y comportamiento bajo las condiciones habituales de experimentación clásica reactiva (estimulación/disrupción fisiológica, patología) e inactiva (control) de varios genes no silentes,
- (b) un profundo conocimiento de la naturaleza, intensidad, direccionalidad y dependencia de las interacciones entre los genes comúnmente tildados de habituales (*housekeeping*) y “de lujo” (*luxury*), enfrentados a una situación natural de competición evolutiva. Desentrañar la arquitectura del transcriptoma requiere, por tanto, herramientas técnicas y estadísticas (aún no) bien definidas capaces de lidiar con reconocimientos moleculares de alto nivel. Su interpretación, en cambio, exige el maridaje de tecnologías de gran productividad y aproximaciones conceptuales ad hoc o confirmatorias que contemple el transcriptoma como diálogo de genes, mezcla de expresión y regulación post transcripcional.

Al margen del análisis cuantitativo de los niveles de ARNm característico de la cara pero robusta aproximación abierta a la expresión genética global (muestreo de secuencias mediante *Serial Analysis of Gene Expression*, SAGE or *Massive Parallel Signature Sequencing*, MPSS), decididamente patogenocéntrica, el análisis mediante micromatrices de transcriptomas “focalizados” (esto es, en los que sólo se analiza un numero limitado de secuencias) constituye una alternativa habitual al análisis paralelo de genomas transcritos y/o subconjuntos de (miles de) genes reactivos, reguladores y alostáticos. Utilizando la metodología de resolución de problemas por fuerza bruta característica de las aproximaciones computacionales para la simplificación de datos complejos, la interrogación (hibridación) de oligonucleótidos, productos genómicos o ADNc obtenidos mediante PCR subraya los posibles genes responsables del estado alterado, reactivo o inactivo gracias a un cribado necesariamente heurístico (dado el estado actual de la tecnología de interpretación de datos masivos), corregido mediante inevitables

pruebas de discriminación de la expresión de miles de genes entre y/o dentro de múltiples experimentos o muestras. Sin embargo, el todavía elevado grado de incertidumbre asociado al análisis estadístico de micromatrices no es óbice para aprovechar las ventajas que, para el descubrimiento de genes o funciones genéticas novedosas, ofrece la evaluación de los clones no anotados habituales en matrices de ADNc de especies no modelo, derivados de librerías de ADNc y colecciones de ETSs escasamente caracterizadas. La controversia entre la eficiencia de micromatrices de ADNc u oligonucleótidos no es, por tanto, relevante si de especies pobremente definidas genómicamente se trata. La cuestión es, como tantas otras veces en biología (véanse por ejemplo los múltiples sabores de la definición de especie, o del gen como unidad compacta), coyuntural, y la respuesta, operativa.

Las plataformas de micromatriz actuales, ya sean de ADNc u oligonucleótidos, se configuran siguiendo dos estrategias principales:

- (a) **Cobertura máxima del transcriptoma** de aquellas especies consideradas modelo o nexo en cuanto a su descripción genómica y relevancia en la red transcripcional descrita hasta la fecha.
- (b) **Cobertura acotada del transcriptoma**, selecto en cuanto al número y funcionalidad de los genes interrogados, exclusivo de especies nodales, modales y no modelos, esto es, constituyentes menores de la red transcripcional descrita hasta la fecha, abundantes en número o importancia ecológica pero irritables en condiciones controladas de laboratorio.

Ambas estrategias poseen ventajas e inconvenientes, al igual que entusiastas y detractores [105-109], pero pueden englobarse, en mayor o menor medida en el intento de *qwertyzación* del genoma propio de un momento en el que todavía no es posible la secuenciación económica a gran escala. En general, el formato de micromatriz de ADNc ha dominado los estudios en piscicultura tanto en el análisis de máxima cobertura genómica como en el de acotación transcriptómica, del que este trabajo es una muestra.

***E pluribus unum:* la Ontología como cincel genético**

Pese a su coste, el uso generalizado de las tecnologías de análisis genético de gran productividad, como las plataformas de micromatriz y las secuenciadoras genómicas de alto rendimiento, obedece a la voluntad de analizar módulos (“ómicos”) discretos que permitan manejar cómodamente los problemas derivados de la escalabilidad en las redes de influencia genéticas. Sin embargo, un flujo de datos abundante conlleva una dificultad añadida: la del despiece racional de los nodos relevantes para la interpretación y/o formulación de hipótesis. A diferencia de lo que ocurre en el ámbito del procesado y deconstrucción de la información digital, la relación señal / ruido de los patrones de información genética ostentan, en virtud de su pasado evolutivo, un grado de

redundancia y *qwertyzación* (esto es, preadaptación aparentemente poco funcional de la función genética en virtud de la carga de secuencias parasíticas virales, transposones, pseudogenes y demás componentes del bestiario ribonucleico; véase el apartado *Micromatrices de ADNc: la QWERTYzación del genoma*) informativas poco usual. La mayoría de genes realizan multiplicidad de funciones, en lugares y momentos concretos y pautados del desarrollo ontogénico, lo que, unido a la red de influencias mutuas que dirige la vida social del genoma, convierte la ordalía genética en una pesadilla para la biblioteconomía genómica.

Una de las mejores soluciones al problema, de uso extensible al análisis estadístico de los resultados obtenidos de micromatrices y que también se ha utilizado en este trabajo para la catalogación del transcriptoma alterado, aprovecha una versión tecnificada y tecnofílica de la delimitación metafísica clásica del ser y el devenir. La ontología, o estudio de la existencia de las entidades y de las relaciones y categorías que contribuyen a ella, preocupaba a los griegos casi tanto como a los empiristas ilustrados o a los estudiosos sociales modernos, hasta el punto de extender la Platonificación de formas y esencias al ámbito de la diversidad biológica y sociocultural. Más allá de las serias dificultades y limitaciones de esta aproximación a la definición del continuo biológico, el valor puramente pragmático, operacional, del concepto reside en el moldeado de la metainformación propio de la moderna ciencia computacional. Aquí, la ontología es un medio formal representativo en el que se vertebran las relaciones, anotadas o no, entre un grupo de conceptos y sus propiedades, sitios en un determinado dominio.

En el ámbito de la genómica, la anotación genética se beneficia de la Gene Ontology (GO), uno de los vocabularios controlados y/o anotados más utilizados para describir la función genética, que se ha utilizado en esta tesis para elucidar la funcionalidad de la expresión transcriptómica en experimentos de agresión inmunitaria. Como ocurre con otros modelos de anotación ontológica biológica, como la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG), la anotación genética es costosa no sólo en términos de tiempo dedicado a la definición experimental de genes selectos, sino también al necesario esfuerzo de revisión de la literatura existente sobre cada gen y sus relaciones (TABLA 2). El proyecto GO adscribe un gen a una categoría trina que le asigna una función molecular, compartimento celular o proceso biológico. Así, la definición inicial de la GO para el gen escogido se construye jerárquicamente a partir de la asignación de códigos descriptivos relativos a las categorías mencionadas, de manera que cada término (clase) del conjunto puede asociarse a diversas subclases, en una relación de parentesco que une una o varias clases con uno o varios términos “progenitores” o “descendientes” en una jerarquía de inclusión que, por su promiscuidad (un término puede tener varios progenitores) se define técnicamente como un grafo directo acíclico (FIGURA 5).

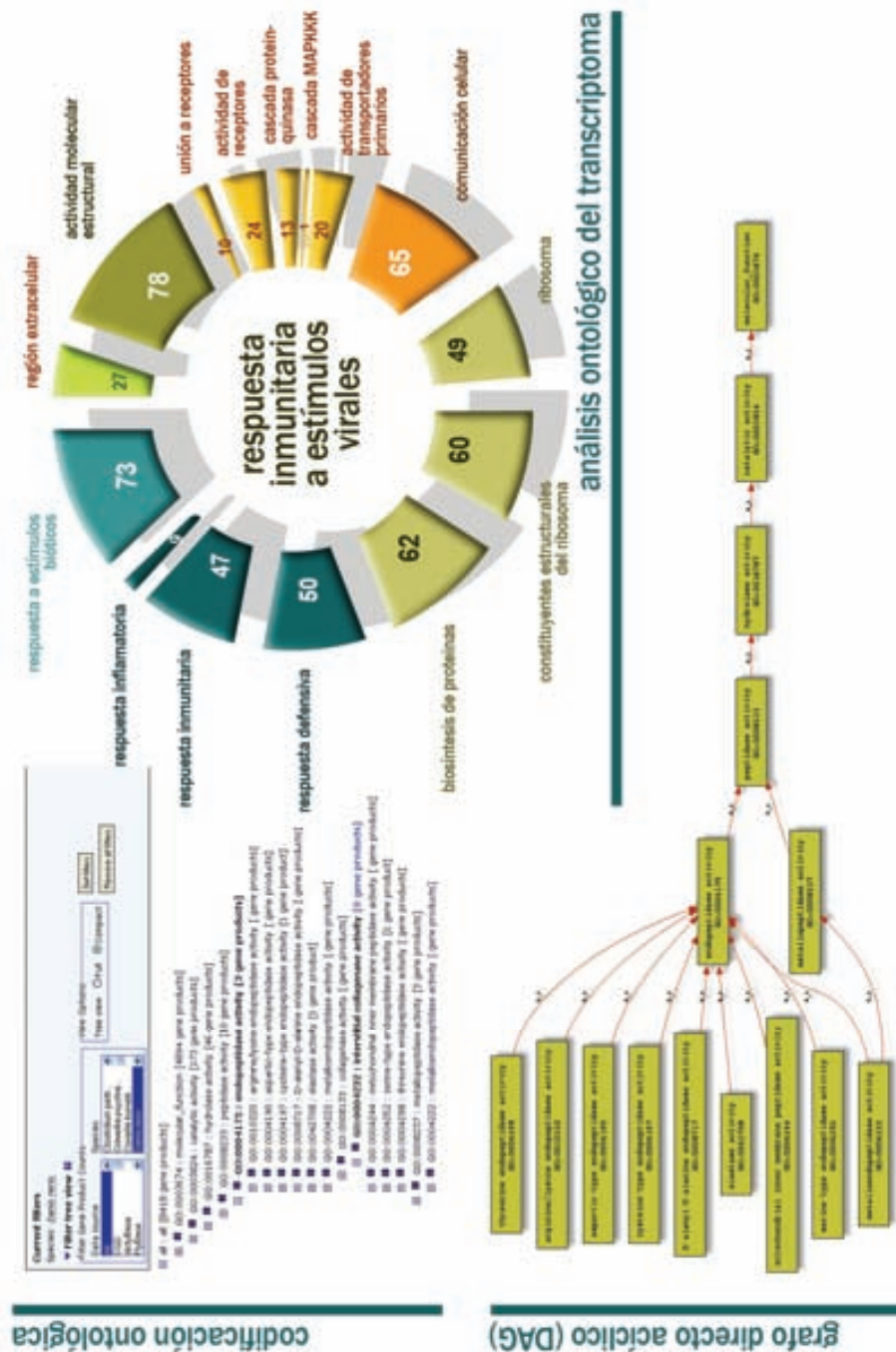
Esta platonificación de la descripción genética, esto es, su delimitación en clases discretas ideales, elude los principales peligros de la reificación gracias a la fundación empírica que sustenta todo intento clasificatorio ontológico en biología: la asignación de códigos a los

genes se lleva a cabo mediante un proceso de no menos de una decena de evidencias justificativas de peso creciente extraídas de investigaciones contrastadas y publicadas sobre los genes de interés. En este trabajo, el análisis ontológico de la expresión genética medida a través de su representación transcriptómica, se ha escogido como medio de evaluación alternativo al análisis de agrupaciones (*clustering*) jerárquicas de genes característico de los primeros estudios detallados de micromatrices de ADN.

TABLA 2. EVIDENCIAS EMPÍRICAS PARA LA ANOTACIÓN ONTOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

Evidencia	Ejemplos	Confianza ¹
Afirmaciones contrastadas de Investigadores		• • • • •
Inferencias de los encargados de la base de datos		• • • • •
Inferencias obtenidas de ensayos directos	Ensayos enzimáticos Reconstrucción in vitro (transcripción) Inmunofluorescencia (componentes celulares) Fraccionamiento celular (componentes celulares) Interacción física/unión a receptores	• • • • •
Inferencias derivadas de fenotipos mutantes	Mutantes genéticos / knockouts Sobreexpresión / expresión ectópica de genes mutantes o salvajes Experimentos anti-sense Experimentación con ARNi Inhibidores específicos de proteínas	• • • • •
Inferencias obtenidas de Interacciones genéticas	Supresores, sintéticos letales Complementación funcional Evaluación de un gen basada en el fenotipo asociado a mutaciones de genes diferentes	• • • • •
Inferencias obtenidas de Interacciones físicas	Híbridos Copurificación Coimmunoprecipitación Unión a proteínas o iones	• • • • •
Inferencias derivadas de patrones de expresión	Niveles de transcripción (micromatrices, transferencia Northern) Niveles de proteínas (transferencia Western)	• • • • •
Inferencias basadas en similitudes estructurales y de composición de las secuencias	Similitud de la secuencia (homología/paralogía) Reconocimiento de dominios Similitud estructural Transferencia Southern	• • • • •
Inferencias basadas en análisis computacionales validados	Experimentos a gran escala de la interacción entre proteínas Experimentos con micromatrices Integración de diversos tipos de bases de datos complejas Computación basada en análisis textual	• • • • •
Inferencias basadas en anotaciones electrónicas		• • • • •
Afirmaciones no contrastadas de Investigadores		• • • • •

¹La valoración de la confianza es una estimación aproximada del peso relativo de cada evidencia en la anotación genética



2

Objetivos: el gen como baliza

objetivos

En este trabajo de investigación se pretende:

- (1) Monitorizar la respuesta inmunitaria temprana (24-72 h) desencadenada por la exposición *in vivo* a lipopolisacárido bacteriano (LPS) en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello se establece un estudio comparativo mediante análisis de micromatriz de ADNc entre dos órganos, el riñón cefálico o anterior y el hígado, responsables de la hematopoyesis y parte de la respuesta inmunitaria de fase aguda, respectivamente, utilizando un modelo de inflamación peritoneal de uso habitual en la experimentación animal.
- (2) Proporcionar un modelo comparativo de los cambios en la expresión genética de la respuesta inmunitaria temprana (24-72 h) en el riñón cefálico de la trucha (*O. mykiss*) desencadenada por la exposición bacteriana y viral *in vivo*. Para ello se analiza el transcriptoma obtenido mediante micromatriz de ADNc de animales sometidos a inflamación experimental *in vivo* con LPS bacteriano o infectados con versiones atenuadas y virulentas del virus IHN, responsable de la necrosis hematopoyética infecciosa en salmónidos.
- (3) Validar el uso de una plataforma acotada de micromatriz de ADNc (SFM 1.0) específica para salmónidos en una experimentación de reactividad inmunitaria con la trucha (*O. mykiss*), a fin de complementar los estudios previos metabólicos y toxicológicos llevados a cabo con la misma plataforma.
- (4) Evaluar la aplicabilidad de la plataforma SFA 2.0 específica de salmónidos para la detección de cambios significativos en el transcriptoma de la dorada (*Sparus aurata*). Para ello se analiza ontológicamente el transcriptoma de las branquias y el riñón cefálico de la dorada, mediante hibridación cruzada con la plataforma de micromatriz SFA 2.0, en respuesta a formulaciones inmunoestimulantes en la dieta.
- (5) Validar el uso del análisis ontológico funcional como herramienta de elevado contenido explicativo y funcional en el análisis de micromatrices de ADN.

Salmonid Fish Microarray (SFM 1.0): descripción de la plataforma

resumen

En el último decenio, la elucidación de la expresión diferencial de genes o grupos de genes mediante micromatrices de ADNc de alta productividad¹ se ha convertido por méritos propios en la aproximación más común al análisis de la expresión génica global. Dejando a un lado los imponderables técnicos asociados tanto a los requerimientos de potencia estadística, precisión, replicabilidad y validación de algoritmos necesarios, como al tiempo necesario para el desarrollo de bases de datos genéticas basadas en especies pobremente caracterizadas desde el punto de vista genómico, las matrices de ADNc interespecíficas aportan a menudo una mayor resolución explicativa que las matrices de oligonucleótidos en este tipo de especies, elegidas más por su interés filogenómico que por su acomodación, a menudo dificultosa, a las condiciones de cultivo, cría y manutención en el laboratorio. Se describe a continuación la estructura de la primera generación de una plataforma de micromatriz de ADNc desarrollada específicamente para salmónidos (SFM 1.0) que se ha utilizado para la experimentación y validación de las respuestas inmunitarias desarrollada en este trabajo de investigación². Asimismo, se discute someramente el anticipo metodológico de parte de la investigación llevada a cabo en este trabajo.

¹ Se siguen aquí y a lo largo de todo el documento las recomendaciones para la traducción de neologismos anglófonos sugeridas en el “Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular” de María Verónica Saladrigas publicado en la revista *Panace@, Boletín de Medicina y Traducción* 2005, VI(21-22):265-275. Asimismo, en el texto, los términos clon, gen y transcrito se utilizan indistintamente para referirse a las sondas de ADNc inscritas en la micromatriz.

² Los experimentos descritos en esta investigación no hubiesen podido realizarse sin el acuerdo académico con la unidad de producción de micromatrices en el centro de Biotecnología de Turku, vinculado a la Universidad de Kuopio en Finlandia, que permitió el uso de la plataforma SFM 1.0 y cuyos elevados estándares en los procesos de impresión y producción de matrices de alta calidad son responsables de gran parte de los resultados expuestos a lo largo del texto.

El salmón reactivo

El valor interpretativo de los datos obtenidos mediante un experimento con micromatrices son tan válidos como la calidad de la anotación y representación de los genes selectos en la plataforma. En el caso de sistemas fisiológicos reguladores como el inmunitario, los eventos transcriptómicos se dan con una rapidez considerable tras la activación del sistema, lo que conlleva perfiles espacio-temporales variables en ubicaciones a menudo alejadas del lugar de la infección, que acarrearán, además, la activación y maduración funcional de multitud de tipos celulares distintos, actuando en la consonancia disonante que constituye la disfunción inmunitaria. Todo ello contribuye a la imprecisión característica de la atribución funcional a los genes involucrados en la respuesta fisiológica, especialmente en especies que, como los salmónidos, carecen, por el momento, de una caracterización genómica anotada completa.

En este sentido, y aunque se han generado numerosos recursos basados en ESTs en los salmónidos [91, 92, 110], así como descripciones ontológicas de la anotación genética, tanto de especies atlánticas (*Salmo salar* L.) como continentales (*Oncorhynchus mykiss*, W.), accesibles mediante servidores on line como Gene Index, iniciativa del Computational Biology and Functional Genomics Laboratory, el número y la diversidad de genes inducibles o activables derivados de análisis a gran escala de ESTs orientados a la función inmunitaria son, hasta la fecha, escasos [91, 111, 112]. Lo que tal vez sea debido a la naturaleza heterogénea de las muestras (habitualmente acervos mezclados de tejidos representativos) que pueden contener una amplia diversidad de tipos celulares con escasa representatividad inmunitaria (véase, sin embargo [9] y el apartado *Ordalías genéticas*). Asimismo, la a menudo gran divergencia en las secuencias de actores principales en la respuesta inmunitaria, como las citoquinas, añade un grado extra de dificultad técnica a la elucidación clara de la función genética en este tipo de respuestas [113].

Liderada por el sistema innato o inespecífico de reconocimiento celular, la reacción inmunitaria temprana a la invasión de patógenos confía en la respuesta de los macrófagos maduros residentes en los tejidos para la orquestación del complejo baile de interacciones celulares mediado por citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno (estallido respiratorio), fagocitosis y presentación de antígenos que precede a la puesta en escena de linfocitos profesionales especializados en la producción de anticuerpos y destrucción de células infectadas y microorganismos foráneos.

A menudo se justifica la modelización de la respuesta inmunitaria fagocítica utilizando modelos cultivados *in vitro*, que permitan detectar la expresión transitoria de genes relevantes, asumiendo los problemas derivados de:

- (a) La complejidad de la activación de los macrófagos y a su escasa representación en librerías tisulares mezcladas de ADNc.
- (b) La mezcolanza de células inmunitarias, maduras e inmaduras, y endocrinas en el

riñón cefálico de los peces que dificulta su análisis particulado.

- (c) La ausencia de un modelo consistente de circulación celular inmunitaria en los peces.
- (d) La propia idiosincrasia de la experimentación in vivo (variabilidad, complejidad semántica, conectividad (véase la FIGURA 4).

Así, en nuestro laboratorio se ha demostrado un incremento progresivo en la expresión de TNF-alpha en cultivos primarios maduros (5 días) de células obtenidas del riñón cefálico de la trucha (*O. mykiss*) y sometidas a estimulación con LPS de *Escherichia coli* [114]. De hecho, la estimulación con diferentes PAMPs origina en este tipo de células un aumento de la regulación de citoquinas proinflamatorias con una sensibilidad similar a la observada en los macrófagos de mamíferos [115]. El análisis de ESTs llevado a cabo con macrófagos activados durante 12 h con LPS se observa una representación cercana al 12% de genes relacionados con la respuesta inmunitaria, lo que implica una elevada tasa de descubrimiento de genes afectados por la estimulación bacteriana, acompañada de una nada desdeñable reducción de la redundancia característica de este tipo de estudios. [116, 117]. Es de destacar el hecho de que el análisis tardío (30 h después de la estimulación con LPS) de más de 1000 ESTs del mismo tipo celular revela una fuerte dependencia del tiempo muestral en el grado de redundancia del número de genes, elevándolo.

En general, los resultados de estos y otros estudios en los que se ha empleado hibridación supresiva sustractiva (SSH) para analizar las respuestas antibacterianas, actividad antiviral y activación de diversos tipos celulares mediada por estimulación de PAMPs [76, 118, 119] confirman la utilidad de estrategias unívocas (micromatrices) o combinadas (micromatriz y SSH) para detallar la expresión de genes selectos en especies de escaso etiquetado genómico pero relevancia experimental como modelos de patologías exóticas, comunes o comerciales.

El salmón anotado: la plataforma SFM 1.0

Concebida como una herramienta de elevada productividad específica de salmónidos para estudios ecotoxicológicos, de estrés, crecimiento y disfunción metabólica, la plataforma de micromatriz de ADNc de alta densidad en su versión original (SFM 1.0, FIGURA 6) contiene 1380 clones de salmónido no redundantes obtenidos mediante (a) análisis de ESTs de librerías comunes y sustraídas de ADNc [112] y (b) selección de genes basada en las clases funcionales definidas en la Ontología Genética (GO), y resulta del esfuerzo combinado de los equipos de investigación en biología molecular y bioinformática de la Universidad de Kuopio (Finlandia), financiados por el programa TEKES de la Unión Europea. Dado que no existe una referencia publicada que describa de manera exclusiva la plataforma, se refiere a continuación una descripción somera de la misma y su elaboración. Una versión muy abreviada de la misma puede consultarse en el

vivero de plataformas, compendios de resultados y anotaciones genéticas mantenido en la base datos Gene Expression Omnibus (GEO) bajo el epígrafe GPL6155.

Las librerías de ADNc obtenidas a partir de las células de peces estresados o inmunocomprometidos se prepararon utilizando hibridación supresiva sustractiva (SSH) utilizando procedimientos descritos previamente [120]. De manera resumida, el ARN se extrajo mediante reactivos de Trizol (Invitrogen) y se purificó con el paquete de análisis Dynabeads (Dyna). La síntesis de las cadenas de prueba y conductora de ADNc se llevó a cabo utilizando transcriptasa inversa PowerScript (Clontech), y la síntesis de ADNc de doble cadena mediante Advantage DNA polymerase mix (Clontech), como paso previo a su purificación por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los ADNc de prueba y conductores de digirieron utilizando RsaI como paso previo a su purificación por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El ADNc de prueba se subdividió en dos segmentos (T1, T2), cada uno de los cuales se ligó con un adaptador diferente durante 12 horas utilizando ligasas de ADN (New England Biolabs). Ambos segmentos se sometieron a una primera hibridaron con el ADNc conductor durante 8 h a 68°C, y a una segunda durante 12 h a 68°C. La primera y segunda tanda de amplificaciones mediante PCR de las secuencias enriquecidas expresadas diferencialmente se llevó a cabo siguiendo el protocolo: 1ª PCR 75°C durante 5 min., número de ciclos optimizados a 94°C durante 30 s, 66°C durante 30 s, 72°C durante 1.5 m) 2ª PCR número de ciclos optimizados a 94°C durante 30 s, 68°C durante 30 s, 72°C durante 1.5 min.) empleando para ello la Advantage DNA polymerase mix (Clontech). Los productos se clonaron empleando TOPO (Invitrogen).

Para la modificación, clonación y amplificación de los ADNc se utilizó una modificación de clonación de ADN por substitución enzimática degradativa (EDS) previamente descrita [121, 122]. Para la preparación de las librerías normalizadas se requirió la síntesis de ADNc mediante transcriptasa inversa Power-Script (Clontech), cebada con oligonucleótidos e incluyendo las zonas de unión a *EcoRI* and *NotI* (5'-ACGAGGCGAATTC-ACAGAGAGGAG(T)VN-3' y 5'-GAGAGAGAGTGGT-GCGGCCGCGGTGTAT-GGGG-3'). Para la generación de ADNc de doble cadena se empleó la Advantage DNA polymerase mix (Clontech) y los siguientes cebadores para la PCR: 5'-ACGAGGCGAATTCACAGAGAGGAG-3' y 5'-GAGAGTGGT-GCGGCCGCGGTGTA-3'. Los productos de la PCR se purificaron empleando el paquete de reactivos QIAquick kit (Qiagen), se precipitaron con etanol previa disolución en 1 µg/µl de tampón de hibridación (1 M NaCl, 50 mM HEPES (pH 8.3), 1 mM EDTA). El ADN se desnaturalizó durante 5 min. a 94°C. Después de la reasociación a 72°C durante 16 horas, se eliminó el ADN de doble cadena mediante precipitación con etanol seguida de digestión, durante 15 min. a 37°C, con 150 U de exonucleasa III (MBI Fermentas) [122]. El ADN de cadena simple se amplificó y aisló utilizando PCR y electroforesis con geles de agarosa, y para su clonación se empleó el vector pGEM⁺-11Zf (+) (Promega).

Como ya se ha mencionado, la plataforma SFM 1.0 contiene, además de las librerías de ADNc normalizadas y de sustracción obtenidas a partir de diversos tejidos clave, constituyentes de barreras para el tránsito celular o implicados en la regulación de la homeostasis (cerebro, branquias, riñón cefálico, medio y posterior, hígado, bazo, músculo) de peces estresados, inmunocomprometidos o disfuncionales, varios clones obtenidos de librerías de ADNc de trucha (*O. mykiss*) y salmón del Báltico (*S. salar*) construidas en el Centro de Biotecnología de Turku. De hecho, y siguiendo a Rise et al., 2004, la evaluación de la hibridación interespecífica en micromatrices de 7.36 k de ADNc es remarcablemente similar dentro de la familia Salmonidae, a la que pertenecen ambas especies. Las secuencias se analizaron mediante paquetes de software autónomo blastn and blastx [123] y la adscripción, identificación y anotación genética en términos de familias multigenéticas (INTERPRO) y categorías funcionales de la Ontología Genética, se llevó a cabo paralelamente al desarrollo de una plataforma (START) basada en los entornos Windows y Java dedicada a la anotación semiautomática de los genes de trucha (*O. mykiss*), cuya base de datos relacionales, unida a la interfase GO Tree Viewer permitió la discriminación de genes en el seno de familias genéticas y ordenaciones jerárquicas de categorías funcionales.

A fin de aumentar la versatilidad funcional y delimitar, a la vez, el espectro analítico de la plataforma a la idiosincrasia inmunitaria de las especies estudiadas, restringiendo su uso a la (dis)función inmunitaria y metabólica, la plataforma de micromatriz acotada se benefició del enriquecimiento de clones pertenecientes a diversas clases funcionales, especialmente aquellas relacionadas de manera directa con los estados de estrés (145 genes), respuestas defensivas (105 genes), ciclo celular (62 genes), transducción de la señalización celular (114 genes), actividad de carabinas moleculares (41 genes) y procesos relacionados con la apoptosis (79 genes). La plataforma incluye, además, 315 genes seleccionados mediante análisis ontológico involucrados en estados de estrés, ecotoxicología y respuestas relacionadas con la exposición a patógenos. Más de cuatro quintas partes de dichos transcritos se obtuvieron de librerías multitisulares normalizadas empleadas en la indexación de los genes de la trucha [112], y el resto (33 genes) se obtuvieron mediante RT-PCR, en una estrategia de enriquecimiento que permitió una mayor cobertura de diversas clases funcionales [72].

Los insertos de ADNc se amplificaron mediante PCR, empleando cebadores universales, y se purificaron con un paquete de reactivos Millipore Montage PCR96 Cleanup Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se dispuso en portaobjetos cubiertos con poli (L) lisina (Menzel) utilizando DMSO como tampón de impresión y una configuración de 8 puntas de impresión (Telechem) dispuestas en 2 x 4. Todo el proceso se llevó a cabo utilizando el Virtek ChipWriter Pro Arrayer en el Finnish DNA Microarray Centre sito en el centro de Biotecnología de Turku.

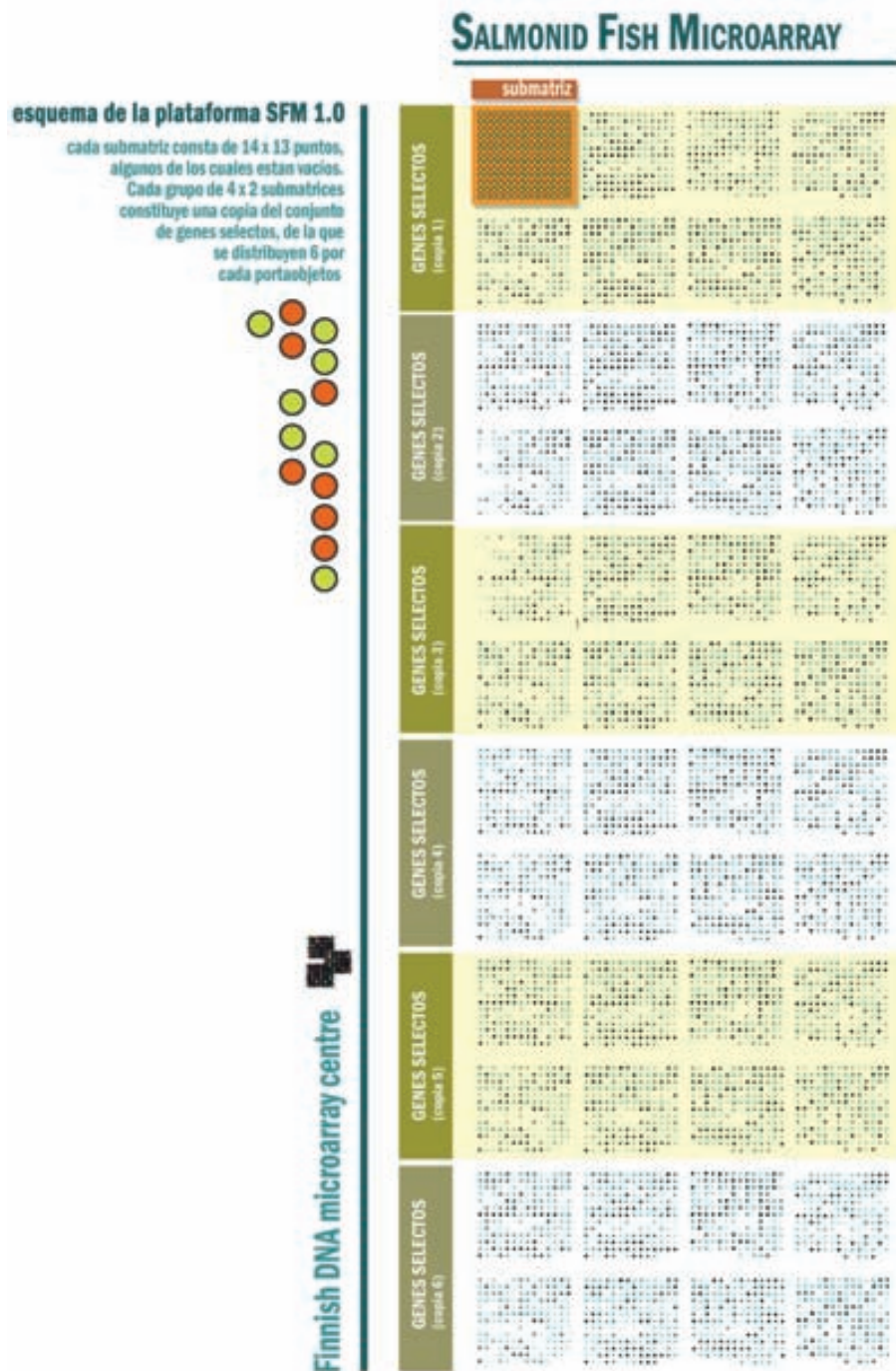
A vista de pájaro, la micromatriz consta de 12 filas y 4 columnas de submatrices, cada una de las cuales se compone de una ordenación de puntos con un diámetro de 150 μm

dispuestos en 13 filas y 14 columnas (FIGURA 6). Cada portaobjetos contiene 6 réplicas técnicas de la matriz de 1380 clones. Para la experimentación llevada a cabo en esta tesis, se utilizó un diseño experimental de tinción cruzada (*dye-swap*) para analizar las muestras obtenidas de experimentos clásicos (condición experimental versus control), debido al ajuste correctivo que sobre la variabilidad derivada de la relación señal/ruido posee este tipo de diseños [14].

De manera sucinta, el marcaje con dCTP unidos a los fluorocromos Cy3 y Cy5 (Amersham Pharmacia) se llevó a cabo utilizando SuperScript III (Invitrogen) y cebadores de oligo(dT), hibridándose cada muestra en dos micromatrices. Los portaobjetos se trataron previamente con 1% de BSA, fracción V, 5 x SSC, 0.1% SDS (30 min. a 50°C) y lavaron con 2 x SSC (3 min.) y 0.2 x SSC (3 min.), hibridándose durante 12 h en una solución con 1.3 x Denhardt's, 3 x SSC 0.3% SDS, 0.67 µg/µl poliadenilato y 1.4 µg/µl de ARNt de levadura. Para el escaneo de las micromatrices se utilizó el modelo 5000 de ScanArray, procesándose las imágenes con el modelo QuantArray (GSI Luminomics). De manera habitual, las medición de la señal en cada punto se filtró siguiendo el criterio $I/B \geq 3$ and $(I-B)/(S_I+S_B) \geq 0.6$, donde I y B representan la media de las intensidades de señal y de fondo, y S_I , S_B sus desviaciones estándar. Una vez sustraída de la intensidad de fondo, se aplicó una normalización clásica de Lowess [124] a cada portaobjetos por separado y en su conjunto.

Para el análisis de la expresión diferencial se utilizó el test de la t de Student ($p < 0.01$), ordenándose los genes de utilizando preferentemente el log del valor p . Dado el número de genes a evaluar en cada plataforma, muestra y/o experimento, en todos los casos se aplicó la corrección FDR (*False Discovery Rate*) para comparaciones entre múltiples experimentos, un algoritmo popular en este tipo de análisis que asume un cierto nivel de interacción genética y resulta computacionalmente eficiente [125]. En los casos en los que se analizó la representación de categorías funcionales mediante análisis ontológico, se compararon las clases GO anotadas empleando para ello la media del logaritmo de la relación de expresión, así como las correcciones de Fisher y/o Ji cuadrado para la significación de categorías funcionales singulares y el grado de representación de las escogidas por su significación considerando la composición funcional de la plataforma de micromatriz, una valoración esta absolutamente necesaria y no siempre utilizada que, de no efectuarse en micromatrices acotadas y enriquecidas con clones específicos de procesos fisiológicos selectos como la presente, conduce a menudo a una representación no gaussiana de las categorías funcionales, infravalorándolas o sobrevalorándolas, con el consiguiente aumento de la incertidumbre en la formulación de hipótesis.

FIGURA 6. DESCRIPCIÓN DE LA PLATAFORMA SFM 1.0 DISCUTIDA EN LOS SIGUIENTES APARTADOS



Validación de la plataforma SFM1.0

El funcionamiento de la micromatriz se ha evaluado repetidamente (TABLA 3) en salmónidos sometidos a estrés, exposición a contaminantes acuáticos e agresiones inmunitarias [72, 75, 126-132], utilizando diversos tejidos y estadios vitales de diferentes especies (*O.mykiss*, *S.trutta lacustris* L. ay *S.salar*). En todos los casos, la detección de genes expresados diferencialmente es concurrente con la eficiencia esperada para la mayoría plataformas de micromatriz consistentes basadas en ADNc. A modo de ejemplo, y aunque se discutirá en profundidad en los siguientes capítulos, se aportan a continuación una parte de los resultados obtenidos al evaluar por primera vez la plataforma mediante insultos virales y bacterianos. Desde entonces, otras investigaciones han incidido en la presión viral como medio de analizar la respuesta transcriptómica en los salmónidos mediante actualizaciones de la plataforma SFM [133-135].

El efecto sobre los transcriptomas del hígado y del riñón cefálico de la trucha tras la inoculación intraperitoneal de LPS bacteriano, o, en el caso del riñón cefálico, también de formas atenuadas o activas del virus responsable de la necrosis hemorrágica infecciosa (IHNV) se evaluó utilizando la micromatriz SFM 1.0, ajustando los datos de intensidad mediante la normalización de Lowess (FIGURAS 7 y 8).

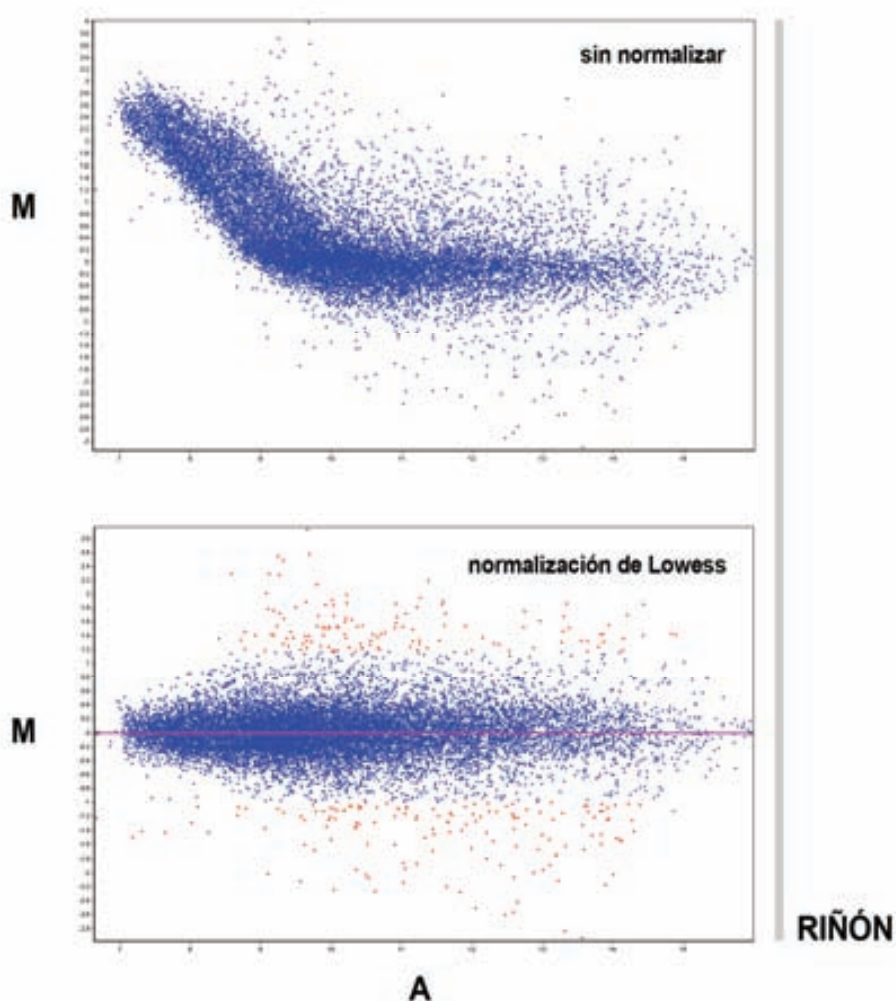
TABLA3 . VALORACIÓN CUANTITATIVA DE LA MICROMATRIZ SFM 1.0.

Condición experimental	Perturbación	GED ¹ (p<0.01)	GED ¹ relativo	Referencia
Disfunción ontogénica	M/4 (embriones)	507	10%	Vuori et al 2006
Ecotoxicología	Pireno (hígado)	141	8%	Krasnov et al. 2005, 2007
	CCL4 (hígado)	128	8%	Krasnov et al. 2005, 07
	Resina ácida (hígado)	238	13%	Krasnov et al. 2007
	Cadmio (hígado)	309	17%	Merilainen et al. 2007
Patogeneidad bacteriana	LPS (riñón anterior)	45	3%	Esta tesis, Mackenzie et al. 2008
	LPS (hígado)	20	1%	Esta tesis
Patogeneidad viral	IHNV (riñón anterior)	426	26%	Esta tesis, Mackenzie et al. 2008
	VHSV (riñón anterior)	429	24%	Figueras et al.(no publicado)

¹La cuantificación toma como referencia el número de genes expresados diferencialmente (GED) i el porcentaje de los mismos en relación a los clones en cada plataforma (GED relativo).

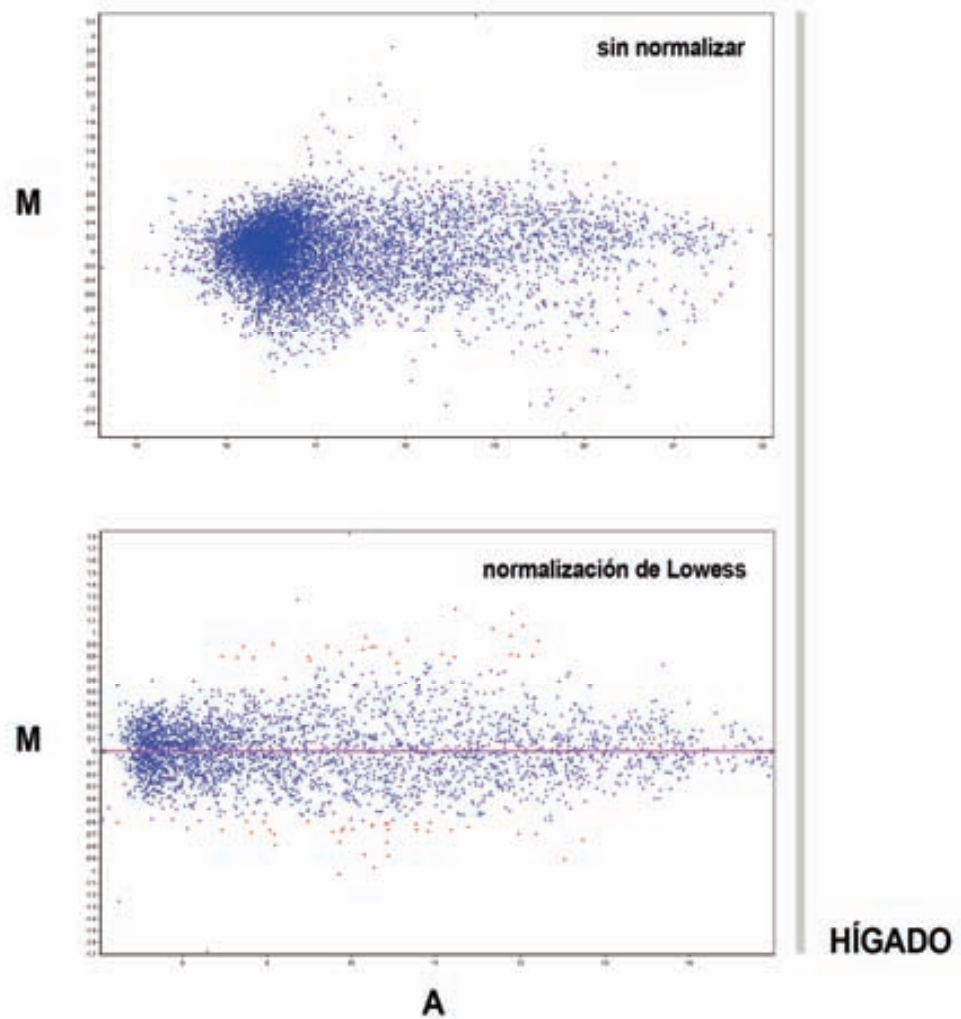
Abreviaturas: M74, medida de la mortalidad de larvas de salmónido; CCL4, compuesto hepatotóxico tetracloruro de carbono; IHNV virus de la necrosis hemorrágica infecciosa; VHSV, virus de la septicemia hemorrágica.

FIGURA 7. GRÁFICOS M-A DEL EFECTO DE LA NORMALIZACIÓN DE LOWESS SOBRE LOS DATOS DE INTENSIDAD DE LA SEÑAL EN LA MICROMATRIZ DEL RIÑÓN CEFÁLICO DE LA TRUCHA



El efecto de la normalización de Lowess (abajo) sobre la señal de hibridación obtenida de la micromatriz del riñón cefálico de la trucha sin normalizar (arriba) se muestra en un gráfico M-A, en la que se representan la relación entre la señal promedio A calculada como $[0.5 * (\log R + \log G)]$, donde R es la intensidad de la señal del canal rojo, una vez sustraída la señal de fondo, y G la intensidad de la señal del canal verde, una vez sustraída la señal de fondo, y M , calculada como la relación $\log_2(R/G)$. Los valores en los extremos de la distribución se indican en rojo.

FIGURA 8. GRÁFICOS M-A DEL EFECTO DE LA NORMALIZACIÓN DE LOWESS SOBRE LOS DATOS DE INTENSIDAD DE LA SEÑAL EN LA MICROMATRIZ DEL HÍGADO DE LA TRUCHA



El efecto de la normalización de Lowess (abajo) sobre la señal de hibridación obtenida de la micromatriz del hígado de la trucha sin normalizar (arriba) se muestra en un gráfico M-A, en la que se representan la relación entre la señal promedio A calculada como $[0.5 * (\log R + \log G)]$, donde R es la intensidad de la señal del canal rojo, una vez sustraída la señal de fondo, y G la intensidad de la señal del canal verde, una vez sustraída la señal de fondo, y M , calculada como la relación $\log_2(R/G)$. Los valores en los extremos de la distribución se indican en rojo.

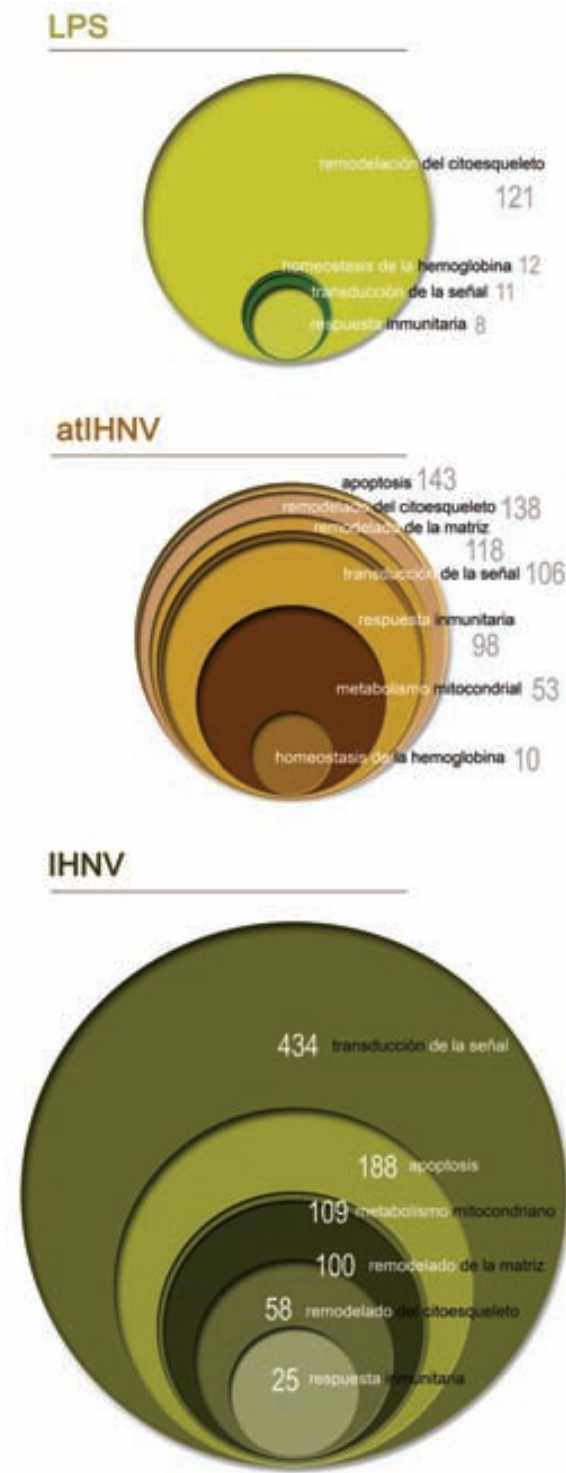
Como se comenta más adelante, y a modo de anticipo de la capacidad discriminativa de la plataforma, se hallaron diferencias significativas en la intensidad de la respuesta transcriptómica en el riñón cefálico en respuesta a uno u otro tratamiento, tanto por lo que respecta al número de genes estimulados o inhibidos en las diferentes categorías funcionales analizadas (FIGURA 9), como en la expresión diferencial relativa de los mismos, mayor en el caso de los animales infectados con el patógeno viral que en los peces inoculados con LPS bacteriano.

Un ejemplo de la valoración de las categorías funcionales propias de los genes que se expresaron diferencialmente durante la experimentación se muestra en la FIGURA 9. La reacción, en cada caso, parece seguir una respuesta general tisular un tanto meliflua de activación inmunitaria en el caso de los animales estimulados con LPS, y una fuerte respuesta inmunitaria en la que participan procesos apoptóticos, inmunitarios y transcripcionales, probablemente debido a

- (1) la especificidad tisular de la respuesta en el riñón cefálico, zona de actuación predilecta para el la colonización y replicación del virus IHN y
- (2) la localización peritoneal de la inflamación aguda inducida por la administración de LPS, que sugiere una respuesta tisular secundaria, regulada por mediadores alostáticos circulantes.

De hecho, algunos estudios previos dedicados a evaluar la patogeneicidad de virus IHN en los salmónidos, una de las más activas en animales cultivados [136, 137], describen un retardo de 24 h en los títulos virales detectables y otras medidas internas de perturbación inmunitaria, seguido de un rápido incremento en la expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta viral y de fase aguda en los principales órganos hematopoyéticos [138, 139]. Los datos obtenidos en esta experimentación apoyan sugerencias recientes [9] referidas a la capacidad del sistema inmunitario para movilizar un mayor grado de recursos asociados con el remodelado transcripcional que el observado para la mayoría de respuestas fisiológicas.

FIGURA 9. PROCESOS FISIOLÓGICOS AFECTADOS POR LA EXPOSICIÓN VIRAL Y BACTERIANA EN EL RIÑÓN CEFÁLICO DE LA TRUCHA.



Expresión genética diferencial (número de genes cuya expresión se ve estimulada o menguada en un valor de más de 1 vez su expresión evaluada en el control, $p < 0.01$) basada en la detección de categorías funcionales en el riñón cefálico de truchas (*O. mykiss*) sometidas a inflamación bacteriana con LPS de *E. coli* e infección viral con formas atenuadas y virulentas del patógeno IHNV (atIHNV y IHNV respectivamente).

Influencias viral y bacteriana durante la respuesta inmunitaria temprana en el riñón anterior

resumen

La respuesta inmunitaria temprana (24-72 horas) a la infección experimental mediante inyección intraperitoneal de lipopolisacárido bacteriano (LPS) y formas activas y atenuadas del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV y atIHNV, respectivamente) se evaluó en el riñón cefálico de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) mediante análisis de una micromatriz de ADNc (SFM 1.0, véase el apartado *Salmonid Fish Microarray (SFM 1.0): descripción de la plataforma*) específica de salmónidos¹. En respuesta a la exposición a LPS bacteriano, el análisis transcriptómico del riñón cefálico o anterior inflamado muestra una reacción inicial típica de estrés agudo que involucra la supresión de procesos celulares generales, incluidos los relacionados con la función inmunitaria, seguida de una respuesta asociada a la biogénesis y/o proliferación hematopoyética, aparente tres días después de la infección bacteriana. La respuesta inmunitaria a la agresión viral se destaca por la supresión temprana de las funciones hematopoyéticas y de biosíntesis de proteínas, acompañada de una estimulación de la respuesta inmunitaria. La especificidad tisular de la patología inducida viral justifica la pérdida de funciones celulares vitales como son la transducción de las vías de activación y señalización celulares, la actividad transcripcional generalizada y el mantenimiento del ciclo celular. Durante los primeros estadios de la infección, el patrón transcriptómico de la respuesta inmunitaria a la inoculación de virus atenuados (atIHNV) resulta similar al observado durante la infección provocada por la forma activa; al tercer día, sin embargo, el efecto del virus atenuado se asemeja al observado durante la recuperación de la infección bacteriana.

¹ Esta investigación se ha beneficiado de las subvenciones del Plan Nacional AGL2005-12134 del Ministerio de Educación y Ciencia y del proyecto FOOD-CT-2005-007103 del proyecto europeo IMAQUANIM. Una versión reducida de la experimentación y análisis descritos en este apartado se ha publicado recientemente: Simon Mackenzie, Joan C Balasch, Beatriz Novoa, Laia Ribas, Nerea Roher, Aleksei Krasnov, Antonio Figueras: **Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to in vivo challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation.** *BMC Genomics*, 9:141.

Introducción: el palimpsesto reactivo

La orquestación de una respuesta inmunitaria exitosa frente a la infección requiere una respuesta tisular integrada e integradora, coordinada a través de la liberación de citoquinas y quimioquinas específicas. La respuesta del organismo a la intrusión involuntaria se perfila en el seno de una jerarquía de activación modular fisiológica enraizada en lo ecológico pero expresada en el proteoma, dependiente en última instancia de las vicisitudes de la conversación genética. Así, el estado alostático, del organismo, esto es, las correcciones reactivas del grado de adecuación y satisfacción fisiológicas al cambio interno (patológico, alterado) o externo (comportamental, ecológico) viene condicionado por las respuestas primarias condicionadas o inducibles de las que la inmunidad participa de manera inequívoca (FIGURA 10).

FIGURA 10. NIVELES DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA A LA PERTURBACIÓN EXÓGENA.



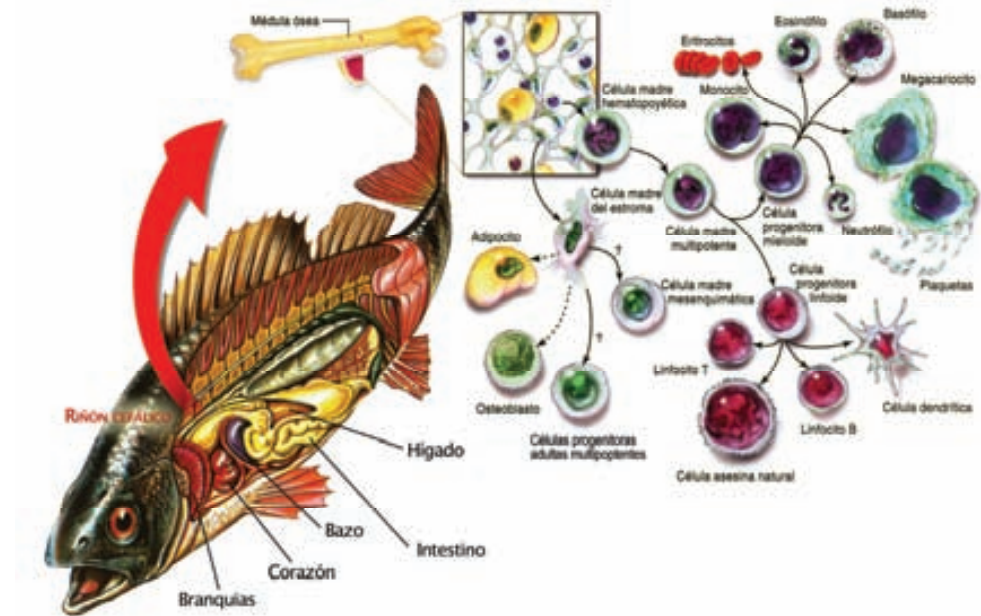
Las respuestas defensivas vinculada a la entrada de patógenos dependen y a la vez son coordinadas gracias a la activación de receptores de reconocimiento específico de patógenos (PRRs en su nomenclatura anglosajona), sitios en algunas subpoblaciones leucocitarias como los monocitos/macrófagos o las células dendríticas. Los PRRs responden a la presentación de patógenos a través de los patrones moleculares asociados a estos (PAMPs), altamente conservados en virtud de su funcionalidad vital para el microorganismo, iniciándose así una serie de programas transcriptómicos característicos

que dictaran la respuesta celular y tisular a la intrusión [140-142]. En los mamíferos, varios de estos programas se han identificado gracias al análisis de plataformas de micromatriz dirigidas a la detección de PAMPs específicos (virales, bacterianos, fúngicos) por los macrófagos y células dendríticas capaces de desencadenar la respuesta inmunitaria que acompaña la secreción de moléculas como las citoquinas proinflamatorias [143, 144]. La disponibilidad de biochips específicos de salmónidos [72, 75, 126] que permiten la caracterización de la respuesta inmunitaria en este grupo de teleósteos, ya sea *in vitro* o *in vivo*, ha llevado a la publicación de diversos estudios centrados en los efectos del reconocimiento de PAMPs [145], transcriptómica de macrófagos activados [75] inmunómica [78, 99, 100, 146-149] y valoraciones del genoma completo [150], que muestran una respuesta claramente diferencial de los macrófagos de los teleósteos frente a los patógenos si consideramos sus contrapartes mamíferas, lo que parece sugerir una reactividad inmunitaria *in vivo* si no diferente, al menos divergente en los vertebrados acuáticos.

En el análisis que sigue, se valora la respuesta transcriptómica a la intrusión de patógenos en el riñón cefálico de la trucha (*O. mykiss*), un órgano localizado dorsalmente, posterior al cráneo en esta especie, y que es considerado el órgano hematopoyético central en los salmónidos y otras especies de teleósteos (FIGURA 11). Carecemos en la actualidad de una descripción precisa y exhaustiva de las subpoblaciones celulares inmunitarias y su red de comunicación química en los órganos hematopoyéticos de los peces, poco estructurados por lo demás en comparación con la mayoría de órganos funcionalmente similares en los mamíferos. Es asumible, sin embargo, una elevada similitud en el fenotipo de las principales poblaciones celulares descritas en estos (monocitos/macrófagos, linfocitos B y T, probablemente células dendríticas) y, hasta un cierto punto, también en las interacciones inmunoendocrinas que, en el caso de los peces, obedecen a la profusión de células cromafines productoras de cortisol, el principal glucocorticoide y mineralcorticoide en los peces, que rodean el tejido hematopoyético en el riñón anterior [151-154]. Su condición de órgano integrador de lo que bien podría llamarse tejido neuroinmunoendocrino lo convierte nexo funcional de la maduración de los componentes celulares de la respuesta inmunitaria y blanco preferido para la investigación inmunitaria en los peces, especialmente para la obtención de precursores de macrófagos destinados a su cultivo e investigación *in vitro* [117, 155], pero también, y por la misma razón, en crisol de multiplicación de patógenos. Paradójicamente, y quizás debido a su complejidad funcional, se han llevado a cabo pocos estudios sobre la regulación genética global durante la infección o estimulación mediada por PAMPs en los salmónidos [78].

El *Novirhabdovirus* IHNV, responsable de la necrosis infecciosa hematopoyética es uno de los patógenos virales de mayor impacto en la acuicultura de los salmónidos [136, 137]. Su genoma alberga un ARN de cadena simple completamente secuenciado [156, 157] que codifica cinco proteínas estructurales: una nucleoproteína (N), una proteína asociada

FIGURA 11. ÓRGANOS HEMATOPOYÉTICOS E IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INMUNITARIA EN LOS PECES.



La mayoría de las células presentes en el crisol hematopoyético sito en la médula ósea de los mamíferos se han descrito en los peces. Sin embargo, las relaciones entre los diversos tipos celulares distan de estar resueltas satisfactoriamente. Hasta la fecha, los estudios de la inmunidad celular en los peces demuestran la existencia de células prototípicas de los linajes linfóide y mieloide, con una reactividad menos dependiente de la diversidad de inmunoglobulinas que de la robustez de la repuesta innata regulada por componentes humorales de fase aguda (lisozima, complemento), monocitos/macrófagos y, tal vez, por células similares a las dendríticas.

a la polimerasa (P), una proteína de matriz (M), una polimerasa de ARN dependiente de ARN (L) y una glicoproteína de superficie (G) responsable de la inmunogeneidad [158-160]. Un gen adicional, presente únicamente en algunos rhabdovirus de peces, localizado entre los genes G y L, codifica una proteína no estructural (NV) cuyo papel en la replicación del virus dista de estar resuelto [161] pero parece ligado al crecimiento y patogeneidad virales [160]. La conspicua respuesta inmunitaria temprana desencadenada por la infección de este y otros virus de ARN relacionados ha propiciado el desarrollo de diversas vacunas utilizando estrategias de investigación genética inversa [162, 163].

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) resulta un constituyente fundamental de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, además de uno de los PAMPs más utilizados para la inducción de respuestas inmunitarias, de las que responde principalmente su porción lipídica (lípidos A), responsable de la disfunción endotóxica

observada en modelos animales de experimentación inoculados con LPS [164, 165]. En los peces se ha descrito repetidamente una remarcable tolerancia a la infección por LPS en comparación con los mamíferos, que se ha explicado gracias a las posibles diferencias en el reconocimiento mediado por receptores del lipopolisacárido [166]. De hecho, la administración *in vivo* de elevadas concentraciones de LPS en los peces no conduce a la mortalidad mediada por endotoxinas característica de los modelos inflamatorios murinos [117].

En el transcurso de esta experimentación, se inocularon formas atenuadas o activas del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (atIHNV y IHNV respectivamente) o lipopolisacárido bacteriano (LPS de *E. coli*) en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Se muestreó el ARN total obtenido del riñón anterior o cefálico de la trucha en el primer y tercer días posteriores a la inoculación intraperitoneal (i.p.) del PAMP y los patógenos, y su análisis se llevó a cabo utilizando la plataforma de micromatriz SFM 1.0 descrita anteriormente. Con ello se identificó:

- (1) una respuesta generalizada que involucró genes relacionados con el estrés y representativos de la (dis)función inmunitaria y hematopoyética, presentes en todos los tratamientos, y
- (2) un elevado conjunto de genes que respondieron de manera específica a la agresión viral.

El análisis ulterior basado en la ontología genética discriminó dos tipos de respuestas fisiológicas diferenciadas respecto al efecto viral y bacteriano, en las que las características distintivas de la patogeneicidad por IHNV están claramente representadas. La respuesta a la inoculación de LPS desencadenó una activación inflamatoria generalizada seguida de una significativa respuesta hematopoyética. Se relata a continuación el análisis pormenorizado de la comparación de los patrones de genes expresados diferencialmente inducidos *in vivo* por un PAMP genérico (LPS) y un patógeno viral (IHNV) en el riñón cefálico de la trucha.

Material y métodos

Manejo de animales e infecciones experimentales

Las truchas, *Oncorhynchus mykiss*, de 70-100g de peso, se obtuvieron de dos distribuidores comerciales y se mantuvieron en tanques de flujo continuo bajo condiciones ambientales controladas de luz (fotoperíodo de 10/14 horas de luz y oscuridad, respectivamente) y temperatura ($15 \pm 2^\circ\text{C}$). Los peces se alimentaron con pienso particulado comercial *ad libitum* y se les mantuvo en los tanques durante dos semanas para su aclimatación previa a la fase experimental. El estado de salud de los animales y la calidad del agua se evaluó cada tres días durante el período de aclimatación y

diariamente a lo largo de todo el periodo experimental. Los experimentos de infección experimental se llevaron a cabo separadamente para cada tratamiento en tanques con recirculación de agua aireados a 14 °C. Las truchas, en número de 10 por tanque, se separaron en 6 tanques experimentales distintos, 3 para los controles y 3 para los individuos que recibirían la inoculación viral y bacteriana. Antes de la inoculación intraperitoneal, los animales se anestesiaron ligeramente utilizando MS-222 (40 ppm, estadio II de la anestesia de acuerdo con la clasificación de Iwama et al. 1989). En función de su adscripción a uno u otro grupo experimental, a los peces se les inoculó solución salina (control), 6mg/Kg de LPS (Sigma), o 100 µl de una dilución de 10⁶ ufc/ml de IHNV o atIHNV o medio de cultivo (control negativo). En los puntos muestrales definidos previamente, 24 y 72 h después de la inyección i.p., los animales controles y experimentales se seleccionaron de cada tanque (n=3) y se sacrificaron mediante hipernestesia (MS-222, 100 ppm, estadio III de la anestesia [167]). Inmediatamente se procedió a la disección, extracción y mezcla (*pooling*) de los riñones cefálicos para cada grupo experimental, de los que se procesó su ARN mediante Tri Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones del fabricante [168, 169].

Virus y líneas celulares

La variedad 32/87 del virus IHNV se propagó en la línea celular epitelial EPC derivada de la carpa común (*Cyprinus carpio*) [170]. Las células EPC se cultivaron en medio mínimo esencial Eagle (MEM, Gibco) suplementado con suero bovino fetal (FCS), penicilina (100 IU ml⁻¹) y estreptomycin (100 µg ml⁻¹), tamponado con bicarbonato sódico al 7,5% y se incubaron a 20°C. El virus se inoculó a las células EPC en crecimiento en el medio MEM con antibióticos y 2% de FCS a 14 °C. Una vez completado el efecto citopático, se recolectó y centrifugó el sobrenadante para eliminar los restos celulares. La titración del stock viral se llevó a cabo según lo descrito por Reed y Muench [171] en placas de EPC de 96 pozos. La forma atenuada del virus atIHNV se obtuvo por ingeniería genética inversa a partir de su forma activa, según lo descrito por M. Bremont [161].

Obtención del ARN

El ARN de los riñones cefálicos de los animales inyectados con solución salina, LPS y formas virales se obtuvo mediante reactivos de Trizol (Life Technologies) o Tri Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eliminó la contaminación de ADN de la preparación mediante tratamiento con ADNasas. El ARN se precipitó empleando etanol al 100% i acetato de amonio (pH 5.2), conservándose a -80°C en etanol para su uso posterior.

Diseño y análisis de la micromatriz

El diseño general de la micromatriz se ha detallado anteriormente (véanse el apartado

Salmonid Fish Microarray (SFM 1.0): descripción de la plataforma y las referencias [72, 126]. Una descripción somera de la plataforma y de los experimentos reseñados a continuación se describe en la base datos Gene Expression Omnibus (GEO) bajo los epígrafes GPL6155 y GSE10272. Mediante electroforesis desnaturizante se cuantificó y verificó la integridad del ARN total obtenido del riñón cefálico, paso previo al marcaje con Cy3- y Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia), completado empleando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y cebadores de oligo(dT). ELK ADN se purificó utilizando el paquete de reactivos de Microcon YM30 (Millipore). Se escogió un diseño experimental de marcaje cruzado (*dye swap*) [14] y cada muestra se hibridó en dos micromatrices. En el primer portaobjetos, las muestras control y experimental de ADNc se marcaron con Cy5 y Cy3, respectivamente, invirtiéndose la asignación de marcaje para el segundo portaobjetos. Los portaobjetos se trataron previamente con 1% BSA, fracción V, 5 x SSC, 0.1% SDS (30 min. a 50°C), lavándose posteriormente con 2 x SSC (3 min.) y 0.2 x SSC (3 min.). La hibridación se llevó a cabo durante 12 h en una mezcla de 1.3 x Denhardt's, 3 x SSC 0.3% SDS, 2.1 µg/µl poliadenilato y 1 µg/µl de ARNt de levadura (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich). El escaneado de la micromatriz y el procesamiento de las imágenes se llevaron a cabo utilizando ScanArray 5000 y QuantArray (GSI Luminomics), respectivamente. La medida de la señal en cada punto de la micromatriz se filtró siguiendo el criterio $I/B \geq 3$ y $(I-B)/(S_I+S_B) \geq 0.6$, donde I y B son las intensidades medias de la señal y el fondo, respectivamente, y S_I, S_B sus desviaciones estándar. Una vez sustraída la media de la intensidad de fondo, se llevó a cabo una normalización por regresión balanceada no lineal local (Lowess) [124] separadamente para cada portaobjetos.

Para la evaluación de la expresión genética diferencial se analizó el logaritmo de la relación de intensidades normalizadas mediante la prueba de la t de Student con ($p < 0.01$). Asimismo se aplicó la modificación Bayesiana de la tasa de descubrimientos erróneos (*False Discovery Rate*, FDR) para la corrección del error derivado de la aplicación de múltiples pruebas de comparación, estimándose el valor q para cada conjunto de genes expresados diferencialmente [125]. El análisis de los perfiles funcionales se llevó a cabo escogiendo aquellos genes cuya expresión difería al menos en una muestra con probabilidad $p < 0.01$. Debido al elevado número de genes analizados, se evaluó la significación estadística de las categorías funcionales sobrerrepresentadas en cada experimento mediante la corrección de Yates para la prueba de Ji cuadrado (valor p corregido < 0.05). El grado de aumento o disminución de la expresión genética, evaluada ordenando los genes utilizando como criterio el logaritmo del valor p , se analizó interrogando las clases funcionales de la Ontología Genética (GO) [172] y comparándolas mediante la prueba de la t de Student ($p < 0.05$). El número de genes cuya respuesta al tratamiento viral y bacteriano se consideró significativa se evaluó adicionalmente mediante consulta ontológica sobre la base de datos de más de 150 experimentos asociada al desarrollo de la plataforma de micromatriz [72, 127]. La

comparación de los valores obtenidos mediante micromatriz con los obtenidos mediante RT qPCR se reseña, junto con una descripción de la metodología de RT qPCR, en el material adicional (anexo II *RT-qPCR de genes selectos*).

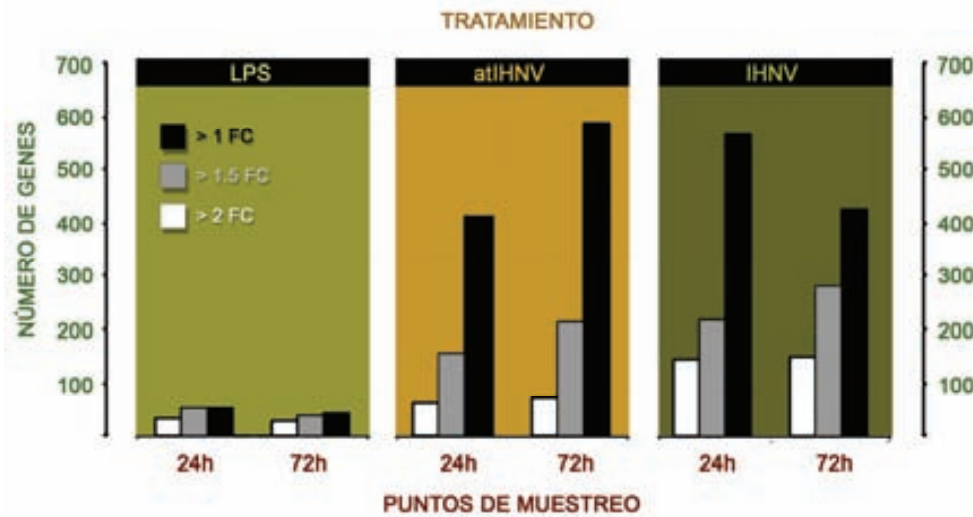
Resultados y discusión

Debido a la relevancia de la necrosis hematopoyética en los cultivos de salmónidos, la epizootiología de la infección por IHNV ha sido objeto de numerosos estudios [139, 157, 173-177] que destacan, como síntomas clave de la patología, la aparición de hemorragias generalizadas en el riñón, hígado y musculatura que desembocan en anemia, acompañada de extensas áreas necróticas en órganos hematopoyéticos (riñón cefálico y bazo). Durante los periodos muestrales reseñados (24 y 72 h) no se observaron signos externos de lesiones histológicas en los peces infectados con las formas atenuada y activa del virus IHN. En los peces remanentes mantenidos en los tanques la manifestación de la sintomatología infecciosa condujo a una mortalidad del 100% a los 7-9 días en el caso de los animales infectados con la forma activa del virus, y a los 15-17 días en los afectados por la forma atenuada. La inoculación de LPS bacteriano, en cambio, no produjo bajas en el grupo experimental, en consonancia con la respuesta típica observada reiteradamente en los peces, que, a concentraciones consideradas letales en modelos murinos, carecen de una respuesta inflamatoria aguda (shock séptico) omnipresente en la mayoría de modelos de mamíferos estudiados hasta la fecha, lo que sugiere una divergencia en las vías de señalización de los receptores Toll-like /TLR4 en los peces respecto a los mamíferos. De hecho, la sensibilidad a la estimulación mediante LPS es unas 1000 veces menor en macrófagos de peces que en su contrapartida murina [145].

El riñón reactivo (I): modelo transcriptómico de la respuesta a la infección

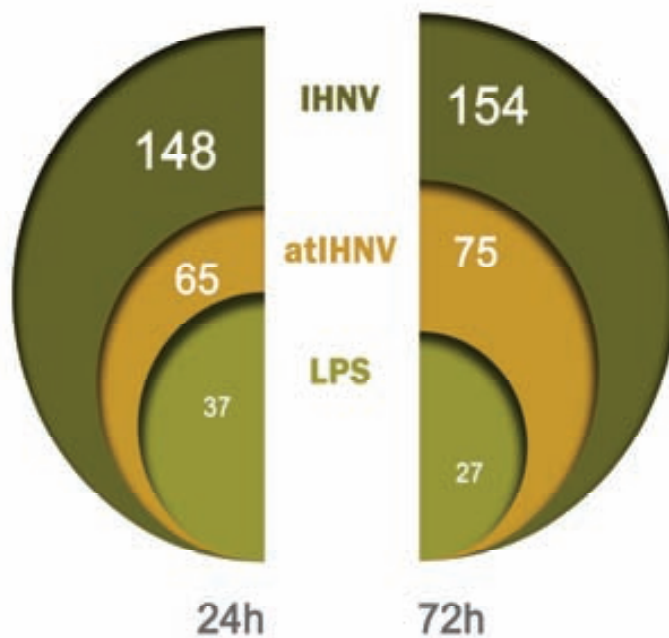
El análisis de las alteraciones patológicas en el perfil transcriptómico del riñón cefálico de la trucha puede considerarse el primer estudio basado enteramente en la reactividad inmunitaria frente a un proceso infeccioso realizado con una plataforma de micromatriz utilizada (y validada) en su origen para evaluar respuestas al estrés y la ecotoxicología del medio [72, 75, 126, 127]. El número total de genes expresados significativamente en cada uno de los tratamientos se representa en las FIGURAS 12 y 13, y una lista de 20 genes seleccionados en base a sus niveles de expresión se incluye en las TABLAS 4 a 6. Utilizando un criterio de selección basado en una expresión mínima 2 veces mayor que la expresión basal ($FC > 2$) en los genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) se resalta la mayor inducción *global* de la expresión genética que sigue a la inoculación de las formas atenuada y activa del virus IHN.

FIGURA 12. COMPARACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA A LA INFECCIÓN VIRAL Y BACTERIANA EN EL RIÑÓN ANTERIOR DE LA TRUCHA.



Número de genes diferencialmente expresados ($FC > 1$, $p < 0.01$, $FDR < 0.01$) para cada tratamiento y punto de muestreo.

FIGURA 13. COMPARACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA A LA INFECCIÓN VIRAL Y BACTERIANA EN EL RIÑÓN ANTERIOR DE LA TRUCHA (Y II).



Número de genes diferencialmente expresados ($FC > 2$, $p < 0.01$, $FDR < 0.01$) para cada tratamiento y punto de muestreo.

La inflamación experimental provocada por la inoculación intraperitoneal de LPS induce una respuesta mayor en comparación con la infección viral entre los grupos de genes expresados diferencialmente (>1 FC, $p<0.01$). Aunque el número de genes selectos resulta inferior al observado en los tratamientos virales ($p<0.01$), un 56.5% ($n= 58$) y 60% ($n= 45$) de los genes que muestran regulación a las 24 y 72 horas, respectivamente, alcanzan unos niveles de expresión más de 2 veces superiores a los basales, en marcado contraste con el porcentaje de genes que, para los mismos criterios de comparación, se expresan en respuesta a la inoculación de IHNV atenuado (15%; $n=413$ a 24 h y 25%; $n= 591$ a 72 h) o activo (26%, $n= 570$ a 24 h y 35.5%; $n=428$ a 72h).

Sin embargo, utilizando el mismo criterio de selección (>2 FC, $p<0.01$), la magnitud de la respuesta transcriptómica, medida en función del número de genes que se expresan diferencialmente, muestra una clara diferencia entre los tratamientos viral (activo) y bacteriano, en la que aquel actúa como el desencadenante de unas respuestas inmunitaria, apoptótica y transcripcional considerablemente mayores (véase el análisis de las clases funcionales y las FIGURAS 14 a 19).

Considerando niveles de inducción genética del orden de 1-1.5 veces los basales (FIGURA 12), ambos tratamientos virales se asemejan considerablemente en el grado de inducción de la expresión genética, incluyéndose en la respuesta transcriptómica un elevado número de genes cuya expresión, por debajo de 1.5 FC ($p<0.01$), cuya funcionalidad puede adscribirse a programas de mantenimiento transcripcionales, metabólicos y homeostáticos de bajo nivel (véanse las TABLAS 7 y 8 y las FIGURAS 14 a 16). Aunque es de esperar una respuesta de menor magnitud en el caso de la expresión genética estimulada por la inoculación de la forma atenuada del virus IHN, la respuesta inmunitaria inicial específica de salmónidos desencadenada por la glicoproteína (G) altamente antigénica presente en la forma atenuada del virus IHN puede contribuir al patrón observado de expresión genética, tal y como se ha descrito en varios ensayos de vacunas de ADN dirigidas a rhabdovirus patógenos de peces [100, 149, 163].

De manera esperable, ambos tratamientos virales muestran un 10% de incremento en el número de genes regulados ($FC>2$) a las 72 de la inoculación vírica. De hecho, diversos estudios previos sobre la patogeneicidad de la necrosis hematopoyética en los salmónidos inciden en la dificultad de detección de títulos virales e indicadores internos de disfunción inmunitaria en el período inicial (24 horas) de infección. Superado el umbral de replicación y diseminación viral, las huellas de la actividad inmunitaria se observan en la mayoría de órganos hematopoyéticos [138, 139].

No debe olvidarse el marcado efecto específico de tejido que determina la dinámica del trasiego de las poblaciones celulares implicadas en la respuesta defensiva durante la inflamación, acompañada de perfiles característicos de expresión genética, dependientes del tejido afectado. De hecho, se ha sugerido [178] un papel determinante de las formas

intermedias del ARN de doble cadena, producidas por la replicación acelerada del IHNV a las 24 horas de la entrada en el organismo, en la regulación de la expresión del receptor Toll-like 3 (rtTLR3), a la vez impredecible y marcada por la fuerte dependencia que para su expresión tienen los ciclos celulares de recirculación inmunitaria influenciados por el ritmo de crecimiento viral y la maduración y activación leucocitaria del hospedador. Así, el patrón de expresión del rtTLR3 en respuesta a la infección por *Yersinia ruckeri*, un patógeno bacteriano Gram negativo de la trucha, resulta notablemente inferior, en términos de niveles de expresión genética, que el observado si la infección se produce por influencia viral [178], lo que se asemeja a la magnitud de la respuesta observada en este trabajo entre los tratamientos de LPS y las formas atenuada y activa de IHNV.

Aunque en ambos tratamientos se incrementa el número de genes regulados, los patrones de expresión son claramente diferentes. El número de genes regulados en respuesta a la inoculación de LPS lo son en tanto que su expresión mengua en ambos puntos de muestreo. Un efecto similar de regulación a la baja de la expresión genética se observó en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, utilizando la misma plataforma de micromatriz, con macrófagos maduros de trucha (*O. mykiss*) estimulados con LPS [75]. En el caso de las truchas expuestas a lipopolisacárido bacteriano, la magnitud del cambio en la expresión genética resulta muy elevado en genes cuya expresión se regula a la baja (TABLA 4). En cambio, los tratamientos virales estimulan una elevada inducción de actividad transcriptómica y apoptótica/ciclo celular con un peso similar, en términos de magnitud de la inducción al alza o a la baja de la expresión genética (TABLAS 5 y 6).

Ambos tratamientos virales muestran el mayor recuento de genes expresados diferencialmente si se comparan con experimentos similares almacenados en la base de datos asociada a la plataforma, lo que parece confirmar, considerando la extensa actividad transcripcional observada en el análisis ontológico de las categorías funcionales, la sugerencia de Abbas *et al.* (2006) referida al hecho de que la respuesta inmunitaria específica es capaz de movilizar un mayor número de actores celulares y desencadenar un remodelado transcripcional más extenso que el observado en la mayoría de respuestas fisiológicas.

TABLA 4. LISTA DE 20 GENES REGULADOS AL ALZA O A LA BAJA EN EL RIÑÓN CEFÁLICO DE LATRUCHA COMO CONSECUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS.

Se detalla la intensidad de la expresión (*Fold Change*, FC) al alza o a la baja de los 20 genes con mayor intensidad de expresión diferencial ($p < 0.01$, FDR > 0.01).

24 h REGULACIÓN AL ALZA				72 h REGULACIÓN AL ALZA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	P	Identidad clon	Nombre gen	FC	P
es03a11	Unknown-42	8.42	0.00	es03a11	Unknown-42	3.81	0.00
es04a01	Similar to rRNA (Mag2)	4.54	0.00	es03a02	Hypothetical.15	3.39	0.00
EXOR2_405	Transposase-4	3.16	0.00	es04a04	HMC class 1b antigen	3.17	0.00
EXOR2_406	NADH dehydrogenase subunit 5-L	2.76	0.00	EXOR2_406	High affinity immunoglobulin epsilon receptor alpha	2.73	0.00
es03a07	Ig mu heavy chain disease protein	2.73	0.00	CA387817	Nuclear protein N8937	2.37	0.00
es03a11	Ig kappa chain V-JH region B17-2	2.71	0.00	EXOR2_411	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1 precursor	2.15	0.00
EST1-JA_G09	Unknown-75	2.32	0.00	EXOR2_409	Beta-2-microglobulin-1	1.99	0.00
CA383544	Costomer epsilon subunit 1	2.25	0.00	EXOR2_409	60S ribosomal protein L12-2	1.80	0.00
es04a04	HMC class 1b antigen	2.24	0.00	HST0001_C05	Cell division control protein 42 homolog	1.72	0.00
EST1-JA_712	Transposase-59	2.12	0.00	EXOR2_409	HMC class 1 heavy chain-1	1.71	0.00
HX0002_D09	Prothymosin alpha	2.03	0.00	es03a04	S-aminopropylamine synthase	1.58	0.00
es03a09	Ig heavy chain V-B1 region H18	2.00	0.05				
EXOR2_D12	Hpa repeat.1	1.99	0.00				
HX0003_B06	ChenJ homolog subfamily C member 9	1.96	0.05				
HX0003_B08	Unknown-194	1.90	0.00				
es04a12	Envelope protein	1.79	0.00				
HX0002_H08	TATA-binding protein associated factor 2N	1.79	0.00				
CA387845	Cytochrome P450 3J2	1.76	0.00				
es03a01	Unknown-19	1.76	0.00				
es03b01	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-1	1.48	0.00				
24 h REGULACIÓN A LA BAJA				72 h REGULACIÓN A LA BAJA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	P	Identidad clon	Nombre gen	FC	P
EXOR2_D07	Enzymes related protein-1	-2.28	0.00	es04a10	Unknown-56	-2.04	0.00
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	-2.42	0.00	CA387844	Calmodulin-1	-2.13	0.00
EST1-JA_D08	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase-4	-2.49	0.00	es03a04	Murine metalloproteinase-9	-2.21	0.00
EXOR2_H06	CC chemokine SCYA110-2	-2.55	0.00	HCT0001_D07	Actin, alpha skeletal 1	-2.38	0.00
EST1-JA_H56	Transcription factor jun-B-1	-2.89	0.00	es01a03	DeltaE protein 1	-2.37	0.00
es03a08	Transaldolase	-2.91	0.00	es01a02	Thyroxine beta-4-1	-2.73	0.00
EXOR2_H01	Unknown-100	-2.91	0.00	EXOR2_D05	Actin, cytoplasmic 2	-2.78	0.00
es02a08	Serine protease-like protein-1	-2.97	0.00	EST1-JA_D08	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase-4	-3.14	0.00
EST1-JA_A09	Serine protease-like protein-2	-3.96	0.00	EST1-JA_B03	Hypothetical.14b 44	-3.16	0.00
CA371363	Glucose-6-phosphate isomerase-1	-4.35	0.00	CA382384	CCAAT transducer binding protein beta	-3.22	0.00
HST0001_D08	Beta-globin	-4.46	0.00	CA374193	Chemokine receptor CXCR4	-3.71	0.00
es04a05	Glutathione peroxidase-gutierrezal	-4.54	0.00	es04a08	Actin, alpha skeletal 5	-3.81	0.00
es01a04	Unknown-11	-4.17	0.00	KY612_F01	Unknown-224	-4.21	0.00
EXOR2_D05	Murine metalloproteinase 9.2	-4.63	0.00	es01a01	DNA-binding protein inhibitor ID-1	-4.64	0.00
es01a10	Toll-like protein (myelopoietin-1)	-4.69	0.00	es02a08	Serine protease-like protein-1	-4.64	0.00
CA382384	CCAAT transducer binding protein beta	-7.36	0.00	EST1-JA_A09	Serine protease-like protein-2	-5.52	0.00
es03a04	Murine metalloproteinase-9	-7.44	0.00	EXOR2_H01	Murine metalloproteinase-13	-5.88	0.00
EXOR2_G12	Toll-like protein (myelopoietin-2)	-9.26	0.00	EXOR2_H01	Unknown-100	-12.08	0.00
EST1-JA_B03	Hypothetical.14b 44	-14.01	0.00	es01a10	Toll-like protein (myelopoietin-1)	-12.97	0.00
EXOR2_H01	Murine metalloproteinase-13	-17.18	0.00	EXOR2_G12	Toll-like protein (myelopoietin-2)	-13.47	0.00

LPS

TABLA 5. LISTA DE 20 GENES REGULADOS AL ALZA O A LA BAJA EN EL RIÑÓN CEFÁLICO DE LATRUCHA COMO CONSECUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA FORMA ATENUADA DEL VIRUS IHN.

Se detalla la intensidad de la expresión (*Fold Change*, FC) al alza o a la baja de los 20 genes con mayor intensidad de expresión diferencial ($p < 0.01$, FDR > 0.01).

atIHNv

24 h REGULACIÓN AL ALZA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	P
EX082_B10	Hemoglobin beta chain	19.46	0.000
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	11.19	0.000
KVkm2_A01	Unknown-219	10.93	0.000
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	10.93	0.000
EX084_A03	Carbonic anhydrase	10.57	0.000
CA36554	Huntingtin	8.52	0.000
EX082_B12	RING finger protein 103	8.34	0.000
HST0001_C07	Unknown-213	7.60	0.000
ENH2_E07	Unknown-3	7.04	0.000
EX084_G09	Histone H14	6.94	0.000
EX084_H06	Alpha-globin I-3	6.63	0.000
u001e09	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(I)	4.94	0.000
HK0002_G02	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial precursor	4.49	0.000
HK0001_C08	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-3	4.14	0.000
CA361101	Regulator of G-protein signaling I-2	4.03	0.000
est0211	Ig kappa chain V-JV region B17-2	3.19	0.000
CA343473	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	3.00	0.000
est04001	Similar to rRNA (Vang2)	2.69	0.000
HST0001_D02	ATP-binding cassette, sub-family F, member 2	2.58	0.000
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	2.56	0.000
24 h REGULACIÓN A LA BAJA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	P
est01e10	Toll-like protein (nephrosin)-1	-2.60	0.000
est03e04	Matrix metalloproteinase-9	-2.70	0.000
HST0001_C03	Plasminogen precursor-2	-2.72	0.000
KVkm2_H10	Unknown-227	-2.76	0.000
CA34628	CCAAAT enhancer binding protein beta	-3.05	0.000
EX082_D05	Matrix metalloproteinase 9-2	-3.07	0.000
est0208	Serine protease-like protein-1	-3.21	0.000
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	-3.25	0.000
HK0003_C11	Tropomyosin alpha 3 chain-I	-3.34	0.000
u003e06	Parvalbumin alpha-3	-3.50	0.000
CA370329	Lysosome C precursor	-3.90	0.000
HK0003_C08	Parvalbumin alpha-2	-3.99	0.000
u00401	Myosin light chain 2-2	-4.13	0.000
u002e02	Myosin heavy chain, skeletal, adult I-1	-4.30	0.000
Here0002_A07	Meallothionein-L	-4.49	0.000
HK0003_E07	Myosin light chain 2-1	-4.49	0.000
HK0002_D07	Unknown-172	-5.04	0.000
EX081_A03	Meallothionein A	-5.05	0.000
est01e04	Unknown-11	-6.17	0.000
HK0002_F05	Myosin heavy chain, skeletal, fetal	-7.31	0.000
72 h REGULACIÓN AL ALZA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	P
est03e08	Hypothetical-fish 36	3.06	0.000
CA343473	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	2.98	0.000
EX082_G11	Stannocalcin-I	2.93	0.000
EX081_B02	Hypothetical-fish 34	2.84	0.000
KVkm2_H07	Unknown-226	2.77	0.000
EX083_A01	Unknown-103	2.73	0.000
CA363723	Cyclin C	2.64	0.000
EX084_H01	Unknown-132	2.63	0.000
est04e02	Unknown-53	2.61	0.000
HK0002_G04	Fructose-bisphosphate aldolase A	2.45	0.000
EST1-3A_H03	Unknown-76	2.42	0.000
CA358107	Econucleoside triphosphate diphosphohydrolase I	2.42	0.000
CA378361	Ubiquitin ligase SIAH1	2.40	0.000
HK0001_H12	Unknown-162	2.35	0.000
CA342204	TNF receptor associated factor 3	2.33	0.000
EST1-3A_H05	Adenosine deaminase 3	2.31	0.000
est04f10	Hypothetical-fish I	2.30	0.000
KVkm2_H11	Unknown-228	2.30	0.000
HK0001_A11	Hypothetical-fish I1	2.28	0.000
CA355893	DnaJ homolog subfamily B member 2	2.26	0.000
72 h REGULACIÓN A LA BAJA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	P
EX082_G02	Profilin-1	-2.13	0.000
EX082_F12	60S ribosomal protein L7a-1	-2.13	0.000
est02g11	Cytochrome c oxidase subunit I-1	-2.14	0.000
HK0001_H03	60S ribosomal protein L26	-2.14	0.000
HK0003_A12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-1	-2.16	0.000
EX081_H12	NADH dehydrogenase subunit 4	-2.23	0.000
HK0002_D07	Unknown-172	-2.24	0.000
EX083_G03	60S acidic ribosomal protein P2	-2.31	0.000
EX082_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	-2.34	0.000
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	-2.37	0.000
ENH2_H06	Unknown-5	-2.46	0.000
est04e05	Ferritin heavy chain-I	-2.54	0.000
P_46	ATPase 6	-2.56	0.000
u002e07	Cytochrome c oxidase subunit II	-2.64	0.000
KVkm2_H10	Unknown-227	-2.67	0.000
EST1-3A_H07	Cytochrome b-1	-2.86	0.000
est02h09	Nonhistone chromosomal protein HMG-17	-3.07	0.000
CA370329	Lysosome C precursor	-3.08	0.000
EX081_C02	Unknown-83	-3.44	0.000
EX082_G01	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2	-3.56	0.000

El riñón reactivo (II): respuestas específicas y comunes a las infecciones viral y bacteriana

La evaluación de la respuesta transcriptómica derivada de la exposición a LPS y las agresiones virales se evaluó utilizando aquellos genes cuya expresión difería significativamente ($p < 0.01$) en al menos 5 de 6 experimentos de los 155 presentes en la base de datos asociada a la plataforma de micromatriz, a fin de destacar aquellos genes que manifestasen una coexpresión consistente (prueba exacta de la p de Fisher < 0.01) en uno o ambos tratamientos. De resultas, se identificaron un total de 49 genes de los que una gran parte mostraron una respuesta direccional representativa de los estímulos bacterianos y virales (FIGURAS 14 a 18).

Los genes regulados por la exposición a la forma atenuada del IHN se destacan por su mezcla funcional ontológica, una suerte de efecto combinado de los tratamientos viral activo y bacteriano, lo que sugiere la participación de mecanismos diferenciados, tanto específicos como inespecíficos, en la activación mediada por el virus atIHN. La globina alfa, por ejemplo, muestra una regulación a la baja durante la exposición al LPS; su respuesta frente a la exposición viral indica un patrón bimodal inverso basado en la potenciación de la expresión a las 24 h para la forma atenuada (11 FC) seguida de una regulación a la baja (-2.37 FC) de la misma 3 días después de la infección viral, que, en el caso de la expresión inducida por la forma activa del virus IHN se produce a las 24 h de la inoculación, para después aumentar hasta un valor de 15 FC, representativo de una fuerte inducción del gen.

Tanto la exposición a LPS como a atIHN originan patrones similares de expresión genética para los genes responsables de la producción de isomerasa de la glucosa 6 fosfato, anexina 1, diversas nefrosinas, calmodulina 1, CEBP beta, proteína-1 rica en cisteínas, citocromo oxidasa y citocromo p-450. La mayoría de los genes expresados diferencialmente pertenecen a categorías inmunitarias o relacionadas con la respuesta inflamatoria. Uno de los efectos más característicos de la exposición al LPS parece ser la supresión de las proteasas del riñón cefálico, nefrosinas y metaloproteinasa de matriz como la MMP9. En el caso de las nefrosinas, los valores iniciales de FC se mantienen a la baja a las 24 horas de -6.69 para la nefrosina 1 y -9.26, para la nefrosina 2, disminuyendo sus valores hasta -12.97 y -13.47, respectivamente, a las 72 horas), en contraste con el efecto provocado por la infección debida al tratamiento viral, que potencia su expresión a las 72 h, con valores de 1.44 y 2.98/3.7 para las formas atenuada y activa, respectivamente.

Los genes que codifican las proteínas serina proteasa-like 1 y 2 (spl1 y spl2), precursores del factor D, implicado en la activación del sistema del complemento, se encuentran regulados a la baja en todos los tratamientos a las 24 horas de la inoculación

intraperitoneal. Aunque la supresión continúa 3 días después en los animales expuestos a LPS, en los sometidos a agresión viral se observa un aumento significativo en los niveles de expresión a las 72 horas (de 1,32 FC para ambas tipos de proteínas en el caso de la forma atIHNV y de 6.4 y 3.75 FC para la forma activa del virus). Diversos genes relacionados con el citoesqueleto, incluyendo ARP2/3, actinas y profilinas 1 están regulados a la baja tanto por LPS como por atIHNV, mientras que la forma activa del virus induce regulación al alza 3 días después de la infección experimental.

Ambos tratamientos virales parecen inducir una respuesta inmunitaria típicamente adaptativa (FIGURAS 15-16 y TABLA 8). Las vías de carga implicadas en el procesamiento y presentación de antígenos incluyen la expresión diferencial de los linajes linfóide y mieloide, así como la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I, a tenor de lo observado en la regulación de varios de los genes implicados en este tipo de respuestas, como el coactivador OBF-1, específico de linfocitos B y que resulta esencial para la respuesta de las células B frente a antígenos y la formación de centros germinales, la conservación de los linfocitos B BTK, neutrófilos HCK y vías de señalización para el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, el procesamiento de antígenos mediado por catpsinas y la adenosina desaminasa ADAR1 específica de ARN inducible por interferón (TABLAS 5 y 6).

De manera previsible, la vía de transducción del factor de transcripción NF-kappa-B (NFkB) parece sufrir una regulación de severa a moderada en el riñón cefálico de las truchas infectadas. De hecho, el factor NFkB se considera un factor de transcripción pleiotrópico capaz de expresarse en numerosos tipos celulares sometidos a eventos inflamatorios. Tanto las formas atenuada como activa mostraron regulación diferencial del inhibidor de quinasa kappaB gamma, miembro de una familia de proteínas implicadas en la inactivación del factor NFkB citoplasmático [179] que se expresan de manera muy activa en las células infectadas con virus [180].

El brazo anafiláctico de la activación del sistema del complemento, por su parte, actúa de manera doble a través de su receptor C3a/C3aR, ya sea como un mediador quimiotáctico o, simultáneamente, como un regulador de la recirculación y movilización de las células hematopoyéticas precursoras (véase más abajo). En los peces tratados con LPS y las formas atenuada y activa del virus IHN, tanto las proteasas vinculadas con el sistema del complemento (spl) como diversos componentes proteolíticos de su principal mediador, la proteína C3 mostraron una clara expresión diferencial. Sin embargo, la mayor expresión de los componentes del sistema del complemento evaluados en la micromatriz muestra una fuerte dependencia de la invasión viral en el riñón cefálico (véase el material adicional anexo).

FIGURA 14. ANÁLISIS ONTOLÓGICO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LPS SOBRE EL TRANSCRIPTOMA DEL RIÑÓN CEFÁLICO DE LATRUCHA.

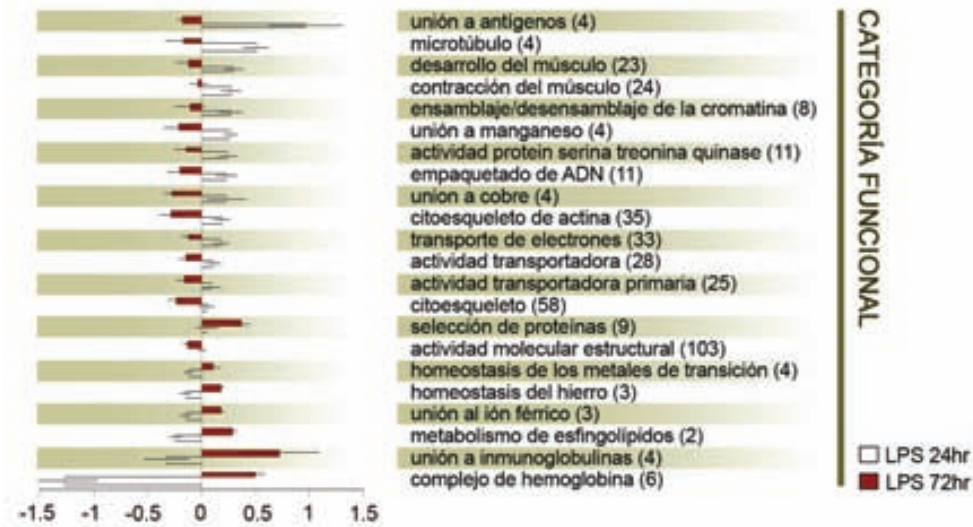
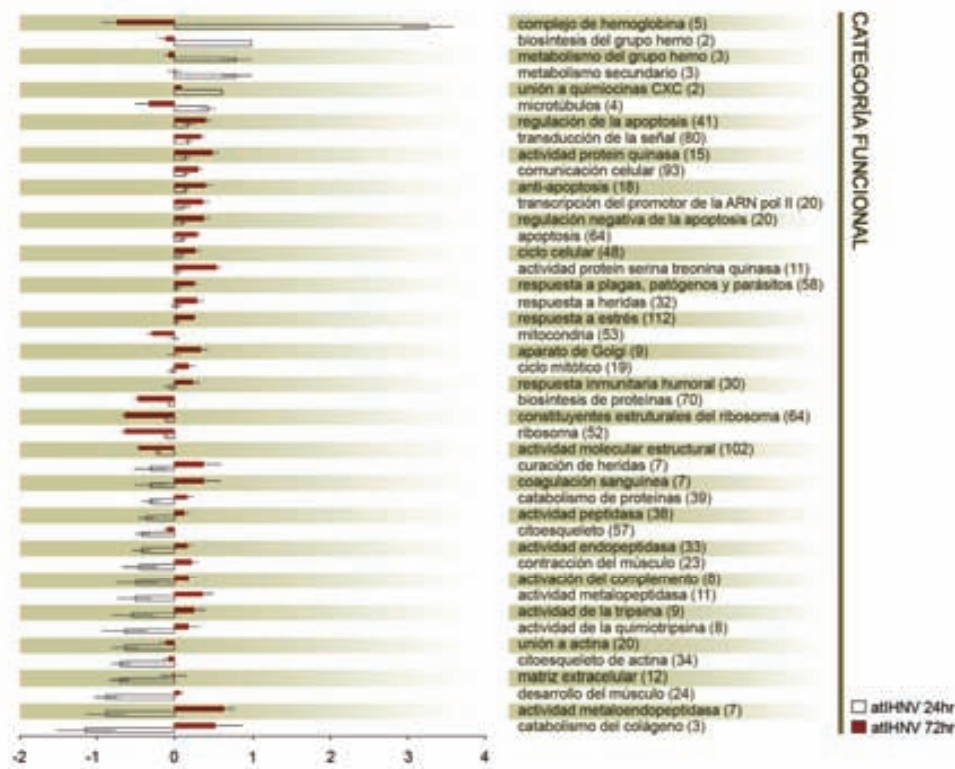
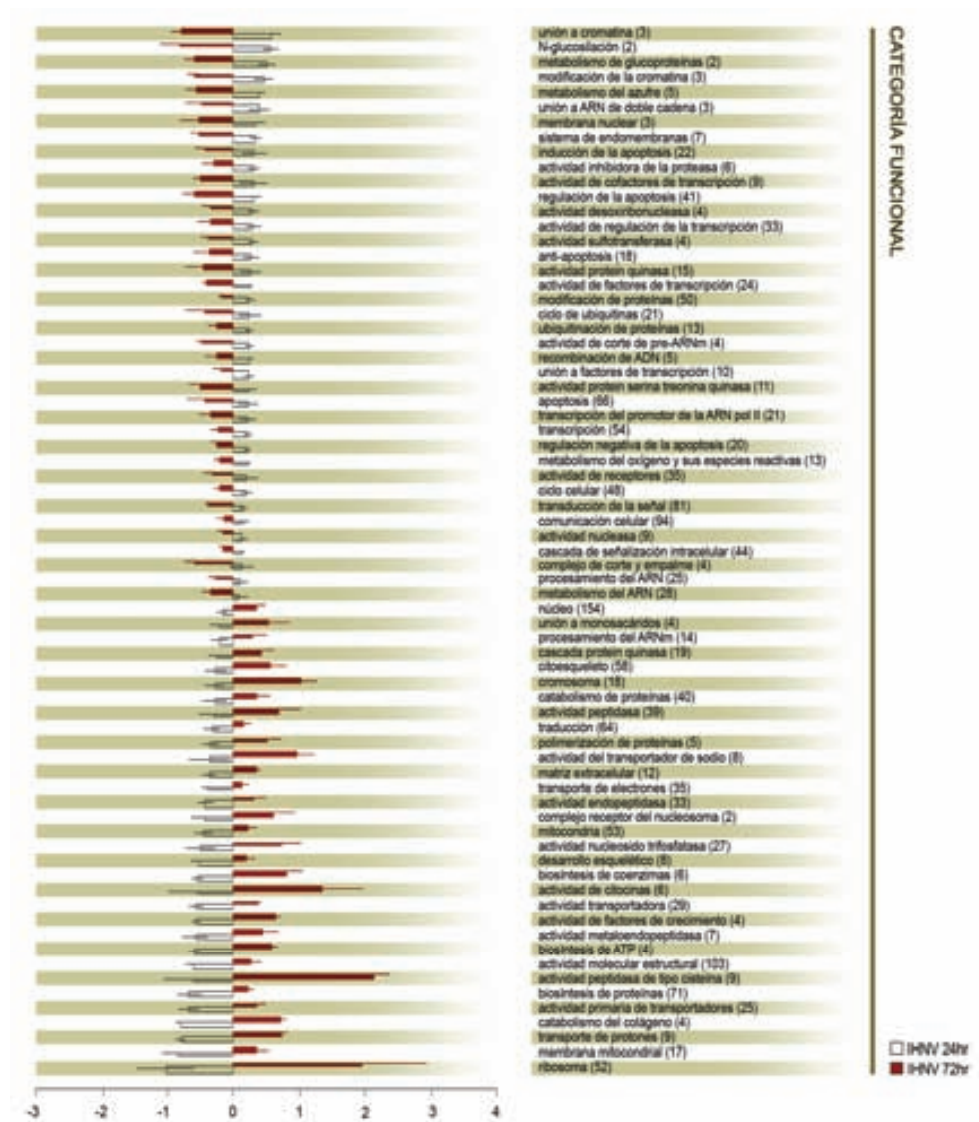


FIGURA 15. ANÁLISIS ONTOLÓGICO DEL EFECTO DEL aIHNV SOBRE EL TRANSCRIPTOMA DEL RIÑÓN CEFÁLICO DE LA TRUCHA.



En ambas figuras se representan las categorías funcionales asociadas a los genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) cuya representación se consideró significativa (prueba de comparación de muestras independientes, $p < 0.05$). Los datos indican la media de la intensidad de la expresión (FC) $\pm$ el error estándar.

FIGURA 16. ANÁLISIS ONTOLÓGICO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL VIRUS IHN SOBRE EL TRANSCRIPTOMA DEL RIÑÓN CEFÁLICO DE LA TRUCHA.



Se representan las categorías funcionales asociadas a los genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) cuya representación se consideró significativa (prueba de comparación de muestras independientes, $p < 0.05$). Los datos indican la media de la intensidad de la expresión (FC) $\pm$ el error estándar.

El riñón reactivo (III): respuestas modales a la infección

Tanto la exposición a LPS bacteriano como a las versiones atenuada y activa del virus IHN desencadenan una serie de respuestas habituales, casi arquetípicas, durante la reacción defensiva a la intrusión de inmunógenos en los vertebrados. Se discuten a continuación las variaciones en la intensidad de la expresión de los transcritos implicados en la remodelación y escultura de la matriz extracelular, la respuesta inmunitaria innata (sistema del complemento), de fase aguda (proteínas HSP) y específica, así como del metabolismo de la hemoglobina en un órgano, como el riñón cefálico, de marcado carácter hematopoyético.

Actividad proteasa en el estroma y remodelación de la matriz extracelular en el riñón cefálico de la trucha

Aunque la función precisa de las nefrosinas, consideradas metaloproteinasas de astacina [181] continúa sin resolverse satisfactoriamente, sí se ha demostrado su participación en los estadios tardíos de la diferenciación de los granulocitos, así como en los procesos de migración celular y/o infiltración tisular en carpas (*Cyprinus carpio*) y danios cebra (*Danio rerio*) sometidos a infecciones experimentales [182, 183]. En las truchas inoculadas con LPS, ambos genes codificantes para las nefrosinas mostraron una severa regulación a la baja (entre -6 y -10 FC) en ambos puntos muestrales (TABLA 4). El resto de metaloproteinasas (MMP 9-2, 13) también mostraron un marcado descenso en sus niveles de expresión (inferior a -6 FC) en truchas inoculadas con LPS en ambos puntos muestrales. La infección experimental con formas atenuadas y activas del virus IHN siguió un patrón similar (de -1.3 a -3 FC; véanse las TABLAS 5 y 6 y el material adicional anexo), lo que sugiere un decremento en el movimiento leucocitario asociado, favorecido por la remodelación de la matriz extracelular.

En los mamíferos, la MMP9 participa en el procesamiento de la señalización y maduración de las células dendríticas, así como en la activación de neutrófilos y células hematopoyéticas precursoras indiferenciadas mediada por la interleucina IL-8 [184, 185]. Aunque la existencia de células dendríticas funcionales completamente diferenciadas en los peces todavía está por demostrar [186, 187], la respuesta leucocitaria que, en los mamíferos, dirige la IL-8 y la MMP 9 parece cuando menos conservada en los teleósteos, aún cuando quedan por determinar el patrón exacto de su distribución en los diversos órganos inmunitarios, la intensidad de la regulación genética a la que se someten durante la inflamación y el papel exacto que juega la IL-8 en el riñón cefálico, propensa a la volubilidad interespecífica [188, 189].

Las propiedades quimiotácticas de la IL-8 en los leucocitos pueden amplificarse si se produce reclutamiento de neutrófilos por efecto de quimioquinas CXC. Nuestros datos muestran una moderada (-3.71 FC) regulación a la baja del gen CXCR4 en la trucha, del que se sabe que la proteína que codifica forma, unida al TNF alfa, diversas proteínas HSP y la GDF5, un complejo de activación involucrado en la transducción de las señales desencadenadas por la exposición a LPS [190] y que actúa de manera sinérgica con el factor de estimulación de colonias (CSF) que regula la movilización de las células madre hematopoyéticas [190, 191].

Es sabido que la familia de genes que codifica las proteínas MMP resulta inducida en macrófagos de trucha estimulados con LPS [75]. En un análisis transcriptómico a gran escala dirigida a valorar la actividad de las metaloproteinasas de la carpa (*C. carpio*) se detectaron grandes cantidades de transcritos de MMP9 en diversos órganos hematopoyéticos, especialmente el riñón cefálico y el bazo [192, 193]. Es de esperar, por tanto, que en los peces las metaloproteinasas actúen de manera parecida a como lo hacen sus homólogos en los mamíferos, mostrando una regulación al alza toda vez que actúen sinérgicamente LPS y TNF alfa durante su estimulación. En consonancia con los bajos niveles de expresión genética de las MMP observado a las 24 posteriores a la inoculación, no se detectó una expresión significativa del transcrito de TNF alfa en las truchas tratadas con LPS, en marcado contraste con las afectadas por la infección viral. Tanto la mieloperoxidasa, una hemoproteína lisosómica común en fagocitos mononucleares, como el TNF alfa mostraron una regulación al alza 24 horas después de la inyección con la forma atenuada de IHNV (2.3 y 2.6 FC, respectivamente). En los animales infectados con la forma activa del virus, no obstante, la expresión del TNF alfa permanece inactiva (véase más abajo). La moderada regulación al alza del TNF alfa 3 días después de la inoculación con atIHNV sugiere, de acuerdo con el modelo descrito de estimulación de macrófagos mediada por LPS [75], el desarrollo de una respuesta proliferativa mieloide en el principal órgano hematopoyético de la trucha.

La timosina beta 4 (TBX-4) se considera el principal péptido intracelular secuestrador de actina G en los mamíferos [194]. Las funciones atribuidas a su forma extracelular incluyen la inducción de la homeostasis, reparación tisular, quimiotaxis, inducción de metaloproteinasas, inhibición de los procesos inflamatorios en coparticipación con granulocitos y regulación de la proliferación de las células madre hematopoyéticas [195]. No sorprenden, por tanto, ni la regulación a la baja (más de 2FC) del gen para la TBX-4 en el riñón de la trucha a las 72 horas de la exposición intraperitoneal a LPS (TABLA 3), ni la fuerte regulación al alza (más de 5-7 FC) en las truchas infectadas con IHNV y que sufren los efectos incipientes de un síndrome necrótico-hemorrágico. Todo ello sugiere que, en los peces, como en los mamíferos, los efectos pleiotrópicos de la proteína TBX-4 vienen condicionados por el remodelado del citoesqueleto de actina intracelular y/o componentes de la matriz extracelular [196].

La moderada/severa regulación a la baja de genes como los que codifican las proteínas

CXCR4 (-3.7 FC) a las 24 horas de la exposición a LPS, así como a las metaloproteinasas (menos de -6 FC) y TBX-4 (menos de -2 FC) en ambos puntos muestrales sugiere un escenario de reactividad retardada a los efectos de la exposición a LPS bacteriano que probablemente afecta a la recirculación y trasiego de células hematopoyéticas en el riñón cefálico de la trucha. De hecho, el propio riñón muestra niveles disminuidos de la remodelación del estroma y la matriz extracelular en los animales tratados con LPS, según se deduce de la regulación a la baja de la expresión de los genes que codifican la actina, metaloproteinasas, nefrosinas y timosina beta 4. Sin embargo, a los 3 días de infección por IHNV, las huellas transcriptómicas dejadas por la replicación viral en el riñón cefálico revelan un cambio de orientación inmunitaria dirigido hacia una activación, probablemente deficiente, del brazo adaptativo, conjuntamente con una fuerte respuesta hemostática acoplada a la remodelación de la matriz extracelular. Así, la diseminación sistémica de la infección viral inhibe claramente la expresión de TNF alfa, MHC de tipo I y varios marcadores de diferenciación y ciclo celular característicos de macrófagos (véanse las tables 3, 4 y la discusión posterior), dando paso a una respuesta inmunitaria reforzada en la que el MHC de tipo II, las inmunoglobulinas y la acción de las MMP/TBX-4 juegan un papel relevante.

Respuesta del sistema del complemento a la infección viral y bacteriana en el riñón cefálico de la trucha

A diferencia del hígado, el riñón cefálico de los teleósteos no debe considerarse un órgano reactivo de fase aguda y, por tanto, su respuesta transcriptómica temprana a la estimulación intraperitoneal con LPS difiere de la de órganos especializados, como el hígado, en la reactividad inmediata. Sin embargo, la dinámica de la respuesta inmunitaria sí resulta de interés en aquellos órganos que, como en el caso del riñón cefálico, actúan no sólo como un crisol para la imprimería inmunitaria de diversas subpoblaciones leucocitarias, sino también como nexo capital en la compleja pero aún poco estudiada red de comunicación neuroinmunoendocrina en los peces. En este sentido, nuestros resultados sugieren una diferencia crucial entre los tratamientos viral y bacteriano en lo tocante a la reacción transcriptómica renal: en los animales infectados con las formas atenuada y activa de IHNV, tanto las proteasas de serina (spl/Factor D) asociadas al complemento como los receptores de anafilatoxinas (C3aR) mantiene una regulación al alza a las 24 y 72 horas de la infección, cuya máxima expresión (más de 5-6 FC) se observa únicamente en los animales infectados con IHNV.

En las truchas inoculadas con LPS se observó la regulación a la baja (-3 y -4 FC a 24h y 72 h, respectivamente) de las proteasas de serina asociadas al complemento (spl1 y spl2), precursoras del Factor D e involucradas en la activación de la vía alternativa del sistema del complemento [197, 198]. Asimismo, los transcritos del receptor C3aR se encuentran regulados al alza en ambos puntos de muestreo en los animales infectados con atIHNV, así como a las 24 horas en los infectados con la forma activa del virus (en nuestros

resultados se aprecia una ligera regulación a la baja del C3aR, de -1.5 FC, en los animales infectados con IHNV a las 72 horas). En el tercer día de infección, la respuesta a la inoculación de IHNV consiste en una mezcla de respuestas inmunitarias adaptativas (MHC, Inmunoglobulinas), innatas (C3aR, spl, lisozima C) y relacionadas con el estrés (HSP70, hemostasia) en el seno de una remodelación de la matriz mediada por metaloproteinasas. Por lo tanto, como sugieren el presente y otros estudios realizados en mamíferos [199-201], la expresión de C3a/C3aR contribuye probablemente a la movilización y diferenciación de células hematopoyéticas precursoras en respuesta a una activación inmunitaria, generalizada y fisiológicamente estresante, debida a la exposición a un patógeno sumamente virulento.

De hecho, en los mamíferos se ha demostrado la relación de varios de los subproductos de la escisión del componente C3 del sistema del complemento con la respuesta de las células precursoras hematopoyéticas mediada por CXCR-4 [201]. La moderada regulación a la baja de CXCR-4 observada en los animales tratados con LPS, y al alza en los infectados con atIHNV (mayor de 1.5 FC, véase el material adicional), junto con la fuerte regulación al alza del receptor de C3a en los peces infectados con la forma activa del virus sugiere, por tanto, la conservación de las respuestas funcionales mediadas por el complemento en el tejido hematopoyético renal. No hay que olvidar, sin embargo, la complejidad, hasta la fecha irresuelta, de la dinámica y trasiego de células inmunitarias hematopoyética y diferenciadas en los teleósteos.

Respuesta inmunitaria específica a la infección viral y bacteriana en el riñón cefálico de la trucha

Los genes implicados en la construcción del sistema de inmunoglobulinas (Ig) muestran una dinámica variable entre tratamientos (véanse las TABLAS 7 y 8). Los transcritos del receptor Fc gamma de Ig (CD46) aumentan en la respuesta tardía a la inyección de lipopolisacárido, mientras que los pertenecientes a la cadena pesada de la IgM (sitios en las células B) y los que se adscriben a la región B17-2 de la cadena kappa V-IV de las Ig (involucrados en la presentación de antígenos) muestran un incremento dramático. El tratamiento con la forma atenuada del virus IHN arroja resultados similares: la regulación de la expresión genética es parecida para los últimos, con la expresión mantenida de los transcritos de IgM a las 72 horas de la infección, y la supresión de la expresión del gen codificante de Ig kappa. Asimismo, los niveles de expresión genética de CD64 menguan una vez inoculado el virus atIHN, mientras que la forma activa de IHNV suprime la expresión de los tres genes mencionados en la fase temprana de la infección, regulándolos al alza (1.7, 10 y 5.4 FC, respectivamente) en los estadios tardíos de la infección inicial. Es probable que todo ello sea reflejo bien de la migración de los leucocitos a las zonas de infección e inflamación primarias y/o del reclutamiento diferencial de subpoblaciones leucocitarias hacia el riñón cefálico infectado en ambos tratamientos virales.

TABLA 7. GENES COMUNES A LOS TRATAMIENTOS VIRAL Y BACTERIANO.

Id. clon	Nombre gen	LPS (FC)		aIHNV (FC)		IHNV (FC)	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
CA384637	60 kDa heat shock protein-1	-	1.47	1.18	1.25	-1.25	1.29
eu03111	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-1	1.68	1.41	1.17	1.32	1.27	1.34
utu01804	Actin, alpha virelata 2	-	-1.31	-1.48	1.18	1.52	1.29
utu01811	Actin, alpha virelata 3	1.67	-1.64	-1.47	-1.25	1.34	1.42
utu04004	Actin, alpha virelata 4	2.00	-1.30	-1.38	-	1.61	1.37
EST1-3A_H05	Adenosine deaminase 3	1.57	-	1.14	2.31	3.21	-6.23
HST0001_D04	Alpha-globin 1-2	-1.30	-	10.93	-2.37	-3.11	15.48
CA364941	Anexin A1-1	-2.08	-1.79	-1.36	-1.46	-1.26	1.68
F_122	ABP2/3 complex 21 kDa subunit	-	-1.92	-1.41	-1.23	-1.57	1.33
P_10	Aryl hydrocarbon receptor	1.35	-	1.32	1.80	1.47	-2.32
CA367764	Calmodulin-1	-	-3.13	-1.26	-1.29	-1.73	1.49
CA348284	CCAAT/enhancer binding protein beta	-7.36	-3.22	-3.05	-	-2.16	1.76
CA363762	Cell death activator CID-8	1.32	-	1.35	1.74	2.08	-2.53
CA383544	Costomer epsilon subunit 1	2.25	-	1.20	1.43	1.24	1.53
HK0003_G01	Creatine kinase, M-2	-	1.61	-2.02	1.32	-1.54	-1.40
HK0002_G02	Creatine kinase, sarcosomic mitochondrial precursor	-1.68	-	4.49	-1.54	-1.82	1.20
CA358998	Cysteine-rich protein 1	-1.75	-2.71	-1.37	-1.51	-1.62	2.75
utu01804	Cytochrome oxidase subunit III-2	-	-1.36	-2.55	-2.04	-2.08	2.33
EXOB3_C10	Cytochrome P450 2K4-2	1.60	1.34	1.20	-1.44	-	-1.14
utu01806	Deoxynucleosidase gamma precursor	1.50	-	-1.19	-1.26	1.46	-1.31
utu01809	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(I)	-1.62	1.42	4.94	-1.41	-1.96	-
HK0001_D12	Estrogen-responsive B box protein	1.29	-	-1.22	-1.14	2.11	-1.38
HK0002_G04	Fructose-bisphosphate aldolase A	1.65	-	1.25	2.45	3.59	-4.80
HK0001_A11	Fumarate hydratase, mitochondrial precursor	-	-1.58	-1.12	-1.21	1.43	-1.25
CA371363	Glucose-6-phosphate isomerase-1	-4.35	-1.68	-1.40	-1.15	-1.37	2.81
EXOB3_H05	Glucose-6-phosphate isomerase-2	-2.07	-	-1.51	-2.08	-1.77	1.81
CA364403	Heat shock 27 kDa protein-1	1.44	-	1.21	1.61	2.49	-2.43
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	-2.42	-	11.19	-1.82	-2.93	2.87
EXOB3_B10	Hemoglobin beta chain	-1.86	-	19.46	-2.07	-2.45	9.58
EXOB4_C11	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor 1 precursor	-	2.15	-1.70	-1.73	-1.88	1.71
eu02211	Ig kappa chain V-IV region B17-2	2.71	-	3.19	-2.07	-4.84	10.06
eu02207	Ig mu heavy chain disease protein	2.73	-	2.38	1.56	-2.14	5.44
EXOB3_D05	Matrix metalloproteinase 9-2	-6.63	-2.62	-3.07	1.71	-1.93	3.20
EXOB3_H01	Matrix metalloproteinase-13	-17.18	-5.88	-1.32	2.06	1.44	4.34
eu03004	Matrix metalloproteinase-9	-7.44	-2.31	-2.70	1.68	-2.92	5.91
EXOB3_P09	MHC class I heavy chain-1	-	1.71	-1.43	-1.20	-2.87	-3.02
P_4	Myeloperoxidase	1.55	-	1.23	1.88	2.32	-3.19
EXOB3_E09	N-myc downstream regulated protein-2	-1.48	1.67	1.16	1.21	-	-1.32
EXOB3_G02	Profilin-1	-	-2.04	-1.79	-2.13	-2.12	4.00
eu02208	Serine protease-like protein-1	-2.97	-4.64	-3.21	1.32	-1.84	6.41
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	-3.96	-5.52	-3.25	1.32	-2.91	3.75
HK0002_H08	TATA-binding protein associated factor 2H	1.79	-	-1.32	-1.32	1.71	-1.32
eu01802	Thymosin beta-4-1	-	-2.73	-2.03	-1.32	-1.47	5.17
eu01810	Toll-like protein (nephrosin)-1	-6.69	-12.97	-2.60	-1.07	-3.11	2.98
EXOB3_G12	Toll-like protein (nephrosin)-2	-8.26	-13.47	-1.67	1.44	-1.75	3.70
Hem0002_E09	Transposase-56	2.06	1.96	1.42	1.30	2.04	1.67
EST1-3A_F12	Transposase-59	2.12	1.62	1.38	1.23	-	1.20
EXOB3_F11	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-18 kDa	-	1.47	1.48	1.68	1.61	-1.84

GENES COMUNES

Se indican aquellos genes expresados al menos en 5 de 6 experimentos, comparados con la base datos asociada a la plataforma de micromatriz y seleccionados en función de su especificidad al tratamiento (prueba exacta de Fisher, $p < 0.01$). Los valores se expresan en función de la intensidad de la expresión (FC).

También la expresión del gen que codifica la proteína COP, implicada en la formación y maduración de los fagosomas [202] resulta inducida en todos los tratamientos. Otro componente mayoritario de la respuesta inmunitaria específica, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I, responsable de la presentación de antígenos en las células dendríticas, muestra una activación tardía bajo los efectos del LPS y una supresión de la expresión genética en los tratamientos virales (inferior a -3 FC. En cambio, el MHC II se muestra regulado al alza (con una inducción de 4.4 FC) a las 72 horas en los peces infectados con la forma activa del virus IHNV.

En los peces, como en los mamíferos, la interacción de las variantes del complejo mayor de histocompatibilidad con los receptores de las células T (TCR) parece ser la

responsable de la activación de subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T colaboradores (Th) [203]. La presencia de homólogos del MHC, varias proteínas asociadas a la presentación de antígenos, microglobulina beta 2 y marcadores CD8+ y CD4+ (distintivos de las células CTL y Th, respectivamente) en la trucha y otras especies de teleósteos [204, 205], refuerza la hipótesis, razonable por otra parte, de la conservación de las vías del procesamiento de los antígenos en los mal llamados vertebrados primitivos. Sin embargo, y como se ya reiterado en diversas ocasiones, el tráfico, recirculación y comunicación celulares de los estados inmunitarios activado y quiescente distan de estar descritos con garantías en los teleósteos. De hecho, la translación del modelo experimental inflamatorio murino acarrea diversas dificultades, metodológicas y conceptuales, la menor de las cuales es la distancia interespecífica entre mamíferos terrestres y vertebrados acuáticos, origen de la elevada variabilidad comentada respecto al umbral mínimo de activación inmunitaria que parece común en los peces y que, con toda seguridad, no es ajena la coevolución entre hospedador y patógeno en un medio, como el acuático, proclive a favorecer cargas bacterianas mayores que las terrestres.

TABLA 8. GENES ESPECÍFICOS DE LOS TRATAMIENTOS VIRALES.

Id. clon	Nombre gen	aIHNV (FC)		IHNV (FC)	
		24 h	72 h	24 h	72 h
CA387866	Arachidonate 5-lipoxygenase-2	1.16	1.34	1.27	1.03
CA384553	B-cell-specific coactivator OBF-1	1.48	1.76	1.37	-1.09
CA343473	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	3.00	2.98	5.35	-1.50
BNH2_F03	Cathepsin K-1	-2.30	1.22	-3.01	1.42
EX084_F03	Cathepsin S	-1.46	-1.28	-1.65	2.80
CA376117	CD231	1.31	1.55	2.04	-1.44
CA363762	Cell death activator CIDE-B	1.35	1.74	2.08	-2.53
EX084_E08	Cytochrome c oxidase subunit VIIa-related	1.08	-1.14	1.18	-2.47
CA381440	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	1.45	1.53	1.69	-1.67
CA351392	Guanine nucleotide exchange factor DBS	1.19	1.93	2.97	-3.13
EX084_C11	High affinity immunoglobulin gamma 1c receptor 1 precursor	-1.70	-1.73	-1.88	1.71
HKT0001_A11	Hypothetical fish I1	1.20	2.28	1.49	-1.85
es03c07	Ig kappa chain V-J region WEA	1.60	2.07	1.41	1.21
es02g07	Ig mu heavy chain disease protein	2.38	1.56	-2.14	5.44
CA363978	Inhibitor of kappaB kinase gamma	1.16	2.13	2.21	-2.14
EX083_F09	MHC class I heavy chain-1	-1.43	-1.20	-2.87	-3.02
CA341859	Nuclear factor NF-kappa-B	1.40	1.12	1.63	1.28
CA378435	Protein phosphatase 2C delta isozyme	1.44	2.05	3.35	-3.87
EX081_B07	PRPF39 protein	1.19	1.22	1.39	
es03e10	Putative inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	-1.11	-1.05	1.33	1.29
es03b12	Secretory granule proteoglycan core protein	-1.83	-1.83	-2.97	2.77
BNH2_B08	Splicing factor, arginine/serine-rich 8	1.10	1.24	1.25	-1.49
CA380121	Telomerase reverse transcriptase	1.33	1.36	1.34	-1.33
EX081_G12	Thioredoxin	-1.24	-1.61	-1.56	1.46
CA342204	TNF receptor associated factor	1.23	2.33	2.64	-2.89
CA378736	Tyrosine-protein kinase BTK	1.28	1.61	1.81	-1.80
EX083_G04	Tyrosine-protein kinase HCK	-1.07	-1.38	-1.39	1.40
P_54	VEGF4	1.23	1.34	1.37	

GENES VIRALES

Se indican aquellos genes expresados al menos en 3 de 4 experimentos, comparados con la base datos asociada a la plataforma de micromatriz y seleccionados en función de su especificidad al tratamiento (prueba exacta de Fisher, $p < 0.01$). Los valores se expresan en función de la intensidad de la expresión (FC). Se descartaron 13 genes sin descripción conocida.

El nuestro y otros estudios recientes han tratado de resolver la caracterización de la respuesta inmunitaria en los peces mediante la ponderación tisular u organográfica de la respuesta inmunitaria en modelos de infección viral o bacteriana, en un esfuerzo por acotar el grado, intensidad y ubicuidad de la expresión mínima necesaria para afrontar un estado alostático alterado. En este sentido, en la trucha la expresión de CD8 y CD4 (coreceptores del MHC de tipo I y II, respectivamente) parece restringida principalmente al timo y, hasta cierto punto, al bazo, aún cuando los animales no infectados son capaces de mantener un cierto grado de expresión de bajo nivel en diversos órganos hematopoyéticos o en los nódulos e infiltraciones leucocitarias [204, 205]. De hecho, en un estudio reciente, Overturf y LaPatra (2006) no encontraron niveles elevados de CD8 en el riñón cefálico de truchas infectadas con bacterias o IHNV a las 24 horas o a los 5 días después de la infección, pese a describirse una correlación positiva entre la dosis de patógenos administrada y la expresión de CD8 y CD4 a las 24 horas de la infección [206]. En un experimento similar, tres días después de haber recibido la inoculación de IHNV, Hansen y LaPatra (2002) observaron una sorprendente anulación de la actividad del MHC de tipo IIB en el riñón cefálico y el bazo de truchas infectadas, lo que tiene sentido si se acepta el refuerzo más que probable de la respuesta mediada por CD8 en conjunción con la presentación de antígenos propiciada por el MHC de tipo I en respuesta inmediata a la infección [207], como se observó en un modelo cohabitante de infección viral descrito recientemente [208].

De manera similar, la exposición a *Vibrio anguillarum* acaba deprimiendo en menos de cuatro días la expresión de transcritos del MHC de tipo II en el riñón cefálico, hígado y bazo del turbot, *Scophthalmus maximus* [209]. Por el contrario, la regulación al alza del mismo complejo de histocompatibilidad (MHC II) se ha descrito en truchas sometidas a inyección intramuscular de vacunas de ADN utilizando IHNV recombinante [210] e inflamación por compuestos xenobióticos [211]. En las truchas infectadas con VSHV, otro miembro de los Rhabdoviridae, la dinámica de la expansión de los linfocitos T, y, por consiguiente, de la respuesta inmunitaria adaptativa comandada por la expresión del MHC, se pudo correlacionar con los ciclos virales esperados de replicación, cuyo pico se produjo una semana después de la inoculación viral [212], en un calco del tiempo necesario (hasta 10 días) para la expresión detectable de transcritos de MHC en leucocitos de *Paralichthys olivaceus* expuestos a *Neoheterobothrium hirame*, un parásito monogéneo [213]. El panorama, por todo lo dicho, resulta a la vez desalentador y estimulante. Desalentador por la dificultad que entraña modelizar una respuesta inmunitaria adaptativa en un modelo, el piscícola, tan diverso genómica y fenómicamente. Y estimulante por la multiplicidad de aproximaciones y tintes que el uso de semejante diversidad permite.

Confirmando lo descrito en otras especies [214, 215], nuestros resultados sugieren

- (1) una marcada predilección por la respuesta linfocitaria mediada por las células CD4 y Th en el riñón cefálico de las truchas sometidas durante 3 días a

infección viral por IHNV, acoplada a

- (2) una fuerte activación del sistema del complemento mediada por las proteínas spl y la ya familiar remodelación de la matriz extracelular comandada por la expresión de metaloproteinasas MMP y TBX-4,
- (3) un decremento en la expresión de la activación de poblaciones de monocitos y macrófagos mediada por TNF alfa,
- (4) la mengua de la expresión del MHC de tipo I y
- (5) una disminución en los procesos que regulan la apoptosis, según se desprende de lo observado en la inhibición de los transcritos de la ligasa de ubiquitinas S1AH1 y la galectina 9.

La administración intraperitoneal de LPS, por su parte, activa la vía de procesamiento de antígenos del MHC de tipo I que también se ha observado en nuestros estudios previos con macrófagos maduros estimulados con LPS [75]. Sin embargo, denotamos no sólo la regulación a la baja, 72 horas después de la exposición a LPS, de la respuesta mediada por la acción conjunta de MMP y TBX-4, sino también la inhibición de los transcritos del factor de transcripción CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBP-alpha), conocido por su papel en la diferenciación de las células mieloides hacia el fenotipo granulocítico y susceptible de inducirse durante la maduración de los macrófagos [216].

La proteína Deltex 1 (DTX) también sufre regulación a la baja tres días después de inyectar LPS a los animales. Aunque carece de una descripción pormenorizada, la conversación inmunitaria entre DTX1 y las vías de señalización intracelular, altamente conservadas a lo largo de la evolución, Notch y NFkappaB [217, 218] es la responsable del desarrollo y maduración normales de las poblaciones de linfocitos diferenciadas en los órganos hematopoyéticos y linfopoyéticos en los mamíferos, lo que, teniendo en cuenta nuestros datos, sugiere una mengua en la efectividad del trasiego de las células de los linajes linfóide y mieloide durante la respuesta inmunitaria temprana en el riñón cefálico de la trucha desencadenada por la exposición a lipopolisacárido.

La mieloperoxidasa (MPO) mostró una clara regulación al alza en todos los tratamientos a las 24 horas de la inyección intraperitoneal, volviendo a valores basales en los animales inoculados con LPS, aumentando en aquellos que recibieron las formas atenuada del virus IHNV y regulándose claramente a la baja en los animales infectados con la forma activa del virus. La mieloperoxidasa, expresada de manera habitual en neutrófilos y monocitos, juega un papel importante en la fagocitosis dependiente de la presencia de oxígeno, lo que, junto a la inhibición del receptor MARCO, expresado en macrófagos [219], en los animales infectados por IHNV, sugiere una disminución de la función microbicida en el riñón cefálico de las truchas infectadas con IHNV.

A vista de pájaro, el panorama que parecen dibujar estos resultados en el riñón cefálico de la trucha es el de una participación funcional poco importante del principal órgano

hematopoyético durante la activación *a corto plazo* de los mecanismos defensivos en respuesta a la infección activa de IHNV o, alternativamente, una expresión diferencial temprana, inducible y tal vez antagonista, del procesamiento y manejo de antígenos dirigido por los complejos mayores de histocompatibilidad de tipo I o II, fuertemente influenciada por el tipo y dinámica infectiva del PAMP o patógeno (LPS versus virus) o las vías de entrada (tejido/órgano). Por todo lo dicho anteriormente referido a las infecciones experimentales, el riñón cefálico no actuaría como un órgano de reacción aguda inmediata a la infección o inflamación, sino más bien como el inductor de un tipo de respuesta adaptativa retardada, a la vez que como un importante regulador de la diferenciación eritropoyética y mieloide frente a este tipo de intrusión patogénica. De todos modos, la expresión dual de la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos dirigida por el MHC se nos aparece fuertemente influenciada por la sensibilidad inmunitaria propia de cada especie [220, 221], la virulencia del tipo de patógeno y el tempo de la diferenciación celular en los distintos órganos inmunitarios. De ahí que se sugiera la necesidad de continuar evaluando esta modalidad dependiente de la especie y su relación con el patógeno que muestra la respuesta inmunitaria dirigida por el MHC en los peces.

Metabolismo de la hemoglobina durante la infección viral y bacteriana en el riñón cefálico de la trucha

En el primero de los puntos muestrales (24 horas), los genes implicados en el metabolismo de la hemoglobina (alfa y beta) permanecieron regulados a la baja, con la supresión de 2-3 FC en aquellos animales que recibieron una inoculación de LPS y la forma activa del virus IHNV. La forma atenuada de este último, en cambio, potenció la inducción de ambos genes (11 y 19 FC, respectivamente) a las 24 horas, invirtiéndose la tendencia tres días después. En cambio, la forma activa del virus IHNV induce su expresión (3 y 10 FC, respectivamente) a las 72 horas, mientras que en los animales inoculados con LPS se recuperan los niveles originales de los transcritos.

Es de destacar la regulación al alza de la 5-aminolevulinato sintasa, el enzima clave para la síntesis del grupo hemo, tanto en los animales infectados con atIHNV como en los expuestos a LPS, tres días después de la inoculación, lo que se asemeja a la repuesta descrita en el riñón cefálico del salmón atlántico (*S. salar*) infectado con *Piscirickettsia* [78]. La expresión coordinada de ambos genes de hemoglobina y la 5-aminolevulinato sintasa sugiere la presencia de actividad eritropoyética en el riñón cefálico de la trucha. De hecho, en esta especie ya hemos descrito un aumento significativo en la proliferación de células positivas al factor PU.1 a las 72 horas de la estimulación con LPS [222] por lo que la activación de mecanismos hematopoyéticos y eritropoyéticos durante los estadios tempranos del proceso infectivo parecen ser una constante en la respuesta inmunitaria inespecífica en los salmónidos.

Comportamiento de las proteínas HSP durante la infección viral y bacteriana en el riñón cefálico de la trucha

La forma activa del virus IHN inhibe la expresión de la proteína de respuesta a shock térmico (HSP) 27 (-2.4 FC) e induce la expresión de las HSP 70 y 90 (2.8 y 2.3 FC, respectivamente) a los tres días de la infección, partiendo de un estado previo de regulación a la baja a las 24 horas (-4.24 FC). Para el mismo punto muestral, la exposición a atIHNV se destaca por la regulación a la baja (inferior a -2 FC) que experimentan los transcritos de HSP 70.

Tradicionalmente, las HSP se han considerado copartícipes de la respuesta generalizada a estados de estrés asociado a la exposición a compuestos xenobióticos y/o al desarrollo de reacciones inflamatorias en los peces [128, 138, 215]. Sin embargo, la relevancia de este tipo de proteínas de fase aguda como indicadores relevantes de un estado inmunitario alterado o patológico vinculado al estrés que experimente el animal se ha criticado recientemente de manera convincente [223], debido a la enorme variabilidad que se obtiene recurrentemente al correlacionar la expresión de las HSP con estados fisiológicos alterados, por la influencia, entre otros factores, de la especie, tejido, familia de HSP, estacionalidad, estadio de desarrollo y agente estresante. Resulta aventurado, por tanto, especular sobre la relevancia que, para un órgano, como el riñón cefálico que, como se ha mencionado, no se considera de fase aguda, tiene la expresión variable de este tipo de proteínas multifunción durante la infección.

El riñón reactivo (y IV): conclusión (onto)lógica

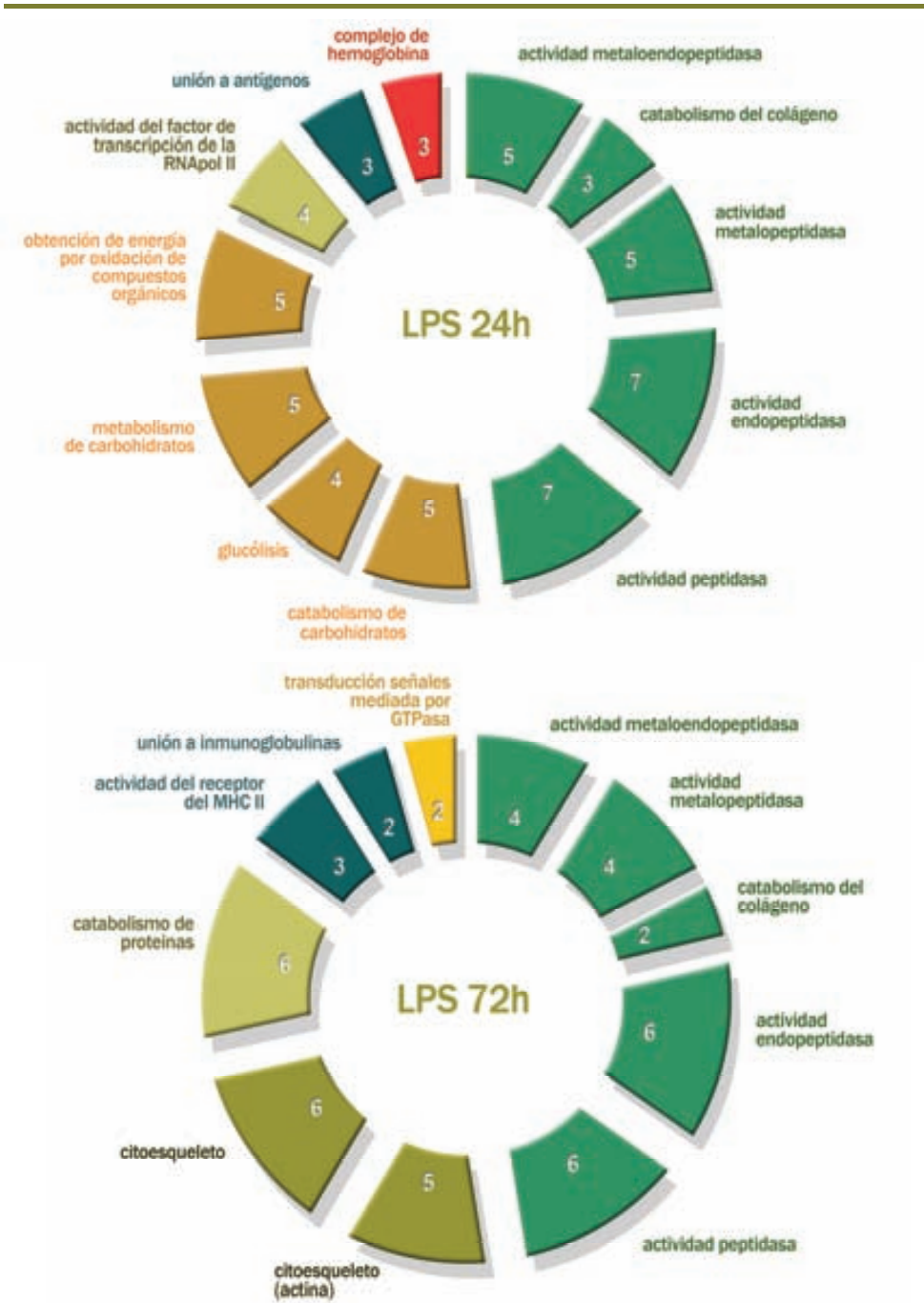
En el análisis funcional del papel biológico de aquellos genes que, por estar diferencialmente expresados, delimitan un tempo inmunitario y permiten la formulación de hipótesis razonables sobre la dinámica del mismo, nuestro enfoque en dos fases (la discriminación de la expresión genética *per se* y la valoración ontológica de las categorías funcionales que responden de su actuación) no está exento de limitaciones. Los valores de corte para la discriminación estadística de la expresión genética mínima, los patrones de coexpresión genética, la conversación no lineal (no gaussiana) entre genoma y proteoma y el carácter acotado de la representación genética impresa en la plataforma de micromatriz empleada son factores todos ellos que pueden limitar la cantidad y calidad de las respuestas transcriptómicas evaluadas o excluir aquellas respuestas genéticas relevantes pero transitorias correlacionadas con el carácter abrupto y dependiente del órgano estudiado del daño sistémico infeccioso en la especie estudiada.

A modo de guía para la comprensión de la respuesta inmunitaria frente a la exposición a LPS o infecciones virales agudas, la comparación ontológica de los genes expresados diferencialmente indica una marcada inducción de metaloproteinasas, colágeno y otros escultores de la matriz extracelular en las truchas inoculadas con lipopolisacárido, paralelamente con la mengua de los transcritos de genes implicados en el control del

metabolismo basal y el aumento de la expresión de mediadores inmunitarios involucrados en la presentación de antígenos dirigida por el MHC y la opsonización orquestada por las inmunoglobulinas al tercer día de la infección.

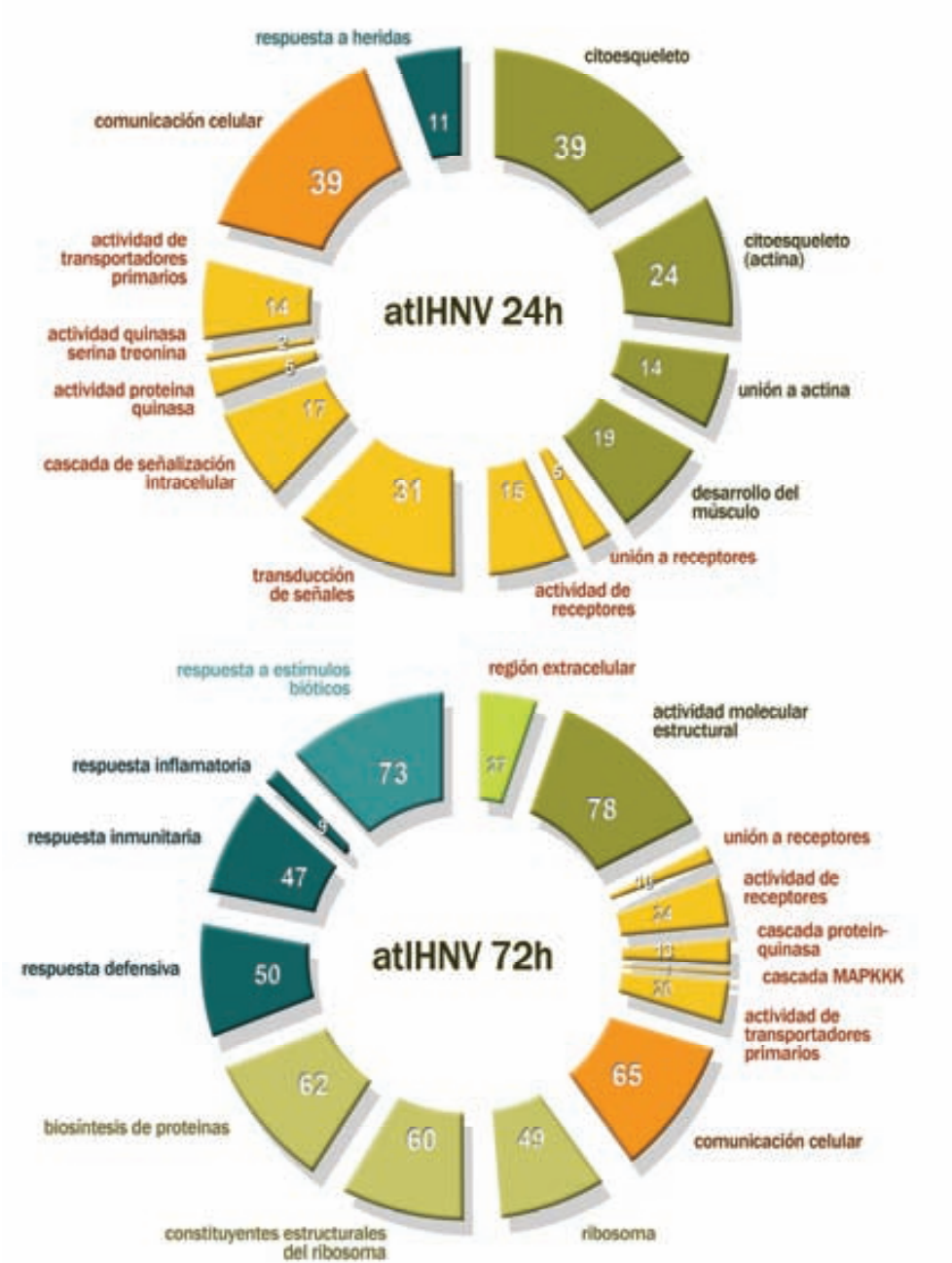
Varios de los genes participantes en la correcta transducción de la señal biológica y la biosíntesis de proteínas se mostraron activos en los animales infectados con la forma atenuada del virus IHN, una vez estimulado el decremento en el remodelado del citoesqueleto. Como ocurre en el caso de los animales inoculados con la forma activa del virus IHN, las categorías funcionales delineadas en el análisis ontológico se muestran enriquecidas con genes activos durante las respuestas inflamatorias, inmunitarias y defensivas. Tanto en los peces tratados con atIHNV y su forma activa, la respuesta inmunitaria a las 72 horas sobrepasa en importancia a la dirigida por la metaloproteinasas bajo la influencia de la exposición a LPS (tablas 7 y 8, FIGURAS 17 a 19). Sin embargo, y como se ha mencionado anteriormente, podemos considerar la respuesta transcriptómica del riñón cefálico a la infección por IHNV muchos más diversificada en términos de número y vías de activación inmunitarias.

FIGURA 17. CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBREREPRESENTADAS EN LOS EXPERIMENTOS CON LPS.



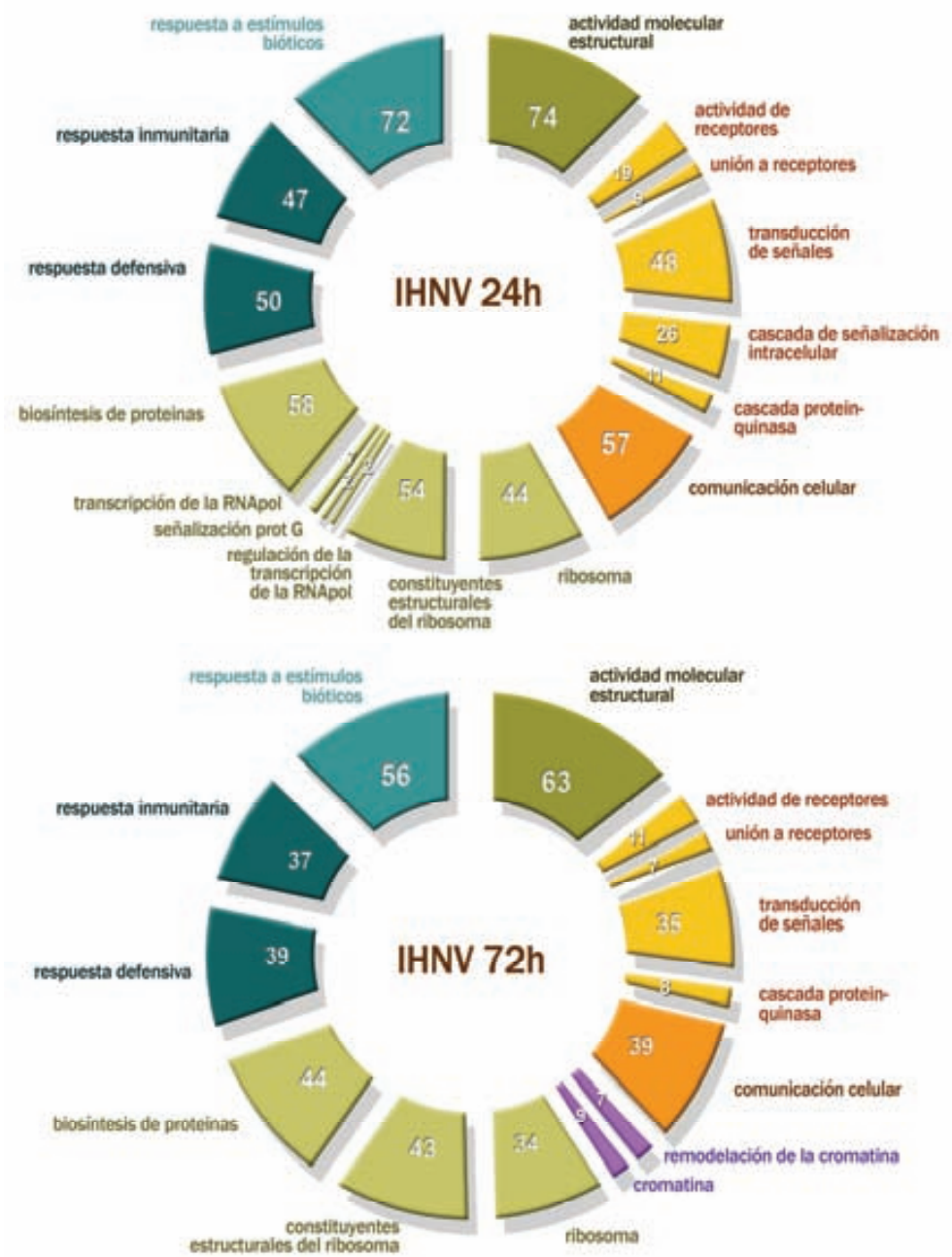
Se representan las categorías ontológicas funcionales cuya representación en la plataforma está claramente mejor representada (corrección de Yates a la prueba de Ji cuadrado, $p < 0.05$), conjuntamente con el número de genes expresados diferencialmente para cada categoría.

FIGURA 18. CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBRREREPRESENTADAS EN LOS EXPERIMENTOS CON aIHNV.



Se representan las categorías ontológicas funcionales cuya representación en la plataforma está claramente mejor representada (corrección de Yates a la prueba de Ji cuadrado, $p < 0.05$), conjuntamente con el número de genes expresados diferencialmente para cada categoría.

FIGURA 19. CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBREPONENTES EN LOS EXPERIMENTOS CON IHNV.



Se representan las categorías ontológicas funcionales cuya representación en la plataforma está claramente mejor representada (corrección de Yates a la prueba de Ji cuadrado, $p < 0.05$), conjuntamente con el número de genes expresados diferencialmente para cada categoría.

Análisis comparativo de la respuesta inmunitaria renal y hepática originada por la exposición a LPS bacteriano

resumen

Se evaluó la respuesta inmunitaria temprana (24-72 horas) a la infección experimental mediante inyección intraperitoneal de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el hígado de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) mediante análisis de una micromatriz de ADNc (SFM 1.0, véase el apartado *Salmonid Fish Microarray (SFM 1.0): descripción de la plataforma*) específica de salmónidos. Durante la peritonitis, el análisis transcriptómico del hígado mostró una reacción bimodal de fase aguda. En primer lugar, una respuesta inicial humoral, inespecífica, de fase aguda y temprana (24 horas), de bajo nivel en términos de expresión genética pero con la participación de numerosos genes de funcionalidad diversa, que tiene a las HSPs, el sistema del complemento e inhibidores de tránsito y la quimiotaxis celulares de neutrófilos y otras poblaciones mieloides como principales actores. Se observó también un arresto metabólico de los procesos de obtención de energía por oxidación de sustratos orgánicos, la glucólisis y el metabolismo de lípidos, así como disminución global de la transducción y señalización intracelulares.

En segundo lugar, se observó una respuesta inmunitaria tardía (a las 72 horas de la exposición a LPS) más intensa en términos transcripcionales (intensidad de la expresión genética) pero escasa en cuanto al número de genes implicados en la respuesta, fuertemente reguladora, en la que se controla la actividad del sistema del complemento y los genes implicados en la síntesis de proteínas características de la respuesta de fase aguda y en la que el diálogo celular entre la inmunidad innata y adaptativa parece cobrar forma. El arresto metabólico previo persiste en el procesamiento de la glucosa pero desaparece en el caso de los lípidos, coincidente con una elevada actividad de la maquinaria mitocondrial.

Introducción: la bisectriz genómica

La expresión física del genoma, ya sea inducida, voluble, viral, azarosa, compartida o reactiva, comienza y termina en la realidad química del proteoma, o conjunto de proteínas expresadas en un nivel biológico (celular, tisular, organismo, metapoblación) determinado. El escenario proteómico es todavía una terra incognita y a la vez un campo minado de isoformas, variantes transcripcionales, millones de clones de inmunoglobulinas y polimorfismos alélicos. De las más de 10^{10} proteínas auguradas en un genoma modesto como el de la especie humana [224], el análisis combinado de la espectrometría de masas y cromatografías de fase inversa actuales permiten discriminar, con un moderado grado de redundancia, poco más de 10^3 - 10^6 repartidas entre varios tejidos [225-227]. De concentración variable (desde pocos pg/ml hasta los varios mg/ml de albúminas transportadoras y determinantes de la osmoregulación plasmática), el escaso centenar de proteínas plasmáticas “clásicas”, esto es, las detectadas mediante electroforesis convencional desde la segunda mitad del siglo pasado, se consideraban, en su inmensa mayoría, producidas y/o secretadas en el hígado, de ahí que a este órgano se le tildase de cruce de caminos para la regulación y cribado fisiológicos de las funciones inmunitaria y detoxificadora. Sin embargo, algunos estudios recientes referidos a la funcionalidad y representatividad ontológicas del proteoma parecen indicar que la mayoría de las proteínas expresadas por el genoma tienen su representación en el plasma [226, 227], lo que, lejos de quitar relevancia al hígado como órgano clave para la fisiología del organismo, lo incluye en la red organográfica implicada en el control de la carga alostática en condiciones de estrés ambiental o patológico. En este sentido, la expresión genética en el hígado resulta tal vez una de las más volubles y cambiantes de todo el organismo, tanto en términos de intensidad transcripcional como de celeridad (reactividad) de la respuesta transcriptómica.

Ya se ha mencionado anteriormente la predilección por la peritonitis como modelo de inflamación en la investigación inmunitaria con animales de laboratorio. Se deriva de ello la distinción, un tanto artificiosa, entre el *proceso inflamatorio*, entendido como la respuesta local, celular, humoral y tisular, a las, entre otras, intrusiones virales o bacterianas, y la *respuesta de fase aguda*, orquestada por el hígado frente a heridas e infecciones, entre otros factores de desajuste alostático.

Durante el proceso inflamatorio, ampliamente estudiado en la trucha [228-230], la inoculación de PAMPs u organismos bacterianos o virales provoca la activación de la población residente de linfocitos (aproximadamente el 55% del total en el peritoneo de un teleosteo como la trucha), macrófagos maduros (el 40%) y neutrófilos (poco menos del 2% del total leucocitario). La fagocitosis y posterior procesamiento de los microorganismos, unida a la liberación de señales de peligro humorales (sistema del complemento, moléculas proinflamatorias) celulares (leucocitos) y tisulares (desgarros de la matriz, vertidos celulares, apoptosis), favorece la maduración de monocitos, la

estimulación y multiplicación de neutrófilos, y su trasiego hacia la zona de inflamación en un período de 48 horas. En animales fundamentalmente ectotérmicos como los peces, si la temperatura lo permite la subsistencia inmunitaria se produce a las dos semanas, una vez eliminada la población bacteriana o viral.

La respuesta de fase aguda (RFA, FIGURA 20), de carácter sistémico, se caracteriza por la rápida (24-48 horas) producción, vertido y exportación de componentes humorales hepáticos en el plasma sanguíneo (proteínas del sistema del complemento, antiproteasas, secuestradores de hierro, péptidos antibacterianos, etc.), inducidos por mediadores proinflamatorios (interleuquinas 1 y 6, TNF alfa y prostaglandinas entre otros) cuyo origen hay que buscarlo de nuevo en el foco de la infección y/o rotura tisulares que aquí, y a diferencia de lo que ocurre durante el proceso inflamatorio, actúan no como escenario (activo, eso sí) sino como acicate de la respuesta inmunitaria humoral. La síntesis hepática de proteínas de fase aguda muestra un tempo variable debido a la ya comentada complejidad funcional del órgano en la regulación alostática, y también al compromiso entre el atenuamiento de las desviaciones de la osmolaridad (provocadas por la

FIGURA 20. RESPUESTA DE FASE AGUDA EN LOS MAMÍFEROS



acumulación de proteínas de elevado peso molecular en la sangre) y el coste energético derivado de la inducción de la síntesis proteica masiva.

Los teleósteos parecen seguir una respuesta de fase aguda estereotipada, muy similar a la de los mamíferos (para una revisión véase [231]). A diferencia de estos, la mayoría de estudios recientes relativos a la RFA en los peces se centran en el análisis del transcriptoma hepático de animales sometidos a agresiones virales, bacterianas o xenobióticas, y, a semejanza de lo que ocurre en los estudios con mamíferos, sólo un selecto número de especies, la mayoría de interés comercial para cultivos o acuariofilia, se han beneficiado de una caracterización extensa de la reactividad hepática. Así, la variación de los transcritos hepáticos frente a infecciones virales o bacterianas, compuestos xenobióticos y tratamientos hormonales se ha analizado utilizando micromatrices o proyectos a gran escala de ESTs en salmónidos (*Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *O. kisuth*, *O. masou*), peces gato (*Ictalurus punctatus*, *I. furcatus*), carpas (*Cyprinus carpio*), lubinas (*Dicentrarchus labrax*), magres (*Lithognathus mormyrus*), platijas (*Platichthys flesus*), sollas (*Pleuronectes platessa*) atunes (*Thunnus tynus*) espinosos (*Gasterosteus aculeatus*), danios cebra (*Danio rerio*), medakas (*Oryzias latipes*) y peces de coral (*Pomacentrus moluccensis*) entre otras especies [76, 93, 98, 127, 128, 232-246].

La respuesta de fase aguda en los peces dista de ser homogénea, debido al carácter transitorio y explosivo de la expresión genética hepática y, no menos importante, la propia diversidad del grupo, en términos de morfología, ciclos de vida, pautas reproductivas, modalidades endotérmicas, distribución geográfica, sensibilidad a las infecciones, rango de tolerancia a los cambios ambientales, tamaño, composición y discurso fenómico del genoma y *serendipidad* de la historia evolutiva. Para complementar los estudios realizados con patógenos vivos en los salmónidos, en este capítulo se utiliza un modelo de inflamación peritoneal para analizar la respuesta transcriptómica frente a la exposición a un PAMP generalizado, el lipopolisacárido bacteriano (LPS de *E. coli*) en el hígado de la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), a las 24 y 72 horas de la inoculación intraperitoneal de LPS. La valoración de los cambios en los transcritos hepáticos se valora gracias al análisis ontológico del transcriptoma activo observado en la micromatriz específica de salmónidos SFM 1.0 discutida anteriormente. Se aporta, además, una comparación con la expresión genética observada en el riñón cefálico de truchas sometidas a las mismas condiciones de experimentación, a fin de valorar la expresión diferencial organográfica de la respuesta inmunitaria temprana en los dos órganos internos más relevantes para el desarrollo inicial de la reacción defensiva.

Materiales y métodos

Manejo de animales e infecciones experimentales

Los animales, *Oncorhynchus mykiss*, de 70-100 g de peso, obtenidos de un distribuidor comercial, se mantuvieron en tanques de flujo continuo bajo condiciones ambientales controladas de luz (fotoperíodo de 10/14 horas de luz y oscuridad, respectivamente) y temperatura ($15 \pm 2^\circ\text{C}$). Los peces se alimentaron con pienso particulado comercial *ad libitum* y se les mantuvo en los tanques durante dos semanas para su aclimatación previa a la fase experimental. El estado de salud de los animales y la calidad del agua se evaluó cada tres días durante el período de aclimatación y diariamente a lo largo de todo el periodo experimental. La inoculación de LPS de *E. coli* se llevó a cabo separadamente para cada tratamiento en tanques con recirculación de agua aireados a 14°C . Las truchas, en número de 10 por tanque, se separaron en 2 tanques experimentales (control e inoculados con LPS). Antes de la inoculación intraperitoneal, los animales se anestesiaron ligeramente utilizando MS-222 (40 ppm, estadio II de la anestesia de acuerdo con la clasificación de Iwama et al. 1989). En función de su adscripción a uno u otro grupo experimental, a los peces se les inoculó solución salina (control) o 6mg/Kg de LPS (Sigma). En los puntos muestrales definidos previamente, 24 y 72 h después de la inyección i.p., los animales controles y experimentales se seleccionaron de cada tanque (n=3) y se sacrificaron mediante hiperanestesia (MS-222, 100 ppm, estadio III de la anestesia [167]). Inmediatamente se procedió a la disección, extracción y mezcla (*pooling*) de los hígados para cada grupo experimental, de los que se procesó su ARN mediante Tri Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones del fabricante [168, 169].

Obtención del ARN

El ARN de los hígados de los animales inyectados con solución salina y LPS se obtuvo mediante reactivos de Trizol (Life Technologies) o Tri Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eliminó la contaminación de ADN de la preparación mediante tratamiento con ADNasas. El ARN se precipitó empleando etanol al 100% i acetato de amonio (pH 5.2), conservándose a -80°C en etanol para su uso posterior.

Diseño y análisis de la micromatriz

El diseño general de la micromatriz se ha detallado anteriormente (véanse el apartado *Salmonid Fish Microarray (SFM 1.0): descripción de la plataforma* y las referencias [72, 126]. Una descripción somera de la plataforma se describe en la base datos Gene Expression Omnibus (GEO) con el epígrafe GPL6155.

Mediante electroforesis desnaturalizante se cuantificó y verificó la integridad del ARN total obtenido del hígado, paso previo al marcaje con Cy3- y Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia), completado empleando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y cebadores de oligo(dT). ELK ADN se purificó utilizando el paquete de reactivos de Microcon YM30 (Millipore). Se escogió un diseño experimental de marcaje cruzado (*dye swap*) [14] y cada muestra se hibridó en dos micromatrices. En el primer portaobjetos, las muestras control y experimental de ADNc se marcaron con Cy5 y Cy3, respectivamente, invirtiéndose la asignación de marcaje para el segundo portaobjetos. Los portaobjetos se trataron previamente con 1% BSA, fracción V, 5 x SSC, 0.1% SDS (30 min. a 50°C), lavándose posteriormente con 2 x SSC (3 min.) y 0.2 x SSC (3 min.). La hibridación se llevó a cabo durante 12 h en una mezcla de 1.3 x Denhardt's, 3 x SSC 0.3% SDS, 2.1 µg/µl poliadenilato y 1 µg/µl de ARNt de levadura (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich). El escaneado de la micromatriz y el procesamiento de las imágenes se llevaron a cabo utilizando ScanArray 5000 y QuantArray (GSI Luminomics), respectivamente. La medida de la señal en cada punto de la micromatriz se filtró siguiendo el criterio $I/B \geq 3$ y $(I-B)/(S_I+S_B) \geq 0.6$, donde I y B son las intensidades medias de la señal y el fondo, respectivamente, y S_I, S_B sus desviaciones estándar. Una vez sustraída la media de la intensidad de fondo, se llevó a cabo una normalización por regresión balanceada no lineal local (Lowess) [124] separadamente para cada portaobjetos (véase la FIGURA 8 en el apartado *Salmonid Fish Microarray (SFM 1.0): descripción de la plataforma*).

Para la evaluación de la expresión genética diferencial en el hígado de la trucha se analizó el logaritmo de la relación de intensidades normalizadas mediante la prueba de la t de Student con ($p < 0.01$). Asimismo se aplicó la modificación Bayesiana de la tasa de descubrimientos erróneos (*False Discovery Rate*, FDR) para la corrección del error derivado de la aplicación de múltiples pruebas de comparación, estimándose el valor q para cada conjunto de genes expresados diferencialmente [125]. El análisis de los perfiles funcionales se llevó a cabo escogiendo aquellos genes cuya expresión difería al menos en una muestra con probabilidad $p < 0.01$ y estaban presentes en al menos dos categorías funcionales, interrogando las clases funcionales de la Ontología Genética (GO) [172] y comparándolas mediante la prueba de la t de Student, $p < 0.05$. También se evaluó la significación estadística de las categorías funcionales sobrerrepresentadas en cada experimento mediante la corrección de Yates para la prueba de Ji cuadrado (valor p corregido < 0.05). La comparación de los valores obtenidos mediante micromatriz con los obtenidos mediante RT qPCR se reseña, junto con una descripción de la metodología de RT qPCR, en el material adicional (anexo II *RT-qPCR de genes selectos*).

Resultados y discusión

De manera similar a lo expuesto previamente en el caso del riñón cefálico, la respuesta transcriptómica del hígado de los animales expuestos a dosis elevadas (según los estándares aplicables a los mamíferos) de LPS resulta en un número modesto de transcritos (véase la TABLA 9 y el material adicional anexo) regulados diferencialmente ($p < 0.01$): 79 a las 24 horas y 20 tres días más tarde, de los que sólo un 2.5 % superan una intensidad de respuesta (FC) del 1.5 en el primer caso, mientras que la práctica totalidad de los expresados a las 78 horas (más del 90 %) mantiene niveles de intensidad superiores a 1.5 FC o dobla la intensidad basal (el 40% de los transcritos). En el caso del riñón cefálico, del medio centenar de transcritos regulados diferencialmente ($p < 0.01$), entre el 57 y el 58% de los transcritos superaban valores de expresión de 2FC a las 24 y 72 horas de la inoculación de LPS. Sin embargo, las diferencias entre ambos órganos se agudizan respecto a los niveles de expresión genética. En el caso del riñón cefálico, los niveles de expresión de algunos transcritos (metaloproteinasas, nefrosinas y proteasas de serina asociadas al sistema del complemento) superan los 5FC y llegan en algunos casos (MMP y nefrosinas) a valores superiores a 10 FC). En el hígado de los animales expuestos a LPS los niveles de expresión global en ningún caso alcanzan valores superiores a 3.5 FC.

Si la respuesta a la inoculación de LPS en el caso del riñón se tildaba de reestructuradora, en términos de composición y escultura de la matriz extracelular, e involucraba la presentación de antígenos mediada por el MHC, en el caso del hígado la respuesta, a juzgar por los datos de expresión genética y ontología funcional que se reseñan a continuación, se caracteriza por una expresión bimodal de bajo nivel (FIGURA 20), basada por una parte en el arresto metabólico de sustratos energéticos (carbohidratos) acompañado de la síntesis lipídica y, por otra, en la síntesis y regulación de proteínas características de la fase aguda, especialmente de componentes reguladores y activadores del sistema del complemento, moduladores e inhibidores del trasiego y quimiotaxis celular (microglobulinas alfa 1, componente amiloide sérico), y secuestrados y reparadores de iones metálicos y disfunción celular (ferritinas, selenoproteínas, proteína L13 de fase aguda, metalotioneínas, y diversas HSPs). En conjunto, la respuesta de fase aguda en el hígado de truchas inoculadas intraperitonealmente con LPS destaca, a las 24 horas de la exposición, por la expresión moderada/baja (por norma menor de 1.5 FC) de un considerable número de genes que codifican proteínas de fase aguda, moduladores inmunitarios y agentes humorales de la inmunidad innata, acompañada de una inhibición metabólica de las vías de síntesis de lípidos y el arresto del metabolismo de la glucosa. Tres días después de la infección, la diversidad de la respuesta mengua y se centra en la regulación de los componentes reactivos de fase aguda activados previamente, esta vez con un grado de expresión de los transcritos mucho mayor (más de 1.5 FC en general) y con una clara dedicación a la regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular innata, acompañada de un aumento en el metabolismo de lípidos y la activación de las vías de señalización y transducción de la señal intracelulares.

TABLA 9. LISTA DE 20 GENES REGULADOS AL ALZA O A LA BAJA EN EL HÍGADO DE LATRUCHA COMO CONSECUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPS.

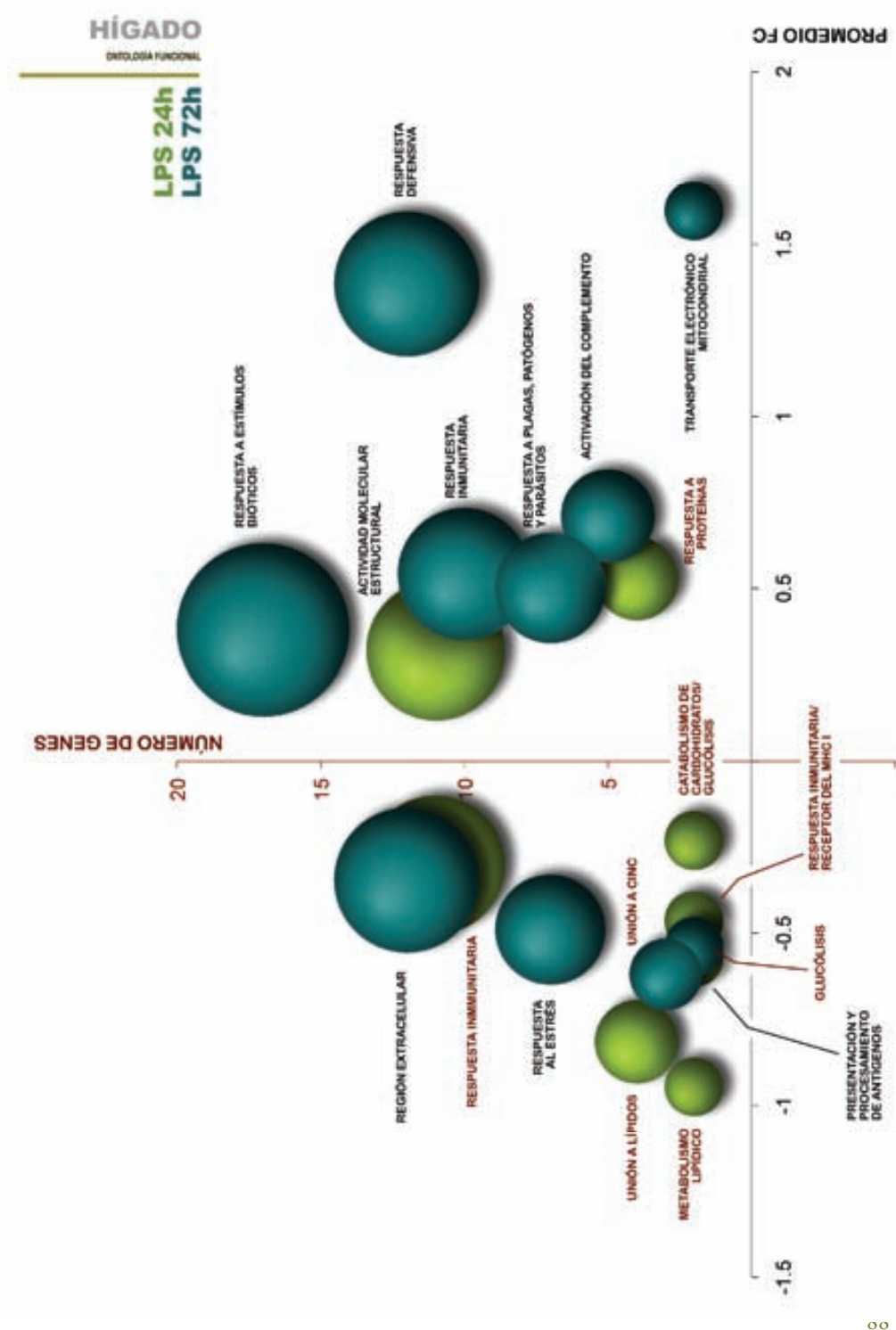
Se detalla la intensidad de la expresión (*Fold Change*, FC) al alza o a la baja de los 20 genes con mayor intensidad de expresión diferencial ($p < 0.01$, FDR > 0.01).

LPS

24 h REGULACIÓN AL ALZA				72 h REGULACIÓN AL ALZA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	p	Identidad clon	Nombre gen	FC	p
EXOB4_D02	Beta actin-2	1.95	0.000	EXOB2_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	3.25	0.002
HK0001_G11	Unknown-161	1.92	0.000	ENH2_B05	60S ribosomal protein L13a-acute phase protein	3.04	0.002
CA381199	94 kDa glucose-regulated protein	1.65	0.000	Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	3.02	0.003
ENH2_B05	60S ribosomal protein L13a-acute phase protein	1.64	0.000	est02e11	Cytochrome c oxidase subunit I-1	2.82	0.003
EST1-3A_F08	Heat shock protein HSP 90-beta-2	1.58	0.000	CA348325	BAG-family molecular chaperone regulator-4	2.05	0.003
Hete0002_B08	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 3	1.54	0.000	CA348849	Unc-13 homolog C	2.01	0.006
ENH2_C10	Collagen alpha 1(VIII) chain precursor	1.53	0.001	HK0003_B09	Complement factor H-2	1.87	0.003
HST0001_D04	Alpha globin I 2	1.53	0.000	CA384134	G1/S specific cyclin D2	1.77	0.010
CA370329	Lysosome C precursor	1.52	0.000	est03c10	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	1.71	0.008
HK0003_B09	Complement factor H-2	1.43	0.000	est02f08	Serine protease-like protein-1	1.64	0.007
EST1-3A_B08	Unknown-67	1.43	0.002	HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	1.59	0.007
EXOB3_C12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit	1.40	0.000	KVkm2_A01	Unknown-219	1.49	0.010
Hete0002_H06	Ribosomal protein S2	1.39	0.000				
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	1.36	0.009				
CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	1.32	0.000				
est01b05	Ribonuclease OX2	1.31	0.003				
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	1.31	0.000				
ut02e12	Periostin precursor	1.31	0.005				
EXOB3_A08	Ribosomal protein L11	1.30	0.006				
est04c05	Ferritin heavy chain-1	1.30	0.003				
24 h REGULACIÓN A LA BAJA				72 h REGULACIÓN A LA BAJA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	p	Identidad clon	Nombre gen	FC	p
ENH2_D07	Ribosomal protein L35-2	-1.39	0.002	EXOB3_B01	Cathepsin C-3	-1.47	0.008
ut01f03	Unknown-238	-1.40	0.002	EXOB1_B09	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-1.52	0.002
CA382259	Unknown-141	-1.41	0.005	EXOB1_F08	nt	-1.55	0.007
HK0001_F01	Complement receptor 1-2	-1.43	0.002	EST1-3A_F07	Unknown-88	-1.58	0.002
Hete0002_F10	Unknown-144	-1.44	0.000	EST1-3A_E07	Metallothionein A	-1.67	0.005
EXOB2_A02	Nucleoside diphosphate kinase	-1.46	0.001	EST1-3A_H06	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	-1.77	0.007
ut04b09	Complement factor H-3	-1.46	0.001	Unknown-72	Unknown-72	-2.08	0.005
ENH2_H01	Beta-2-microglobulin-2	-1.47	0.000	HK0001_G11	Transcription factor jun-B-1	-2.44	0.002
CA373506	Selenoprotein P	-1.48	0.002		Unknown-161		
ENH2_F09	Beta-2-microglobulin-1	-1.50	0.000				
CA376350	Serum amyloid P-component-1	-1.56	0.000				
est03c10	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	-1.63	0.000				
HK0002_D07	Unknown-172	-1.69	0.000				
EXOB3_A02	Alpha-1-microglobulin/Vibkunitin-1	-1.72	0.000				
ENH2_F04	Unknown-4	-1.77	0.000				
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	-1.92	0.000				
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	-1.94	0.000				
CA348849	Unc-13 homolog C	-1.94	0.000				
CA348325	BAG-family molecular chaperone regulator-4	-2.11	0.000				

FIGURA 20. CATEGORÍAS ONTOLÓGICAS CUYOS GENES MUESTRAN COREGULACIÓN SIGNIFICATIVA (≈ 0.05) EN EL HÍGADO DE TRUCHAS EXPUESTAS A LPS.

Se indican el número de genes (tamaño de las esferas) en el eje de ordenadas, y la expresión genética media (FC) en el eje de abscisas



El hígado reactivo (I): componentes de la respuesta de fase aguda

Se describen a continuación la variación de los niveles de los transcritos relacionados con la respuesta inmunitaria inespecífica humoral (sistema del complemento, proteínas de fase aguda) y celular presentes en el hígado durante la respuesta de fase aguda debida a la inflamación peritoneal de truchas expuestas a LPS.

Regulación del sistema del complemento durante la exposición a LPS en el hígado de la trucha

Enfrentadas a una intrusión xenobiótica, parte de las proteasas de serina relacionadas con el sistema del complemento y los moduladores y péptidos proteolíticos que actúan sobre la proteína C3 y sus derivados se sintetizan en el hígado (para una revisión reciente, véase [247]). En los peces, y también en otros vertebrados, una parte menor, pero de gran importancia biológica de la síntesis de los componentes del sistema del complemento es extrahepática y en los teleósteos se lleva a cabo principalmente en células inmunitarias, branquias, piel, corazón, gónadas y tejidos renales [248, 249]. Así, las actividades inflamatorias, quimiotácticas, opsonizantes y líticas del sistema del complemento refuerzan y alargan la actividad de la rama inespecífica o innata de la respuesta inmunitaria en el seno de los principales órganos hematopoyéticos, a la vez que participan de la respuesta a la peritonitis endotóxica característica de los modelos murinos de experimentación animal.

A las 24 horas de la exposición a LPS, tanto la expresión de las varias formas del factor H (CFH) como de los receptores del complemento CR1 y CR2, todos ellos constituyentes clave de la cascada de reacciones del sistema del complemento, permanecen reprimida ($FC < -1.4$) aunque en el primero se detecta también una ligera expresión al alza (1.4 FC) en la forma CFH1. En los mamíferos, la función principal del factor H en la compleja cascada de reacciones que llevan a la escisión del componente C3 y, como consecuencia, a las sucesivas reacciones de opsonización, inflamación y lisis de microorganismos, es la de inhibir la circulación y producción de C3b (la principal opsonina del sistema del complemento) mediante la inhibición de la su unión con el factor B [250], imposibilitando así la escisión de este en el componente Bb que forma, con el componente C3b, la convertasa de C3bBb, capaz de romper el componente C3 e iniciar así la activación explosiva de todo el sistema. Recientemente, se ha demostrado la presencia de receptores para variantes del factor H en linfocitos B, neutrófilos y monocitos en humanos [251], lo que extiende la función del sistema del complemento a la inmunidad adaptativa.

Los receptores del complemento CR1 y CR2 (CD35 y CD21 en la nomenclatura clásica) participan de la regulación de la respuesta inmunitaria celular. La proteína CR1 se une al complejo opsonizador C3b/C4b del sistema del complemento, regulando así la adherencia inmunitaria y participando en la fagocitosis de partículas opsonizadas por parte de neutrófilos y macrófagos. Sin embargo, comparte esta función potenciadora de la limpieza inmunitaria con la inhibición, actuando como cofactor del factor I y promoviendo la conversión del componente C3b a iC3b y C3d(g), de la activación del complemento, así como de la activación y proliferación de linfocitos B por unión a su receptor BCR [252]. El componente CR2, en cambio, parece jugar un papel opuesto al CR1 en la inhibición de linfocitos B, a juzgar por su papel en la transducción de la señal activadora, en coalición con CD19 y CD81, que sigue a su acomplejamiento con Inmunoglobulinas M en la superficie de los linfocitos B [253]. CR2 actúa como receptor para el componente C3d del sistema del complemento que, unido a antígenos, también promueve la activación linfocitaria y el reclutamiento de linfocitos T mediado por la activación previa de células B [254].

Tres días después de la exposición a LPS, la expresión de los receptores CR1/2 en el hígado de la trucha desaparece, aumenta la del factor H (1.8 FC) y la expresión de los transcritos del factor D (proteasa de serina 1, spl) se regulan al alza (1.6 FC). El factor D se considera un activador general de la vía alternativa del sistema del complemento, gracias a su acción sobre el factor B, al que escinde para permitir su unión al componente C3b [247].

En los teleósteos se asume, aunque no se ha demostrado en todas las especies estudiadas hasta la fecha, tanto la presencia de un sistema del complemento completo (véase [26] para una revisión genómica del tema y [27] para un enfoque centrado en los teleósteos) funcionalmente idéntico al de los mamíferos, como la subdivisión de poblaciones celulares linfocitarias. Uno y otro componentes de la respuesta inmunitaria ostentan las peculiaridades inmunitarias propias de grupos filogenéticos antiguos (mezcolanza de funciones y plasticidad celular, diversidad y potenciación de la respuesta innata en detrimento de la adaptativa) en el amplísimo porcentaje de especies (en torno a las 25.000) de vertebrados basales que conforman ese grupo no taxonómico pero si taxativamente dominante de la inmunidad recombinatoria [255, 256] en el linaje vertebrado que son los peces. Cabe, pues, asumir una participación del sistema del complemento en la respuesta de fase aguda en la trucha muy similar a la observada en los mamíferos (exceptuando la intensidad de la expresión genética, véase más abajo). En este sentido, y a falta de la expresión de los componentes del sistema del complemento de los que la plataforma SFM 1.0 no dispone de representación (C1, C3, C5-9, factores Bf, I y MASP), la inhibición de la expresión del factor H y la proteína CR1 sugieren, por tanto, una activación moderada en el comienzo de la respuesta de fase aguda hepática del sistema del complemento en las truchas expuestas a LPS que, a los tres días de la infección, se mantiene gracias al aumento en los niveles de transcritos que indica el balance de activadores (factor D/spl, 1.6 FC) e inhibidores (factor H, 1.8 FC). (véanse la TABLA 9 y

el material adicional anexo).

Asimismo, el análisis ontológico de las categorías funcionales representadas diferencialmente ($p < 0.05$) durante la exposición a LPS destaca la presencia de transcritos propios o relacionados con el sistema del complemento (TABLAS 9 y 10) en el seno de una respuesta global defensiva claramente representada a las 72 horas de exposición al LPS según se observa en la asignación de clases funcionales cuyos transcritos muestran coregulación (TABLA 9). Aún cuando menor, por su representación de transcritos, el análisis de las categorías más representadas en la plataforma de micromatriz sugiere un giro, ausente en los primeros compases de la respuesta de fase aguda (RFA), hacia el mantenimiento y regulación de la activación del sistema del complemento en el momento (72 horas) en el que la respuesta hepática puede empezar a considerarse sistémica y la reacción defensiva involucra el trasiego de células linfocitarias B y T, a lo que probablemente no es ajena la expresión temprana de los receptores CR1 I CR2. La expresión baja a moderada de los genes del complemento involucrados en la RFA hepática de la trucha, junto con la falta de expresión del C3a, uno de los componentes anafilácticos del complemento representados en la plataforma de micromatriz, confirma, por otra parte, la documentada resistencia a la peritonitis y modelos de shock séptico inducidos por LPS en los peces [166, 257].

La respuesta del sistema del complemento (y por extensión, de fase aguda), por otra parte, resulta fuertemente variable en función de la especie infectada, de la virulencia del patógeno y de si se inocula todo o una parte del mismo. En dos estudios recientes [76, 98], la vacunación intraperitoneal de una variante atenuada de *Aeromonas salmonicida*, un patógeno oportunista común en los cultivos de salmónidos, y de *Listonella (Vibrio) anguillarum*, no originó una respuesta robusta del sistema del complemento en el salmón (*Salmo salar*) y la trucha (*O. mykiss*), respectivamente, contrariamente a lo observado durante las infecciones experimentales de peces gato (*Ictalurus punctatus*, *I. furcatus*) con su principal patógeno, *Edwardsiella ictaluri*, una bacteria Gram negativa responsable de la septicemia entérica en esta especie [243, 258]. En este caso, los niveles de expresión hepáticos de los transcritos del sistema del complemento analizados (C3, C7, C8 y factor B) alcanzaron los 5 FC a los cinco días de la infección en el hígado de *I. punctatus*, y entre 3 y 14.5 FC en *I. furcatus* para los componentes C3, C4, C7, C9 y el factor H (14.5 FC) expresados en el hígado a los tres días de la infección por inmersión del patógeno en el agua.

En la trucha, Lovoll *et al.* (2007) describió un patrón de expresión similar al observado en nuestro estudio, en hepatocitos tratados con LPS; la expresión de los componentes del complemento, sin embargo, variaron en función del órgano considerado: en marcado contraste con la conspicua expresión hepática, sólo se observó una regulación menor de los genes que codifican para la proteína C3 en el riñón cefálico y el bazo. Además, la expresión genética se reveló fuertemente dependiente de la isoforma analizada, de manera

que la isoforma C3-4 apareció regulada a la baja en el riñón cefálico previa estimulación con LPS, manteniéndose niveles variables de las isoformas a lo largo de la exposición al lipopolisacárido [259]. A todo ello cabe añadir la activación espontánea de fondo que se ha observado en la vía alternativa del complemento en mamíferos [260], y que contribuye al refuerzo de la reactividad inmunitaria inmediata independiente de la síntesis hepática. El umbral de respuesta del organismo al PAMP o patógeno vivo, así como la vía de entrada son, en este caso, determinantes de una inflamación localizada a la que sigue una respuesta de fase aguda hepática de menor calibre, salvo en los casos, claro está, en los que la función hepática se vea comprometida.

Sin embargo, y a pesar de la variabilidad que, como en el caso de la infección por IHNV discutida anteriormente, cabe atribuir a la respuesta defensiva en los teleósteos, a tenor de estos y otros resultados, la adscripción de los reguladores del sistema del complemento analizados en este trabajo (factores H, D, proteínas CR1/2) a la categoría de indicadores de una respuesta de fase aguda en la trucha parece justificada.

Proteínas de fase aguda e inmunidad celular durante la exposición a LPS en el hígado de la trucha

De las numerosas proteínas de fase aguda presentes durante la respuesta de fase aguda en los vertebrados, nuestra plataforma de micromatriz detectó, en el hígado expuesto a LPS de la trucha, los transcritos de los genes codificantes de componentes antimicrobianos (lisozima), moduladores de la respuesta adaptativa (alfa y beta microglobulinas, componente amiloide del suero P, proteínas de unión a citoquinas, catepsina C3), reguladores del plegamiento, ensamblaje y transporte proteínico (HSP90, HSP70, HSP27, HSPgp96, proteínas BAG), organizadores tisulares plasmáticos (Apolipoproteína AII, catepsina L2) y secuestradores/distribuidores de metales (Ferritina, Metalotioneína A, selenioproteína P y proteína L13). Como se ha comentado en el caso de la activación del sistema del complemento, a las 24 de la exposición a LPS en el transcriptoma del hígado de la trucha abundan la mayoría de los transcritos asociados a las proteínas mencionadas.

Como muchos otros componentes de la respuesta humoral y de fase aguda, la lisozima está presente en vertebrados e invertebrados, y su actuación bactericida se beneficia de su ubicuidad organográfica, así como de sus propiedades opsonicas, en coalición con el sistema del complemento y las poblaciones de macrófagos maduros [261]. Como proteína de defensa general en las barreras de entrada al organismo, no es de extrañar la regulación al alza (1.5 FC) que muestra en el hígado de las truchas expuestas a LPS durante 24 horas, aunque su expresión desaparece dos días después.

Más interesante resulta la expresión bimodal de la apolipoproteína AI-1 (APOA1), el principal componente de las proteínas de alta densidad (HDL) séricas, cuyos transcritos, a la baja durante las primeras 24 horas de exposición a LPS (-1.9 FC), aumentan en el

hígado de las truchas dos días después (1.6 FC). La proteína APOA1 resulta idéntica al factor estabilizador de la prostaciclina, por lo que se le atribuye una función en la regulación de la vasodilatación y agregación plaquetaria en situaciones de rotura tisular y/o inflamación, así como de la síntesis de proteínas hepáticas [262, 263]. Sin embargo, recientemente [264] se ha sugerido un papel inhibitorio en la inhibición de la vía lítica del sistema del complemento en el bacalao (*Gadus morhua*), lo que, en el caso del transcriptoma hepático de la trucha que nos ocupa, explicaría su regulación al alza durante la fase de control de la respuesta defensiva a los tres días de exposición a LPS descrita en el apartado previo.

Las proteínas de respuesta térmica (HSPs, *Heat Shock Proteins*) muestran una regulación al alza variable (de 1.2 a 1.58 FC) durante las primeras 24 de exposición a LPS, desapareciendo del conjunto de genes expresados diferencialmente a las 72 horas de exposición. Los transcritos del precursor de la endoplasmina o HSP96 y de la HSP90 muestran la mayor intensidad de expresión (>1.5 FC). Dada la ubicuidad y su función general como reguladoras del procesamiento y tránsito proteicos, las HSP difícilmente pueden considerarse marcadores unívocos e inequívocos de respuestas inmunitarias, estresantes o alostáticas concretas, ya que, como se ha discutido con anterioridad, su número y expresión tienden a fluctuar demasiado. Sin embargo, la representación de algunos tipos concretos de transcritos en el hígado confirma la reactividad inmunitaria de este órgano frente a la exposición a LPS. A la HSP96, por ejemplo, se la considera un coadyuvante natural de la impronta adaptativa e innata durante la respuesta inmunitaria, debido a sus interacciones con células presentadoras de antígenos y citotóxicas [265], y la HSP27 es capaz de suprimir el incremento de las especies reactivas de oxígeno que conlleva un medio oxidante, característico de la actividad fagocítica [266]. Por su parte, las proteínas HSP90 son capaces de formar un complejo de activación con otras proteínas superficiales de unión al lipopolisacárido, distintas de los receptores Toll-like y CD14, que parece involucrado en la transducción de la señal originada por la unión a LPS, de ahí que se las considera remanentes de un sistema de procesamiento de PAMPs y presentación de antígenos antiguo [190].

Las proteínas BAG actúan a su vez regulando a las reguladoras: su unión a las HSP70 las convierte en un nodo crucial en los procesos de plegado proteínico y función celular general [267]. El transcrito para la BAG-4 se encuentra regulado a la baja (-2 FC) en el hígado de las truchas expuestas durante 24 horas a LPS, pero al alza (2 FC) a los tres días de la inoculación. La proteína BAG-4 se considera una proteína inhibidora de la autoactivación independiente de ligando de los dominios mortales (*death domain*) intracelulares, responsables del desencadenamiento de la apoptosis, que presentan los miembros de la familia de receptores del TNF [268]. La bipolaridad de los niveles de expresión del gen que codifica la proteína BAG-4 en el hígado de la trucha sugiere un arresto inicial (24 horas) de la inhibición de la apoptosis mediada por los infiltrados leucocitarios y poblaciones de macrófagos residentes en el hígado, pareja con el menoscabo de la función reguladora de las HSP70, poco importante si tenemos en

cuenta la expresión aumentada del resto de HSPs analizadas. La disminución de la respuesta defensiva, a las 72 horas, en términos del número de participantes humorales de fase aguda, parece, pues, acompañarse del refuerzo en el control de la respuesta inmunitaria que se desprende del análisis ontológico (FIGURAS 21 a 23) y de la consistente regulación al alza de la BAG-4, el factor D del sistema del complemento y del transcrito asociado a la proteína ribosómica L13, que previa estimulación por la citoquina proinflamatoria interferón gamma [269], actúa silenciando la traducción de proteínas como la ceruloplasmina, importantes en la regulación de los iones hierro bajo una intrusión bacteriana y uno de los transcritos habituales durante la respuesta de fase aguda en el hígado de los teleósteos [243]. En la micromatriz analizada, del metabolismo del hierro se encarga también la ferritina, cuya expresión al alza (1.3 FC) durante las primeras 24 horas a la exposición a LPS también se ha observado durante las infecciones in vivo de *Ictalurus punctatus* con el patógeno *E. ictaluri* [243] y de los salmones (*S. Salar*) infectados con *A. salmonicida* [76]. La selenioproteína P, de común asociada con los endotelios e implicada en la defensa oxidativa del espacio extracelular, permanece, en cambio, inhibida (-1.4 FC) a las 24 horas de la exposición a LPS, de manera similar a lo que ocurre en el hígado infectado de *I. furcatus* [270]. Aunque ambas proteínas intervienen durante la inflamación, de la ferritina se conoce su papel como mediadora en la inhibición de la actividad apoptótica inducida por TNF alfa: la inducción de la ferritina en la cascada de señalización orquestada por los factores de transcripción NF-kappaB previene la señalización y activación de la quinasa terminal c-Jun (JNK) que conduce a la apoptosis, inhibiéndola [271]. La expresión moderada/baja de la ferritina en el hígado de las truchas que experimentan inflamación peritoneal indica, por tanto, que podría participar en el control inicial de la reacción celular inmunitaria mediante la regulación de la apoptosis y/o la activación, consistente pero de bajo nivel de un órgano lejano física y temporalmente (24 horas) del foco de infección, reacción esta observada, como ya se ha comentado, en el mismo órgano bajo inflamación en otras especies de peces.

Precisamente en *I. furcatus*, a los tres días de la inmersión en agua infestada de *Edwardsiella ictaluri*, la expresión de las pentraxinas se regula al alza [270], contrariamente a lo observado en el hígado de las truchas expuesta a LPS durante 24 horas. La proteína amiloide sérica P (SAP), una de las pentraxinas junto con la proteína C-reactiva, arquetipo de la respuesta de fase aguda, se regula a la baja a juzgar por los niveles de expresión de su transcrito (-1.5 FC). En los mamíferos, la proteína SAP es un potente inhibidor de la diferenciación de monocitos en fibrocitos lo que, a su vez, dificulta la curación de las heridas [272]. En los peces, la expresión de las pentraxinas se asume constitutiva [273], aún cuando se las considera todavía proteínas de fase aguda, y sus niveles oscilan al alza o a la baja dentro de unos límites moderados, como confirman nuestros datos. De hecho, en los salmónidos la reactividad de la proteína SAP al la inoculación de LPS o formas activas de *Aeromonas salmonicida* muestra una respuesta significativa pero poco intensa [274].

La familia de proteasas que incluye a las catepsinas lisosómicas son también actores habituales durante la respuesta de fase aguda. Nuestros datos muestran una escasa regulación al alza de la catepsina L2 (1.18 FC) y a la baja (-1.4 FC) de la catepsina C3 a las 24 y 72 horas de la exposición a LPS, respectivamente. La primera, presente en varios tejidos y poblaciones celulares, responde al estrés oxidativo e influye en la degradación de la matriz extracelular [275]. La segunda, frecuente en leucocitos polimorfonucleares, interviene en el proceso inflamatorio coordinando a la activación de proteasas de serina [276]. Dada su ubicuidad y la multiplicidad de funciones, los valores de su expresión apuntan el carácter bimodal de la respuesta de fase aguda expuesta en apartados previos.

A las 24 horas de provocar la inflamación peritoneal con LPS, la conexión con la inmunidad mediada por células durante la respuesta de fase aguda, sugerida por el análisis del transcriptoma hepático de la trucha, se completa con la regulación a la baja de la expresión genética de las proteína de unión a citoquinas (Cybr) (-1.3 FC) y las microglobulinas alfa (-1.7 FC) y beta (-1.5 FC). En los mamíferos, el gen Cybr se expresa preferentemente en tejidos hematopoyéticos y linfocitos Th1 colaboradores [277], y resulta inducido por la acción de citoquinas (TNF alfa, IL-2, IL-12) y LPS durante los procesos de adhesión celular, sinapsis inmunitaria y señalización intracelular del receptor de los linfocitos T [278]. La microglobulina alfa y la microglobulina beta, por su parte, se necesitan para la regulación de la inflamación (debida a la inhibición que de la quimiotaxis en los neutrófilos ejerce la microglobulina alfa [279]) y la expresión de del MHC de tipo I, respectivamente [280]. En este sentido, nuestros resultados sugieren un cierto grado de inhibición en el procesamiento y presentación de antígenos, propiciado por la regulación a la baja de la microglobulina beta, que acompaña la respuesta inmunitaria, claramente humoral, en el hígado de los animales expuestos a LPS durante 24 horas.

TABLA 9. CATEGORÍAS ONTOLÓGICAS CUYOS GENES MUESTRAN COREGULACIÓN SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$)

FUNCIÓN	LPS (24)			LPS (72)		
	FC (media)	FC (var.)	N	FC (media)	FC (var.)	N
PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS	-0.57	0.03	2			
PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS	-0.57	0.03	2			
CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	-0.23	0.01	2	-0.54	0.05	2
ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO				0.71	0.15	5
RESPUESTA DEFENSIVA				1.39	0.37	12
OSTENCIÓN DE ENERGÍA POR OXIDACIÓN	-0.23	0.01	2	-0.54	0.05	2
REGIÓN EXTRACELULAR				-0.35	0.40	12
GLUCÓLISIS	-0.23	0.01	2	-0.54	0.05	2
RESPUESTA INMUNITARIA	-0.30	0.45	11	0.54	0.39	10
UNIÓN A LÍPIDOS	-0.82	0.27	4			
METABOLISMO DE LÍPIDOS	-0.95	0.01	2			
RECEPTOR MHC DE TIPO I	-0.57	0.03	2			
TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL				1.60	0.14	2
MEMBRANA MITOCONDRIAL				1.60	0.14	2
UNIÓN A ARNm	-0.46	0.01	2			
NUCLEOLO	-0.46	0.01	2			
RESPUESTA A ESTÍMULOS BIÓTICOS				0.38	0.41	17
RESPUESTA A PLAGAS, PATÓGENOS Y PARÁSITOS				0.50	0.47	7
RESPUESTA AL ESTRÉS				-0.49	0.47	7
RESPUESTA A PROTEÍNAS	0.53	0.20	4			
ACTIVIDAD MOLECULAR ESTRUCTURAL	0.32	0.44	11			
UNIÓN A CINC				-0.62	0.07	3

HÍGADO
COREGULACIÓN

El análisis de las categorías ontológicas más representadas, en cuanto al número de genes expresados diferencialmente sobre el total en la micromatriz, destaca precisamente las relacionadas con el procesamiento y presentación de antígenos y la actividad del receptor del MHC de tipo I. Coincidente con la escasa (y esperable) respuesta adaptativa temprana al LPS en el hígado, la inhibición de los transcritos para la microglobulina alfa indica un trasiego aumentado de neutrófilos hacia o desde el lugar de la infección. A las 72 horas de la exposición a LPS, el control de la reacción de fase aguda y la extensión de la inflamación mediada por la participación de células de la respuesta adaptativa justifican la considerable regulación a la baja (-2.4 FC) del factor de transcripción JunB1, considerado un regulador crítico de la activación y proliferación de los linfocitos T, gracias a la activación transcripcional de interleucinas mediadoras como la IL-2, IL-4 e IL-10 [281].

El hígado reactivo (II): respuesta metabólica

Durante la respuesta hepática temprana (24 horas) a la inflamación peritoneal en la trucha varios genes codificantes para proteínas ribosómicas implicadas parcial o totalmente en la fosforilación oxidativa mitocondrial se encuentran en un estado de moderada/baja regulación al alza (L11, L17, S12, con valores entre 1.2 y 1.3 FC) o a la baja (L35, con un valor de -1.3 FC). Lo mismo ocurre con algunos factores de transcripción, como los transcritos para la proteína CELTIX1 (regulada a la baja -1.3 FC) y las ciclinas D2 (regulada al alza con valor de 1.2 FC), ambos específicos de la fase de transición G1/S del ciclo celular [282].

Si bien esto parece indicar un proceso normal de activación e inhibición celulares balanceado, el análisis ontológico de la función de los genes implicados en el metabolismo de la glucosa, lípidos y la función mitocondrial muestra una regulación a la baja (inferior a -0.5 FC de promedio) de los procesos metabólicos dirigidos a la obtención de energía, así como de la transducción y señalización intracelulares (FIGURAS 21 a 23) durante las primeras 24 horas de inflamación peritoneal, situación que se invierte dos días más tarde, excepto en lo que respecta al metabolismo de la glucosa.

A las 72 horas, el metabolismo de lípidos y la función mitocondrial destacan como unas de las categorías funcionales más representadas y cuyos genes muestran valores promedio más elevados de regulación al alza (1-1.5 FC) en la micromatriz del hígado expuesto a LPS. De hecho, la fuerte regulación al alza del complejo enzimático COX mitocondrial (3.2 FC) y los transcritos para la proteína de unión a ácidos grasos (3 FC) confirman el aumento de un metabolismo hepático dirigido a sustratos lipídicos concretos, lo que puede interpretarse como un aumento de la producción de moléculas de respuesta a la carga alostática o, dada la escasa reactividad al LPS característica de los teleósteos, el inicio del retorno alostático a una situación de quietud inmunitaria.

Durante la respuesta de fase aguda es común la depleción de diversos micronutrientes, como el hierro, el selenio y el cinc, implicados en la respuesta inmunitaria en tanto que esenciales para el hospedador y el parásito o patógeno. Del control de las disponibilidad de hierro y selenio se encargan, entre otros componentes, la ferritina y las selenoproteínas P (véase más arriba).

TABLA 10. CATEGORÍAS ONTOLÓGICAS CUYOS GENES SE EXPRESAN D EMANERA DIFERENTE ($P < 0.05$)

FUNCIÓN	LPS (24)			LPS (72)		
	FC (media)	FC (var.)	N	FC (media)	FC (var.)	N
RESPUESTA INMUNITARIA	-0.30	0.45	11	0.54	0.39	10
RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL	-0.19	0.44	6	0.51	0.51	6
RESPUESTA DEFENSIVA	-0.18	0.51	13	0.50	0.37	12
ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO	-0.18	0.49	5	0.71	0.15	5
RESPUESTA A PLAGAS, PATÓGENOS Y PARÁSITOS	-0.25	0.43	7	0.50	0.47	7
RESPUESTA A ESTÍMULOS BIÓTICOS	-0.04	0.54	18	0.38	0.41	17
SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR	-0.87	0.12	2	0.88	0.19	2
TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL	-0.87	0.12	2	0.88	0.19	2
REGIÓN EXTRACELULAR	-0.19	0.56	14	0.45	0.40	12
RESPUESTA A PROTEÍNAS	0.53	0.20	4	-0.04	0.30	4
MITOCONDRIA	-0.19	0.47	6	0.68	0.80	6
MEMBRANA MITOCONDRIAL	-0.32	0.08	2	1.60	0.14	2
TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL	-0.32	0.08	2	1.60	0.14	2
CATABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	-0.23	0.01	2	-0.54	0.05	2
OBTENCIÓN DE ENERGÍA POR OXIDACIÓN	-0.23	0.01	2	-0.54	0.05	2
GLUCÓLISIS	-0.23	0.01	2	-0.54	0.05	2
UNIÓN A LÍPIDOS	-0.82	0.27	4	1.09	0.47	3
METABOLISMO DE LÍPIDOS	-0.95	0.01	2	1.13	0.65	2
UNIÓN A IONES CINCO	-0.10	0.28	3	-0.62	0.07	3

HÍGADO
ONTOLÓGICA FUNCIONAL

La mengua en la disponibilidad biológica de cinc que acompaña la respuesta de fase aguda característica de los mamíferos también se observa en el hígado de las truchas expuesta a LPS, según se desprende de la regulación a la baja de los transcritos asociados a la categoría funcional que describe la unión a este ion. Aunque se desconoce el mecanismo exacto que influye en la depleción del cinc, se ha demostrado la participación de la IL-6 en el proceso [283], uno de los mediadores clave de la respuesta de fase aguda en los mamíferos.

El hígado reactivo (y III):

modelo global de la respuesta de fase aguda debida a LPS

En el modelo desarrollado hasta el momento de respuesta inmunitaria bimodal hepática paralela a al peritonitis originada por LPS en la trucha se distinguen, por tanto,

- (1) Una primera respuesta humoral, inespecífica, de fase aguda y temprana (24 horas), de bajo nivel en términos de expresión genética pero con la participación de numerosos genes de funcionalidad diversa, que tiene a las HSPs y el sistema del complemento como principales actores y cuya expresión al alza ya la baja, respectivamente, contrasta con la inhibición de genes codificantes para proteínas inhibitoras del sistema del complemento, el tránsito y la quimiotaxis celulares de neutrófilos y otras poblaciones mieloides errantes, claramente activas durante los

primeros estadios de la infección. El cuadro se completa con el arresto metabólico de los procesos de obtención de energía por oxidación de sustratos orgánicos, la glucólisis y el metabolismo de lípidos, así como de una bajada global de la transducción y señalización intracelulares.

- (2) Una respuesta inmunitaria tardía (a las 72 horas de la exposición a LPS) más intensa en términos transcripcionales (intensidad de la expresión genética) pero escasa en cuanto al número de genes implicados en la respuesta, fuertemente reguladora, en la que la actividad del sistema del complemento y los genes implicados en la síntesis de proteínas características de la respuesta de fase aguda se someten a un considerable control, y en la que el diálogo celular entre la inmunidad innata y adaptativa parece cobrar forma, aún cuando el efecto sistémico de la peritonitis es, debido a la peculiar resistencia a la exposición a LPS en los teleosteos, probablemente escaso. El arresto metabólico previo persiste en el procesamiento de la glucosa pero desaparece en el caso de los lípidos, coincidente con una elevada actividad de la maquinaria mitocondrial.

La comparación de los genes comunes, expresados diferencialmente, en la respuesta defensiva desencadenada por la exposición a LPS bacteriano en el hígado y el riñón cefálico de la trucha sugiere una menor respuesta, en número de transcritos e intensidad de la expresión genética, en aquel.

En el riñón cefálico, los genes implicados en la reorganización y escultura de la matriz extracelular (metaloproteinasas 9 y 13, nefrosina 1), factores activadores del complemento (proteasas de serina spl/factor D) y reguladores del tránsito celular (nefrosina-1) permanecen fuertemente inhibidos a las 24 y 72 horas de la exposición a LPS, mientras que el procesamiento y presentación de antígenos mediado por el MHC de tipo I se regula al alza en el tercer día de la inflamación peritoneal.

En el hígado, en cambio, la respuesta de fase aguda condiciona la reactividad del órgano en el patrón bimodal mencionado. La expresión de los genes comunes, entre los que destacan los transcritos de las proteínas de fase aguda BAG-4 y L13, el factor H del sistema del complemento y reguladores del metabolismo lipídico como la APOA1 y las proteínas de unión a ácidos grasos, oscila entre la regulación a la baja (durante las primeras 24 horas) y al alza (a las 72 horas) en todos los casos excepto para el factor H y el transcrito de la proteína L13. La respuesta bimodal del hígado interesa a la multifuncionalidad del mismo (detoxificación, metabolismo digestivo, respuesta defensiva de fase aguda), mientras que en el caso del riñón cefálico, como se ha comentado previamente, parece clara una vocación exclusivamente inmunitaria y hematopoyética, centrada en la maduración linfocitaria estimulada en parte por el procesamiento de antígenos. No hay que olvidar, sin embargo, el efecto que sobre el principal órgano hematopoyético de los peces y el principal productor de componentes de la respuesta de fase aguda tiene la *lejanía* del foco de infección y que afecta tanto a la

intensidad y tempo de la respuesta como al trasiego leucocitario. De hecho, en dos estudios recientes [284, 285] en los que se sometió a salmones y truchas a la infección del protozoo *Neoparamoeba perurans*, responsable de la patología amebiana de las branquias en las especies de salmónidos cultivadas, la respuesta transcriptómica en el foco de infección (branquia) fue muy superior a la escasa actividad reguladora experimentada por el riñón cefálico y el hígado, lo que se atribuyó a la geografía anatómica del foco de infección, más que a la propia naturaleza de la infección y su tejido diana [285].

FIGURA 21. PERFILES FUNCIONALES DE LA RESPUESTA DE FASEA GUDA EN EL HÍGADO DE LA TRUCHA (24 HORAS). (SE INDICAN EL ROJO LAS CATEGORÍAS CUYOS VALORES DE EXPRESIÓN GENÉTICA SE REGULAN A LA BAJA)

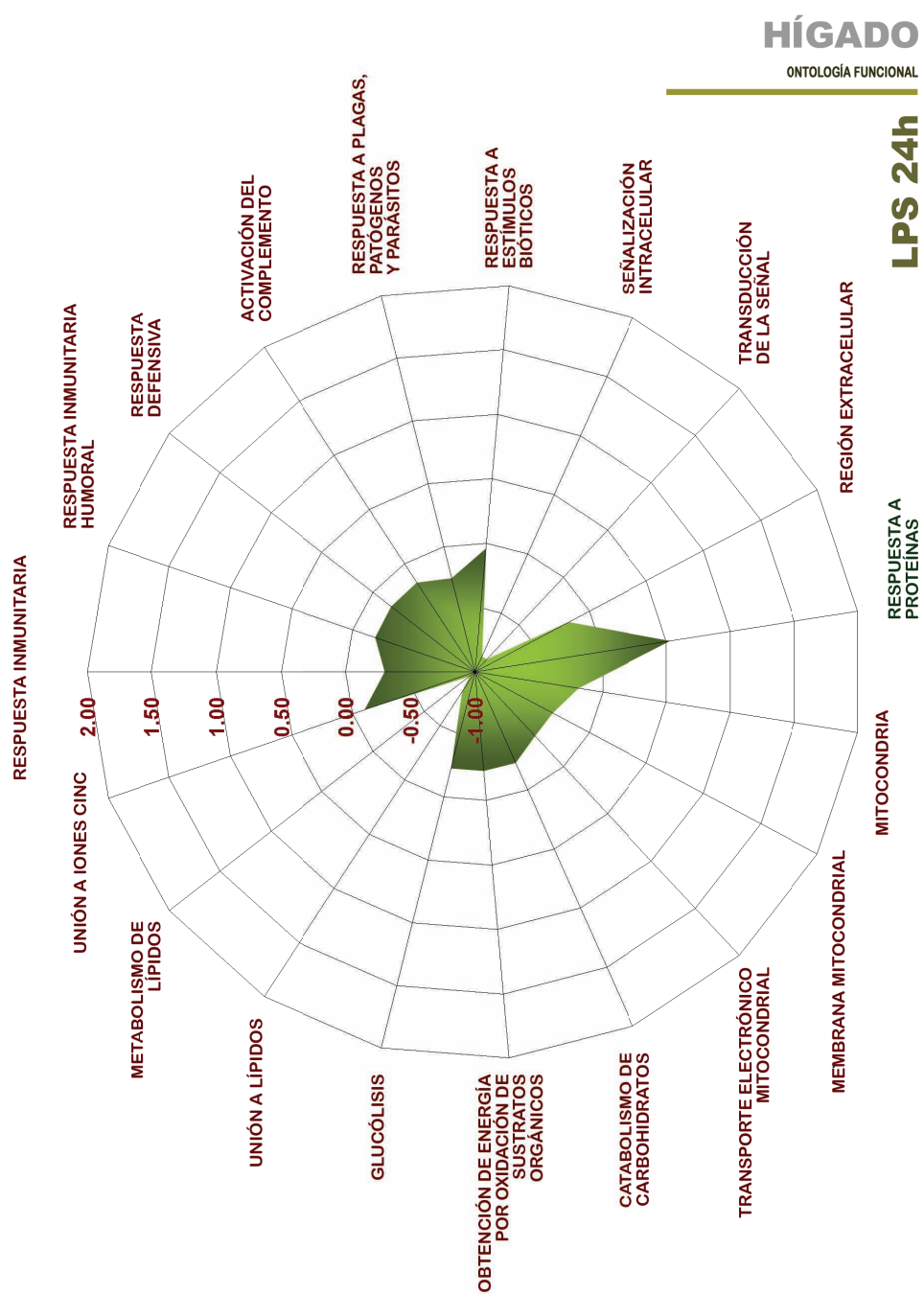


FIGURA 22. PERFILES FUNCIONALES DE LA RESPUESTA DE FASE AGUDA EN EL HÍGADO DE LA TRUCHA (72 HORAS). (SE INDICAN EL ROJO LAS CATEGORÍAS CUYOS VALORES DE EXPRESIÓN GENÉTICA SE REGULAN A LA BAJA)

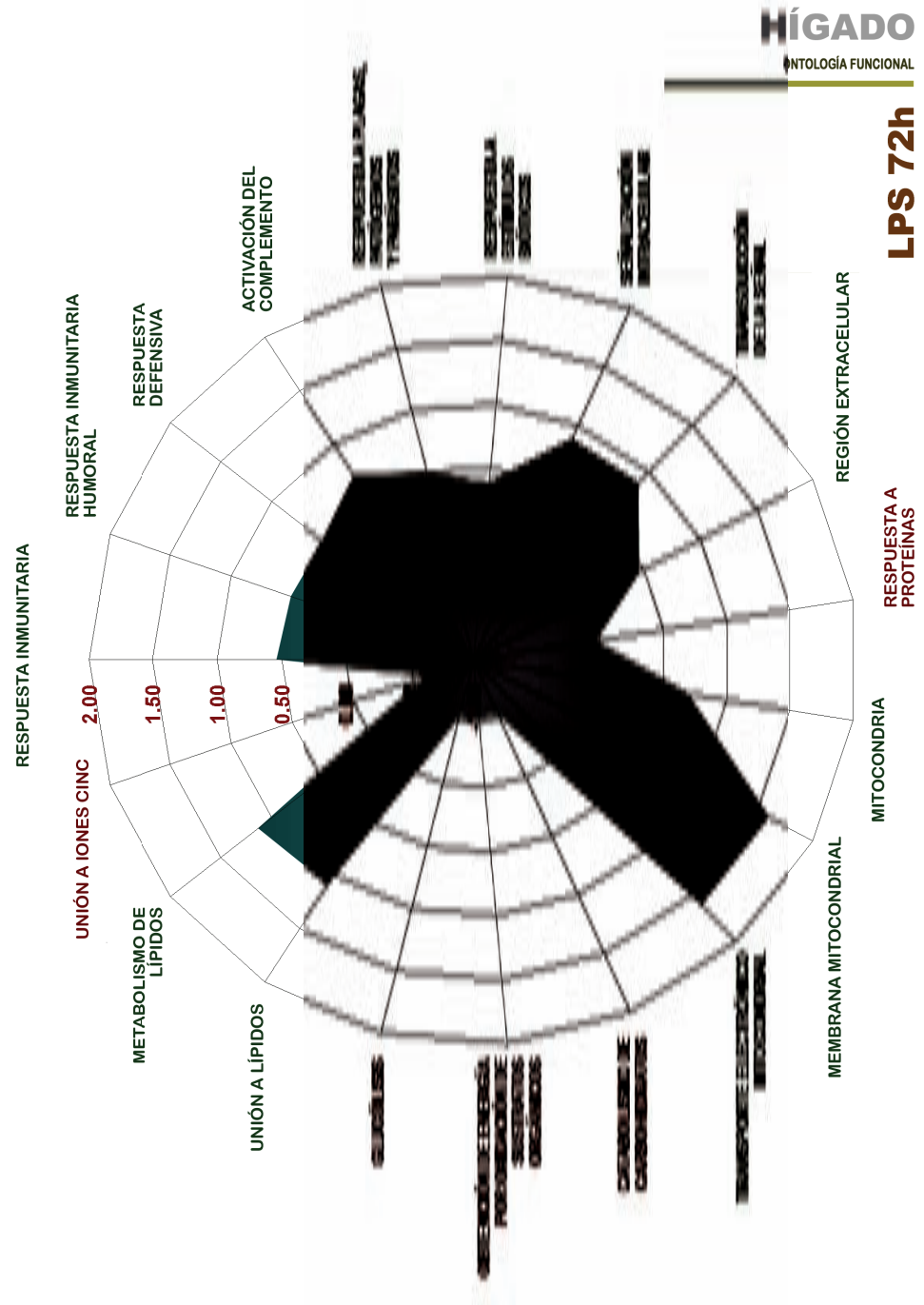
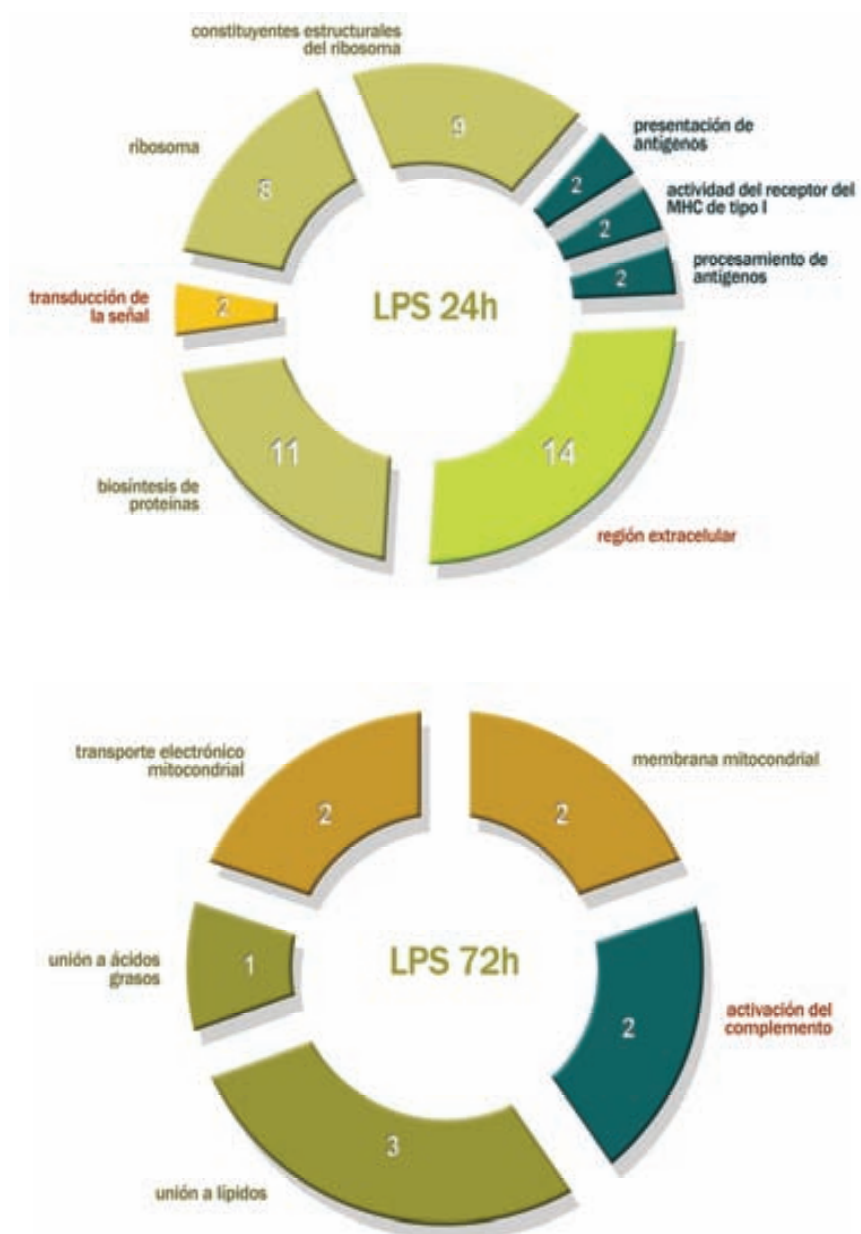


FIGURA 23. CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBREREPRESENTADAS EN EL HÍGADO DE LA TRUCHA.

Se representan las categorías ontológicas funcionales cuya representación en la plataforma está claramente mejor representada (corrección de Yates a la prueba de Ji cuadrado, $p < 0.05$), conjuntamente con el número de genes expresados diferencialmente para cada categoría.

A tenor de estos y otros resultados basados en el análisis de micromatrices de ADN en los que la infección de los peces se desencadena gracias a la inoculación de organismos vivos, atenuados o virulentos, es posible afirmar tanto la presencia de una respuesta de fase aguda arquetípica en los teleósteos analizados hasta la fecha como la inevitable variabilidad que muestran varios de sus componentes en términos de intensidad de la expresión, y que obedece fundamentalmente

- (1) al tratamiento inflingido (tipo de patógeno, virulencia y exposición repetida),
- (2) a la propia idiosincrasia genómica del hospedador y
- (3) a la metodología técnica de la micromatriz.

Este último factor, en especies sin una caracterización genómica clara, se considera unánimemente el menor de los problemas, y raramente la discusión sobre la necesidad de mezclar (*pooling*) o individualizar las muestras para manejar la variabilidad biológica [286, 287] traspasa la barrera de los imponderables económicos o meramente epistemológicos, esto es, teniendo en cuenta la definición informativa no redundante de la especie, especialmente si no hablamos de modelos de experimentación. Lo mismo puede decirse para la utilización de plataformas de micromatriz elaboradas siguiendo la receta genómica de una especie y que se aplican a la elucidación transcriptómica de otra, como se discute en el próximo capítulo.

De la misma manera que la respuesta defensiva resulta un continuo de señalización en las redes celulares y humores plasmáticos y tisulares, y por lo tanto resulta excesivamente simplificador adscribir esta o aquella reacción al brazo adaptativo o innato inmunitarios, tampoco puede establecerse una línea divisoria clara entre el efecto del patógeno *per se*, vivo, virulento y funcional, y el efecto endotóxico de alguna de sus partes. Más allá de diferencias técnicas en la construcción de las micromatrices de análisis, y aunque el diálogo celular entre PAMPs foráneos y sus receptores posibilita la sinapsis inmunitaria y, por ende, las diversas respuestas asociadas (de fase aguda, innata, adaptativa), la complejidad de las aún oscuras relaciones entre hospedador y parásito tiene su reflejo en los resultados dispares que, como en el caso de la infección por *Edwardsiella ictaluri* practicada en *Ictalurs punctatus* e *I. furcatus* [243, 258], afecta al transcriptoma hepático de dos especies hermanas. Si parece segura, por lo reiterado de su observación en varias especies, la tenue respuesta inmunitaria a la exposición a LPS en los teleósteos, independientemente de si la infección se lleva a cabo con organismo vivos o la porción endotóxica de la molécula. Los nuestros y otros estudios [166, 257, 288, 289] parecen demostrar que la sepsis, en los peces, dista de ser arquetípica si se la compara con los modelos murinos y humanos al uso.

La forma y función de la conversación entre genoma y fenoma exclusivos de la especie considerada se constituyen así, en la última frontera del análisis razonado de la interacción genética, molecular y poblacional entre hospedador y parásito. De hecho, En un artículo reciente [290], en el que se examinó la heterocigosidad de más de 4900

polimorfismos de nucleótidos (SNP) repartidos en medio millar de loci codificantes de proteínas implicadas o no en funciones inmunitarias, la diversidad genética de los SNP en los loci adscritos a la función inmunitaria se descubrió mayor que la de los SNP silentes, lo que, con la elevada diversidad observada en las regiones no codificantes 5' de los genes implicados en la respuesta inmunitaria, sugiere una relajación de las constricciones evolutivas dedicadas a purificar el genoma inmunitario de variantes deletéreas, en aras de un, al parecer, deseable polimorfismo genético inmunitario.

Por su parte, la respuesta defensiva específica dispone, como se ha demostrado recientemente [9] y como sugiere el análisis de los resultados de la transcriptómica infectiva con micromatrices en varias especies, de un mayor número de actores celulares para el extenso remodelado transcripcional del escenario fisiológico que sigue a una infección o intrusión foráneas, en un reclutamiento genético mucho más amplio que el observado en la mayoría de respuestas fisiológicas. Todo ello condiciona, limita, estimula y añade un grado de variabilidad e incertidumbre en la definición de las respuestas defensivas, constreñidas en su inicio por el historial evolutivo de la especie. En el caso de los salmónidos, a los que se considera de vuelta de un proceso de tetraploidización y duplicación genómica reiterada (al menos dos eventos) experimentado tras su divergencia del linaje que incluye a los mamíferos [291, 292], y cuyo genoma cargado de transposones oculta una complejo historial de interacciones parasíticas [34, 293], la ganancia o pérdida de diversidad inmunitarias, en términos de componentes e interacciones, dista de estar resuelta, aunque responda, con toda probabilidad, de las divergencias y semejanzas presentes en las respuestas reactivas, de fase aguda e innatas, memorísticas o adaptativas.

Análisis exploratorio del transcriptoma de la dorada (*Sparus aurata*) mediante la plataforma de micromatriz de ADNc SFA 2.0

resumen

La mayoría de las especies de teleósteos que disponen de plataformas de micromatriz específicas pertenecen a grupos de indudable interés comercial (salmónidos, ictalúridos y peces planos) o gran adaptabilidad a las condiciones de laboratorio (danios cebra, medaka, fugu). La dorada, *Sparus aurata*, un Perciforme moderno ampliamente cultivado en la región mediterránea carece, hasta el momento, de una descripción transcriptómica adecuada, especialmente en su fase adulta. Sin embargo, por su condición de especie cultivable necesita del desarrollo de un marco conceptual en el que evaluar su respuesta inmunitaria frente a patógenos, requerimientos de salubridad y factores de crecimiento y productividad comercial. A la espera del desarrollo inminente de herramientas de análisis genético basadas en los proyectos de anotación vigentes para la especie, se propone aquí el análisis, mediante una micromatriz de ADNc específica de salmónidos, de la respuesta transcriptómica valorada en las branquias (interfase metabólica, osmoreguladora y vía de acceso al medio interno) y el riñón cefálico (principal órgano hematopoyético de los teleósteos) de doradas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta comercial enriquecida con componentes inmunoestimulantes. Dada la escasa diversidad de la anotación genómica para la dorada, para la evaluación de la efectividad de la hibridación cruzada entre transcriptomas de ambas especies, se han utilizado los criterios al uso referidos al número de genes expresados diferencialmente y la valoración ontológica de los mismos. Para el análisis se utilizó una variante de la plataforma SFM 1.0, la SFA 2.0 enriquecida con diversas clases funcionales, especialmente las que cuentan con genes implicados en respuesta inmunitaria (236 genes), comunicación celular (291 genes), transducción de la señal (245 genes), actividad de los receptores (126 genes), apoptosis (120 genes), ciclo celular (76 genes), catabolismo de proteínas (90 genes), plegamiento de proteínas (70 genes) y respuesta al estrés oxidativo (39 genes). Los resultados muestran una expresión de transcritos mayor en el riñón que en la branquia, en cuanto al tipo ontológico (respuesta inmune, apoptosis, ciclo celular, hemoglobina en el riñón) y número de genes expresados diferencialmente por encima de 1.5 veces la expresión basal al alza o a la baja (211 de 446 en el riñón y 48 de 331 de en la branquia). En conjunto, la administración de la dieta inmunoestimulante activa con intensidad moderada/baja grupos de genes y categorías funcionales relacionadas con la inmunidad.

¹ La única plataforma de micromatriz que existe en el momento de escribir estas líneas está concebida para el análisis del transcriptoma larvaria de la dorada, y se describe en: Sarropoulou E, Kotoulas G, Power DM, Geisler R., **Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology**, 2005. *Physiol Genomics*. 17;23(2):182-91.

Introducción: lazos de sangre

A lo largo de la introducción general se han comentado los claros y oscuros de la investigación genómica de aquellas especies que, por su pertenencia a grupos minoritarios, endémicos, poco comerciales o adaptables a las condiciones de laboratorio, entre otras características, rehúyen la investigación genómica aplicada. Lo que podríamos llamar el *sesgo mamífero* está presente en el volumen de anotación genética de las bases de datos tanto como el *sesgo filocomercial* lo está en los reservorios de datos dedicados a las especies piscícolas. Obviando la pormenorizada descripción funcional y arquitectónica del genoma de la que disponen algunas especies de peces “murinos” (danio cebra, medaka, fugu) y sus variantes mutagénicas, sólo algunas especies de indudable interés comercial e indisoluble relación histórica con determinadas áreas geográficas (v.g. algunos salmónidos en el centro y norte de Europa, los ictalúridos en Norteamérica y las tilapias en el continente africano) mantienen una salud (relativamente) envidiable en el ámbito de la anotación e investigación genómicas. Si bien es cierto que la popularización de la secuenciación genómica de alto rendimiento es una cuestión de tiempo, no lo es menos que, hasta la fecha, sólo el esfuerzo combinado de varios grupos de investigación permite el análisis genómico de las especies menores en la era postgenómica.

En este sentido, la caracterización funcional del genoma de la dorada resulta un claro paradigma. La especie, *Sparus aurata*, una de las más cultivadas y apreciadas en el mediterráneo, junto con la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Psetta maxima*) se cultiva en volúmenes de hasta 90.000 Tm en países como Grecia, Turquía, España e Italia, valorándose su extracción pesquera en poco más del 8-10 % del total de la producción conjunta [294]. Sin embargo, hasta la fecha sólo una plataforma de micromatriz de ADNc permite explorar el transcriptoma de doradas en su fase larvaria [295]. De ahí que en especies de escasa denominación genómica, y debido al coste que implica diseñar y elaborar plataformas de micromatriz específicas para especies determinadas, se haya optado por la utilización de micromatrices diseñadas propias de una especie concreta para la evaluación del transcriptoma de otra. Las plataformas en las que la hibridación cruzada se utiliza para el análisis transcriptómico masivo de patologías, exposición a contaminantes o rutas filogenéticas no son exclusivas de especies marinas y se han utilizado recurrentemente en mamíferos y anfibios (véase [296] para una revisión reciente).

A grosso modo, cabe diferenciar los estudios de hibridación cruzada en dos modalidades [297]: (1) Los que pretenden evaluar las diferencias genéticas entre las variantes de una especie y (2) los que intentan evaluar la expresión genética en especies diferentes con la pretensión de analizar la evolución de la regulación genética. Los problemas a los que se enfrentan ambos tipos de estudios se reducen al efecto que sobre la eficiencia de la hibridación y, por tanto, de la resolución efectiva de diferencias significativas en la expresión genética, tiene la utilización de secuencias disimilares. La metodología

bioinformática y, especialmente, matemática, para la resolución tajante del problema dista de estar resuelta, y, aunque se han propuesto varias alternativas para mejorar el análisis de los resultados de hibridación cruzada, ninguna se ha erigido como definitiva o, cuando menos, completa [298-303]. El enfoque experimental pasa, así, por la elección pragmática de dos tipos de diseños de plataformas:

- (1) *las uniespecíficas*, en las que la hibridación de las sondas de una especie con las dianas de la otra puede configurarse de manera unívoca (hibridación simple de las muestras de una especie en la micromatriz de otra) o biunívoca (hibridación de las muestras de una especie en la micromatriz de otra conjuntamente con la autohibridación o hibridación con controles específicos añadidos), y
- (2) *las multiespecíficas*, en las que la micromatriz se construye con secuencias de varias especies, y que admiten la misma complejidad de diseño que la comentada para las uniespecíficas.

Por supuesto el nudo Gordiano de la transcriptómica basada en la hibridación cruzada se resuelve hibridando el ARN de todas las especies a analizar en todos los tipos específicos de micromatrices diseñados para dichas especies, lo que, aun cuando eficaz en términos de elegancia experimental, plantea problemas de ineficiencia en la utilización del material biológico. De ahí que la receta del análisis prudente de la hibridación cruzada en las micromatrices se base en [296, 297]:

- (1) *La similitud de las secuencias* más que en la distancia filogenética, a menudo difícil de estimar y basada en modelos proclives a las sacudidas conceptuales debidas a breves episodios de secuenciación masiva de especies hasta la fecha poco estudiadas.
- (2) *La longitud de las secuencias*, dado que se ha demostrado una mayor identificación de genes regulados diferencialmente en aquellas plataformas cuyas secuencias superan los 25-70 oligómeros característicos de las plataformas de oligonucleótidos, esto es, de las plataformas de ADNc que utilizan productos derivados de PCR.
- (3) *La completitud de las secuencias*, en el sentido que si las secuencias utilizadas contienen la secuencia codificante o transcritos completos, las posibilidades de hibridación cruzada aumentan.

Y de ahí que, a su vez, el análisis de la expresión genética diferencial observado en un experimento de hibridación cruzada con matrices de ADNc, descansa en un conjunto de valoraciones mínimas que incluyan, como criterio de eficiencia y funcionamiento de la micromatriz hibridada con material poco emparentado filogenéticamente: (1) *el número y nivel de expresión de los genes* expresados diferencialmente, normalmente empleando criterios fuertemente restrictivos como limitar la elección de genes a aquellos que superen los 2 FC de regulación al alza o a la baja (2) *el análisis ontológico de las categorías funcionales asociadas*, a fin de obtener una medida cualitativa del sentido biológico de los

datos a la vez que un punto de corte para la valoración de la eficiencia de la hibridación cruzada y, en menor medida, (3) las medidas de la *similitud de las secuencias* que den razón de la divergencia de las especies.

El espacio de posibles diseños experimentales en estos casos se restringe bien a la aposición de dianas de ADNc (u oligonucleótidos) procedentes de dos o más especies sobre una micromatriz uni o multiespecífica o bien a la aposición de muestras diferentes de ADNc u oligonucleótidos de una misma especie sobre la micromatriz de otra. En el segundo caso, la divergencia genética interesa a la presente entre ambas especies, lo que simplifica el análisis y limita la variabilidad de los resultados.

De hecho, la mayoría de los estudios teórico-prácticos llevados a cabo con experimentos de hibridación cruzada en matrices de ADNc coinciden en el escaso peso de la divergencia interespecífica sobre la capacidad de detección de la expresión genética diferencial de las metodologías al uso, así como en el hecho de que a mayor distancia filogenética, más probable resulta la mengua en el número de genes expresados diferencialmente que es posible detectar [297, 298, 304-306]. A modo de ejemplo, en un estudio reciente que evaluó la expresión diferencial de genes entre diversas especies de teleósteos, aquellas cuya escisión filogenética se había producido en un período de 65 millones de años mostraron una mayor similitud en los niveles de expresión que aquellas cuyo antepasado común más próximo se remontaba a más de 200 millones de años [305].

Aunque la distancia filogenética que separa la dorada, *S. aurata*, un perciforme moderno, de la trucha, *O. mykiss*, un Protacantopterio “primitivo” supera los 200 millones de años [307], dada la escasez, en el momento de escribir estas líneas, de descripciones transcriptómicas relacionadas con la inmunidad en aquella, se describen a continuación los patrones de expresión genética y el análisis ontológico de las categorías funcionales asociadas de la branquias y el riñón cefálico de doradas sometidas a una dieta comercial inmunoestimulante. Ambos tejidos se consideran relevantes desde el punto de vista inmunitario, uno, la branquia, debido a su condición de puerta de acceso e interfase con el medio exógeno, y el otro, el riñón cefálico, por su función hematopoyética y ser albergue de las poblaciones leucocitarias de los linajes linfóide y mieloide. Para la evaluación del perfil transcriptómico de las doradas se ha optado por un diseño experimental de hibridación heteróloga en una matriz uniespecífica de salmónidos, acotada y enriquecida con transcritos asociados a la función inmunitaria, utilizando el número de genes expresados diferencialmente, el análisis de las categorías ontológicas y la comparación de los valores de expresión genética obtenidos en la micromatriz con los observados mediante RT-qPCR de genes selectos como criterios de eficiencia en el análisis transcriptómico.

Materiales y métodos

Manejo de animales y dietas experimentales

Las doradas adultas, *Sparus aurata*, de aproximadamente 100 g de peso, obtenidos de un distribuidor comercial, se mantuvieron en tanques de flujo continuo, a razón de 25 peces por tanque bajo condiciones ambientales controladas de luz (fotoperíodo de 12/12 horas de luz y oscuridad, respectivamente) y temperatura ($15 \pm 2^\circ\text{C}$). El estado de salud de los animales y la calidad del agua se evaluó cada tres días durante el período de aclimatación previo a la administración de las dietas (dos semanas) y diariamente a lo largo de todo el periodo experimental.

La dieta comercial Mistral de pienso extruído de Proaqua (granulación de 3 mm) con una composición de 43% de proteínas y 20 % de grasas se utilizó como control. La dieta de la gama Immunomistral del mismo distribuidor (granulación de 3 mm), enriquecida con levaduras ricas en bases nitrogenadas y grupos fosfato, además de vitaminas A, D3, E y C, se utilizó como alimento inmunoestimulante.

Durante el período experimental, se alimentó a las doradas manualmente una vez cada día con la dieta control e inmunoestimulante separadamente, en tanques duplicados, siguiendo las instrucciones del fabricante (1 g de comida por pez durante 4 semanas). Transcurrido el período experimental de alimentación, se seleccionaron 4 peces de cada tanque (8 para cada dieta), se sacrificaron mediante hiperanestesia (MS-222, 100 ppm, estadio III de la anestesia [167]) y se procedió a la disección, extracción y mezcla (*pooling*) de las branquias y el riñón cefálico para cada grupo experimental, que se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Diseño y análisis de la micromatriz

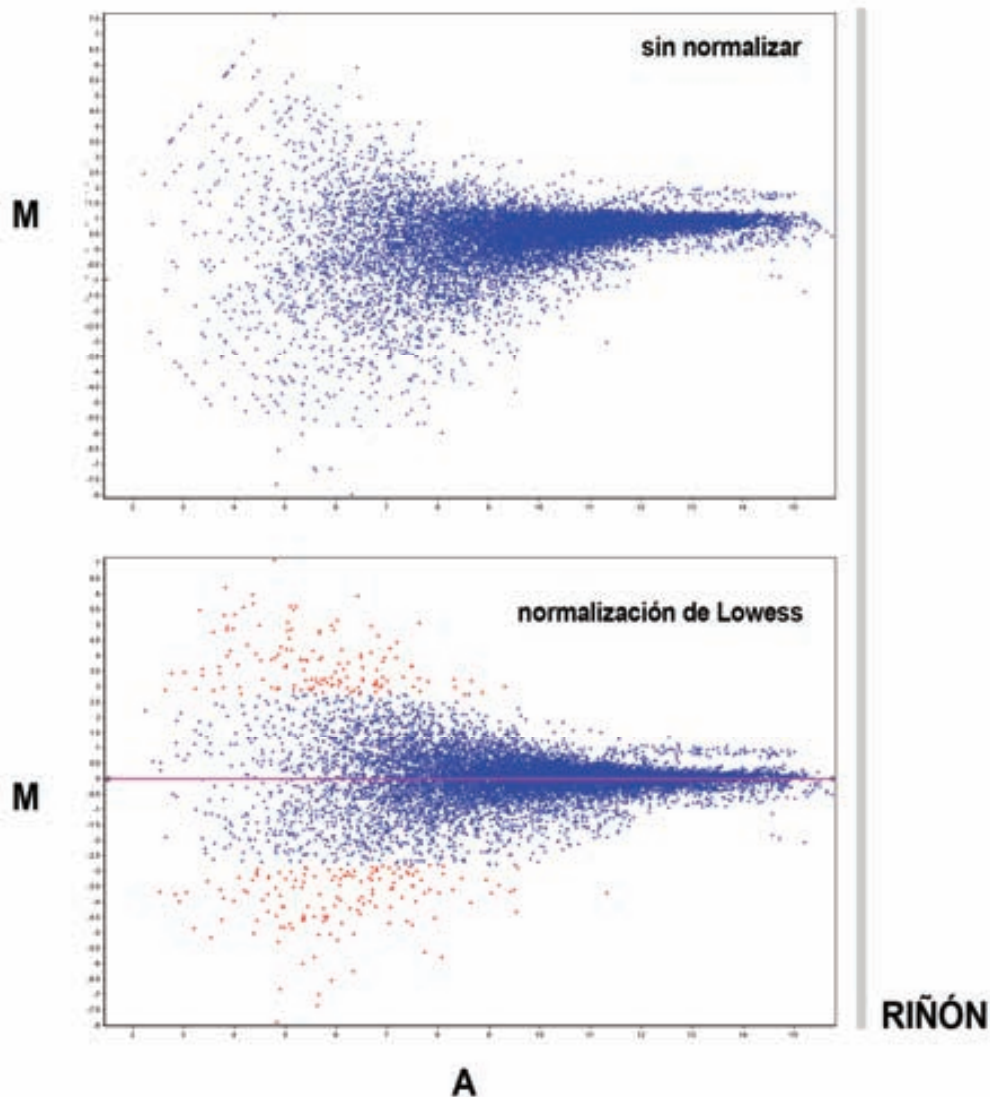
Para la experimentación reseñada se utilizó una variante ampliada de la plataforma SFM 1.0 detallada anteriormente (véanse el apartado *Salmonid Fish Microarray (SFM 1.0): descripción de la plataforma* y las referencias [72, 126]). La plataforma de ADNc SFA 2.0 específica de salmónidos, de la que puede hallarse una descripción somera en la base datos Gene Expression Omnibus (GEO) con el epígrafe GPL6154, contiene 1800 clones dispuestos, al igual que la plataforma SFM 1.0 en seis conjuntos de réplicas. Los nuevos genes incluidos en la plataforma, seleccionados por su papel funcional, la enriquecen respecto a las clases funcionales incluidas en la respuesta inmunitaria (236 genes), comunicación celular (291 genes), transducción de la señal (245 genes), actividad de los receptores (126 genes), apoptosis (120 genes), ciclo celular (76 genes), catabolismo de proteínas (90 genes), plegamiento de proteínas (70 genes) y respuesta al estrés oxidativo (39 genes). La plataforma SFA 2.0 ya se ha utilizado en dos estudios recientes [133, 135]

relacionados con los patrones de infección en salmónidos.

El ARN total de las branquias y el riñón cefálico de los animales alimentados con las dietas control e inmunoestimulante se obtuvo utilizando reactivos de Trizol (Life Technologies) o Tri Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones del fabricante [168, 169]. La calidad e integridad del ARN se evaluó utilizando el paquete de análisis Experion RNA StdSens (Bio-Rad). EL ARN se mezcló (*pooling*) entre los tratamientos ($n=8$) y 15 μg de la muestra control e inmunoestimulante se marcaron con Cy3- y Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia), completado empleando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y cebadores de oligo(dT). EL ADN se purificó utilizando el paquete de reactivos de Microcon YM30 (Millipore). Se escogió un diseño experimental de marcaje cruzado (*dye swap*) [14] y cada muestra se hibridó en dos micromatrices. En el primer portaobjetos, las muestras control y experimental de ADNc se marcaron con Cy5 y Cy3, respectivamente, invirtiéndose la asignación de marcaje para el segundo portaobjetos. Los portaobjetos se trataron previamente con 1% BSA, fracción V, 5 x SSC, 0.1% SDS (30 min. a 50°C), lavándose posteriormente con 2 x SSC (3 min.) y 0.2 x SSC (3 min.). La hibridación se llevó a cabo durante 12 h en una mezcla de 1.3 x Denhardt's, 3 x SSC 0.3% SDS, 0.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ poliadenilato y 1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARNt de levadura (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich). El escaneado de la micromatriz y el procesamiento de las imágenes se llevaron a cabo utilizando un escáner Axon 4000B y las imágenes se procesaron mediante el programa GenePix Pro 6.0. La medida de la señal en cada punto de la micromatriz se filtró siguiendo el criterio $I/B \geq 3$ y $(I-B)/(S_I+S_B) \geq 0.6$, donde I y B son las intensidades medias de la señal y el fondo, respectivamente, y S_I, S_B sus desviaciones estándar. Una vez sustraída la media de la intensidad de fondo, se llevó a cabo una normalización por regresión balanceada no lineal local (Lowess) [124] separadamente para cada portaobjetos (FIGURAS 24 y 25).

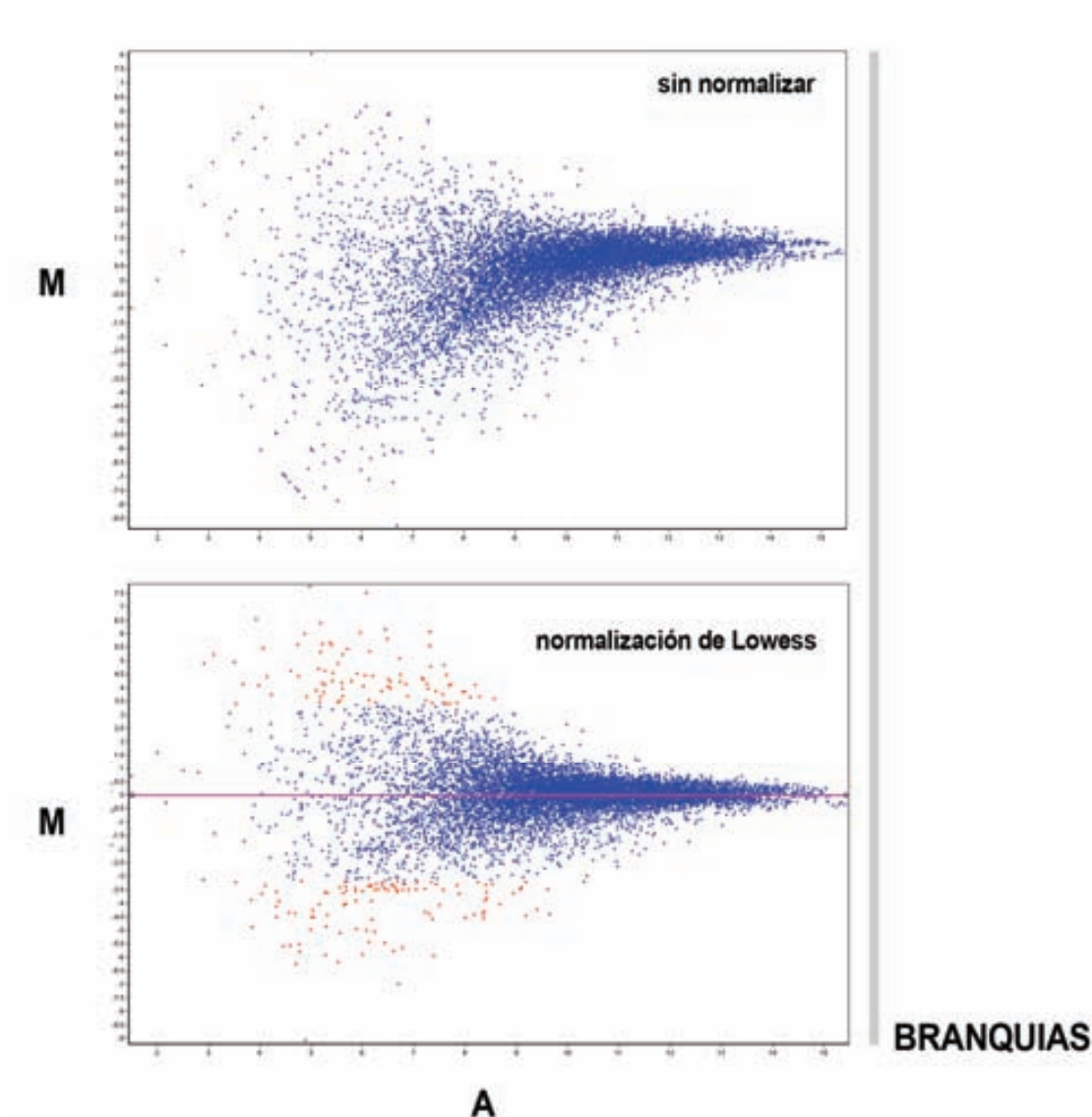
Para la evaluación de la expresión genética diferencial en las branquias y el riñón cefálico de las doradas se analizó el logaritmo de la relación de intensidades normalizadas mediante la prueba de la t de Student con ($p < 0.01$). Asimismo se aplicó la modificación Bayesiana de la tasa de descubrimientos erróneos (*False Discovery Rate*, FDR) para la corrección del error derivado de la aplicación de múltiples pruebas de comparación, estimándose el valor q para cada conjunto de genes expresados diferencialmente [125]. El análisis de los perfiles funcionales se llevó a cabo escogiendo aquellos genes cuya expresión difería al menos en una muestra con probabilidad $p < 0.01$ y estaban presentes en al menos dos categorías funcionales, interrogando las clases funcionales de la Ontología Genética (GO) [172] y comparándolas mediante la prueba de la t de Student, $p < 0.05$. También se evaluó la significación estadística de las categorías funcionales sobrerrepresentadas en cada experimento mediante la corrección de Yates para la prueba de Ji cuadrado (valor p corregido < 0.05).

FIGURA 24. GRÁFICOS M-A DEL EFECTO DE LA NORMALIZACIÓN DE LOWESS SOBRE LOS DATOS DE INTENSIDAD DE LA SEÑAL EN LA MICROMATRIZ DEL RIÑÓN CEFÁLICO DE LA DORADA



El efecto de la normalización de Lowess (abajo) sobre la señal de hibridación obtenida de la micromatriz del riñón cefálico de la dorada sin normalizar (arriba) se muestra en un gráfico M-A, en la que se representan la relación entre la señal promedio A calculada como $[0.5 * (\log R + \log G)]$, donde R es la intensidad de la señal del canal rojo, una vez sustraída la señal de fondo, y G la intensidad de la señal del canal verde, una vez sustraída la señal de fondo, y M , calculada como la relación $\log_2(R/G)$. Los valores en los extremos de la distribución se indican en rojo.

FIGURA 25. GRÁFICOS M-A DEL EFECTO DE LA NORMALIZACIÓN DE LOWESS SOBRE LOS DATOS DE INTENSIDAD DE LA SEÑAL EN LA MICROMATRIZ DE LAS BRANQUIAS DE LA DORADA



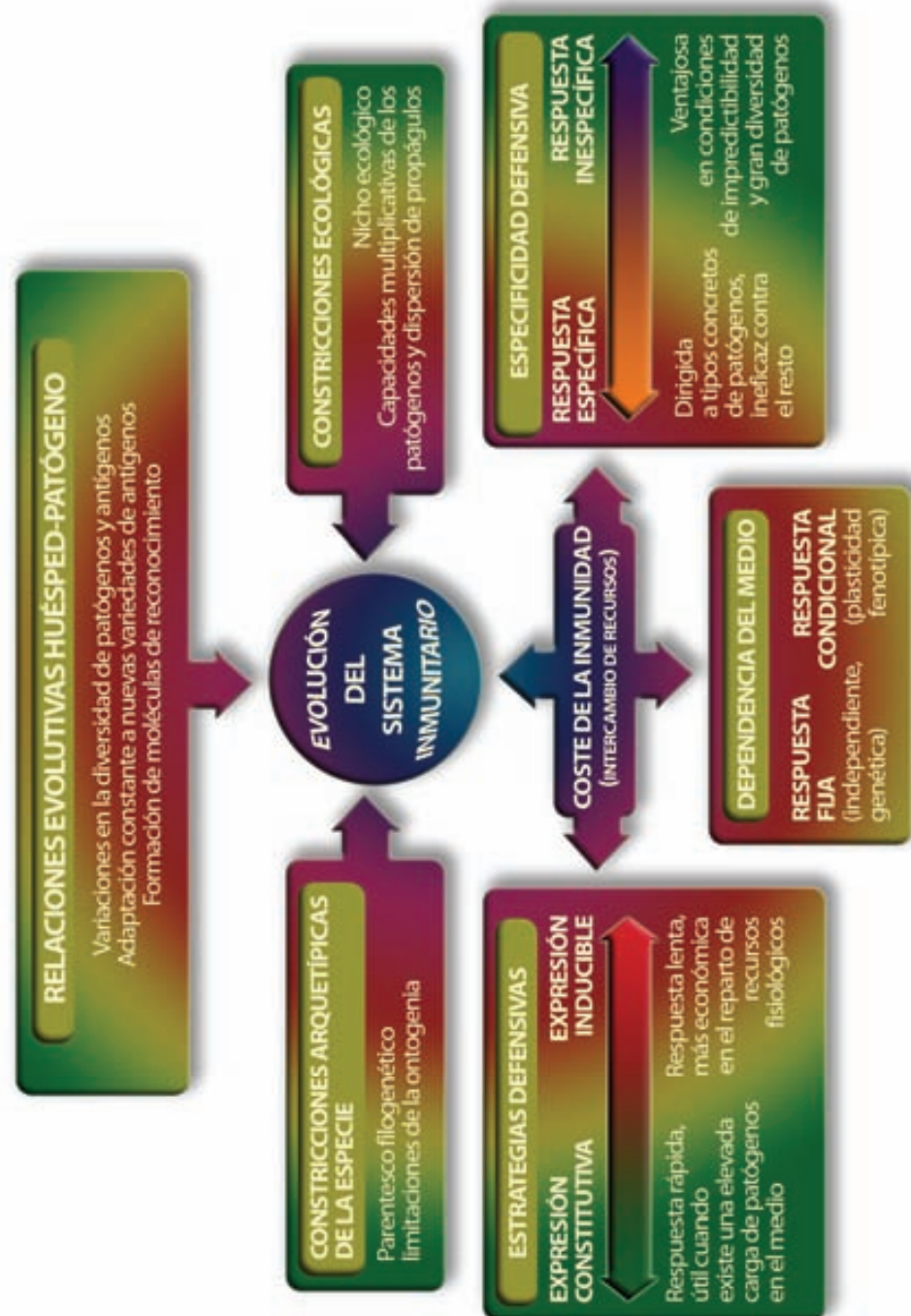
El efecto de la normalización de Lowess (abajo) sobre la señal de hibridación obtenida de la micromatriz de las branquias de la dorada sin normalizar (arriba) se muestra en un gráfico M-A, en la que se representan la relación entre la señal promedio A calculada como $[0.5 * (\log R + \log G)]$, donde R es la intensidad de la señal del canal rojo, una vez sustraída la señal de fondo, y G la intensidad de la señal del canal verde, una vez sustraída la señal de fondo, y M , calculada como la relación $\log_2(R/G)$. Los valores en los extremos de la distribución se indican en rojo.

Resultados y discusión

La administración de dietas suplementadas con inmunoestimulantes es una práctica añeja y habitual en numerosos cultivos de especies marinas y dulceacuícolas en el ámbito de la acuicultura [55, 308, 309]. Aunque la relevancia funcional que tiene la administración de compuestos que activan el sistema inmunitario para el crecimiento del animal y el aprovechamiento que hace de los recursos disponibles durante las fases de engorde son discutibles, sí es cierto que, dejando aparte factores idiosincrásicos de la especie (grado de estresabilidad y aclimatación a las densidades y manipulaciones propias de los cultivos, amplitud de los márgenes óptimos de las variables fisiológicas, diversidad genética y genómica de los componentes del sistema inmunitario, etc.), la administración de PAMPs mezclados en la dieta induce pequeñas alteraciones inmunitarias que requieren de mecanismos alostáticos de reajuste. En este sentido, cabe recordar la compleja interregulación de los sistemas fisiológicos, en los que el balance energético en condiciones de carga alostática resulta determinante para el correcto funcionamiento de la respuesta inmunitaria. La estimulación inducida artificialmente de la inmunidad innata y, en menor grado la adaptativa conlleva por tanto, un inevitable reajuste alostático de los mecanismos de inducción naturales, con la consiguiente compromiso energético y metabólico para los constitutivos (FIGURA 26).

En los cultivos piscícolas, la justificación de la inmunoestimulación hay que buscarla en la activación de bajo nivel del sistema inmunitario mediante PAMPs y/o complejos vitamínicos o coadyuvantes de la función defensiva, con el fin de provocar y mantener un tono inmunitario basal que, a la vez proteja al animal frente a futuras patologías y decida el balance entre reactividad y proactividad inmunitarias en favor de esta última. En la dorada, *Sparus aurata*, el efecto sobre la función inmunitaria de la administración de dietas ricas en componentes vitamínicos y de las paredes celulares de levaduras, a menudo de *Saccharomyces cerevisiae* se ha investigado en ensayos in vivo e in vitro dirigidos a evaluar los niveles de proteínas de fase aguda, péptidos antimicrobianos generales (como la lisozima) y la fagocitosis y el estallido respiratorio asociado a la activación de células del linaje mielóide [310-315]. La experimentación in vivo suele llevarse a cabo mediante la inyección intraperitoneal de la mezcla inmunoestimulante, lo que desemboca las más de las veces en una respuesta típica de fase aguda como la descrita en el capítulo previo, además de resultar impracticable dada la logística de la alimentación en las piscifactorías, de ahí que, para facilitar la administración y controlar, aunque sea indirectamente, la intensidad de la respuesta reactiva en el organismo, se opte por la administración oral, lo que, como contrapartida, impide valorar de manera eficaz y precisa la dosis efectiva que toma el animal.

FIGURA 26. RED DE INFLUENCIAS EN LA EVOLUCIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO



Otro punto de controversia estriba en la conveniencia de proporcionar partes (PAMPs) o la totalidad del organismo inmuoestimulante, a menudo de fácil cultivo en el laboratorio. En este sentido, la inmunoreactividad de las levaduras obedece a los materiales de construcción de su pared celular [310, 316, 317], compuesta fundamentalmente por polímeros de manosa unidos covalentemente a péptidos (manoproteínas) y polímeros de glucosa (glucanos), además de un pequeño porcentaje, inferior al 1% de quitina. Los efectos de la administración de vitaminas antioxidantes (C y E) sobre la función inmunitaria son controvertidos, y aunque su deficiencia patológica puede dañar al sistema inmunitario, no existe un consenso claro sobre las ventajas de su administración en relación con la potenciación inmunitaria [313, 314, 318, 319].

Según nuestros datos, de los 331 genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$) en la branquia, 48 muestran una regulación al alza o a la baja de los niveles de expresión de 1.5 FC en valores absolutos, un 7% (22 genes) superan los 2 FC en valor absoluto (FIGURA 27) y el rango de expresión oscila entre los -4.6 y 6.6 FC. En el caso del riñón, 446 genes muestran expresión diferencial ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$), un 47% se mantienen regulados al alza o a la baja en más o menos de 1.5 FC, y 62 de ellos (el 14%) expresan más de 2 veces los valores basales absolutos (FIGURA 30). En este caso, el rango de variación de la expresión genética oscila entre -26.6 y 6 FC. De todos los genes expresados diferencialmente más de 2 veces los valores basales, sólo 8 de ellos son comunes a uno y otro órgano (FIGURA 27), e interesan fundamentalmente al metabolismo de la hemoglobina (transcritos de la cadena beta y la alfa globina, 2.6 y 2.4 FC, respectivamente) y los transcritos asociados a la coronina 1C (-5.2 FC), colágeno (tipo I alfa 2, 4.6 FC), queratina (tipo II, citoesqueleto, 2 FC) y proteínas asociadas a los ribosomas (proteína de unión a poly(RC) y Vangl2, -2.8 y -4.6 FC, respectivamente).

FIGURA 27. GENES PROPIOS Y COMUNES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE ($>2FC$, $P < 0.01$) EN LA BRANQUIA Y EL RIÑÓN CEFÁLICO DE DORADAS ALIMENTADAS CON INMUNOESTIMULANTES

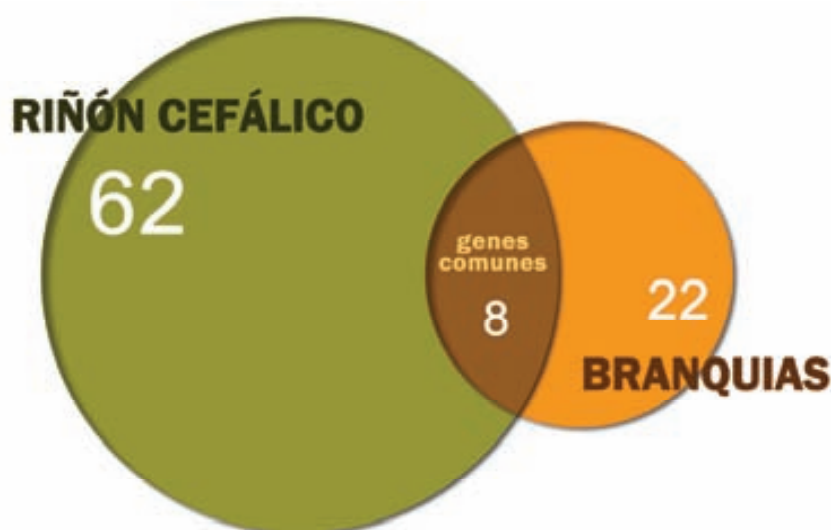


TABLA 11. LISTA DE 20 GENES REGULADOS AL ALZA O A LA BAJA EN EL RIÑÓN CEFÁLICO Y LAS BRANQUIAS DE LA DORADA COMO CONSECUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DIETA INMUNOESTIMULANTE

Se detalla la intensidad de la expresión (*Fold Change*, FC) al alza o a la baja de los 20 genes con mayor intensidad de expresión diferencial ($p < 0.01$, FDR > 0.01).

Sparus aurata

BRANQUIAS REGULACIÓN AL ALZA				RIÑÓN REGULACIÓN AL ALZA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	p	Identidad clon	Nombre gen	FC	p
HK0001_B03	Alpha 2 type I collagen-1	4.64	0.000	utu04h11	Myosin light chain 2-2	6.06	0.000
CA343143	NF-kappaB inhibitor alpha-1	4.40	0.000	es01g04	5-aminolevulinate synthase	5.71	0.000
es03b03	Cathepsin C-2	4.02	0.001	HK0001_E10	Myosin regulatory light chain 2,	5.50	0.000
utu01e09	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(1)	3.47	0.000	EX0B2_B10	Hemoglobin beta chain	5.45	0.000
utu02a06	Collagen a3(I)-1	3.01	0.000	utu03g04	Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform	4.71	0.000
EX0B2_B10	Collagen a3(I)-2	2.68	0.000	es04c05	Ferritin heavy chain-1	4.31	0.000
HST0001_D04	Hemoglobin beta chain	2.68	0.000	utu04h06	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-2	4.27	0.000
EX0B4_F03	Alpha-globin I-2	2.48	0.003	HK00002_C10	CXC chemokine receptor transcript variant B	4.10	0.000
es04b04	Cathepsin S	2.47	0.000	CA343700	Creatine kinase, M-1	4.02	0.000
CA385697	Cytoferritin 8	2.20	0.000	CA346488	p53-like transcription factor	3.98	0.003
utu01g10	X-box binding protein 1	2.08	0.000	CA360089	Transposase-33	3.90	0.000
HK0003_A03	Keratin, type II cytoskeletal 8	2.05	0.000	utu02c02	Troponin T-2, fast skeletal muscle	3.90	0.000
EST1-3A_D03	Thymosin beta-4-2	2.04	0.000	utu01h05	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-1	3.85	0.000
utu02a08	60S ribosomal protein L23	2.01	0.000	es04c07	Ferritin heavy chain-2	3.53	0.000
	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-2	2.00	0.000	utu04a06	Creatine kinase, M-3	3.41	0.002
				utu03b03	Beta enolase-2	3.35	0.000
				HST0002_E07	PEP carboxykinase-Embryonic beta-type globin2	3.28	0.000
				CA379787	Cyclin G1	3.10	0.000
				es02e09	Ig heavy chain V-III region HIL	3.08	0.000
				HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain		
BRANQUIAS REGULACIÓN A LA BAJA				RIÑÓN REGULACIÓN A LA BAJA			
Identidad clon	Nombre gen	FC	p	Identidad clon	Nombre gen	FC	p
HK0001_C05	Eukaryotic translation initiation factor 5	-2.37	0.007	CA344100	Galectin like 1	-2.03	0.002
es03e03	Poly(RC) binding protein 2	-2.82	0.007	CA382903	Transposase-55	-2.13	0.009
es03d11	Unknown-42	-3.59	0.000	EX0B1_B03	Unknown-81	-2.21	0.000
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	-3.82	0.000	EX0B1_D11	Dynem light chain 2, cytoplasmic	-2.24	0.004
es04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	-4.65	0.001	EX0B1_A07	Unknown-79	-2.29	0.001
utu04c06	Cytoferritin 17-3	-4.93	0.008	EST1-3A_C12	Coronin-1C	-2.33	0.001
Coronin-1C		-5.24	0.001	CA373506	Selenoprotein P	-2.36	0.003
EX0B1_C06	Nucleolar protein Nop56-1	-6.61	0.005	es03e03	Poly(RC) binding protein 2	-2.64	0.001
				HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	-2.75	0.001
				CA355527	Adenosine kinase 2	-3.20	0.006
				es03e05	Hypothetical protein LOC122618	-3.28	0.000
				es03d11	Unknown-42	-4.34	0.009
				EST1-3A_B03	Hypothetical-fish 44	-8.99	0.010
				utu04c03	60S ribosomal protein L4	-9.97	0.000
				es04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	-14.72	0.004
				utu04g09	Unknown-271	-26.64	0.002
				CA377768	Phospholipase D1		

En conjunto, los datos de expresión genética y el análisis ontológico de los mismos (FIGURAS 28 y 29), muestran una mayor expresión de genes y categorías funcionales relacionados con la inmunidad (innata y adaptativa), el ciclo celular y los procesos apoptóticos y el metabolismo y procesamiento de la hemoglobina y el ión férrico. En la branquia, la función inmunitaria, tanto innata como adaptativa, prevalece pero con una intensidad de transcritos menor. Se describe a continuación una interpretación funcional y ontológica de los datos siguiendo el criterio antes mencionado para el análisis de datos derivados de plataformas de micromatriz interespecíficas: se valoraran únicamente aquellos genes cuya expresión ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$) supere los 2 FC en valores absolutos (con referencias ocasionales a los que muestren niveles de expresión genética entre -1.5 y 1.5 FC) y las categorías ontológicas cuya representación se asuma significativa ($p < 0.05$).

La branquia reactiva:

respuesta transcriptómica a una dieta inmunoestimulante

En las doradas alimentadas con dieta inmunoestimulante enriquecida con derivados de levaduras y vitaminas antioxidantes, la expresión genética al alza de los transcritos para la timosina beta 4 (2 FC), las catepsinas S y C (con valores de FC de 2.4 y 4, respectivamente) y el factor inhibidor del factor de transcripción NK kappaB (4.4 FC) destacan por su función inmunitaria. De las catepsinas ya se ha hablado al tratar la respuesta de fase aguda en el hígado de la trucha (véase el capítulo anterior). La catepsina C resulta frecuente en leucocitos polimorfonucleares, e interviene en las reacciones inflamatorias coordinando a la activación de otras proteasas de serina presentes en los linfocitos asesinos naturales, células citotóxicas y neutrófilos maduros participantes en la inflamación [276]. La catepsina S, por su parte, resulta especialmente abundante en células presentadoras de antígenos, de las que modula su función, y también en la matriz extracelular, el colágeno de la cual remodela con la ayuda de metaloproteinasas de matriz [320]. La expresión al alza de la catepsina S, junto con la expresión también al alza de varios transcritos para componentes del colágeno (2-3.4 FC) sugiere procesos de reorganización de la matriz extracelular, probablemente influidos por el trasiego de poblaciones leucocitarias infiltradas (especialmente de macrófagos y neutrófilos residentes) que, en la branquia, por su grado de exposición al medio, suele ser habitual.

En este sentido, la regulación al alza del inhibidor del factor NFkappaB, un factor de transcripción implicado en los más variopintos procesos de expresión genética (pero especialmente en la producción de citoquinas, quimioquinas, proteínas de fase aguda) característico de la respuesta inflamatoria mediada por células del linaje mieloide [321], sugiere un cierto grado de control de la función inmunitaria, activa según se desprende también de la expresión al alza del MHC de tipo II (1.8 FC) y el componente C6 del sistema del complemento (1.6 FC).

Una de las variedades de la coronina, la coronina 1C, imprescindible para la

supervivencia de los linfocitos T y que actúa como factor quimiotáctico para esta población celular [322], se encuentra fuertemente regulada a la baja (-5 FC), al igual que la apolipoproteína1 (APOA1, -3.8 FC) y, en menor grado, la proteína inducida por interferón 44-2 (-1.5 FC). Ya se ha comentado el papel de la proteína APO1 en la regulación de la vasodilatación y agregación plaquetaria en situaciones de rotura tisular y/o inflamación, así como de la síntesis de proteínas hepáticas [262, 263] y en la inhibición de la vía lítica del sistema del complemento [264]. En el caso que nos ocupa, sin embargo, la mayoría de componentes del sistema del complemento expresados diferencialmente (factor H, C3 3-2 y factor B/C2-B) se encuentra regulados a la baja (con valores que oscilan entre -1.4 y -1.3 FC)

Sin embargo, el número de componentes activadores de la respuesta inmunitaria que se mantienen fuertemente inhibidos (de -1.5 a -6 FC) es inferior a los que, para el mismo intervalo de intensidades, muestran regulación al alza (véanse la TABLA 11 y el material adicional anexo), lo que indica un tono inmunitario elevado en la branquia después de cuatro semanas de alimentación con dieta rica en inmunoestimulantes.

El análisis de los genes coregulados y expresados diferencialmente en función de la categoría ontológica que describe su función (véanse las TABLAS 12 y 13 y las FIGURAS 28 y 29) muestra una preponderancia de los procesos relacionados con la biosíntesis, modificación y catabolismo proteicos de proteínas parejo a la regulación de la homeostasis del hierro, esta última relacionada bien con el mantenimiento de un cierto grado de activación inmunitaria debido a la presencia constante de PAMPs derivados de la levadura y/o de los omnipresentes transcritos para la hemoglobina, la alfa globina. Las categorías funcionales más representadas, teniendo en cuenta la composición de la plataforma de micromatriz, en la branquia incluyen la actividad molecular estructural y, especialmente, los procesos de transcripción y traducción de proteínas, la regulación del complejo de la hemoglobina y la actividad de la 5-aminolevulinato sintasa, el enzima limitante de la vía biosintética del grupo hemo en los mamíferos. La comunicación celular es otra de las categorías funcionales sobrerrepresentadas, como no podía ser de otro modo en un órgano tan poblado y activo como la branquia.

Cabe destacar, por su importancia relativa a estudios previos efectuados *in vitro* e *in vivo* con doradas alimentadas con beta-glucanos, mananos y vitaminas C y E [312, 315], no solo la escasa activación de la mayoría de los componentes del sistema del complemento observada en el transcriptoma de la branquia, sino también la regulación a la baja de algunos de los principales enzimas implicados en la respuesta oxidativa de los macrófagos maduros activados. Tanto los transcritos de la glutatión transferasa S, como los de la glutatión peroxidasa (GPX) y la superóxido dismutasa (SOD) se encuentran regulados a la baja (-1.5 FC, -1.3 FC y -1.3 FC, respectivamente), contrariamente a lo observado en un estudio reciente en el que tanto la actividad hemolítica del complemento como el estallido respiratorio de los leucocitos derivados del riñón cefálico de dorada alimentadas durante 15-45 días con pienso enriquecido en vitaminas C y E se vio potenciado por el

efecto sinérgico de ambos micronutrientes [315]. Los mismos autores no hallaron, en cambio, diferencias en la actividad oxidativa asociada a la fagocitosis en leucocitos obtenidos del riñón cefálico de doradas alimentadas con levaduras liofilizadas durante cuatro semanas [323], lo que concuerda con lo observado en el análisis transcriptómico descrito en este trabajo y destaca la dificultad de describir con precisión la influencia de las vitaminas incluidas en la dieta sobre la capacidad oxidativa mediada por células mieloides. De hecho, la capacidad oxidativa de otro espárido comercial, *Sparus macrocephalus*, en cuya alimentación y durante ocho semanas, se añadió vitamina E, resultó en un aumento significativo de la actividad de la SOD sérica, aún cuando la actividad de la GPX permaneció inalterada [324].

En conjunto, nuestros datos indican un tono inmunitario moderado en la branquia de doradas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta de inmunoestimulantes ricos en vitaminas antioxidantes y extractos de levadura, con la participación de componentes de la respuesta defensiva adaptativa, una escasa regulación a la baja de moduladores y/o activadores de la respuesta y una regulación a la baja de la síntesis de especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere un grado apreciable de quiescencia en la actividad fagocítica.

El riñón reactivo:

respuesta transcriptómica a una dieta inmunoestimulante

En el riñón cefálico de las doradas alimentadas con la dieta inmunoestimulante reseñada, la respuesta transcriptómica más representativa, en términos de categorías funcionales (véanse las TABLAS 12 y 13 y las FIGURAS 28 y 29), viene dominada por los transcritos implicados en la biosíntesis de proteínas, como en el caso de la branquia y la comunicación celular, y, como gran diferencia, de los genes involucrados en la respuesta defensiva y a estímulos bióticos y al control de la apoptosis. En el riñón cefálico la expresión de los transcritos individuales es más intensa e incluye una mayor representación de genes codificantes para los moduladores del metabolismo de la hemoglobina (cadenas alfa y beta, 5-aminolevulinato sintasa; 4-5 FC) y el hierro (ferritina, 4 FC), carabinas moleculares de respuesta aguda (HSP90 y 70, 2.6 y 1.8 FC), quimioquinas (CXC receptor B, 4 FC), inmunoglobulinas (cadena pesada V-III, 3 FC), agentes antioxidantes (Peroxiredoxina, 2.9 FC) y factores de transcripción y modulación de la proliferación celular (p-53 y enolasa beta, 3.9 y 3.4 FC, respectivamente).

La regulación al alza incluye, en este caso, genes cuyos transcritos se expresan entre el 1.3 y el 1.5 FC, como el MHC de tipo II, la lisozima, los componentes C6 y C8 del sistema del complemento, implicados ambos en el desarrollo y consumación de la vía lítica, y el factor de necrosis tumoral (TNF), que también muestra regulación a la baja en su receptor (-1.6 FC). La respuesta a la baja, en cambio, viene dominada por la inhibición de los transcritos para la proteína APOA1 (-2.7 FC), la selenoproteína P (-2.3 FC, de la que se habló en el capítulo anterior), la coronina 1C (-2.3 FC), el inhibidor del factor de

transcripción NFkappaB (-1.8 FC), algunos componentes del sistema del complemento (factor H y factor B/C2-B, -1.6 FC y -1.3 FC, respectivamente), quimioquinas (CCL4, -1.4 FC), agentes proinflamatorios (receptor B4 de leucotrienos, -1.5 FC) y, especialmente de los genes asociados a proteínas apoptóticas como la caspasa y la proteína de dedos de cinc (-1.6 FC).

TABLA 12. CATEGORÍAS ONTOLÓGICAS CUYOS GENES MUESTRAN COREGULACIÓN SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$)

FUNCIÓN	BRANQUIAS			RINÓN		
	FC (media)	FC (var.)	N	FC (media)	FC (var.)	N
METABOLISMO DE PROSTAGLANDINAS	-0.37	0.02	2	-0.52	0.01	2
CATABOLISMO DE PROTEÍNAS POR UBIQUITINA	-0.24	0.29	7	-0.62	0.26	7
UNIÓN A IONES FÉRRICOS	0.34	0.12	3	1.67	0.63	3
HOMEOSTASIS DEL HIERRO	0.34	0.12	3	1.67	0.63	3
TRANSPORTE DEL HIERRO	0.34	0.12	3	1.67	0.63	3
ACTIVIDAD SINTASA 5-AMINOLEVULINATO	0.38	0.29	3	1.72	0.72	3
BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO	0.38	0.29	3	1.72	0.72	3
CATABOLISMO DE PROTEÍNAS	0.13	0.74	25	-0.24	0.58	27

Sparus aurata
COREGULACIÓN

TABLA 13. CATEGORÍAS ONTOLÓGICAS CUYOS GENES SE EXPRESAN D EMANERA DIFERENTE ($P < 0.05$)

FUNCIÓN	BRANQUIAS			RINÓN		
	FC (media)	FC (var.)	N	FC (media)	FC (var.)	N
actin cytoskeleton				0.59	1.07	23
anti-apoptosis	-0.64	0.09	3	-0.75	0.11	4
cellular defense response	-0.30	0.01	2	-0.53	0.08	4
cellular respiration				-0.47	0.01	2
chymotrypsin activity				-0.57	0.16	5
complement activation, alternative pathway				-0.51	0.18	5
cytolysis				0.62	0.19	3
cytoskeleton				0.37	1.07	36
DNA catabolism				-0.51	0.06	3
fatty acid metabolism				-0.46	0.10	3
ferric iron binding	0.34	0.12	3	1.67	0.63	3
hemoglobin complex	1.03	0.70	5	1.60	0.54	7
icosanoid metabolism				-0.46	0.10	3
iron ion homeostasis	0.34	0.12	3	1.67	0.63	3
iron ion transport	0.34	0.12	3	1.67	0.63	3
mitochondrial transport				0.84	0.15	3
microtubule	-0.61	0.13	4			
microtubule-based process	-0.61	0.11	5			
muscle development				0.61	1.09	17
muscle contraction	0.20	0.38	17			
negative regulation of apoptosis	-0.64	0.09	3	-0.75	0.11	4
prostaglandin metabolism	-0.37	0.02	2	-0.52	0.01	2
protease inhibitor activity	-0.51	0.05	2			
proteasome complex (sensu Eukaryota)				-0.75	0.18	3
protein biosynthesis	0.30	0.41	60	0.37	0.66	60
protein catabolism				-0.24	0.58	27
protein kinase binding	0.36	0.00	2			
protein modification	0.18	0.41	23			
ribosome	0.37	0.34	56	0.40	0.64	56
RNA-dependent DNA replication	-0.48	0.04	2	-0.51	0.00	2
structural constituent of ribosome	0.37	0.36	58	0.40	0.64	58
structural molecule activity	0.33	0.58	83	0.43	0.76	83
transcription cofactor activity				-0.51	0.02	2
transcription factor binding				-0.45	0.20	4
trypsin activity				-0.57	0.16	5
ubiquitin-dependent protein catabolism				-0.62	0.26	7

Sparus aurata
ONTOLOGÍA FUNCIONAL

La mayoría de estudios recientes relacionados con los efectos de las dietas inmunoestimulantes en teleósteos de interés comercial se han llevado a cabo, previa administración oral de la formulación inmunoestimulante en la dieta, en concentraciones y tiempos muy variables, valorando los niveles de lisozima y la actividad hemolítica del sistema del complemento en el suero de los animales tratados, en conjunción con el estudio *in vitro* de la reactividad de las poblaciones leucocitarias (mayoritariamente macrófagos) obtenidas del riñón cefálico. Si bien en la mayoría de los casos tanto los niveles de la lisozima sérica como la actividad fagocítica suelen aumentar en los peces inmunoestimulados con beta-glucanos o vitaminas antioxidantes (A, C y E), el efecto sobre el sistema del complemento dista de estar resuelto satisfactoriamente. Aunque en algunos estudios se ha demostrado un aumento en la actividad hemolítica sérica del complemento [315, 325, 326], en otros la actividad del sistema del complemento se ha visto inalterada en ambas [327] o en alguna de sus dos vías de activación principales, clásica y alternativa [328, 329], y, de hecho, tanto el período de administración como, especialmente, la dosis de inmunógeno suministrado con la dieta, resultan determinantes para la intensidad de la respuesta y los niveles de activación de los componentes del sistema inmunitario, que puede llegar a inhibirse si la cantidad de inmunógeno y/o micronutrientes suministrados con el pienso alcanza valores muy superiores a los fisiológicos [316, 328].

Al igual que en el caso de la branquia, también aquí algunos componentes involucrados en la regulación de especies reactivas de oxígeno, como la glutatión S transferasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa se mantienen regulados a la baja (entre -1.6 y -1.15 FC), lo que confirma y extiende la discusión apuntada anteriormente al principal órgano hematopoyético de los peces que, en el caso de las doradas alimentadas con pienso inmunoestimulante, tiene entre sus prioridades funcionales la regulación, mucho más intensa en términos de intensidad de la expresión genética y número de genes implicados, del metabolismo y la homeostasis del hierro y la hemoglobina, así como de la reorganización del citoesqueleto de actina, como corresponde a un órgano, que a semejanza de la branquia, está atestado de células, pero, a diferencia de esta, almacena y estimula sus formas precursoras indiferenciadas.

En el caso del riñón cefálico de doradas alimentadas con dietas ricas en vitaminas antioxidantes y extractos de levadura, la respuesta inmunitaria después de cuatro semanas de tratamiento es de mayor intensidad e incluye un mayor número de participantes, que en el caso de la branquia. La modalidad de la respuesta parece ser, al igual que lo observado para el mismo órgano en el caso de las infecciones virales por IHNV comentadas anteriormente, más adaptativa que innata, y, al igual que en el caso de la branquia, el control de la respuesta es efectivo, a juzgar por los niveles de expresión de los transcritos de los agentes apoptóticos, los implicados en el estallido respiratorio y la activación del sistema del complemento. Puede, por tanto, asumirse un cierto grado de tono inmunitario originado por la administración constante de inmunoestimulantes, del que es buena muestra la regulación al alza del transcrito para la peroxiredoxina (2 FC),

uno de los factores que aumentan la actividad de los linfocitos asesinos naturales (NK), participantes de la respuesta defensiva innata que también ayudan en la regulación de la adaptativa. Contrariamente a lo observado por Ortuño et al. [323] con leucocitos de doradas alimentadas con pienso enriquecido con extractos de *S. cerevisiae*, la administración de la formulación reseñada a las doradas favorece la regulación al alza de la lisozima (1.7 FC). Nuestros resultados confirman, sin embargo, la activación de la peroxiredoxina (Peroxiredoxina 1-2 y 4) y algunos componentes de I sistema del complemento (C6 y C8), marcadores del desencadenamiento de la respuesta lítica (aunque véanse [327-329] para una visión opuesta de la actividad hemolítica del complemento).

En resumen, la administración de una dieta inmunoestimulante rica en vitaminas antioxidantes y extractos de levadura induce una respuesta inmunitaria de bajo nivel en la dorada, en la que participan de manera destacada los componentes del brazo adaptativo de la inmunidad, probablemente como consecuencia de la duración del tratamiento inmunoestimulante (cuatro semanas), tiempo más que suficiente para desencadenar una respuesta defensiva basada en el reclutamiento de poblaciones celulares y la maduración y proliferación, previo procesamiento y presentación de antígenos, de células efectoras. La activación del sistema del complemento, la actividad de péptidos antimicrobianos ubicuos como la lisozima y la expresión de carabinas moleculares de protección (HSPs) parece ser mayor en el riñón cefálico que en la branquia, que carece del control de la apoptosis observado en aquel. La respuesta, en términos de intensidad de la expresión genética y número de genes expresados diferencialmente, es mayor en el riñón anterior que en la branquia, cuya dedicación a la biosíntesis de proteínas y al metabolismo del hierro, aunque compartida con el riñón, se ve acentuada en este último. El control de la respuesta oxidativa mediada por las células mieloides sugiere un grado mensurable de quiescencia, pero no inactividad, en las poblaciones fagocíticas en ambos órganos.

A tenor de los resultados obtenidos en este y los estudios mencionados anteriormente, el modelo emergente de inmunoestimulación sugerido parece depender tanto de la dosis de vitaminas como de su cadencia durante la alimentación de las doradas, tal y como se indica en un estudio reciente [330], en el que se observó un aumento en la proliferación y viabilidad de las poblaciones de macrófagos y la actividad de la lisozima dependiente de la administración óptima de vitaminas A, C y E y algunos minerales (Se, Zn, Cu, Mn y Fe) en monocitos/macrófagos de tilapias (*Oreochromis hybrids*). Sin embargo, los mismos autores comprobaron que no sólo la administración en la dieta de cantidades subóptimas de los mismos componentes disminuía los valores de las variables inmunitarias mencionadas, sino que también se comprobó que cualquier combinación de dietas y vitaminas favorecía la mengua de la producción de iones superóxido y óxido nítrico.

FIGURA 28. CATEGORÍAS ONTOLÓGICAS CUYOS GENES MUESTRAN COREGULACIÓN SIGNIFICATIVA ($\alpha=0.05$) EN EL RIÑÓN CEFÁLICO Y LAS BRANQUIAS DE DORADAS INMUNOESTIMULADAS

Se indican el número de genes (tamaño de las esferas) en el eje de ordenadas, y la expresión genética media (FC) en el eje de abscisas

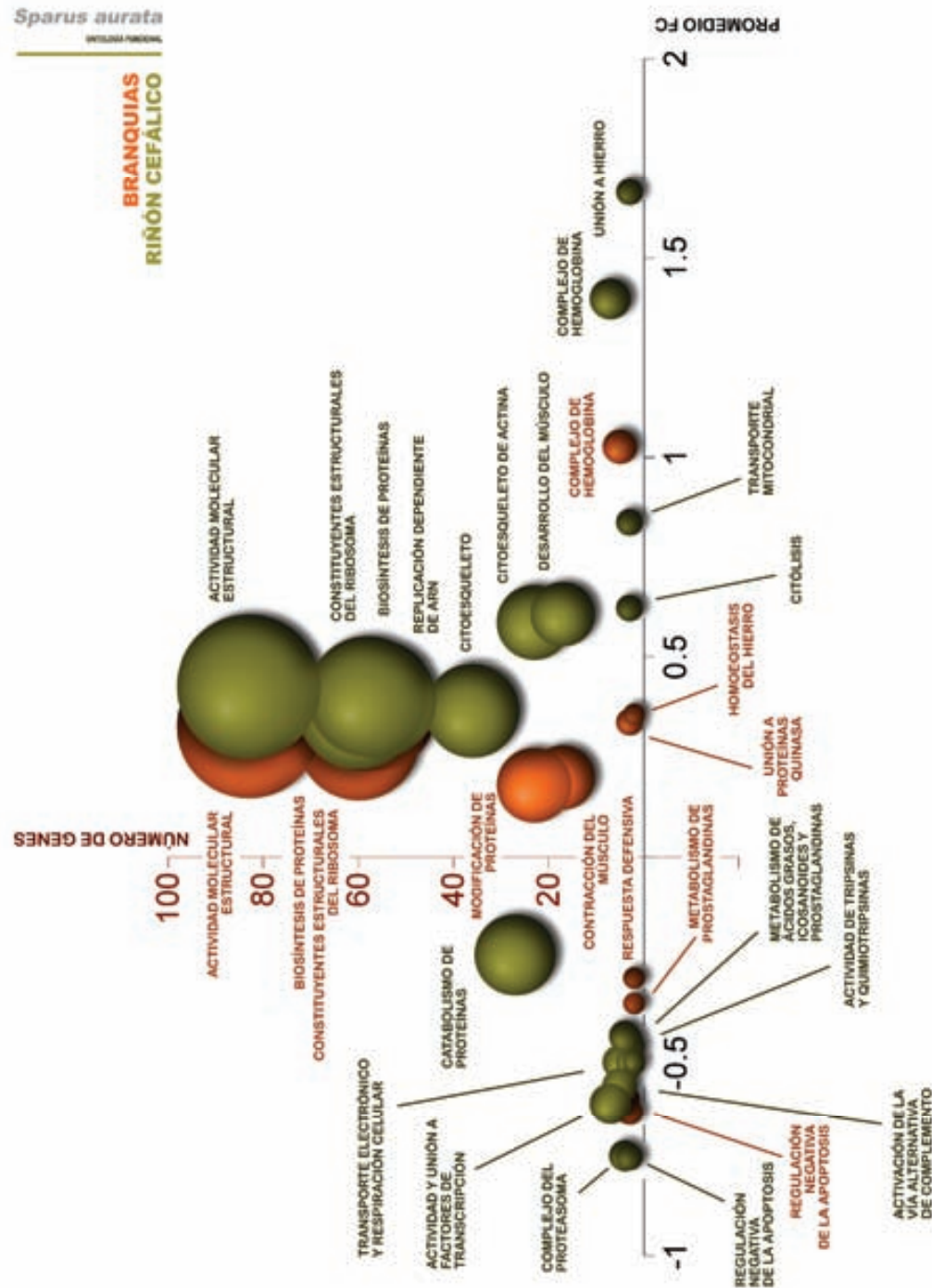
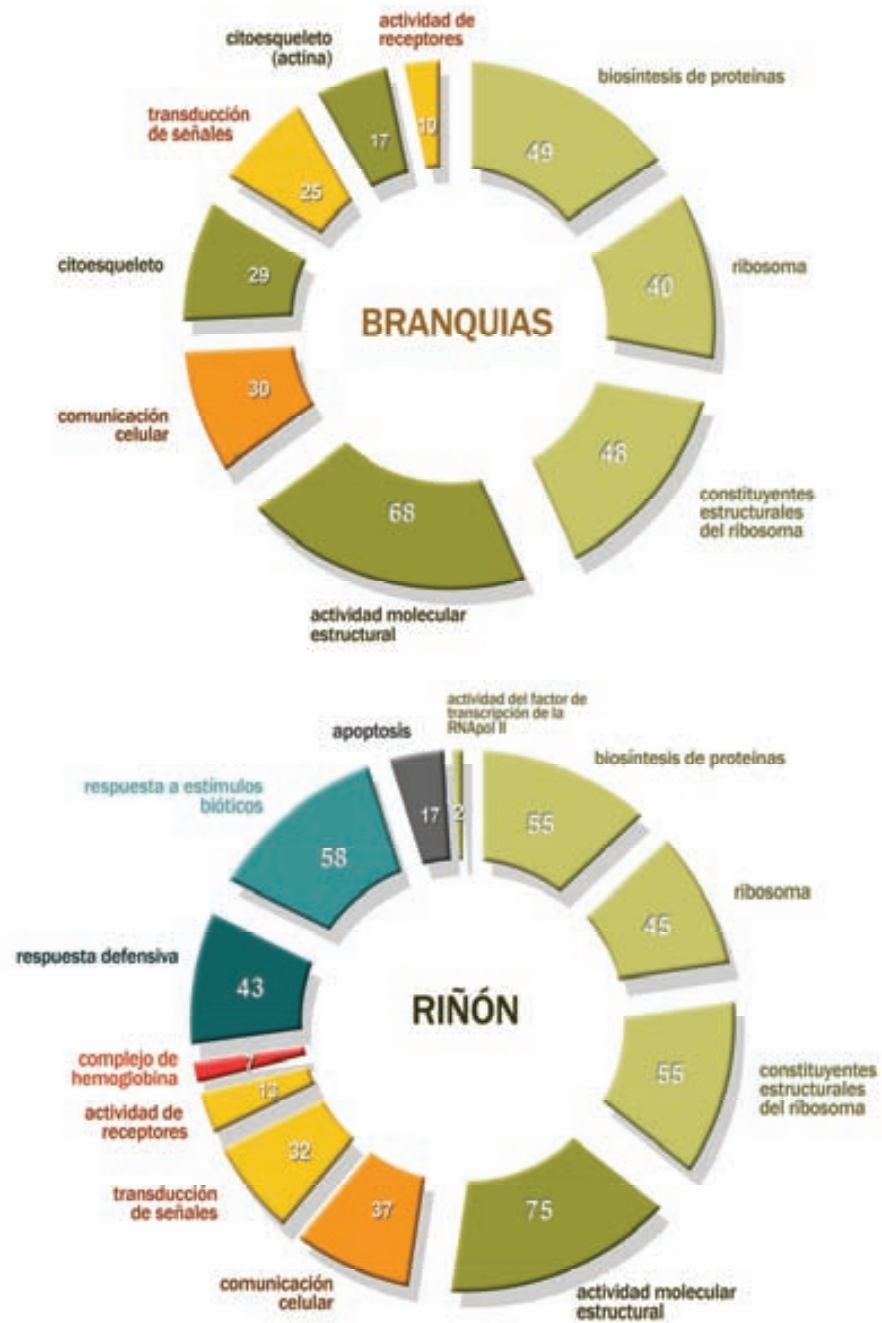


FIGURA 29. CATEGORÍAS FUNCIONALES SOBREREPRESENTADAS EN LAS BRANQUIAS Y EL RIÑÓN CEFÁLICO DE LA DORADA

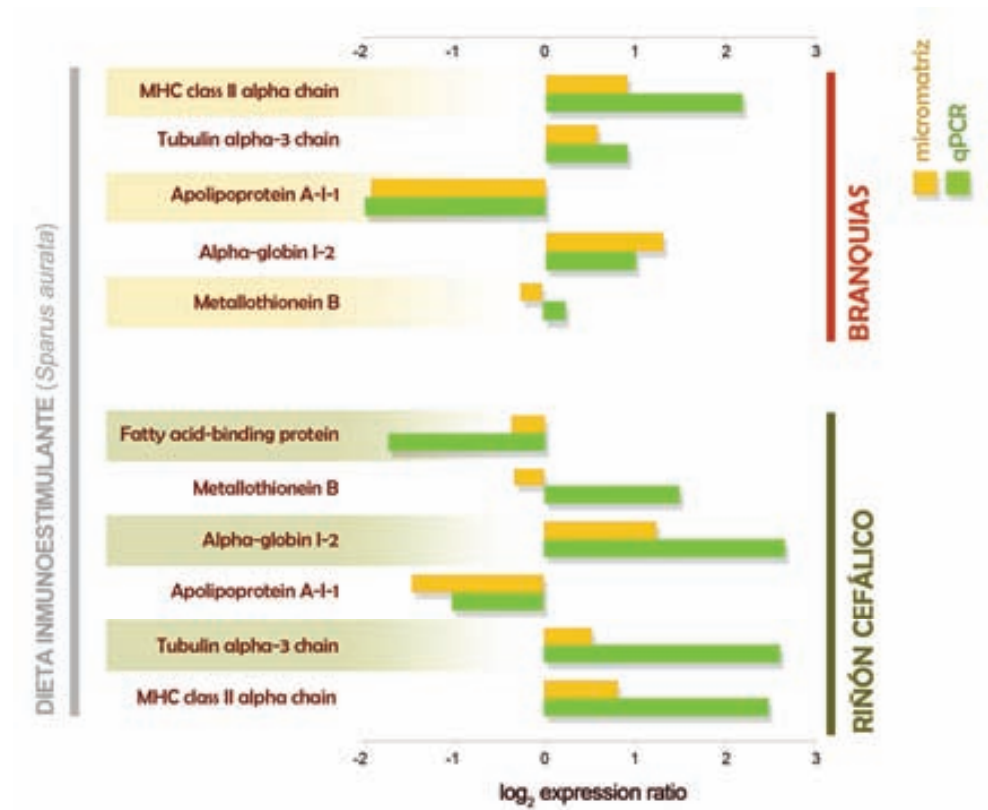


Se representan las categorías ontológicas funcionales cuya representación en la plataforma está claramente mejor representada (corrección de Yates a la prueba de Ji cuadrado, $p < 0.05$), conjuntamente con el número de genes expresados diferencialmente para cada categoría.

El análisis, mediante qPCR, de los niveles de expresión de algunos de los genes expresados diferencialmente en el análisis de la plataforma de micromatriz indica un acuerdo general, en los resultados referidos a la regulación al alza o a la baja para ambos órganos, obtenidos mediante una y otra metodologías (FIGURA 30), excepto en el caso de la expresión del gen que codifica la metalotioneína B.

Las diferencias en la cuantificación de la intensidad de la expresión genética consitutyen en la actualidad un lugar común en el análisis comparativo de muestras biológicas similares o idénticas mediante plataformas de micromatriz y qPCR, y se han atribuido a (1) niveles bajos de expresión genética, inferiores a 2 FC y cuyos valores pueden aumentar la varianza de la medida de las sondas en la micromatriz) y (2) a las diferencias en el procesamiento y normalización de las muestras para cada metodología [331-334].

De los transcritos analizados, tanto los correspondientes a la alfa globina I como a la apolipoproteína AI-1 superan los 2 FC de expresión al alza o a la baja en la branquia y en el riñón cefálico de las doradas alimentadas con dieta inmunoestimulante (véanse la TABLA 11 y el material adicional anexo). La semejanza de sus niveles de expresión genética con los observados en la qPCR se corresponde con lo descrito en literatura para las comparaciones entre metodologías de análisis de genes regulados al alza más de 2 FC [335], que suelen mostrar una correlación positiva de los valores medidos con ambas metodologías, contrariamente a lo descrito para aquellos transcritos cuya regulación al alza o a la baja resulta claramente inferior a 1.5 FC, como ocurre en el caso de los transcritos de la metalotioneína B y la proteína de unión a ácidos grasos (FIGURA 30), lo que puede explicar, amén de los requisitos técnicos de cada analítica, las diferencias observadas, aún cuando, salvo en el caso aquella, se mantenga el sentido de la regulación genética tanto en la qPCR como en la micromatriz. En este caso, dado el carácter necesariamente híbrido de la experimentación y la todavía escasa representación de genes descritos para la dorada en las bases de datos públicas, para la elección de los transcritos se ha seguido un criterio menos basado en la cuantía de la expresión genética que en el grado de similitud de las secuencias genéticas analizadas. En todos los casos, en el análisis mediante BLAST de los pares de secuencias de dorada y trucha seleccionadas, la identidad entre las secuencias escogidas supera el 75% y el valor e, asociado a la preeminencia de falsos positivos, resulta inferior a 10^{-5} , ambos requisitos mínimos para el análisis consistente de secuencias [336].

FIGURA 30. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PARA GENES SELECTOS MEDIANTE MICROARRAY Y qPCR

Se indican los niveles de expresión valorados como el logaritmo en base 2 de los valores de la relación de la expresión genética entre los tratamientos experimentales obtenida para cada gen en la plataforma de micromatriz (naranja) y la RT PCR cuantitativa (verde). Véase el material adicional para más detalles.

Las ventajas y desventajas metodológicas de la experimentación con micromatrices, los clásicos cuellos de botella, asociados al todavía complejo procesado y análisis de la imagen escaneada, pero también a la reproducibilidad entre diseños experimentales y plataformas diferentes, comerciales o no, se acompañan de una no menos desdeñable incomodidad epistemológica: la definición precisa del diálogo entre genoma y el fenoma basada exclusivamente en los perfiles transcripcionales cuando se consideran no como una medida real o absoluta del esfuerzo transcripcional de un nodo (célula o tejido) sometido a tensiones con sus vecinos en la red, sino como una comparación justificada de los niveles relativos de ARN en un estado supuestamente estacionario sito en el marco de la investigación experimental clásica (control versus tratamiento). En este sentido, la delineación de los perfiles de expresión globales necesitan de una cuantificación adecuada de aquellos eventos postranscripcionales inmediatos (variantes de ARN) o persistentes (proteómica recursiva, esto es, cascadas de interacciones de amplificación y/o regulación) que ayuden a caracterizar el vacío conceptual que, para algunas especies, todavía separa al genoma y el fenoma en la arena ecológica.

La solución pasa por la caracterización efectiva, en términos de componentes y funcionalidad, del proteoma, efector último de la expresión genética. Sin embargo, la elucidación precisa del número, composición e importancia funcional diferenciales de las proteínas circulantes y tisulares, de síntesis constitutiva o inducida, producto unívoco o proveniente del corte y empalme caprichoso de transcritos (a su vez inducibles o expresados constitutivamente como genes habituales de mantenimiento de la función celular) resulta, cuando menos, hercúlea, incluso para la maquinaria de última generación de la que disponen las empresas farmacéuticas, verdaderos zahoríes en la búsqueda de la definición farmacológica del proteoma. De hecho, se ha estimado que el acervo de compuestos químicos de que disponen la mayoría de compañías farmacéuticas (unos 10^6 compuestos por término medio) constituye una minúscula parte del espacio de formulaciones químicas posibles, que, para, el n-hexano, a modo de ejemplo, contiene más de 10^{29} derivados posibles, si se restringe el número de sustituyentes y posiciones de sustitución, por lo que para la reducción de semejante vastedad se ha propuesto la elaboración de una quimiogeografía que sitúe los compuestos en relación a descriptores químicos de diversas propiedades fisicoquímicas o topológicas [337]. El escenario es parecido al de las formas morfológicas posibles que puede discriminar la criba evolutiva

en una arena ecológica dada: no todas son viables y menos aún adaptables, pero el potencial combinatorio de las que sí lo son exige una organización formal topográfica que, al igual que la quimiogeografía, sitúe a cada combinación individual o poblacional de genes y sus expresiones en un marco conceptual adecuado para la comprensión cabal del diálogo entre genoma y fenoma. Aunque es cierto que la propuesta es, por el momento, tecnología-ficción, no lo es menos la necesidad de llegar al posicionamiento global de la expresión genética de una especie en relación a las perturbaciones del medio (ecotoxicología, patología, etc.), especialmente en el caso de aquellas que, como se ha venido reiterando a lo largo de este trabajo, carecen de una identidad genómica correctamente caracterizada. En este sentido, la utilización de micromatrices, acotadas (*focused*) o no, se justifica por su capacidad exploratoria y no tanto por la confirmatoria o clasificatoria. Cuando aún no está resuelto el conflicto entre eficiencia y sensibilidad para la mayoría de plataformas de micromatriz, comerciales o no, su uso discriminado, en combinación con construcciones jerárquicas para la anotación genética y su meta-análisis como la ontología o los diversos avatares del análisis de conjuntos similares (*clusters*), permite, cuando menos, la formulación de hipótesis y, en parte, su validación.

La mayoría de micromatrices construidas ad hoc para especies de escasa caracterización genómica, y por tanto acreedoras de un balance económico ajustado referido a los costes de fabricación de las mismas, confían en la validación técnica previa de la plataforma y en la validación biológica de los resultados a partir de su adecuación al conocimiento experimental y bibliográfico previo sobre el proceso analizado y, en menor grado, en la descripción alternativa de la expresión de algunos genes selectos, habitualmente mediante RT PCR cuantitativa [333, 338]. La discusión sobre la validez de estos y otros métodos alternativos de validación biológica aún no está zanjada, y a menudo viene limitada por las constricciones económicas que para la investigación aplicada en laboratorios no farmacéuticos tiene la utilización de las tecnologías de análisis genético masivo. Así, el uso de las micromatrices como medio para elucidar el grado y estado de la carga alostática de un organismo sometido a infecciones, patologías o agresiones xenobióticas excluye una validación paralela de igual magnitud basada en el análisis particulado de genes mediante PCR cuantitativa o transferencias Northern, validación, por otra parte, dependiente de la idiosincrasia de cada tecnología, sujeta a los mismos problemas [331-334] estadísticos (discriminación de la expresión diferencial, validez de las respectivas varas de medir la expresión, balance entre eficiencia y sensibilidad y sus alter egos repetitibilidad y precisión biológica...) y metodológicos (calidad de las sondas de ADN o ARN, contaminación indeseada, hibridación heteróloga, capacidad de detección de los reactivos...), que con diferente sabor, que también afligen al análisis de micromatrices.

Aunque se acompaña del análisis confirmatorio mediante qRT PCR de algunos genes selectos (véase el material adicional y el capítulo previo), el grueso de este trabajo descansa en el análisis pormenorizado de la expresión genética, desde una perspectiva ontológica, de la variación alostática del sistema inmunitario, definida por la exposición a inmunógenos de distintos grados de virulencia, que se desprende del uso de

micromatrices de ADNc homólogas y heterólogas en dos especies de teleósteos, la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y la dorada (*Sparus aurata*), de reconocida importancia comercial e imprecisa, por el momento y por poco tiempo, definición genómica, con la finalidad de elaborar hipótesis coherentes, contrastadas con el conocimiento experimental previo que, en situaciones de carga alostática semejante, se tiene sobre ambas especies, y, por supuesto, falsables que ayuden a evaluar la intensidad y alcance del reajuste alostático en cada caso. Se refieren a continuación los resultados obtenidos y sus implicaciones en relación a los objetivos planteados.

Objetivos

Mediante el análisis ontológico funcional de la expresión genética de dos especies de teleósteos descrito en este trabajo se pretendía

- (1) Proporcionar un modelo comparativo de los cambios en la expresión genética de la respuesta inmunitaria temprana (24-72 h) en el riñón cefálico de la trucha (*O. mykiss*) desencadenada por la exposición bacteriana y viral *in vivo*. Para ello se analiza el transcriptoma obtenido mediante micromatriz de ADNc de animales sometidos a inflamación experimental *in vivo* con LPS bacteriano o infectados con versiones atenuadas y virulentas del virus IHNV, responsable de la necrosis hematopoyética infecciosa en salmónidos.
- (2) Monitorizar la respuesta inmunitaria temprana (24-72 h) desencadenada por la exposición *in vivo* a lipopolisacárido bacteriano (LPS) en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Para ello se establece un estudio comparativo mediante análisis de micromatriz de ADNc entre dos órganos, el riñón cefálico o anterior y el hígado, responsables de la hematopoyesis y parte de la respuesta inmunitaria de fase aguda, respectivamente, utilizando un modelo de inflamación peritoneal de uso habitual en la experimentación animal.
- (3) Validar el uso de una plataforma acotada de micromatriz de ADNc (SFM 1.0) específica para salmónidos en una experimentación de reactividad inmunitaria con la trucha (*O. mykiss*), a fin de complementar los estudios previos metabólicos y toxicológicos llevados a cabo con la misma plataforma.
- (4) Evaluar la aplicabilidad de la plataforma SFA 2.0 específica de salmónidos para la detección de cambios significativos en el transcriptoma de la dorada (*Sparus aurata*). Para ello se analiza ontológicamente el transcriptoma de las branquias y el riñón cefálico de la dorada, mediante hibridación cruzada con la plataforma SFA 2.0, en respuesta a formulaciones inmunoestimulantes en la dieta.

- (5) Validar el uso del análisis ontológico funcional como herramienta de elevado contenido explicativo y funcional en el análisis de micromatrices de ADN.

Validación de la plataforma de micromatriz en estudios inmunitarios

Los objetivos asociados a la validación del uso de la plataforma específica de salmónidos SFM 1.0 que, para el análisis transcriptómico de la expresión genética inmunitaria en la trucha, *Oncorhynchus mykiss* (objetivos 1-3 y 5) pueden considerarse cumplidos en lo que respecta a la evaluación transcriptómica de

- (a) la respuesta defensiva de la mencionada especie en el riñón cefálico y el hígado de los animales expuestos a concentraciones elevadas de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en un modelo de peritonitis y
- (b) la reactividad del riñón cefálico frente a una infección viral con las formas atenuada y activa del virus IHN, uno de los principales patógenos de las especies de salmónidos cultivados en la actualidad.

Los resultados, en número de genes, intensidad de la respuesta transcriptómica y valoración ontológica de las categorías funcionales son comparables a los obtenidos en estudios ecotoxicológicos y metabólicos previos en los que se utilizó la misma plataforma [34, 72, 75, 127, 128, 131, 132], lo que confirma la eficiencia de la plataforma para la evaluación de la alteración inmunitaria y la respuesta alostática en la trucha.

Por otra parte, el análisis funcional y estadístico de la expresión genética utilizando como herramienta de discriminación el análisis mediante ontologías genéticas anotadas de dicha funcionalidad, se revela como una metodología de interpretación de gran ayuda para la formulación de hipótesis sobre la modelización de los procesos biológicos en situaciones de carga alostática (objetivo 5). Se sugiere, por tanto, el uso extensivo de este tipo de acercamientos metodológicos, empleando pruebas estadísticas al uso para la discriminación de aquellas categorías ontológicas cuya expresión diferencial permita la evaluación de la expresión genética y de las que, dada la composición de la plataforma de micromatriz utilizada, puedan considerarse sobreexpresadas. En el caso de plataformas enriquecidas con transcritos específicos como las discutidas en este trabajo, este último enfoque se considera imprescindible para la correcta evaluación de los resultados, tal y como se ha sugerido recientemente [339].

De manera específica, la experimentación detallada de la respuesta transcriptómica defensiva frente a la exposición a LPS y las formas atenuada y activa del virus IHN puede desglosarse en las siguientes conclusiones:

Efectos de la infección viral y bacteriana en el riñón cefálico de la trucha

Obviando la descripción pormenorizada de los niveles de expresión de los transcritos asociados a los principales moduladores y participante activos en la respuesta defensiva a la intrusión viral y bacteriana en el riñón cefálico de la trucha, la **comparación de los efectos de la infección viral y la exposición a LPS bacteriano sobre el transcriptoma del riñón cefálico de la trucha, *O. mykiss*** (objetivo 1) sugiere que

- (1) El número de genes regulados en respuesta a la inoculación de LPS lo son en tanto que su expresión mengua en ambos puntos de muestreo y la magnitud del cambio en la expresión genética resulta muy elevado en genes cuya expresión se regula a la baja.
- (2) Los tratamientos virales estimulan una elevada inducción de actividad transcriptómica y apoptótica/ciclo celular con un peso similar, en términos de magnitud de la inducción al alza o a la baja de la expresión genética. Los genes regulados por la exposición viral a la forma atenuada del IHNV se destacan por su mezcla funcional ontológica, una suerte de efecto combinado de los tratamientos viral activo y bacteriano, lo que sugiere la participación de mecanismos diferenciados, tanto específicos como inespecíficos, en la activación mediada por el virus atIHN.
- (3) Varios de los genes participantes en la correcta transducción de la señal biológica y la biosíntesis de proteínas se mostraron activos en los animales infectados con la forma atenuada del virus IHN, una vez estimulado el decremento en el remodelado del citoesqueleto. Como ocurre en el caso de los animales inoculados con la forma activa del virus IHN, las categorías funcionales delineadas en el análisis ontológico se muestran enriquecidas con genes activos durante las respuestas inflamatorias, inmunitarias y defensivas. Tanto en los peces tratados con atIHNV y su forma activa, la respuesta inmunitaria a las 72 horas sobrepasa en importancia a la dirigida por la metaloproteinasas bajo la influencia de la exposición a LPS. Puede, por tanto, considerarse la respuesta transcriptómica del riñón cefálico a la infección por IHNV muchos más diversificada en términos de número y vías de activación inmunitarias.
- (4) La comparación ontológica general de los genes expresados diferencialmente indica una marcada inducción de metaloproteinasas, colágeno y otros escultores de la matriz extracelular en las truchas inoculadas con lipopolisacárido, paralelamente con la mengua de los transcritos de genes implicados en el control del metabolismo basal y el aumento de la expresión de mediadores inmunitarios involucrados en la presentación de antígenos

dirigida por el MHC y la opsonización orquestada por las inmunoglobulinas al tercer día de la infección.

- (5) El riñón cefálico participa de manera primordial durante la activación *a corto plazo* de los mecanismos defensivos en respuesta a la infección activa de IHNV o, alternativamente, una expresión diferencial temprana, inducible y tal vez antagonista, del procesamiento y manejo de antígenos dirigido por los complejos mayores de histocompatibilidad de tipo I o II, fuertemente influenciada por el tipo y dinámica infectiva del PAMP o patógeno (LPS versus virus) o las vías de entrada (tejido/órgano).
- (6) Según el modelo transcriptómico reseñado, el riñón cefálico no actuaría como un órgano de reacción aguda inmediata a la infección o inflamación, sino más bien como el inductor de un tipo de respuesta adaptativa retardada, a la vez que como un importante regulador de la diferenciación eritropoyética y mieloide frente a este tipo de intrusión patogénica.

Efectos de la infección bacteriana en la respuesta de fase aguda hepática de la trucha

Por lo que respecta a la **respuesta transcriptómica comparativa entre el riñón cefálico y el hígado de la trucha expuesta a LPS** (objetivo 2) nuestros resultados indican

- (1) Una primera respuesta humoral, inespecífica, de fase aguda y temprana (24 horas), de bajo nivel en términos de expresión genética pero con la participación de numerosos genes de funcionalidad diversa, que tiene a las HSPs y el sistema del complemento como principales actores y cuya expresión al alza ya la baja, respectivamente, contrasta con la inhibición de genes codificantes para proteínas inhibidoras del sistema del complemento, el tránsito y la quimiotaxis celulares de neutrófilos y otras poblaciones mieloides errantes, claramente activas durante los primeros estadios de la infección.
- (2) Una respuesta inmunitaria tardía (a las 72 horas de la exposición a LPS) más intensa en términos transcripcionales (intensidad de la expresión genética) pero escasa en cuanto al número de genes implicados en la respuesta, fuertemente reguladora, en la que la actividad del sistema del complemento y los genes implicados en la síntesis de proteínas características de la respuesta de fase aguda se someten a un considerable control, y en la que el diálogo celular entre la inmunidad innata y adaptativa parece cobrar forma, aún cuando el efecto sistémico de la peritonitis es, debido a la peculiar resistencia a la exposición a LPS en los teleósteos, probablemente escaso.

- (3) El arresto metabólico de los procesos de obtención de energía por oxidación de sustratos orgánicos, la glucólisis y el metabolismo de lípidos, así como de una bajada global de la transducción y señalización intracelulares a las 24 de la exposición a LPS.
- (4) El arresto metabólico previo (24 horas) persiste en el procesamiento de la glucosa pero desaparece en el caso de los lípidos, coincidente con una elevada actividad de la maquinaria mitocondrial a los 2 días de la inflamación.
- (5) La comparación de los genes comunes, expresados diferencialmente, en la respuesta defensiva desencadenada por la exposición a LPS bacteriano en el hígado y el riñón cefálico de la trucha sugiere una menor respuesta, en número de transcritos e intensidad de la expresión genética, en aquel. En el riñón cefálico, los genes implicados en la reorganización y escultura de la matriz extracelular, factores activadores del complemento y reguladores del tránsito celular permanecen fuertemente inhibidos a las 24 y 72 horas de la exposición a LPS, mientras que el procesamiento y presentación de antígenos mediado por el MHC de tipo I se regula al alza en el tercer día de la inflamación peritoneal. En el hígado, en cambio, la respuesta de fase aguda condiciona la reactividad del órgano en el patrón bimodal mencionado en los apartados (1) y (2).
- (6) Se confirma, por tanto, la presencia de una respuesta de fase aguda arquetípica, muy similar a la de los mamíferos, en la trucha, acompañada de cambios mensurables en el transcriptoma hepático. La respuesta bimodal del hígado interesa a la multifuncionalidad del mismo (detoxificación, metabolismo digestivo, respuesta defensiva de fase aguda), mientras que en el caso del riñón cefálico, como se ha comentado previamente, parece clara una vocación exclusivamente inmunitaria y hematopoyética, centrada en la maduración linfocitaria estimulada en parte por el procesamiento de antígenos.

Efectos de una dieta rica en vitaminas C y E y extractos de levadura en el riñón cefálico y las branquias de la dorada

El análisis de los resultados observados de la evaluación de la actividad transcripcional mediante hibridación cruzada con la plataforma SFA 2.0 específica de salmónidos en doradas (*Sparus aurata*) alimentadas con una dieta inmunoestimulante (objetivo 4) sugieren que

- (1) Se mantiene un tono inmunitario moderado en la branquia de doradas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta de inmunoestimulantes ricos en vitaminas antioxidantes y extractos de levadura, con la participación de componentes de la respuesta defensiva adaptativa, una escasa regulación a la baja de moduladores y/o activadores de la respuesta y una regulación a la baja de la síntesis de especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere un grado apreciable de quiescencia en la actividad fagocítica.
- (2) Las categorías funcionales más representadas, teniendo en cuenta la composición de la plataforma de micromatriz, en la branquia incluyen la actividad molecular estructural, la comunicación celular y, especialmente, los procesos de transcripción y traducción de proteínas, probablemente como reflejo de la multifuncionalidad del órgano.
- (3) En el caso del riñón cefálico de doradas alimentadas con dietas ricas en vitaminas antioxidantes y extractos de levadura, la respuesta inmunitaria después de cuatro semanas de tratamiento es de mayor intensidad e incluye un mayor número de participantes, que en el caso de la branquia. Asimismo, la activación del sistema del complemento, la actividad de péptidos antimicrobianos ubicuos como la lisozima y la expresión de carabinas moleculares de protección (HSPs) parece ser mayor en el riñón cefálico que en la branquia.
- (4) En el riñón cefálico de las doradas alimentadas con la dieta inmunoestimulante reseñada la respuesta transcricional más representativa, en términos de categorías funcionales, viene dominada por los transcritos implicados en la biosíntesis de proteínas, como en el caso de la branquia y la comunicación celular, y, como gran diferencia, de los genes involucrados en la respuesta defensiva y a estímulos bióticos y al control de la apoptosis.
- (5) En resumen, la administración de una dieta inmunoestimulante rica en vitaminas antioxidantes y extractos de levadura induce una respuesta inmunitaria de bajo nivel, en la que participan de manera destacada los componentes del brazo adaptativo de la inmunidad, probablemente como consecuencia de la duración (cuatro semanas) del tratamiento inmunoestimulante. La modalidad de la respuesta parece ser, al igual que lo observado para el mismo órgano en el caso de las infecciones virales por IHNV comentadas anteriormente, más adaptativa que innata, Y, al igual que en el caso de la branquia, el control de la respuesta es efectivo, a juzgar por los niveles de expresión de los transcritos de los agentes apoptóticos, los implicados en el estallido respiratorio y la activación del sistema del complemento. El control de la respuesta oxidativa mediada por las células mieloides sugiere un grado mensurable de quiescencia, pero no inactividad, en las poblaciones fagocíticas en ambos órganos.

- (6) El número de transcritos y la intensidad de su expresión indican un alto grado de eficiencia en el uso de la plataforma SFA 2.0 específica de salmónidos para evaluar la respuesta transcriptómica en la dorada (*Sparus aurata*). De los 331 genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$) en aquella, 48 muestran una regulación al alza o a la baja de los niveles de expresión de 1.5 FC en valores absolutos, un 7% (23 genes) superan los 2 FC en valor absoluto y el rango de expresión oscila entre los -4.6 y 6.6 FC. En el caso del riñón, 446 genes muestran expresión diferencial ($p < 0.01$, $FDR < 0.01$), un 47% se mantienen regulados al alza o a la baja en más o menos de 1.5 FC, y 62 de ellos (el 14%) expresan más de 2 veces los valores basales absolutos, con una variación en el rango de valores que oscila entre -26.6 y 6 FC. El análisis ontológico de todos ellos muestra una mayor expresión de genes y categorías funcionales relacionados con la inmunidad (innata y adaptativa), el ciclo celular y los procesos apoptóticos y el metabolismo y procesamiento de la hemoglobina y el ión férrico.

Las plataformas de micromatriz de ADNc, debido a su plasticidad y (relativa) facilidad de producción, continuaran siendo utilizados especialmente en aquellas especies, modelos y no modelos, modales o extremos que carezcan de una definición genómica precisa, tanto en términos estructurales como funcionales. Por el momento, y a la espera de la vulgarización de los grandes secuenciadores, el análisis de ESTs unido al desarrollo de plataformas de análisis transcriptómico como las micromatrices, constituye una aproximación efectiva, en términos de coste y productividad, a la investigación del interactoma, y permite el desarrollo de estudios de expresión genética a gran escala, confirmando así el principio de Krogh que afirma que para resolver un interrogante fisiológico dado, siempre hay una especie en la que la respuesta se puede estudiar de manera óptima [227]. Si una especie, parafraseando a Richard Dawkins, es un modelo histórico de la idiosincrasia del medio en el que persiste, la modelización transcriptómica del modelo no es sino una manera de hacer pública la conversación privada entre genoma y fenoma, o, lo que es lo mismo, extender la descripción funcional del fenotipo a la red, compleja e independiente de la escala, de las interacciones que regulan los sistemas vivos.

1. Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabasi AL: **The human disease network.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(21):8685-8690.
2. Palla G, Barabasi AL, Vicsek T: **Quantifying social group evolution.** *Nature* 2007, **446**(7136):664-667.
3. Wilkins MR, Kummerfeld SK: **Sticking together? Falling apart? Exploring the dynamics of the interactome.** *Trends Biochem Sci* 2008, **33**(5):195-200.
4. Stumpf MP, Thorne T, de Silva E, Stewart R, An HJ, Lappe M, Wiuf C: **Estimating the size of the human interactome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(19):6959-6964.
5. Wild CP: **Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**(8):1847-1850.
6. IHGSC: **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** *Nature* 2004, **431**(7011):931-945.
7. Chang CH, Hsieh LC, Chen TY, Chen HD, Luo L, Lee HC: **Shannon information in complete genomes.** *Journal of bioinformatics and computational biology* 2005, **3**(3):587-608.
8. Schug J, Schuller WP, Kappen C, Salbaum JM, Bucan M, Stoeckert CJ, Jr.: **Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy.** *Genome Biol* 2005, **6**(4):R33.
9. Abbas AR, Baldwin D, Ma Y, Ouyang W, Gurney A, Martin F, Fong S, van Lookeren Campagne M, Godowski P, Williams PM *et al*: **Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data.** *Genes Immun* 2005, **6**(4):319-331.
10. Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S: **Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells.** *PLoS biology* 2006, **4**(10):e309.
11. Hyatt G, Melamed R, Park R, Seguritan R, Laplace C, Poirot L, Zucchelli S, Obst R, Matos M, Venanzi E *et al*: **Gene expression microarrays: glimpses of the immunological genome.** *Nat Immunol* 2006, **7**(7):686-691.
12. Khatri P, Draghici S: **Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2005, **21**(18):3587-3595.

13. Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M: **Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus.** *Nature reviews* 2006, 7(1):55-65.
14. Yang YH, Speed T: **Design issues for cDNA microarray experiments.** *Nature reviews* 2002, 3(8):579-588.
15. Liolios K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, Kyrpides NC: **The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide.** *Nucleic Acids Res* 2006, 34(Database issue):D332-334.
16. Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, Angerer RC, Angerer LM, Arnone MI, Burgess DR, Burke RD *et al*: **The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*.** *Science* 2006, 314(5801):941-952.
17. Culley AI, Lang AS, Suttle CA: **High diversity of unknown picorna-like viruses in the sea.** *Nature* 2003, 424(6952):1054-1057.
18. Cadavid LF: **Self-discrimination in colonial invertebrates: genetic control of allorecognition in the hydroid *Hydractinia*.** *Dev Comp Immunol* 2004, 28(9):871-879.
19. Iwanaga S, Lee BL: **Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals.** *Journal of biochemistry and molecular biology* 2005, 38(2):128-150.
20. Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ: **Reconstructing immune phylogeny: new perspectives.** *Nat Rev Immunol* 2005, 5(11):866-879.
21. Pasquier LD: **Germline and somatic diversification of immune recognition elements in Metazoa.** *Immunol Lett* 2006, 104(1-2):2-17.
22. Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-de Frias C, Cortes A: **Ontogeny of the immune system of fish.** *Fish & shellfish immunology* 2006, 20(2):126-136.
23. Alder MN, Herrin BR, Sadlonova A, Stockard CR, Grizzle WE, Gartland LA, Gartland GL, Boydston JA, Turnbough CL, Jr., Cooper MD: **Antibody responses of variable lymphocyte receptors in the lamprey.** *Nature immunology* 2008, 9(3):319-327.
24. Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP, Buckley KM, Brockton V, Nair SV, Berney K *et al*: **The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome.** *Developmental biology* 2006, 300(1):349-365.
25. Kufer TA, Fritz JH, Philpott DJ: **NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity.** *Trends Microbiol* 2005, 13(8):381-388.
26. Nonaka M, Kimura A: **Genomic view of the evolution of the complement system.** *Immunogenetics* 2006, 58(9):701-713.
27. Boshra H, Li J, Sunyer JO: **Recent advances on the complement system of teleost fish.** *Fish Shellfish Immunol* 2006, 20(2):239-262.
28. De Tomaso AW, Nyholm SV, Palmeri KJ, Ishizuka KJ, Ludington WB, Mitchel K, Weissman IL: **Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus.** *Nature* 2005, 438(7067):454-459.

29. Yu C, Dong M, Wu X, Li S, Huang S, Su J, Wei J, Shen Y, Mou C, Xie X *et al*: Genes "waiting" for recruitment by the adaptive immune system: the insights from amphioxus. *J Immunol* 2005, 174(6):3493-3500.
30. Kurn U, Sommer F, Hemmrich G, Bosch TC, Khalturin K: Allorecognition in urochordates: Identification of a highly variable complement receptor-like protein expressed in follicle cells of *Ciona*. *Dev Comp Immunol* 2007, 31(4):360-371.
31. Pancer Z, Cooper MD: The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2006, 24:497-518.
32. Volff JN: Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 2005, 94(3):280-294.
33. Venkatesh B: Evolution and diversity of fish genomes. *Current opinion in genetics & development* 2003, 13(6):588-592.
34. Krasnov A, Koskinen H, Afanasyev S, Molsa H: Transcribed Tc1-like transposons in salmonid fish. *BMC genomics* 2005, 6:107.
35. Davis RH: The age of model organisms. *Nature reviews* 2004, 5(1):69-76.
36. Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI: The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 2004, 20(4):367-379.
37. Traver D, Herbomel P, Patton EE, Murphey RD, Yoder JA, Litman GW, Catic A, Amemiya CT, Zon LI, Trede NS: The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Advances in immunology* 2003, 81:253-330.
38. Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin YM: Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol* 2004, 28(1):9-28.
39. Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, Steiner LA: The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol* 2005, 6(3):295-302.
40. Hansen JD, Landis ED, Phillips RB: Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(19):6919-6924.
41. Savan R, Aman A, Nakao M, Watanuki H, Sakai M: Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Immunogenetics* 2005, 57(6):458-463.
42. Savan R, Aman A, Sato K, Yamaguchi R, Sakai M: Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur J Immunol* 2005, 35(11):3320-3331.

43. Saha NR, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y: **Fugu immunoglobulin D: a highly unusual gene with unprecedented duplications in its constant region.** *Immunogenetics* 2004, 56(6):438-447.
44. Bengten E, Quiniou S, Hikima J, Waldbieser G, Warr GW, Miller NW, Wilson M: **Structure of the catfish IGH locus: analysis of the region including the single functional IGHM gene.** *Immunogenetics* 2006, 58(10):831-844.
45. Langenau DM, Zon LI: **The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development.** *Nat Rev Immunol* 2005, 5(4):307-317.
46. Zon LI, Peterson RT: **In vivo drug discovery in the zebrafish.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4(1):35-44.
47. Robertsen B: **The interferon system of teleost fish.** *Fish Shellfish Immunol* 2006, 20(2):172-191.
48. Yoder JA, Litman RT, Mueller MG, Desai S, Dobrinski KP, Montgomery JS, Buzzeo MP, Ota T, Amemiya CT, Trede NS *et al*: **Resolution of the novel immune-type receptor gene cluster in zebrafish.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(44):15706-15711.
49. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G *et al*: **Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition.** *The EMBO journal* 2004, 23(7):1587-1597.
50. Panagos PG, Dobrinski KP, Chen X, Grant AW, Traver D, Djeu JY, Wei S, Yoder JA: **Immune-related, lectin-like receptors are differentially expressed in the myeloid and lymphoid lineages of zebrafish.** *Immunogenetics* 2006, 58(1):31-40.
51. Kelley J, Walter L, Trowsdale J: **Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters.** *PLoS genetics* 2005, 1(2):129-139.
52. Jault C, Pichon L, Chluba J: **Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in Danio rerio.** *Mol Immunol* 2004, 40(11):759-771.
53. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A: **The evolution of vertebrate Toll-like receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(27):9577-9582.
54. Stet RJ, Hermsen T, Westphal AH, Jukes J, Engelsma M, Lidy Verburg-van Kemenade BM, Dortmans J, Aveiro J, Savelkoul HF: **Novel immunoglobulin-like transcripts in teleost fish encode polymorphic receptors with cytoplasmic ITAM or ITIM and a new structural Ig domain similar to the natural cytotoxicity receptor NKp44.** *Immunogenetics* 2005, 57(1-2):77-89.
55. Magnadottir B: **Innate immunity of fish (overview).** *Fish & shellfish immunology* 2006, 20(2):137-151.
56. Sunyer JO, Boshra H, Li J: **Evolution of anaphylatoxins, their diversity and novel roles in innate immunity: insights from the study of fish complement.** *Veterinary immunology and immunopathology* 2005, 108(1-2):77-89.

57. Secombes CJ, Bird S, Zou J: **Adaptive immunity in teleosts: cellular immunity.** *Developments in biologicals* 2005, 121:25-32.
58. Secombes C, Cunningham C: **Cytokines: an evolutionary perspective.** *Developmental and comparative immunology* 2004, 28(5):373-374.
59. Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI: **Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(13):4596-4601.
60. Kellam P, Weiss RA: **Infectogenomics: insights from the host genome into infectious diseases.** *Cell* 2006, 124(4):695-697.
61. Segal E, Shapira M, Regev A, Pe'er D, Botstein D, Koller D, Friedman N: **Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data.** *Nature genetics* 2003, 34(2):166-176.
62. Shaffer AL, Wright G, Yang L, Powell J, Ngo V, Lamy L, Lam LT, Davis RE, Staudt LM: **A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology.** *Immunological reviews* 2006, 210:67-85.
63. Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, Klein U, Dalla-Favera R, Califano A: **Reverse engineering of regulatory networks in human B cells.** *Nat Genet* 2005, 37(4):382-390.
64. Stuart JM, Segal E, Koller D, Kim SK: **A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules.** *Science* 2003, 302(5643):249-255.
65. von Schalburg KR, Rise ML, Cooper GA, Brown GD, Gibbs AR, Nelson CC, Davidson WS, Koop BF: **Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray.** *BMC genomics* 2005, 6:126.
66. Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR: **Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101 Suppl 2:14615-14621.
67. Bartling B, Hofmann HS, Boettger T, Hansen G, Burdach S, Silber RE, Simm A: **Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma.** *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2005, 49(2):145-154.
68. Stone JD, Demkowicz WE, Jr., Stern LJ: **HLA-restricted epitope identification and detection of functional T cell responses by using MHC-peptide and costimulatory microarrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(10):3744-3749.
69. Stout RD, Suttles J: **Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments.** *J Leukoc Biol* 2004, 76(3):509-513.
70. Franch R, Louro B, Tsalavouta M, Chatziplis D, Tsigenopoulos CS, Sarropoulou E, Antonello J, Magoulas A, Mylonas CC, Babbucci M *et al*: **A ge-**

- netic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* 2006, 174(2):851-861.
71. Hagen-Larsen H, Laerdahl JK, Panitz F, Adzhubei A, Hoyheim B: **An EST-based approach for identifying genes expressed in the intestine and gills of pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*)**. *BMC genomics* 2005, 6:171.
72. Krasnov A, Koskinen H, Pehkonen P, Rexroad CE, 3rd, Afanasyev S, Molsa H: **Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress**. *BMC genomics* 2005, 6(1):3.
73. Kurobe T, Yasuike M, Kimura T, Hirono I, Aoki T: **Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays**. *Developmental and comparative immunology* 2005, 29(6):515-523.
74. Liu WJ, Chang YS, Wang CH, Kou GH, Lo CF: **Microarray and RT-PCR screening for white spot syndrome virus immediate-early genes in cycloheximide-treated shrimp**. *Virology* 2005, 334(2):327-341.
75. MacKenzie S, Iliev D, Liarte C, Koskinen H, Planas JV, Goetz FW, Molsa H, Krasnov A, Tort L: **Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol**. *Mol Immunol* 2006, 43(9):1340-1348.
76. Martin SA, Blaney SC, Houlihan DF, Secombes CJ: **Transcriptome response following administration of a live bacterial vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*)**. *Molecular immunology* 2006, 43(11):1900-1911.
77. Matsuyama T, Fujiwara A, Nakayasu C, Kamaishi T, Oseko N, Hirono I, Aoki T: **Gene expression of leucocytes in vaccinated Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) during the course of experimental infection with *Edwardsiella tarda***. *Fish & shellfish immunology* 2006.
78. Rise ML, Jones SR, Brown GD, von Schalburg KR, Davidson WS, Koop BF: **Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection**. *Physiological genomics* 2004, 20(1):21-35.
79. Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent III HF, Chen YA, Peck ME, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW *et al*: **Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge**. *Physiol Genomics* 2006.
80. Humphries JE, Yoshino TP: **Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: connections with the innate system of invertebrates**. *Integrative Comparative Biology* 2003, 43:305-312.
81. Jenny MJ, Ringwood AH, Lacy ER, Lewitus AJ, Kempton JW, Gross PS, Warr GW, Chapman RW: **Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the**

- American oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine biotechnology* (New York, NY 2002, 4(1):81-93.
82. Jenny MJ, Warr GW, Ringwood AH, Baltzegar DA, Chapman RW: **Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors.** *Gene* 2006, 379:156-165.
83. Dondero F, Piacentini L, Marsano F, Rebelo M, Vergani L, Venier P, Viarengo A: **Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray.** *Gene* 2006, 376(1):24-36.
84. Venier P, Pallavicini A, De Nardi B, Lanfranchi G: **Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*.** *Gene* 2003, 314:29-40.
85. Song L, Xu W, Li C, Li H, Wu L, Xiang J, Guo X: **Development of expressed sequence tags from the Bay Scallop, *Argopecten irradians* irradians.** *Marine biotechnology* (New York, NY 2006, 8(2):161-169.
86. Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A: **Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach.** *Diseases of aquatic organisms* 2004, 61(1-2):123-135.
87. Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW: **Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*.** *Developmental and comparative immunology* 2001, 25(7):565-577.
88. Somboonwiwat K, Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, Hirono I, Tassanakajon A: **Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*.** *Journal of biochemistry and molecular biology* 2006, 39(1):26-36.
89. Roux MM, Pain A, Klimpel KR, Dhar AK: **The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*).** *Journal of virology* 2002, 76(14):7140-7149.
90. Li RW, Waldbieser GC: **Production and utilization of a high-density oligonucleotide microarray in channel catfish, *Ictalurus punctatus*.** *BMC genomics* 2006, 7:134.
91. Rise ML, von Schalburg KR, Brown GD, Mawer MA, Devlin RH, Kuipers N, Busby M, Beetz-Sargent M, Alberto R, Gibbs AR *et al*: **Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics.** *Genome Res* 2004, 14(3):478-490.

92. Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y: **Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries.** *BMC genomics* 2006, 7:196.
93. Williams TD, Diab AM, George SG, Godfrey RE, Sabine V, Conesa A, Minchin SD, Watts PC, Chipman JK: **Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose.** *Environmental science & technology* 2006, 40(20):6479-6488.
94. Long S, Milev-Milovanovic I, Wilson M, Bengten E, Clem LW, Miller NW, Chinchar VG: **Identification and expression analysis of cDNAs encoding channel catfish type I interferons.** *Fish & shellfish immunology* 2006, 21(1):42-59.
95. Roberge C, Paez DJ, Rossignol O, Guderley H, Dodson J, Bernatchez L: **Genome-wide survey of the gene expression response to saprolegniasis in Atlantic salmon.** *Molecular immunology* 2007, 44(6):1374-1383.
96. Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T: **Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis.** *Vaccine* 2006, 24(7):921-930.
97. Zou J, Mercier C, Koussounadis A, Secombes C: **Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish.** *Molecular immunology* 2007, 44(4):638-647.
98. Gerwick L, Corley-Smith G, Bayne CJ: **Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus.** *Fish & shellfish immunology* 2007, 22(3):157-171.
99. Morrison RN, Cooper GA, Koop BF, Rise ML, Bridle AR, Adams MB, Nowak BF: **Transcriptome profiling the gills of amoebic gill disease (AGD)-affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a role for tumor suppressor p53 in AGD pathogenesis?** *Physiological genomics* 2006, 26(1):15-34.
100. Purcell MK, Nichols KM, Winton JR, Kurath G, Thorgaard GH, Wheeler P, Hansen JD, Herwig RP, Park LK: **Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus.** *Molecular immunology* 2006, 43(13):2089-2106.
101. Greenspan NS: **Conceptualizing immune responsiveness.** *Nat Immunol* 2007, 8(1):5-7.
102. Raz E: **Organ-specific regulation of innate immunity.** *Nat Immunol* 2007, 8(1):3-4.
103. Matzinger P: **Friendly and dangerous signals: is the tissue in control?** *Nat Immunol* 2007, 8(1):11-13.
104. Cossins AR, Crawford DL: **Fish as models for environmental genomics.** *Nat Rev Genet* 2005, 6(4):324-333.

105. Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, Gabrielson E, Garcia JG, Geoghegan J, Germino G *et al*: **Multiple-laboratory comparison of microarray platforms.** *Nat Methods* 2005, 2(5):345-350.
106. Larkin JE, Frank BC, Gavras H, Sultana R, Quackenbush J: **Independence and reproducibility across microarray platforms.** *Nat Methods* 2005, 2(5):337-344.
107. Sherlock G: **Of fish and chips.** *Nat Methods* 2005, 2(5):329-330.
108. Gracey AY, Fraser EJ, Li W, Fang Y, Taylor RR, Rogers J, Brass A, Cossins AR: **Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(48):16970-16975.
109. Cossins A, Fraser J, Hughes M, Gracey A: **Post-genomic approaches to understanding the mechanisms of environmentally induced phenotypic plasticity.** *J Exp Biol* 2006, 209(Pt 12):2328-2336.
110. Adzhubei AA, Vlasova AV, Hagen-Larsen H, Ruden TA, Laerdahl JK, Hoyheim B: **Annotated expressed sequence tags (ESTs) from pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in a searchable data resource.** *BMC genomics* 2007, 8:209.
111. Davey GC, Caplice NC, Martin SA, Powell R: **A survey of genes in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) as identified by expressed sequence tags.** *Gene* 2001, 263(1-2):121-130.
112. Rexroad CE, 3rd, Lee Y, Keele JW, Karamycheva S, Brown G, Koop B, Gahr SA, Palti Y, Quackenbush J: **Sequence analysis of a rainbow trout cDNA library and creation of a gene index.** *Cytogenet Genome Res* 2003, 102(1-4):347-354.
113. Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ, Cunningham C, Zou J: **Cytokines and innate immunity of fish.** *Dev Comp Immunol* 2001, 25((8-9)):713-723.
114. MacKenzie S, Planas JV, Goetz FW: **LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages.** *Dev Comp Immunol* 2003, 27(5):393-400.
115. Iliev DB, Liarte, C.Q., MacKenzie, S. and Goetz, F.W.: **Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents.** *Molecular Immunology* 2005, Jun; 42(10):1215-1223.
116. Goetz FW, Iliev D, McCauley LAR, Cristina QL, Tort LB, Planas JV, MacKenzie S: **Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages.** *Molecular Immunology* 2004, Nov;41(12):1199-1210.
117. Mackenzie S, Liarte C, Iliev D, Planas JV, Tort L, Goetz FW: **Characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow**

- trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Immunogenetics* 2004, 56(8):611-615.
118. Tsoi SC, Ewart KV, Penny S, Melville K, Liebscher RS, Brown LL, Douglas SE: **Identification of immune-relevant genes from atlantic salmon using suppression subtractive hybridization.** *Mar Biotechnol (NY)* 2004, 6(3):199-214.
119. O'Farrell C, Vaghefi N, Cantonnet M, Buteau B, Boudinot P, Benmansour A: **Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection.** *J Virol* 2002, 76(16):8040-8049.
120. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED *et al*: **Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(12):6025-6030.
121. Chenchik A, Zhu Y, Diachenko L, Li R, Hill J, Siebert P: **Generation and use of high quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR.** In: *RT-PCR methods for Gene Cloning and Analysis*. Edited by Siebert P, Larrick J; 1998: 305-319.
122. Zeng J, Gorski RA, Hamer D: **Differential cDNA cloning by enzymatic degrading subtraction (EDS).** *Nucleic Acids Res* 1994, 22(21):4381-4385.
123. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, 25(17):3389-3402.
124. Cleveland WS, Grosse, E., Shyu, W.M.: **Local regression models.** In: *Statistical Models*. Edited by J.M. Chambers TJHE: S, Pacific Grove, Wadsworth and Brooks/Cole; 1999: 309-376.
125. Storey JD, Tibshirani R: **Statistical significance for genomewide studies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(16):9440-9445.
126. Koskinen H, Pehkonen P, Vehniainen E, Krasnov A, Rexroad C, Afanasyev S, Molsa H, Oikari A: **Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants.** *Biochemical and biophysical research communications* 2004, 320(3):745-753.
127. Krasnov A, Afanasyev S, Oikari A: **Hepatic responses of gene expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta lacustris*) exposed to three model contaminants applied singly and in combination.** *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 2007, 26(1):100-109.
128. Krasnov A, Koskinen H, Rexroad C, Afanasyev S, Molsa H, Oikari A: **Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquat Toxicol* 2005, 74(1):70-81.

129. MacKenzie S, Montserrat N, Mas M, Acerete L, Tort L, Krasnov A, Goetz FW, Planas JV: **Bacterial lipopolysaccharide induces apoptosis in the trout ovary.** *Reprod Biol Endocrinol* 2006, 4:46.
130. Vornanen M, Hassinen M, Koskinen H, Krasnov A: **Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, 289(4):R1177-1184.
131. Vuori KA, Koskinen H, Krasnov A, Koivumaki P, Afanasyev S, Vuorinen PJ, Nikinmaa M: **Developmental disturbances in early life stage mortality (M74) of Baltic salmon fry as studied by changes in gene expression.** *BMC genomics* 2006, 7:56.
132. Merilainen PS, Krasnov A, Oikari A: **Time- and concentration-dependent metabolic and genomic responses to exposure to resin acids in brown trout (*Salmo trutta m. lacustris*).** *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 2007, 26(9):1827-1835.
133. Jorgensen SM, Afanasyev S, Krasnov A: **Gene expression analyses in Atlantic salmon challenged with infectious salmon anemia virus reveal differences between individuals with early, intermediate and late mortality.** *BMC Genomics* 2008, 9:179.
134. MacKenzie S, Balasch JC, Novoa B, Ribas L, Roher N, Krasnov A, Figueras A: **Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to in vivo challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation.** *BMC genomics* 2008, 9:141.
135. Schiotz BL, Jorgensen SM, Rexroad C, Gjoen T, Krasnov A: **Transcriptomic analysis of responses to infectious salmon anemia virus infection in macrophage-like cells.** *Virus Res* 2008.
136. Bootland LM, J.C. L: **Infectious hematopoietic necrosis virus.** *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Woo PTK & Bruno DW, eds CAB International, Oxon, UK 1999:57-121.
137. Hoffmann B, Beer M, Schutze H, Mettenleiter TC: **Fish rhabdoviruses: molecular epidemiology and evolution.** *Current topics in microbiology and immunology* 2005, 292:81-117.
138. Purcell MK, Kurath G, Garver KA, Herwig RP, Winton JR: **Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination.** *Fish Shellfish Immunol* 2004, 17(5):447-462.
139. Yamamoto T, Batts WN, Arakawa CK, Winton JR: **Multiplication of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout following Immersion Infection: Whole-Body Assay and Immunohistochemistry.** *J Aquaculture Health* 1990, 2(4):271-280.
140. Bianchi ME: **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.** *Journal of leukocyte biology* 2007, 81(1):1-5.

141. Sepulcre MP, Lopez-Castejon G, Meseguer J, Mulero V: **The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish.** *Molecular immunology* 2007, 44(8):2009-2016.
142. Zhong J, Kyriakis JM: **Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) recruit the JNK and p38 MAPKs and trigger cytokine release.** *J Biol Chem* 2007.
143. Giri MS, Nebozhyn M, Showe L, Montaner LJ: **Microarray data on gene modulation by HIV-1 in immune cells: 2000-2006.** *Journal of leukocyte biology* 2006, 80(5):1031-1043.
144. Li J, Pritchard DK, Wang X, Park DR, Bumgarner RE, Schwartz SM, Liles WC: **cDNA microarray analysis reveals fundamental differences in the expression profiles of primary human monocytes, monocyte-derived macrophages, and alveolar macrophages.** *Journal of leukocyte biology* 2007, 81(1):328-335.
145. Iliev DB, Liarte CQ, MacKenzie S, Goetz FW: **Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents.** *Molecular immunology* 2005, 42(10):1215-1223.
146. Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T: **Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination.** *Fish Shellfish Immunol* 2005, 18(2):135-147.
147. Ewart KV, Belanger JC, Williams J, Karakach T, Penny S, Tsoi SC, Richards RC, Douglas SE: **Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology.** *Dev Comp Immunol* 2005, 29(4):333-347.
148. Peatman E, Baoprasertkul P, Terhune J, Xu P, Nandi S, Kucuktas H, Li P, Wang S, Somridhivej B, Dunham R *et al*: **Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium.** *Dev Comp Immunol* 2007.
149. Yasuike M, Kondo H, Hirono I, Aoki T: **Difference in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* gene expression profile following hirame rhabdovirus (HIRRV) G and N protein DNA vaccination.** *Fish Shellfish Immunol* 2006.
150. Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y *et al*: **The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution.** *Nature* 2007, 447(7145):714-719.
151. Engelsma MY, Huising MO, van Muiswinkel WB, Flik G, Kwang J, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade BM: **Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1.** *Veterinary immunology and immunopathology* 2002, 87(3-4):467-479.

152. Kobayashi I, Sekiya M, Moritomo T, Ototake M, Nakanishi T: **Demonstration of hematopoietic stem cells in gimbuna carp (*Carassius auratus langsdorfii*) kidney.** *Dev Comp Immunol* 2006, **30**(11):1034-1046.
153. To TT, Hahner S, Nica G, Rohr KB, Hammerschmidt M, Winkler C, Alolio B: **Pituitary-interrenal interaction in zebrafish interrenal organ development.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2007, **21**(2):472-485.
154. Willett CE, Cortes A, Zuasti A, Zapata AG: **Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish.** *Dev Dyn* 1999, **214**(4):323-336.
155. Joerink M, Ribeiro CM, Stet RJ, Hermesen T, Savelkoul HF, Wiegertjes GF: **Head kidney-derived macrophages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) show plasticity and functional polarization upon differential stimulation.** *J Immunol* 2006, **177**(1):61-69.
156. Schutze H, Enzmann PJ, Kuchling R, Mundt E, Niemann H, Mettenleiter TC: **Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus.** *The Journal of general virology* 1995, **76** (Pt 10):2519-2527.
157. Schutze H, Mundt E, Mettenleiter TC: **Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus.** *Virus genes* 1999, **19**(1):59-65.
158. Lee JY, Cho WJ, Do JW, Kim HJ, Park JW, Park MA, Sohn SG, Jeong G, Hah YC: **Monoclonal antibodies raised against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) G protein and a cellular 90 kDa protein neutralize IHNV infection in vitro.** *The Journal of general virology* 1996, **77** (Pt 8):1731-1737.
159. McAllister PE, Wagner RR: **Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses.** *Journal of virology* 1975, **15**(4):733-738.
160. Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C, Bremont M: **Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout.** *Journal of virology* 2004, **78**(8):4098-4107.
161. Biacchesi S, Thoulouze MI, Bearzotti M, Yu YX, Bremont M: **Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes.** *Journal of virology* 2000, **74**(23):11247-11253.
162. Biering E, Villoing S, Sommerset I, Christie KE: **Update on viral vaccines for fish.** *Developments in biologicals* 2005, **121**:97-113.
163. Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra SE: **DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout.** *Fish Shellfish Immunol* 2002, **12**(5):439-453.
164. Bishop RE: **Fundamentals of endotoxin structure and function.** *Contributions to microbiology* 2005, **12**:1-27.
165. Raetz CR, Whitfield C: **Lipopolysaccharide endotoxins.** *Annual review of biochemistry* 2002, **71**:635-700.

166. Iliev DB, Roach JC, Mackenzie S, Planas JV, Goetz FW: **Endotoxin recognition: in fish or not in fish?** *FEBS letters* 2005, **579**(29):6519-6528.
167. Iwama GK, McGeer JC, Pawluck MP: **The effect of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, cortisol and adrenaline in rainbow trout.** *Can J Zool* 1989(67):2065-2073.
168. Chomczynski P: **A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.** *BioTechniques* 1993(15):532-537.
169. Chomczynski P, Sacchi N: **Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987(162):156-169.
170. Tomasec J, Fijan N: **Virusne bolestiriba (viral diseases of fish).** *Final report on research under a part of project 6n/1966, Zagreb* 1971.
171. Reed LJ, Muench H: **A simple method of estimating fifty percent endpoints.** *The American Journal of Hygiene* 1938, **27**:493-497.
172. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al*: **Gene ontology: tool for the unification of biology.** The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000, **25**(1):25-29.
173. Amend DF, Yasutake WT, Mead RW: **A haematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon.** *Trans Am Fish Soc* 1969(98):796-804.
174. Drolet BS, Rohovec JS, Leong JC: **The route of entry and progression of infectious hematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a sequential immunohistochemic study.** *J Fish Dis* 1994(17):337-347.
175. Romero A, Figueras A, Tafalla C, Thoulouze MI, Bremont M, Novoa B: **Histological, serological and virulence studies on rainbow trout experimentally infected with recombinant infectious hematopoietic necrosis viruses.** *Diseases of aquatic organisms* 2005, **68**(1):17-28.
176. Wolf K: **Infectious hematopoietic necrosis.** In: Wolf K (ed) *Fish viruses and fish viral diseases.* Cornell University Press, Ithaca, NY., 1988:83-114.
177. Yamamoto T: **Multiplication of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in rainbow trout following immersion infection: Whole-body assay and immunohistochemistry.** *J Aquat Anim Health* 1990(2):271-280.
178. Rodriguez MF, Wiens GD, Purcell MK, Palti Y: **Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Immunogenetics* 2005, **57**(7):510-519.
179. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M: **A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B.** *Nature* 1997, **388**(6642):548-554.
180. O'Donnell SM, Holm GH, Pierce JM, Tian B, Watson MJ, Chari RS, Ballard DW, Brasier AR, Dermody TS: **Identification of an NF- κ B-**

- dependent gene network in cells infected by mammalian reovirus. *Journal of virology* 2006, 80(3):1077-1086.
181. Hung CH, Huang HR, Huang CJ, Huang FL, Chang GD: **Purification and cloning of carp nephrosin, a secreted zinc endopeptidase of the astacin family.** *J Biol Chem* 1997, 272(21):13772-13778.
182. Boutet I, Long Ky CL, Bonhomme F: **A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*.** *Gene* 2006, 379:40-50.
183. Song HD, Sun XJ, Deng M, Zhang GW, Zhou Y, Wu XY, Sheng Y, Chen Y, Ruan Z, Jiang CL *et al*: **Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(46):16240-16245.
184. Laterveer L, Lindley IJ, Heemskerk DP, Camps JA, Pauwels EK, Willemze R, Fibbe WE: **Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8.** *Blood* 1996, 87(2):781-788.
185. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G: **Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact.** *Blood* 2000, 96(8):2673-2681.
186. Donate C, Roher N, Balasch JC, Ribas L, Goetz FW, Planas JV, Tort L, Mackenzie S: **CD83 expression in sea bream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response.** *Fish Shellfish Immunol* 2007.
187. Ohta Y, Landis E, Boulay T, Phillips RB, Collet B, Secombes CJ, Flajnik MF, Hansen JD: **Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish.** *J Immunol* 2004, 173(7):4553-4560.
188. Jimenez N, Coll J, Salguero FJ, Tafalla C: **Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Vaccine* 2006, 24(27-28):5615-5626.
189. Tafalla C, Coll J, Secombes CJ: **Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection.** *Dev Comp Immunol* 2005, 29(7):615-626.
190. Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL: **A CD14-independent LPS receptor cluster.** *Nature immunology* 2001, 2(4):338-345.
191. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ: **Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide.** *The Journal of clinical investigation* 2003, 111(2):187-196.

192. Johnson MC, Sangrador-Vegas A, Smith TJ, Cairns MT: **Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) matrix metalloproteinase-9.** *Fish Shellfish Immunol* 2004, 17(5):499-503.
193. Takeuchi K, Kubota S, Kinoshita M, Toyohara H, Sakaguchi M: **Cloning and characterization of cDNA for carp matrix metalloproteinase 9.** *Fisheries Sci* 2002(68):610-617.
194. Muller CS, Huff T, Hannappel E: **Reduction of thymosin beta₄ and actin in HL60 cells during apoptosis is preceded by a decrease of their mRNAs.** *Molecular and cellular biochemistry* 2003, 250(1-2):179-188.
195. Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E: **beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2001, 33(3):205-220.
196. Sun HQ, Yin HL: **The {beta}-Thymosin Enigma.** *Ann N Y Acad Sci* 2007, (submitted).
197. Nakao M, Kajiya T, Sato Y, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Matsushita M, Nakata M, Fujita T, Yano T: **Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*).** *J Immunol* 2006, 177(8):5471-5479.
198. Nakao M, Osaka K, Kato Y, Fujiki K, Yano T: **Molecular cloning of the complement (C1r/C1s/MASP2-like serine proteases from the common carp (*Cyprinus carpio*).** *Immunogenetics* 2001, 52(3-4):255-263.
199. Ratajczak J, Reca R, Kucia M, Majka M, Allendorf DJ, Baran JT, Janowska-Wieczorek A, Wetsel RA, Ross GD, Ratajczak MZ: **Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow.** *Blood* 2004, 103(6):2071-2078.
200. Ratajczak MZ, Reca R, Wysoczynski M, Kucia M, Baran JT, Allendorf DJ, Ratajczak J, Ross GD: **Transplantation studies in C3-deficient animals reveal a novel role of the third complement component (C3) in engraftment of bone marrow cells.** *Leukemia* 2004, 18(9):1482-1490.
201. Reca R, Mastellos D, Majka M, Marquez L, Ratajczak J, Franchini S, Glodek A, Honczarenko M, Spruce LA, Janowska-Wieczorek A *et al*: **Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1.** *Blood* 2003, 101(10):3784-3793.
202. Botelho RJ, Hackam DJ, Schreiber AD, Grinstein S: **Role of COPI in Phagosome Maturation.** *J Biol Chem* 2000, 275(21):15717-15727.
203. Nakanishi T, Fischer U, Dijkstra JM, Hasegawa S, Somamoto T, Okamoto N, Ototake M: **Cytotoxic T cell function in fish.** *Dev Comp Immunol* 2002, 26(2):131-139.

204. Dijkstra JM, Somamoto T, Moore L, Hordvik I, Ototake M, Fischer U: **Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish.** *Molecular immunology* 2006, 43(5):410-419.
205. Moore LJ, Somamoto T, Lie KK, Dijkstra JM, Hordvik I: **Characterisation of salmon and trout CD8alpha and CD8beta.** *Molecular immunology* 2005, 42(10):1225-1234.
206. Overturf K, LaPatra S: **Quantitative expression (Walbaum) of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus.** *J Fish Dis* 2006, 29(4):215-224.
207. Hansen JD, La Patra S: **Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection.** *Immunogenetics* 2002, 54(9):654-661.
208. Jorgensen SM, Hetland DL, Press CM, Grimholt U, Gjoen T: **Effect of early infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection on expression of MHC pathway genes and type I and II interferon in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues.** *Fish Shellfish Immunol* 2007, In press.
209. Zhang YX, Chen SL: **Molecular identification, polymorphism, and expression analysis of major histocompatibility complex class IIA and B genes of turbot (*Scophthalmus maximus*).** *Marine biotechnology (New York, NY)* 2006, 8(6):611-623.
210. Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, Benmansour A: **Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout.** *Virology* 1998, 249(2):297-306.
211. Hoeger B, Kollner B, Dietrich DR, Hitzfeld B: **Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*).** *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 2005, 75(1):53-64.
212. Boudinot P, Boubekeur S, Benmansour A: **Rhabdovirus infection induces public and private T cell responses in teleost fish.** *J Immunol* 2001, 167(11):6202-6209.
213. Matsuyama T, Fujiwara A, Nakayasu C, Kamaishi T, Oseko N, Tsutsumi N, Hirono I, Aoki T: **Microarray analyses of gene expression in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes during monogenean parasite *Neoheterobothrium hirame* infection.** *Diseases of aquatic organisms* 2007, 75(1):79-83.
214. Tassakka AC, Savan R, Watanuki H, Sakai M: **The in vitro effects of CpG oligodeoxynucleotides on the expression of cytokine genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney cells.** *Veterinary immunology and immunopathology* 2006, 110(1-2):79-85.

215. Sakai M, Kono T, Savan R: **Identification of expressed genes in carp (*Cyprinus carpio*) head kidney cells after in vitro treatment with immunostimulants.** *Developments in biologicals* 2005, 121:45-51.
216. Rangatia J, Vangala RK, Treiber N, Zhang P, Radomska H, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G: **Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment.** *Molecular and cellular biology* 2002, 22(24):8681-8694.
217. Moran ST, Cariappa A, Liu H, Muir B, Sgroi D, Boboila C, Pillai S: **Synergism between NF- κ B1/p50 and Notch2 during the Development of Marginal Zone B Lymphocytes.** *J Immunol* 2007, 179(1):195-200.
218. Liu WH, Lai MZ: **Deltex regulates T-cell activation by targeted degradation of active MEKK1.** *Molecular and cellular biology* 2005, 25(4):1367-1378.
219. Kraal G, van der Laan LJ, Elomaa O, Tryggvason K: **The macrophage receptor MARCO.** *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2000, 2(3):313-316.
220. Bergmann SM, Fichtner D, Skall HF, Schlotfeldt HJ, Olesen NJ: **Age- and weight-dependent susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) of varying virulence.** *Diseases of aquatic organisms* 2003, 55(3):205-210.
221. Quillet E, Dorson M, Le Guillou S, Benmansour A, Boudinot P: **Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout.** *Fish Shellfish Immunol* 2007, 22(5):510-519.
222. Ribas L, Roher N, Martinez M, Balasch JC, Donate C, Goetz FW, Iliev D, Planas JV, Tort L, Mackenzie S: **Characterization and expression of the transcription factor PU.1 during LPS-induced inflammation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Fish Shellfish Immunol* 2008, 24(1):35-45.
223. Iwama GK, Afonso LO, Todgham A, Ackerman P, Nakano K: **Are hsp90s suitable for indicating stressed states in fish?** *The Journal of experimental biology* 2004, 207(Pt 1):15-19.
224. Jacobs JM, Adkins JN, Qian WJ, Liu T, Shen Y, Camp DG, 2nd, Smith RD: **Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery.** *J Proteome Res* 2005, 4(4):1073-1085.
225. Schmidt A, Aebersold R: **High-accuracy proteome maps of human body fluids.** *Genome biology* 2006, 7(11):242.
226. Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R *et al*: **The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources.** *Mol Cell Proteomics* 2004, 3(4):311-326.
227. Nedelkov D, Kiernan UA, Niederkofler EE, Tubbs KA, Nelson RW: **Investigating diversity in human plasma proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(31):10852-10857.
228. Afonso A, Lousada S, Silva J, Ellis AE, Silva MT: **Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout**

- Oncorhynchus mykiss. A light and electron microscopic cytochemical study.** *Diseases of aquatic organisms* 1998, 34(1):27-37.
229. Harun NO, Zou J, Zhang YA, Nie P, Secombes CJ: **The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin-8.** *Developmental and comparative immunology* 2008, 32(6):673-681.
230. Hong S, Peddie S, Campos-Perez JJ, Zou J, Secombes CJ: **The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1beta on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Developmental and comparative immunology* 2003, 27(9):801-812.
231. Bayne CJ, Gerwick L: **The acute phase response and innate immunity of fish.** *Developmental and comparative immunology* 2001, 25(8-9):725-743.
232. Aluru N, Vijayan MM: **Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout.** *Physiol Genomics* 2007, 31(3):483-491.
233. Auslander M, Yudkovski Y, Chalifa-Caspi V, Herut B, Ophir R, Reinhardt R, Neumann PM, Tom M: **Pollution-affected fish hepatic transcriptome and its expression patterns on exposure to cadmium.** *Marine biotechnology (New York, NY)* 2008, 10(3):250-261.
234. Brown M, Robinson C, Davies IM, Moffat CF, Redshaw J, Craft JA: **Temporal changes in gene expression in the liver of male plaice (*Pleuronectes platessa*) in response to exposure to ethynyl oestradiol analysed by macroarray and Real-Time PCR.** *Mutat Res* 2004, 552(1-2):35-49.
235. Brown MM, Williams TD, Kevin Chipman J, Katsiadaki I, Sanders M, Craft JA: **Construction of subtracted EST and normalised cDNA libraries from liver of chemical-exposed three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) containing pollutant-responsive genes as a resource for transcriptome analysis.** *Mar Environ Res* 2008, 66(1):127-130.
236. Chini V, Cattaneo AG, Rossi F, Bernardini G, Terova G, Saroglia M, Gornati R: **Genes expressed in Blue Fin Tuna (*Thunnus thynnus*) liver and gonads.** *Gene* 2008, 410(1):207-213.
237. Chini V, Rimoldi S, Terova G, Saroglia M, Rossi F, Bernardini G, Gornati R: **EST-based identification of genes expressed in the liver of adult seabass (*Dicentrarchus labrax*, L.).** *Gene* 2006, 376(1):102-106.
238. Gahr SA, Vallejo RL, Weber GM, Shepherd BS, Silverstein JT, Rexroad CE, 3rd: **Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Physiol Genomics* 2008, 32(3):380-392.
239. Gallagher EP, LaVire HM, Bammler TK, Stapleton PL, Beyer RP, Farin FM: **Hepatic expression profiling in smolting and adult coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).** *Environ Res* 2008, 106(3):365-378.
240. Kassahn KS, Crozier RH, Ward AC, Stone G, Caley MJ: **From transcriptome to biological function: environmental stress in an ectothermic verte-**

- brate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. *BMC genomics* 2007, 8:358.
241. Kausch U, Alberti M, Haindl S, Budczies J, Hock B: **Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*)**. *Environ Toxicol* 2008, 23(1):15-24.
242. Moens LN, van der Ven K, Van Remortel P, Del-Favero J, De Coen WM: **Gene expression analysis of estrogenic compounds in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) using a custom cDNA microarray**. *J Biochem Mol Toxicol* 2007, 21(5):299-311.
243. Peatman E, Baoprasertkul P, Terhune J, Xu P, Nandi S, Kucuktas H, Li P, Wang S, Somridhivej B, Dunham R *et al*: **Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium**. *Developmental and comparative immunology* 2007, 31(11):1183-1196.
244. Rise ML, Douglas SE, Sakhrani D, Williams J, Ewart KV, Rise M, Davidson WS, Koop BF, Devlin RH: **Multiple microarray platforms utilized for hepatic gene expression profiling of GH transgenic coho salmon with and without ration restriction**. *J Mol Endocrinol* 2006, 37(2):259-282.
245. Volz DC, Hinton DE, Law JM, Kullman SW: **Dynamic gene expression changes precede dioxin-induced liver pathogenesis in medaka fish**. *Toxicol Sci* 2006, 89(2):524-534.
246. Williams TD, Diab AM, George SG, Sabine V, Chipman JK: **Gene expression responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to 17-beta estradiol**. *Toxicol Lett* 2007, 168(3):236-248.
247. Sim RB, Tsiftoglou SA: **Proteases of the complement system**. *Biochem Soc Trans* 2004, 32(Pt 1):21-27.
248. Lovoll M, Dalmo RA, Bogwald J: **Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Fish Shellfish Immunol* 2007.
249. Laufer J, Katz Y, Passwell JH: **Extrahepatic synthesis of complement proteins in inflammation**. *Molecular immunology* 2001, 38(2-3):221-229.
250. Alexander JJ, Aneziokoro OG, Chang A, Hack BK, Markaryan A, Jacob A, Luo R, Thirman M, Haas M, Quigg RJ: **Distinct and separable roles of the complement system in factor H-deficient bone marrow chimeric mice with immune complex disease**. *J Am Soc Nephrol* 2006, 17(5):1354-1361.
251. Jozsi M, Kapus A, Kerekes K, Karman J, Bajtay Z, Zipfel PF, Erdei A: **Characterization of factor H-related cell membrane molecules expressed by human B lymphocytes and neutrophil granulocytes**. *Immunology letters* 2001, 77(1):55-62.
252. Jozsi M, Prechl J, Bajtay Z, Erdei A: **Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes**. *J Immunol* 2002, 168(6):2782-2788.

253. Mongini PK, Inman JK: Cytokine dependency of human B cell cycle progression elicited by ligands which coengage BCR and the CD21/CD19/CD81 costimulatory complex. *Cell Immunol* 2001, 207(2):127-140.
254. Mongini PK, Tolani S, Fattah RJ, Inman JK: Antigen receptor triggered upregulation of CD86 and CD80 in human B cells: augmenting role of the CD21/CD19 co-stimulatory complex and IL-4. *Cell Immunol* 2002, 216(1-2):50-64.
255. Du Pasquier L, Zucchetti I, De Santis R: Immunoglobulin superfamily receptors in protochordates: before RAG time. *Immunological reviews* 2004, 198:233-248.
256. Camargo MM, Nahum LA: Adapting to a changing world: RAG genomics and evolution. *Hum Genomics* 2005, 2(2):132-137.
257. Swain P, Nayak SK, Nanda PK, Dash S: Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish- a review. *Fish & shellfish immunology* 2008, doi:10.1016/j.fsi.2008.04.009
258. Peatman E, Terhune J, Baoprasertkul P, Xu P, Nandi S, Wang S, Somridhivej B, Kucuktas H, Li P, Dunham R *et al*: Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Molecular immunology* 2008, 45(2):553-566.
259. Lovoll M, Fischer U, Mathisen GS, Bogwald J, Ototake M, Dalmo RA: The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription. *Veterinary immunology and immunopathology* 2007, 117(3-4):284-295.
260. Manderson AP, Pickering MC, Botto M, Walport MJ, Parish CR: Continual low-level activation of the classical complement pathway. *J Exp Med* 2001, 194(6):747-756.
261. Hall C, Flores MV, Storm T, Crosier K, Crosier P: The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol* 2007, 7:42.
262. Katsuramaki T, Mizuguchi T, Nagayama M, Kimura Y, Furuhashi T, Yamaguchi K, Hata F, Hirata K: Analysis of the changes pattern of serum apolipoprotein A-1 after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2006, 53(72):924-927.
263. Hasebe A, Pennock ND, Mu HH, Chan FV, Taylor ML, Cole BC: A microbial TLR2 agonist imparts macrophage-activating ability to apolipoprotein A-1. *J Immunol* 2006, 177(7):4826-4832.
264. Magnadottir B, Lange S: Is Apolipoprotein A-I a regulating protein for the complement system of cod (*Gadus morhua* L.)? *Fish Shellfish Immunol* 2004, 16(2):265-269.

265. Strbo N, Podack ER: **Secreted heat shock protein gp96-Ig: an innovative vaccine approach.** *Am J Reprod Immunol* 2008, 59(5):407-416.
266. Wyttenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC: **Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin.** *Hum Mol Genet* 2002, 11(9):1137-1151.
267. Gehring U: **Biological activities of HAP46/BAG-1. The HAP46/BAG-1 protein: regulator of HSP70 chaperones, DNA-binding protein and stimulator of transcription.** *EMBO Rep* 2004, 5(2):148-153.
268. Ozawa F, Friess H, Zimmermann A, Kleeff J, Buchler MW: **Enhanced expression of Silencer of death domains (SODD/BAG-4) in pancreatic cancer.** *Biochemical and biophysical research communications* 2000, 271(2):409-413.
269. Mazumder B, Sampath P, Seshadri V, Maitra RK, DiCorleto PE, Fox PL: **Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control.** *Cell* 2003, 115(2):187-198.
270. Peatman E, Terhune J, Baoprasertkul P, Xu P, Nandi S, Wang S, Somridhivej B, Kucuktas H, Li P, Dunham R *et al*: **Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with Edwardsiella ictaluri.** *Molecular immunology* 2007.
271. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, Jayawardena S, De Smaele E, Cong R, Beaumont C *et al*: **Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species.** *Cell* 2004, 119(4):529-542.
272. Naik-Mathuria B, Pilling D, Crawford JR, Gay AN, Smith CW, Gomer RH, Olutoye OO: **Serum amyloid P inhibits dermal wound healing.** *Wound Repair Regen* 2008, 16(2):266-273.
273. Lund V, Olafsen JA: **A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species.** *Developmental and comparative immunology* 1998, 22(2):185-194.
274. Lund V, Olafsen JA: **Atypical phosphorylcholine-reactive protein from Atlantic salmon, Salmo salar L.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1998, 119(3):471-477.
275. Ishidoh K, Kominami E: **Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro.** *Biochemical and biophysical research communications* 1995, 217(2):624-631.
276. Methot N, Rubin J, Guay D, Beaulieu C, Ethier D, Reddy TJ, Riendeau D, Percival MD: **Inhibition of the activation of multiple serine proteases with a cathepsin C inhibitor requires sustained exposure to prevent pro-enzyme processing.** *J Biol Chem* 2007, 282(29):20836-20846.
277. Tang P, Cheng TP, Agnello D, Wu CY, Hissong BD, Watford WT, Ahn HJ, Galon J, Moss J, Vaughan M *et al*: **Cybr, a cytokine-inducible protein that**

- binds cytohesin-1 and regulates its activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(5):2625-2629.
278. Chen Q, Coffey A, Bourgoin SG, Gadina M: **Cytohesin binder and regulator augments T cell receptor-induced nuclear factor of activated T Cells.AP-1 activation through regulation of the JNK pathway.** *J Biol Chem* 2006, **281**(29):19985-19994.
279. Kanayama S, Yamada Y, Onogi A, Shigetomi H, Ueda S, Tsuji Y, Haruta S, Kawaguchi R, Yoshida S, Sakata M *et al*: **Molecular structure and function analysis of bikunin on down-regulation of tumor necrosis factor-alpha expression in activated neutrophils.** *Cytokine* 2008, **42**(2):191-197.
280. Gussow D, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A, Ploegh HL: **The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit.** *J Immunol* 1987, **139**(9):3132-3138.
281. Garaude J, Farras R, Bossis G, Charni S, Piechaczyk M, Hipskind RA, Villalba M: **SUMOylation regulates the transcriptional activity of JunB in T lymphocytes.** *J Immunol* 2008, **180**(9):5983-5990.
282. Staal A, Enserink JM, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ: **Molecular characterization of celtix-1, a bromodomain protein interacting with the transcription factor interferon regulatory factor 2.** *J Cell Physiol* 2000, **185**(2):269-279.
283. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, Cousins RJ: **Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(19):6843-6848.
284. Bridle AR, Morrison RN, Nowak BF: **The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during amoebic gill disease (AGD).** *Fish Shellfish Immunol* 2006, **20**(3):346-364.
285. Wynne JW, O'Sullivan MG, Cook MT, Stone G, Nowak BF, Lovell DR, Elliott NG: **Transcriptome Analyses of Amoebic Gill Disease-affected Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Tissues Reveal Localized Host Gene Suppression.** *Marine biotechnology (New York, NY)* 2008, **10**(4):388-403.
286. Kendzierski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN: **On the utility of pooling biological samples in microarray experiments.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(12):4252-4257.
287. Mary-Huard T, Daudin JJ, Baccini M, Biggeri A, Bar-Hen A: **Biases induced by pooling samples in microarray experiments.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2007, **23**(13):i313-318.

288. Berczi I, Bertok L, Bereznai T: **Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species.** *Can J Microbiol* 1966, 12(5):1070-1071.
289. Russell S, Hayes MA, Simko E, Lumsden JS: **Plasma proteomic analysis of the acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to intraperitoneal inflammation and LPS injection.** *Developmental and comparative immunology* 2006, 30(4):393-406.
290. Hughes AL, Packer B, Welch R, Chanock SJ, Yeager M: **High level of functional polymorphism indicates a unique role of natural selection at human immune system loci.** *Immunogenetics* 2005, 57(11):821-827.
291. Hansson MC, Wittzell H, Persson K, von Schantz T: **Unprecedented genomic diversity of AhR1 and AhR2 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 2004, 68(3):219-232.
292. Moghadam HK, Ferguson MM, Danzmann RG: **Evidence for Hox gene duplication in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a tetraploid model species.** *J Mol Evol* 2005, 61(6):804-818.
293. de Boer JG, Yazawa R, Davidson WS, Koop BF: **Bursts and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids.** *BMC genomics* 2007, 8:422.
294. Ojeda J: **La acuicultura marina de peces en España.** *Ipac Acuicultura* 2006(12):22-25.
295. Sarropoulou E, Kotoulas G, Power DM, Geisler R: **Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology.** *Physiol Genomics* 2005, 23(2):182-191.
296. Bar-Or C, Czosnek H, Koltai H: **Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity.** *Trends Genet* 2007, 23(4):200-207.
297. Oshlack A, Chabot AE, Smyth GK, Gilad Y: **Using DNA microarrays to study gene expression in closely related species.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2007, 23(10):1235-1242.
298. Bar-Or C, Bar-Eyal M, Gal TZ, Kapulnik Y, Czosnek H, Koltai H: **Derivation of species-specific hybridization-like knowledge out of cross-species hybridization results.** *BMC genomics* 2006, 7:110.
299. Bar-Or C, Novikov E, Reiner A, Czosnek H, Koltai H: **Utilizing microarray spot characteristics to improve cross-species hybridization results.** *Genomics* 2007, 90(5):636-645.
300. Chen YA, McKillen DJ, Wu S, Jenny MJ, Chapman R, Gross PS, Warr GW, Almeida JS: **Optimal cDNA microarray design using expressed sequence tags for organisms with limited genomic information.** *BMC Bioinformatics* 2004, 5:191.

301. Cohen R, Chalifa-Caspi V, Williams TD, Auslander M, George SG, Chipman JK, Tom M: **Estimating the efficiency of fish cross-species cDNA microarray hybridization.** *Marine biotechnology* (New York, NY 2007, 9(4):491-499.
302. Haudry Y, Berube H, Letunic I, Weeber PD, Gagneur J, Girardot C, Kapushesky M, Arendt D, Bork P, Brazma A *et al*: **4DXpress: a database for cross-species expression pattern comparisons.** *Nucleic acids research* 2008, 36(Database issue):D847-853.
303. Kuhn A, Luthi-Carter R, Delorenzi M: **Cross-species and cross-platform gene expression studies with the Bioconductor-compliant R package 'annotationTools'.** *BMC Bioinformatics* 2008, 9:26.
304. Jenny MJ, Chapman RW, Mancia A, Chen YA, McKillen DJ, Trent H, Lang P, Escoubas JM, Bachere E, Boulo V *et al*: **A cDNA microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*.** *Marine biotechnology* (New York, NY 2007, 9(5):577-591.
305. Renn SC, Aubin-Horth N, Hofmann HA: **Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray.** *BMC Genomics* 2004, 5(1):42.
306. Von Schalburg KR, Rise ML, Cooper GA, Brown GD, Gibbs AR, Nelson CC, Davidson WS, Koop BF: **Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray.** *BMC Genomics* 2005, Sep 15(6):126.
307. Steinke D, Salzburger W, Meyer A: **Novel Relationships Among Ten Fish Model Species Revealed Based on a Phylogenomic Analysis Using ESTs.** *J Mol Evol* 2006(62):772-784.
308. Anderson DP: **Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish.** *Dev Biol Stand* 1997, 90:257-265.
309. Bricknell I, Dalmo RA: **The use of immunostimulants in fish larval aquaculture.** *Fish Shellfish Immunol* 2005, 19(5):457-472.
310. Esteban MA, Cuesta A, Ortuno J, Meseguer J: **Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system.** *Fish Shellfish Immunol* 2001, 11(4):303-315.
311. Rodriguez A, Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J: **The effect of dietary administration of the fungus *Mucor circinelloides* on non-specific immune responses of gilthead seabream.** *Fish Shellfish Immunol* 2004, 16(2):241-249.
312. Rodriguez A, Cuesta A, Ortuno J, Esteban MA, Meseguer J: **Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.).** *Veterinary immunology and immunopathology* 2003, 96(3-4):183-192.

313. Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J: **Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C.** *Fish Shellfish Immunol* 2002, 13(2):97-109.
314. Cuesta A, Esteban MA, Ortuno J, Meseguer J: **Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.).** *Fish Shellfish Immunol* 2001, 11(4):293-302.
315. Ortuno J, Cuesta A, Angeles Esteban M, Meseguer J: **Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system.** *Veterinary immunology and immunopathology* 2001, 79(3-4):167-180.
316. Bagni M, Romano N, Finoia MG, Abelli L, Scapigliati G, Tiscar PG, Sarti M, Marino G: **Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*).** *Fish Shellfish Immunol* 2005, 18(4):311-325.
317. Kumari J, Sahoo PK: **Dietary beta-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.).** *J Fish Dis* 2006, 29(2):95-101.
318. Kumari J, Sahoo PK: **High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*.** *Molecular and cellular biochemistry* 2005, 280(1-2):25-33.
319. Abbink W, Hang XM, Guerreiro PM, Spanings FA, Ross HA, Canario AV, Flik G: **Parathyroid hormone-related protein and calcium regulation in vitamin D-deficient sea bream (*Sparus auratus*).** *J Endocrinol* 2007, 193(3):473-480.
320. Abdul-Hussien H, Soekhoe RG, Weber E, von der Thusen JH, Kleemann R, Mulder A, van Bockel JH, Hanemaaijer R, Lindeman JH: **Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases.** *Am J Pathol* 2007, 170(3):809-817.
321. Barnes PJ, Karin M: **Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.** *N Engl J Med* 1997, 336(15):1066-1071.
322. Mueller P, Massner J, Jayachandran R, Combaluzier B, Albrecht I, Gatfield J, Blum C, Ceredig R, Rodewald HR, Rolink AG *et al*: **Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1,4,5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor triggering.** *Nature immunology* 2008, 9(4):424-431.
323. Ortuno J, Cuesta A, Rodriguez A, Esteban MA, Meseguer J: **Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.).** *Veterinary immunology and immunopathology* 2002, 85(1-2):41-50.
324. Zhang XD, Wu TX, Cai LS, Zhu YF: **Effects of alpha-tocopheryl acetate supplementation in preslaughter diet on antioxidant enzyme activities and**

- fillet quality of commercial-size *Sparus macrocephalus*. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007, 8(9):680-685.
325. Montero D, Tort L, Robaina L, Vergara JM, Izquierdo MS: **Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles.** *Fish Shellfish Immunol* 2001, 11(6):473-490.
326. Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Robaina L, Real F, Sweetman J, Tort L, Izquierdo MS: **Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides.** *Fish Shellfish Immunol* 2007, 23(5):969-981.
327. Cook MT, Hayball PJ, Hutchinson W, Nowak BF, Hayball JD: **Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter.** *Fish Shellfish Immunol* 2003, 14(4):333-345.
328. Ai Q, Mai K, Zhang L, Tan B, Zhang W, Xu W, Li H: **Effects of dietary beta-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*.** *Fish Shellfish Immunol* 2007, 22(4):394-402.
329. Wang WS, Hung SW, Lin YH, Tu CY, Wong ML, Chiou SH, Shieh MT: **The effects of five different glycans on innate immune responses by phagocytes of hybrid tilapia and Japanese eels *Anguilla japonica*.** *J Aquat Anim Health* 2007, 19(1):49-59.
330. Hung SW, Tu CY, Wang WS: **In vivo effects of adding singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals to diets on the immune system of tilapia (*Oreochromis* hybrids) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages.** *Veterinary immunology and immunopathology* 2007, 115(1-2):87-99.
331. Beckman KB, Lee KY, Golden T, Melov S: **Gene expression profiling in mitochondrial disease: assessment of microarray accuracy by high-throughput Q-PCR.** *Mitochondrion* 2004, 4(5-6):453-470.
332. Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY *et al*: **Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms.** *Nat Biotechnol* 2006, 24(9):1115-1122.
333. Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M *et al*: **Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments.** *Nature genetics* 2002, 32 Suppl:509-514.
334. Wong ML, Medrano JF: **Real-time PCR for mRNA quantitation.** *Biotechniques* 2005, 39(1):75-85.
335. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM: **Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR.** *Biol Proced Online* 2006, 8(1):175-193.

- 336. Baxevanis AD: **Assessing pairwise sequence similarity: BLAST and FASTA.** in AD Baxevanis and BFOuellette (eds), *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*, 3rd edition 2005.
- 337. Lipinski C, Hopkins A: **Navigating chemical space for biology and medicine.** *Nature* 2004, **432**:855-861.
- 338. Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY *et al*: **The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements.** *Nat Biotechnol* 2006, **24**(9):1151-1161.
- 339. Draghici S, Khatri P, Shah A, Tainsky MA: **Assessing the functional bias of commercial microarrays using the onto-compare database.** *Biotechniques* 2003, Suppl:55-61.

En la era postgenómica, en la que el mundo es a la vez infinitamente complejo y complicadamente simple, en la que el sudoku social domina sobre el contrato social, y en la que los geek(OS) (bio)informáticos le pierden el respeto a la ley de Moore, resulta un vicio inconfesable, casi rayano en el sibaritismo, poder reflexionar sobre el ser y el devenir del esto y el aquello en un ambiente, el académico, proclive a la construcción de castillos en el aire, a veces brumoso, de la especulación teórico-práctica. De ahí que un trabajo de análisis e interpretación biológicas tardío como el que precede a estas líneas sea improbable sin la atención obsesiva que merece el detalle y el oteo inquieto de la falsabilidad argumental. Y que una y otro sean, a su vez, impensables sin el *grooming* intelectual que facilitan la docencia de la investigación y la investigación de la docencia en el aulario y el laboratorio. Después de todos estos años, el círculo se cierra con el retorno, en forma de saludo y reconocimiento escritos, de la confianza y la proximidad que un fenómeno investigador experimentado depositó en un doctorado todavía por descubrir. Esta tesis es lo que es gracias a

Lluís

que me guió, en un ejemplo de libro, al principio y durante los (muchos) nudos argumentales, hasta el inevitable (y feliz) desenlace. Lo que demuestra que de la canulación branquial a la transcriptómica de la branquia apenas hay un paseo evolutivo.

y

Simon

que desparramó su fenotipo isleño y su inquietud epistemológica sobre mis preconcepciones biológicas con una generosidad impropia de un colono de la cuenca mediterránea. Después de nuestras conversaciones, el único misterio que nos queda por descubrir es porque los cefalópodos son, demasiadas veces, los malos en las películas de acción.

Y, desde luego, esta tesis no sería lo que es, sin la participación, desinteresada las más de las veces, interesada algunas, interesante la mayoría y siempre alentadora de:

El grupo de peces, lugar de encuentro de fenómenos diversos, búsqueda comunitaria de bancos de ideas y elaboraciones experimentales, rincón de freza ocasional y desove de

proyectos embrionarios (algunos hechos ya realidad) y referente taxonómico de la diversidad, vital y vitelina, en un laboratorio fundamentalmente murino. Sin ellos, sin todos los que han estado, están y empiezan a estar, la mayoría de ideas apuntadas en estas páginas se verían en escala de grises.

A los que no están, no se quedaron o, simplemente pasaban por allí: Tatiana (la reina del Pisco-sour –pronúnciese “sauer”), Pep (el más rápido consumiendo cigarrillos e hipofisectomizando doradas sorprendidas), Joan, Rashid, Anna, Cristi, Alex (el único gaitero que conozco y con el que he compartido habitación en un hotel dieciochesco), pero, especialmente a

Adriana, la primera, cronológica y cromáticamente, ahora demasiado lejos, en su patria chica pero siempre cercana. Si no existiera, como Mafalda, habría que inventarla (en versión Uruguasha, claro...)

Abbas, el primero, cronológica y experimentalmente. Me enseñó cómo cocinar un trabajo experimental, me educó en los sinsabores del error estadístico y me desanimó en el aprendizaje de la, casi genómica por su complejidad, gramática árabe.

Cristina, la Cristineta, que no sabía si podía poder y al final descubrió que poder, podía, así que se marchó sin acabar y acabó siendo una de las mejores cosas que me ocurrió entre separata y separata. Y odia que la llamen Cristineta.

Leif, que surgió del frío y me templó el temple investigador con la prudencia, la repetición y la exasperación necesarias ante aquella célula ahora quiescente que, momentos antes, prometía un capítulo completo de la tesis. El período de aprendizaje emocional y experimental que pasé anclado al *patch-clamp* ha convertido en innecesaria cualquier terapia basada en el Tai-chi.

Mila, que siempre fue (¡y es!) más madura de lo que parecía, aunque lo pareciese. Y que estuvo tan encantada como yo de que acudiera a ver su defensa de la tesina.

Marc, que, como yo, sin el *grooming* social, el de los primates no humanos, no el virtual tan denostado (con razón) en la actualidad, languidecería entre reactivos y fotos decoloradas de peces de colores. Nunca olvidaré su asaeteamiento de un espárido durante un muestreo de los buenos, de los de antes, al lado de una piscina de barro repleta de doradas enfermas.

Laia, la predecesora de parte de esta tesis, la de, como dice Carmen, los e-mails que te levantan el ánimo, y también la que es capaz de inhibir, a fuerza de carisma, la expresión fenotípica (y tal vez genética) de cualquier acompañante que la lleve a una reunión social. Una variedad de helado, allá en América, lleva su nombre.

A los que están y empiezan a estar, a los que todavía no conozco como me gustaría (Mariana, Juan), los que fueron alumnos y ahora son colegas y compañeros de trabajo y los que, como diría Sebastián, se hallan y no se hallan:

Laura, la más joven de la Vieja Guardia. Es imposible olvidar a alguien cuando la has visto drenar la sangre amarillenta de decenas de doradas enfermas enfundada en una bolsa de la basura convertida en improvisada combinación de blusa y peto prêt-à-porter. Especialmente cuando uno lleva lo mismo, en la versión masculina, claro. Si eso no te une, nada más puede hacerlo.

Carmen, la más vieja de la Nueva Guardia, un ejemplo de todo lo bueno que una provincia inexistente puede producir cuando se talla una pieza compacta y sin fisuras. Si con Nerea tiemblan los reactivos, con Carmen abren sus enlaces covalentes y se entregan, rendidos, a sus pies (o a sus guantes azulados).

Lilo, al que, por una vez, llamaré Israel, que cruzó el charco filogenético entre el hongo y el pez para chapotear en las aguas procelosas de la biología molecular y descubrió que el RACE es, efectivamente, una carrera, pero de obstáculos. Es tan buena gente que, si algún día me voy a una isla desierta, la poblaré con sus clones.

Agnès (pronúnciese “ágnès”), lo más parecido al verdadero (y único) sueño de Bill Gates: un sistema operativo multitarea, capaz lo mismo de un fregado que de un barrido. Como una actriz Shakesperiana, el método y la versatilidad la definen tanto como su amor a L’Escala. Cuando me vaya de la isla desierta, la pondré al timón del barco.

Davinia, la bioquímica, un estigma que perdurará en su currículum y que, ahora, en territorio enemigo, oculta con una mezcla de orgullo y tesón. Su paso de alumna a investigadora, sin perder un ápice del deseo de descubrir y analizar lo que la rodea, retornan la esperanza al más encallecido de los experimentadores. Nunca la dejaría utilizar el ordenador de a bordo.

Sebastián, que lo mismo iría y vendría que subiría que bajaría. Pocas mentes se mueven tanto y en tantas direcciones, y están tan poco disciplinadas (lo que es una suerte en el mundo de la ciencia). Suya sería la creación de una nueva raza de enanos en lo más recóndito de la isla desierta.

Roger, con el que compartí la defensa de tesina y sin cuyo temple y habilidad domesticadora de peces buena parte de lo que aquí se ha defendido no hubiera ocurrido. Preguntadle alguna vez sobre las heridas de guerra que lleva por su condición de casteller y comprenderéis que, sin lugar a dudas, sería el que otearía el barco que nos rescataría de la isla desierta.

Nerea, azote de visitantes médicos, comerciales y representantes genómicos de cartón-piedra. Si en un laboratorio está Nerea, la RNAasa se lo piensa dos veces antes de hacer de las suyas. En la isla desierta (que, a estas alturas, empieza a estar muy poblada), sería la única capaz de organizar la recogida y procesamiento de los alimentos. Todos refunfuñarían y luego se darían cuenta de lo buena gente que es y la enorme responsabilidad que asume y la proclamarían reina de la isla.

Yolanda, que me soportó, como Lilo, Agnès y Virginia en las tareas de la docencia, y que divide su tiempo entre el desciframiento del comportamiento de los peces y el rasgueo deshilachado de viejas camisetas reconvertidas en atuendo grunge a la moda.

Virginia, que superó complejos e inseguridades y se ganó el respeto (merecido) de una autoridad en el campo del comportamiento de los peces. Es obvio que llegará donde quiera llegar. Y además, tiene acceso a una fuente inagotable de catànies!

A los otros fenómenos de fisiología animal, los murinos y los veterinarios, que compartieron sabores y sinsabores, recetas minimalistas y menús pantagruélicos, a los que aún no conozco cono quisiera, a los que se fueron (Quino, al que le picó una araña y le salieron poderes, Sheila, Jordi, encarnación catalana de *The Quiet Man*, Natalia, Albert, Sergi y sus alter egos warcraftianos...), a los que se quedaron y vinieron (Lorena, Umberto –el

argentino eterno-, Yas, Gemme –con e final y pronunciado unas octavas por encima de la escala tonal-, las Cristinas, Núria -la joya de Sabadell-, Silvia, Raúl –el otro-, Javier, Almu, Raquel, Núria –la otra, la del IBB, siempre dispuesta a tomar un café y ver lo último en arte y ensayo cinematográfico–, Carlota...), a los reactivos y los estándares (Antonio, Roser, Amalia, Mercè, Juanma, Octavi, Silvia, Maica, Ernesto, Alejandro, Josep, el gran maestro del kékfir que también había jugado con *caliches* de pequeño...) y a tantos otros que ya se saben saludados y que disculparan mi memoria.

Y especialmente a Yoli, que me dedicó un miniconcierto de guitarra y mantuvo la amistad a pesar de la distancia (y el olor a necropsia de ratón), a Mariona, que descubrió sus penas electrofisiológicas y compartió las mías, a Elena, que me dedicó su tiempo y apoyo, a Maite, que siempre me recibe con una sonrisa en los labios, a David, al que el Sónar debería dedicar un homenaje scoobydooniano en forma de tablero de rol in situ, y ni aún así se le haría justicia histórica, a Raúl, el Raulillo, que llegó, encandiló y perdió parte de la inocencia ganando sabiduría técnica, a Xavi, la xava, la xava loca, el neng y otros calificativos para definir lo indefinible, incansable trabajador y compañero ideal del que espero no descubrir nunca lo que es capaz de hacer con un cubito de hielo en sus manos, a Olga, la supersecretaria, que sin duda se encargaría de todas las auditorías que me llegasen hasta la isla desierta y cuya capacidad para obtener un significado de las pantallas fucsia y azules de los programas informáticos raya en la numerología, y... especialmente a Cristina, la Márquez, lo más parecido al ideal platónico de un mimo (y de cualquiera que quiera tener alguien en quien confiar): la transparencia emocional hecha carne y la oyente perfecta. Y no porque sea psicóloga, sino porque, como dicen los que la quieren, “es que se hace querer”.

A los alumnos, los futuros biólogos, ambientólogos y biotecnólogos (algunos ya consumados) que me soportaron en las clases, ese terreno de pruebas para la explicación y argumentación de las mal llamadas preguntas simples, especialmente a los que ahora son amigos. A Laia, la primera, la combativa, la que ahora dirige a otros en proyectos transoceánicos, a Laura, que iba para bioquímica y se convirtió en una investigadora excelente, a Ana (con una ene) que no sabía lo que quería pero sí sabía lo que no quería, a Alba, que mantiene a raya toda la población de marmotas del Pirineo, a Silvia, que ha descubierto en el momento justo la empollona que lleva dentro, a Caro, que comenzará lo que no se acaba cuando acabe la vuelta al mundo...

Y por último, a los más importantes: a mis padres, que estuvieron al principio pero no pudieron ver el final. A nadie debo más que a ellos lo que soy y como soy. Me encantaría que pudiesen estar aquí y ver todo esto.

Y, de nuevo y siempre, a Marta. Alguien dijo que, en Biología, nada tiene sentido si no es a la luz a de evolución. Aquí y ahora, mi biología vital sólo tiene sentido bajo su luz.

Bellaterra, Julio de 2008

10

material adicional

listado de genes expresados diferencialmente en la micromatriz

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el riñón cefálico de truchas sometidas a la forma atenuada del virus IHN (atIHNV) a las 24 horas de la infección.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	atIHNV FC
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	19.46
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	11.19
KVkm2_A01	Unknown-219	10.93
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	10.93
EXOB4_A03	Carbonic anhydrase	10.57
CA366564	Huntingtin	8.52
EXOB2_B12	RING finger protein 103	8.34
HST0001_C07	Unknown-213	7.60
ENH2_E07	Unknown-3	7.04
EXOB4_G09	Histone H14	6.94
EXOB4_H06	Alpha-globin 1-3	6.63
utu01e09	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(1)	4.94
HK0002_G02	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial precursor	4.49
HK0001_C08	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-3	4.14
CA361101	Regulator of G-protein signaling 1-2	4.03
est02a11	Ig kappa chain V-IV region B17-2	3.19
CA343473	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	3.00
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	2.69
HST0001_D02	ATP-binding cassette, sub-family F, member 2	2.58
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	2.56
ENH2_F04	Unknown-4	2.46
est04b11	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-1	2.44
EXOB2_C02	Hypothetical-fish 35	2.41
est02g07	Ig mu heavy chain disease protein	2.38
CA363438	Interferon-induced protein 44-3	2.24
est02e09	Ig heavy chain V-III region HIL	2.07
CA349577	Tyrosine-protein kinase FRK	2.01
est01g04	5-aminolevulinate synthase	1.99
CA381692	Ubiquitin-like 1 activating enzyme E1B	1.98
EXOB2_H05	Uroporphyrinogen decarboxylase	1.97
est02b08	Peroxiredoxin 1-2	1.94

CA351800	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	1.84
EXOB4_H08	Alanine-glyoxylate aminotransferase 1	1.83
CA359043	NAD-dependent deacetylase sirtuin 5	1.82
utu03g11	Hypothetical-fish 12	1.81
CA363480	Aquaporin-CHIP	1.79
Hete0002_E07	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-Embryonic beta-type globin2	1.77
EST1-3A_F09	Unknown-73	1.72
KVkm2_D11	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 11 kDa protein, mitochondrial precursor	1.69
EXOB3_E11	Unknown-118	1.66
CA368411	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, isoform 1	1.66
EXOB4_F12	F-box/WD-repeat protein 5	1.62
est02c08	Nicotinamide riboside kinase 2	1.62
CA369653	Cellular nucleic acid binding protein	1.61
CA359042	Bloom's syndrome protein	1.60
est03e08	Hypothetical-fish 36	1.60
est03c07	Ig kappa chain V-I region WEA	1.60
est02f04	Tubulin alpha-3 chain	1.59
HK0001_C12	Unknown-152	1.55
EXOB2_F01	Proteasome subunit alpha type 6	1.55
EXOB2_B09	Unknown-94	1.54
Hete0002_C07	Unknown-139	1.54
CA374193	Chemokine receptor CXCR4	1.54
utu04c02	Unknown-265	1.53
EXOB1_A01	Unknown-78	1.53
est03g07	Unknown-47	1.52
CA343700	CXC chemokine receptor transcript variant B	1.52
est04c02	Unknown-53	1.51
EXOB1_B02	Hypothetical-fish 34	1.51
est04c05	Ferritin heavy chain-1	1.51
EXOB4_G12	Unknown-131	1.51
EST1-3A_F04	ReO_6-2	1.50
EXOB2_D11	E3 ligase for inhibin receptor	1.50
EXOB3_F07	Unknown-120	1.50
CA385359	Serum amyloid P-component-2	1.49
CA384555	B-cell-specific coactivator OBF-1	1.48
est02b02	PEST-containing nuclear protein	1.48
P_9	Glutathione S-transferase P	1.48
EXOB3_F11	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-18 kDa	1.48
EXOB4_B08	60 kDa heat shock protein-2	1.48
utu02c12	Unknown-240	1.47
CA365505	Retinoblastoma-like protein 1	1.46
EXOB3_G09	Ornithine decarboxylase antizyme-2	1.46
CA381440	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	1.45
CA378435	Protein phosphatase 2C delta isoform	1.44

HK0002_H10	Unknown-182	1.43
EXOB4_D10	Prosaposin	1.43
EXOB1_A07	Unknown-79	1.43
CA359963	Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein	1.42
Hete0002_E09	Transposase-56	1.42
KVkm2_A09	60S ribosomal protein L35	1.41
EST1-3A_H05	Adenosine deaminase 3	1.41
EXOB2_H07	WD-repeat containing protein Ciao 1	1.41
EXOB4_A11	Tubulin alpha-ubiquitous chain	1.40
CA363944	Nuclear factor NF-kappa-B	1.40
EXOB4_E04	Elongation factor 1-beta	1.40
EXOB2_C07	Splicing factor, arginine/serine-rich 12-2	1.39
utu02f06	Unknown-244	1.39
EXOB1_B03	Unknown-81	1.39
EXOB1_H06	CC chemokine SCYA110-2	1.38
CR_8	14-3-3 G2	1.38
est04c09	Hypothetical-fish 41	1.38
KVkm2_C04	Unknown-221	1.38
est04c07	Ferritin heavy chain-2	1.38
CA363723	Cyclin C	1.38
CA357173	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2-2	1.38
P_7	Peptide methionine sulfoxide reductase	1.37
EXOB1_D10	Unknown-85	1.37
est01h03	Galectin-3 binding protein	1.37
est03e07	Unknown-43	1.36
KVkm2_A12	Unknown-220	1.36
est04f08	Telomerase-binding protein p23-1	1.36
ENH2_F10	ATP synthase lipid-binding protein	1.35
EXOB4_A10	Unknown-126	1.35
ENH2_B04	TCF3 (E2A) fusion partner	1.35
CA378361	Ubiquitin ligase SIAH1	1.35
CA363762	Cell death activator CIDE-B	1.35
P_19	glucocorticoid receptor (GCR)	1.35
EXOB1_G05	Unknown-89	1.35
EXOB3_A02	Alpha-1-microglobulin\bikunin-1	1.34
EXOB1_G04	Splicing factor 3B subunit 1	1.34
utu02g07	Glycogen phosphorylase-2	1.34
EST1-3A_F07	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	1.34
CA373850	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	1.34
EXOB4_H01	Unknown-132	1.34
EXOB3_H04	Transposase-1	1.33
est04f10	Hypothetical-fish 1	1.33
CA380121	Telomerase reverse transcriptase	1.33
P_10	Aryl hydrocarbon receptor	1.32
est01g07	Proteasome activator complex subunit 2	1.32

est03e03	Poly(RC) binding protein 2	1.32
KVkm2_G02	Proteasome subunit alpha type 7-2	1.32
KVkm2_H11	Unknown-228	1.32
HK0001_H12	Unknown-162	1.31
CA348325	BAG-family molecular chaperone regulator-4	1.31
EXOB2_D01	Proteasome subunit alpha type 3	1.31
CA384587	Transcription factor Dp-1	1.31
CA369440	NAD(P)H menadione oxidoreductase 1, dioxin-inducible	1.31
EXOB4_C02	Unknown-127	1.31
est01f09	High-mobility group protein 2-like 1	1.31
EXOB3_A05	WD-repeat containing protein Ciao 1	1.31
CA376117	CD231	1.31
utu03a02	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-7	1.28
est03f04	F-box/WD-repeat protein 11	1.28
EXOB4_B09	Macrophage receptor MARCO	1.28
CA378736	Tyrosine-protein kinase BTK	1.28
utu03f12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	1.28
CA370661	Barrier-to-autointegration factor	1.28
EXOB3_E05	Mitochondrial 39S ribosomal protein L51	1.27
est03g05	Unknown-46	1.27
EXOB2_A06	Nucleolar protein Nop56-2	1.27
EXOB1_B04	Beta actin-1	1.26
HK0002_H06	Unknown-180	1.26
utu02g04	Glycogen phosphorylase-1	1.26
CA342225	CARBONYL reductase	1.26
EXOB4_B04	AD024	1.26
CA365208	C-C chemokine receptor type 6	1.26
EXOB4_G06	NADH-ubiquinone oxidoreductase B15 subunit	1.26
EST1-3A_G03	Unknown-74	1.25
EXOB1_A10	Unknown-80	1.25
EST1-3A_A01	Cytosolic nonspecific dipeptidase	1.25
CA341859	Nuclear factor kappa-B, subunit 1	1.24
CA368716	Membrane-bound transcription factor site 2 protease	1.24
EXOB2_A11	Tubulin alpha-1 chain	1.24
est03d09	Unknown-40	1.23
P_54	VEGF4	1.23
P_4	Myeloperoxidase	1.23
CA352454	Semaphorin 4D	1.23
CA384029	Chromobox protein homolog 4	1.23
CA362758	Cyclophilin-2	1.23
CA342204	TNF receptor associated factor 3	1.23
CA370579	Hematopoietically expressed homeobox	1.22
CA356454	Guanine nucleotide exchange factor	1.22
est04c08	Unknown-55	1.21
EXOB4_E09	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	1.21
utu04c03	60S ribosomal protein L4	1.21

utu03a06	Elongation factor 1-alpha 2	1.21
EXOB3_A06	Programmed cell death 10	1.21
CA342760	47 kDa heat shock protein-2	1.21
EXOB3_F08	60S ribosomal protein L10-1	1.21
CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	1.21
EST1-3A_B09	Lysozyme g-2	1.21
CA342227	Protein tyrosine kinase 2 beta	1.21
EXOB1_B09	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	1.20
HK0002_C02	Chromosome-associated kinesin KIF4A	1.20
EXOB1_C10	Cytochrome P450 2K4-2	1.20
est04d07	Microspherule protein 1	1.20
CA369698	Tumor suppressor p53	1.20
CA383564	Coatomer epsilon subunit 1	1.20
HKT0001_A11	Hypothetical-fish 11	1.20
EXOB2_B01	Nuclease sensitive element binding protein 1-1	1.19
EXOB1_B07	PRPF39 protein	1.19
CA380011	Cullin homolog 1	1.18
EXOB1_E10	Unknown-87	1.18
CA384637	60 kDa heat shock protein-1	1.18
EXOB3_A07	Unknown-105	1.18
CA352381	Protein kinase C, alpha type	1.18
EXOB3_D06	Unknown-112	1.18
CA344228	Phospholipase A-2-activating protein	1.18
EXOB4_E01	Transposase-58	1.17
EXOB3_A11	Unknown-107	1.17
EXOB3_E09	N-myc downstream regulated protein-2	1.16
CA365040	FKBP12-rapamycin complex-associated protein	1.16
CA387866	Arachidonate 5-lipoxygenase-2	1.16
EXOB1_D03	5'-3' exoribonuclease 2	1.16
CA363978	Inhibitor of kappaB kinase gamma	1.16
CA355893	DnaJ homolog subfamily B member 2	1.15
CA357899	Death-associated protein kinase 3	1.15
est01c03	Histone H33-3	1.15
P_3	Epididymal secretory glutathione peroxidase	1.14
utu02d01	Unknown-241	1.13
EXOB2_A10	Unknown-92	1.07
est04b04	Cytokeratin 8	-1.11
est03c02	Adrenal gland protein AD-002	-1.11
EXOB4_F08	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	-1.11
HK0003_A03	Thymosin beta-4-2	-1.12
est01e06	Coronin-1B	-1.12
CA380028	StAR-related lipid transfer protein 3	-1.12
EXOB4_H07	Beta-galactosidase-related protein	-1.13
est04c06	Unknown-54	-1.15
EXOB2_F12	60S ribosomal protein L7a-1	-1.16
CA383652	ATP-binding cassette, sub-family F, member 1	-1.16

est01c09	Unknown-12	-1.17
utu02e02	Tropomyosin alpha 3 chain-2	-1.17
utu01d01	60S acidic ribosomal protein P1	-1.17
CA388407	DnaJ homolog subfamily A member 2	-1.18
utu04e11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 precursor	-1.18
utu04d04	Actin, alpha skeletal 4	-1.18
HK0002_B01	60S ribosomal protein L8	-1.18
CA376574	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1	-1.19
utu01d06	Deoxyribonuclease gamma precursor	-1.19
utu04c08	Transposase-7	-1.19
HK0003_A04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-2	-1.19
P_46	ATPase 6	-1.19
EST1-3A_F01	Ependymin I	-1.19
utu01c12	Heat shock cognate 71 kDa protein	-1.19
HK0001_C04	Unknown-150	-1.21
est01c08	14-3-3C2	-1.21
HK0003_A10	Unknown-184	-1.21
HK0003_C10	Over-expressed breast tumor protein-like	-1.21
EXOB4_H05	Unknown-133	-1.22
EXOB2_B04	Syntenin 1	-1.22
EST1-3A_E06	60S ribosomal protein L5-1	-1.22
EXOB4_F11	40S ribosomal protein S20	-1.22
HKT0001_C09	Malate dehydrogenase, mitochondrial-1	-1.22
HK0001_D12	Estrogen-responsive B box protein	-1.22
EXOB3_E01	Na/K ATPase alpha subunit-2	-1.23
EXOB2_F08	CDC10 protein homolog	-1.23
utu01c03	Unknown-232	-1.23
EXOB2_H02	Serine/arginine repetitive matrix 1	-1.23
CA361443	Nucleolysin TIAR	-1.24
HK0001_C09	Unknown-151	-1.24
EXOB1_G12	Thioredoxin	-1.24
EXOB4_D05	Hypothetical-fish 19	-1.25
utu01b08	Unknown-231	-1.25
CA371855	PDZ and LIM domain protein 1	-1.25
est02g10	Unknown-31	-1.25
CA367764	Calmodulin-1	-1.26
utu04f03	NB thymosin beta	-1.26
HK0002_A12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 15 kDa subunit	-1.26
EST1-3A_C11	Cdk inhibitor p21 binding protein	-1.26
HK0003_H04	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit	-1.27
HK0003_D08	Unknown-193	-1.27
utu01d07	Unknown-236	-1.27
utu01h01	Unknown-239	-1.28
utu01b01	Unknown-230	-1.28
HK0001_H01	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain,	-1.28
utu01d11	Unknown-237	-1.29

utu04d12	Unknown-269	-1.29
HKT0001_H07	60S ribosomal protein L37a	-1.29
HK0003_F02	Unknown-195	-1.30
EXOB2_A04	Hypothetical-fish 4	-1.30
HK0002_D11	Myosin regulatory light chain MRCL2-1	-1.30
utu04d03	Fish-egg lectin	-1.31
EXOB4_D02	Beta actin-2	-1.31
est03e02	Hypothetical-fish 15	-1.32
HK0002_H08	TATA-binding protein associated factor 2N	-1.32
EXOB3_E03	Unknown-114	-1.32
HK0003_F10	Unknown-200	-1.32
est02f02	Unknown-28	-1.32
HK0003_E04	Hypothetical-fish 10	-1.32
utu03h02	6-phosphofructokinase	-1.32
EXOB3_H01	Matrix metalloproteinase-13	-1.32
EXOB3_D10	Na/K ATPase alpha subunit-1	-1.33
EXOB2_E04	Unknown-97	-1.33
HK0003_B03	Cytochrome c-2	-1.33
HK0003_B05	FLJ14655	-1.34
CA387513	Connective tissue growth factor	-1.34
utu01e12	Zinc finger protein 228	-1.34
HK0003_F07	Unknown-198	-1.35
ENH2_F09	Beta-2-microglobulin-1	-1.35
HK0003_C07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	-1.36
utu04f08	Actin, alpha skeletal 5	-1.36
HK0003_H02	Cathepsin L2	-1.37
EXOB3_B12	Unknown-109	-1.37
CA358998	Cysteine-rich protein 1	-1.37
EST1-3A_D03	60S ribosomal protein L23	-1.37
utu03c09	40S ribosomal protein S5	-1.37
KVkm2_D09	14-3-3E1-1	-1.37
utu04d02	Beta enolase-5	-1.37
CA367787	Bax inhibitor-1	-1.38
est01b05	Ribonuclease Ok2	-1.38
HK0003_G10	Unknown-202	-1.38
CA377007	Growth arrest and DNA-damage-inducible GADD45 gamma-1	-1.39
HK0001_B08	Putative pre-mRNA splicing factor RNA helicase	-1.40
HK0003_F09	Unknown-199	-1.40
CA371363	Glucose-6-phosphate isomerase-1	-1.40
HK0002_H04	Unknown-179	-1.40
F_122	ARP2/3 complex 21 kDa subunit	-1.41
CA383795	Allograft inflammatory factor-1	-1.41
HK0001_C06	Prostaglandin D synthase homolog	-1.41
EXOB2_H01	Unknown-100	-1.42
est03h04	Epididymal secretory protein E1	-1.43
EXOB3_F09	MHC class I heavy chain-1	-1.43

Hete0002_B07	Unknown-135	-1.43
EST1-3A_F05	Heat shock 70 kDa protein 1	-1.43
utu04d10	Unknown-268	-1.43
utu04g05	40S ribosomal protein S9-3	-1.43
HK0002_B09	Transgelin	-1.44
EXOB2_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	-1.44
KVkm2_D01	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	-1.45
EXOB4_F03	Cathepsin S	-1.46
EXOB2_C01	Cofilin, muscle isoform	-1.47
est03b03	Cathepsin C-2	-1.47
utu01g11	Actin, alpha skeletal 3	-1.47
EXOB1_C02	Unknown-83	-1.47
utu01f04	Actin, alpha skeletal 2	-1.48
EXOB4_C05	Galectin-1	-1.48
EST1-3A_G09	Unknown-75	-1.48
EXOB4_A08	Lysozyme g-3	-1.49
EST1-3A_D01	Tissue factor pathway inhibitor 2 precursor	-1.49
KVkm2_D03	Nuclear protein 1	-1.50
EXOB3_B01	Cathepsin C-3	-1.50
utu02a08	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-2	-1.51
EXOB3_H05	Glucose-6-phosphate isomerase-2	-1.51
HK0002_G11	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-1.51
utu01f03	Unknown-238	-1.52
HK0002_F03	Unknown-176	-1.52
est04c10	Unknown-56	-1.52
EXOB1_H08	ADP,ATP carrier protein 3	-1.53
utu04e07	60S ribosomal protein L39	-1.53
CA365039	CD63	-1.54
EXOB2_A07	Unknown-91	-1.54
HK0002_B07	Heat shock 70kDa protein 8	-1.54
est04f01	Polyposis locus protein 1	-1.54
HK0002_B06	Troponin T-3, fast skeletal muscle	-1.54
est02f05	Cytochrome c oxidase subunit III-4	-1.54
est01d01	Growth arrest and DNA-damage-inducible GADD45 alpha-1	-1.54
EXOB4_E11	Annexin IV	-1.55
HK0002_G03	Histone H10	-1.56
EST1-3A_B06	Ring finger protein 10	-1.57
est01f01	DNA-binding protein inhibitor ID-1	-1.59
CA351992	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein alpha-2	-1.60
HKT0001_H05	Cytochrome b-3	-1.60
utu02b11	Collagen a3(I)-2	-1.60
utu02b09	60S acidic ribosomal protein P0	-1.60
utu03e09	Nebulin-1	-1.61
est01e04	Adapter-related protein complex 1 sigma 1A subunit	-1.61
EXOB1_A06	ADP,ATP carrier protein T2	-1.62
est03h09	Unknown-49	-1.62

HKT0001_H03	Microtubule-associated protein RP/EB	-1.63
HK0003_C02	Collagen alpha 1(I) chain-1	-1.64
EXOB2_D07	Ependymin related protein-1	-1.64
EXOB2_G12	Tolloid-like protein (nephrosin)-2	-1.67
HK0002_A01	Unknown-163	-1.68
est03g08	Cathepsin Z precursor	-1.68
est03d11	Unknown-42	-1.69
est04e05	Glutathione peroxidase-gastrointestinal	-1.69
EXOB4_C11	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I precursor	-1.70
utu04f06	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-2	-1.71
EST1-3A_H06	Transcription factor jun-B-1	-1.73
utu04c11	Collagen alpha 1(I) chain-2	-1.75
EXOB2_G02	Profilin-1	-1.79
EXOB2_H04	Unknown-101	-1.81
est03b12	Secretory granule proteoglycan core protein	-1.83
HK0003_B12	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	-1.83
utu01g10	Keratin, type II cytoskeletal 8	-1.84
utu03e08	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	-1.85
est04a04	Midkine precursor	-1.87
EXOB4_H04	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	-1.89
HKT0001_B03	Alpha 2 type I collagen-1	-1.90
utu03h09	Unknown-262	-1.91
est04h11	Iodotyrosine dehalogenase protein	-1.94
HK0002_D05	Parvalbumin alpha-1	-1.95
EST1-3A_B03	Hypothetical-fish 44	-1.99
HK0003_G01	Creatine kinase, M-2	-2.02
est01e02	Thymosin beta-4-1	-2.03
est01b09	Tolloid-like 2 protein (nephrosin)	-2.03
utu01h02	Cytochrome oxidase subunit III-3	-2.14
HK0003_D01	Troponin C-1, skeletal muscle	-2.15
est02f12	Proteasome subunit beta type 9 precursor	-2.18
HK0002_D09	Prothymosin alpha	-2.22
ENH2_F03	Cathepsin K-1	-2.30
HK0002_E12	Creatine kinase, M-2	-2.32
utu02b07	Cytochrome c oxidase subunit II	-2.35
utu04a06	Creatine kinase, M-3	-2.42
EXOB3_A04	Unknown-104	-2.44
utu02f09	Myosin light chain 2-2	-2.46
HK0001_E10	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	-2.54
utu01g04	Cytochrome oxidase subunit III-2	-2.55
EXOB2_G01	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2	-2.55
est01e10	Tolloid-like protein (nephrosin)-1	-2.60
est03c04	Matrix metalloproteinase-9	-2.70
HST0001_C03	Plasminogen precursor-2	-2.72
KVkm2_H10	Unknown-227	-2.76

CA348284	CCAAT/enhancer binding protein beta	-3.05
EXOB2_D05	Matrix metalloproteinase 9-2	-3.07
est02f08	Serine protease-like protein-1	-3.21
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	-3.25
HK0003_C11	Tropomyosin alpha 3 chain-1	-3.34
utu03e06	Parvalbumin alpha-3	-3.50
CA370329	Lysozyme C precursor	-3.90
HK0003_C08	Parvalbumin alpha-2	-3.99
utu04h11	Myosin light chain 2-2	-4.13
utu02c02	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-1	-4.30
Hete0002_A07	Metallothionein-II	-4.49
HK0003_E07	Myosin light chain 2-1	-4.49
HK0002_D07	Unknown-172	-5.04
EXOB1_A03	Metallothionein A	-5.05
est01c04	Unknown-11	-6.17
HK0002_F05	Myosin heavy chain, skeletal, fetal	-7.31

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el riñón cefálico de truchas sometidas a la forma atenuada del virus IHN (atIHNV) a las 72 horas de la infección.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	atIHNV FC
est03e08	Hypothetical-fish 36	3.06
CA343473	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	2.98
EXOB2_G11	Stanniocalcin-1	2.93
EXOB1_B02	Hypothetical-fish 34	2.84
KVkm2_H07	Unknown-226	2.77
EXOB3_A01	Unknown-103	2.73
CA363723	Cyclin C	2.64
EXOB4_H01	Unknown-132	2.63
est04c02	Unknown-53	2.61
HK0002_G04	Fructose-bisphosphate aldolase A	2.45
EST1-3A_H03	Unknown-76	2.42
CA358107	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	2.42
CA378361	Ubiquitin ligase SIAH1	2.40
HK0001_H12	Unknown-162	2.35
CA342204	TNF receptor associated factor 3	2.33
EST1-3A_H05	Adenosine deaminase 3	2.31
est04f10	Hypothetical-fish 1	2.30
KVkm2_H11	Unknown-228	2.30
HKT0001_A11	Hypothetical-fish 11	2.28
CA355893	DnaJ homolog subfamily B member 2	2.26
EXOB4_B09	Macrophage receptor MARCO	2.22
est01a07	Unknown-7	2.22
est03f04	F-box/WD-repeat protein 11	2.22
EXOB4_E09	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	2.19
EST1-3A_G03	Unknown-74	2.18
est02b02	PEST-containing nuclear protein	2.16
P_19	glucocorticoid receptor (GCR)	2.14
CA363978	Inhibitor of kappaB kinase gamma	2.13
CA366489	Multidrug resistance protein 3-1	2.13
est03c07	Ig kappa chain V-I region WEA	2.07
EST1-3A_F09	Unknown-73	2.07
EXOB3_A06	Programmed cell death 10	2.07
EXOB1_F02	Transcription regulator protein BACH1	2.07
EXOB3_H01	Matrix metalloproteinase-13	2.06
est01h03	Galectin-3 binding protein	2.06
CA378435	Protein phosphatase 2C delta isoform	2.05
EXOB1_B03	Unknown-81	2.04
HK0002_H10	Unknown-182	1.98
HST0001_C03	Plasminogen precursor-2	1.96
HKT0001_G11	Nucleoside diphosphate kinase 3	1.95

CA368716	Membrane-bound transcription factor site 2 protease	1.95
P_7	Peptide methionine sulfoxide reductase	1.93
CA351392	Guanine nucleotide exchange factor DBS	1.93
CA384029	Chromobox protein homolog 4	1.90
P_4	Myeloperoxidase	1.88
Hete0002_C06	Hypothetical protein FLJ46057	1.86
EXOB3_H07	Hypothetical-fish 6	1.85
HST0001_F09	Alpha-1-microglobulin/bikunin-2	1.83
P_3	Epididymal secretory glutathione peroxidase	1.82
HK0003_G05	Unknown-201	1.82
P_10	Aryl hydrocarbon receptor	1.80
KVkm2_A12	Unknown-220	1.79
CA346979	MAPK/ERK kinase kinase 5-1	1.79
est03e07	Unknown-43	1.79
CA342760	47 kDa heat shock protein-2	1.79
EST1-3A_F04	ReO_6-2	1.77
CA387146	Mannosidase alpha	1.76
CA384555	B-cell-specific coactivator OBF-1	1.76
est03a05	Unknown-35	1.76
est03f12	Chimeric AFGP/trypsinogen-like serine protease	1.74
EXOB3_G01	Unknown-122	1.74
CA363762	Cell death activator CIDE-B	1.74
CA360187	G2/mitotic-specific cyclin B1	1.72
CA357899	Death-associated protein kinase 3	1.71
CA352381	Protein kinase C, alpha type	1.71
EXOB2_D05	Matrix metalloproteinase 9-2	1.71
KVkm2_H06	Hypothetical-fish 22	1.70
est01c11	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] mitochondrial	1.70
est02a06	Axonal transporter of synaptic vesicles	1.69
CA357173	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2-2	1.68
P_2	Catalase	1.68
EXOB2_B09	Unknown-94	1.68
est03c04	Matrix metalloproteinase-9	1.68
EXOB3_F11	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-18 kDa	1.68
utu02g04	Glycogen phosphorylase-1	1.68
EXOB3_A11	Unknown-107	1.68
CA382570	Mitogen-activated protein kinase 13	1.67
HK0002_H06	Unknown-180	1.67
CA359043	NAD-dependent deacetylase sirtuin 5	1.66
P_52	C2gamma (AhR gamma)	1.63
EXOB1_A10	Unknown-80	1.62
HK0001_C08	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-3	1.62
CA349577	Tyrosine-protein kinase FRK	1.61
CA378736	Tyrosine-protein kinase BTK	1.61
CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	1.61
utu03g11	Hypothetical-fish 12	1.61

est04b11	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-1	1.59
est02g07	Ig mu heavy chain disease protein	1.56
CA362833	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U	1.55
CA376117	CD231	1.55
est02g10	Unknown-31	1.55
CA382425	B-cell translocation gene 1-2	1.55
CA365208	C-C chemokine receptor type 6	1.54
CA348325	BAG-family molecular chaperone regulator-4	1.53
Hete0002_B09	Unknown-136	1.53
CA381440	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	1.53
est04h08	ADP-ribosylation factor 3	1.53
KVkm2_D11	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 11 kDa protein, mitochondrial precursor	1.53
EXOB4_D12	Hpa repeat-1	1.52
CA342225	CARBONYL reductase	1.51
CA359963	Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein	1.51
utu02g07	Glycogen phosphorylase-2	1.51
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	1.50
CA368052	Myosin-like BCL2-interacting protein	1.50
utu03e11	Troponin I, slow skeletal muscle	1.50
EXOB4_A10	Unknown-126	1.49
est03a11	ReO_6-1	1.48
EXOB2_A02	Nucleoside diphosphate kinase, mitochondrial precursor	1.48
P_53	Aryl hydrocarbon receptor	1.48
CA373506	Selenoprotein P	1.47
CA382259	Complement receptor 1-2	1.47
EXOB1_G05	Unknown-89	1.47
CA361724	Signal transducer and activator of transcription 3	1.47
EXOB2_H07	WD-repeat containing protein Ciao 1	1.47
EXOB2_H04	Unknown-101	1.46
CA357217	Ubiquitin ligase protein CHFR	1.45
CA377838	Mitogen activated protein kinase activated protein kinase-3	1.45
CA349597	C-C chemokine receptor type 7 precursor	1.45
Hete0002_C07	Unknown-139	1.44
CA341859	Nuclear factor kappa-B, subunit 1	1.44
EXOB2_G12	Tolloid-like protein (nephrosin)-2	1.44
utu02e02	Tropomyosin alpha 3 chain-2	1.44
CA384452	Heat shock protein HSP 90-alpha	1.44
est04b04	Cytokeratin 8	1.43
CA383564	Coatomer epsilon subunit 1	1.43
CA366608	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator precursor	1.42
CA362691	N-myc downstream regulated protein-1	1.42
est03c08	Hypothetical protein DKFZp434I209	1.42
CA373850	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	1.41
CA382877	Fibronectin receptor beta	1.41

est02h12	Unknown-33	1.41
EST1-3A_E05	Hpa repeat-2	1.41
EXOB3_A03	SEC13-related protein	1.40
utu03d06	Retinoic acid receptor responder 3-2	1.40
est02b07	Unknown-24	1.40
CA361342	Orphan nuclear receptor NR4A2	1.40
CA375569	Serine/threonine-protein kinase Chk1	1.40
EXOB1_C12	Hypothetical-fish 31	1.39
est01a10	Unknown-9	1.39
CA363983	Cell growth regulator with RING finger domain 1	1.39
CA358266	T-cell, immune regulator 1, isoform a	1.39
utu02d05	Unknown-242	1.39
CA371001	Very-long-chain acyl-CoA synthetase	1.39
utu03c02	Retinoic acid receptor responder 3-1	1.38
est03g12	Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2	1.38
EST1-3A_D05	Unknown-70	1.38
CA376709	Protein activator of the interferon-induced protein kinase	1.38
EXOB1_D07	Unknown-84	1.38
CA368739	BCL2-associated athanogene 1	1.38
est01h06	Unknown-21	1.38
CA364621	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	1.37
CA357413	Amyloid beta A4 protein precursor	1.37
CA349350	Serum/glucocorticoid-regulated kinase	1.37
HK0003_A01	Unknown-183	1.37
CA380121	Telomerase reverse transcriptase	1.36
EXOB2_E02	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein	1.36
EXOB1_H05	Transposase-6	1.36
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	1.35
CA358548	Polyadenylate-binding protein 4	1.35
est04g11	Hypothetical protein FLJ90275	1.35
HK0003_C01	Unknown-188	1.35
CA387866	Arachidonate 5-lipoxygenase-2	1.34
P_8	Glutathione reductase, mitochondrial-1	1.34
est01b09	Tolloid-like 2 protein (nephrosin)	1.34
EXOB2_H11	Glucose-6-phosphatase	1.34
P_9	Glutathione S-transferase P	1.34
KVkm2_C04	Unknown-221	1.34
EXOB2_H01	Unknown-100	1.34
P_54	VEGF4	1.34
utu02e08	Nonhistone chromosomal protein HMG-14-1	1.33
est04g12	Envelope protein	1.33
CA380457	Aminopeptidase N	1.33
CA367029	Rho guanine nucleotide exchange factor 5	1.33
CA372588	Inhibitor of apoptosis protein 2	1.32
est02a09	Gap junction alpha-3 protein	1.32
CA342691	Lanosterol synthase	1.32

CA346849	Unc-13 homolog C	1.32
EXOB3_E03	Unknown-114	1.32
HK0003_G01	Creatine kinase, M-2	1.32
est02f08	Serine protease-like protein-1	1.32
est03b11	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-1	1.32
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	1.32
utu02c08	Tripartite motif protein 25	1.32
CA346925	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 E	1.32
utu03b10	Beta enolase-3	1.32
est02f12	Proteasome subunit beta type 9 precursor	1.32
CA353088	Cold-inducible RNA-binding protein-1	1.31
est02a04	Protein-tyrosine phosphatase kappa precursor	1.31
CA388591	Cyclin T2	1.31
utu01h05	Troponin T-2, fast skeletal muscle	1.31
P_49	HIF	1.31
utu01f12	Troponin T-1, fast skeletal muscle	1.30
Hete0002_E09	Transposase-56	1.30
utu01d08	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2B	1.30
HK0002_C04	Apolipoprotein E-2	1.30
CA364711	Inhibitor of apoptosis protein 3	1.30
EXOB3_H04	Transposase-1	1.29
CA344206	A-kinase anchor protein 9	1.29
utu03g08	Unknown-259	1.29
HK0002_B04	Phospholemman precursor	1.29
est02c11	Ubiquitin specific proteinase 53	1.28
HK0002_D08	Unknown-173	1.28
CA364370	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 precursor	1.28
CA344201	Peroxisomal targeting signal 2 receptor	1.28
est02d12	Growth hormone inducible transmembrane-1	1.28
est02b09	Unknown-25	1.28
est01g12	Megakaryocyte stimulating factor	1.27
CA363480	Aquaporin-CHIP	1.27
CA387992	Heparanase	1.27
EST1-3A_H08	Sp1 transcriptional activation factor	1.27
est04f04	Unknown-60	1.27
utu02h03	Proteasome subunit beta type 2	1.26
CA377768	Phospholipase D1	1.26
EXOB3_F07	Unknown-120	1.25
CR_7	14-3-3 G1	1.25
CA342227	Protein tyrosine kinase 2 beta	1.25
CA384637	60 kDa heat shock protein-1	1.25
CA387665	Cytochrome P450 2J2	1.25
CA354056	Nucleolysin TIA-1	1.25
utu03h09	Unknown-262	1.25
CA373382	RING finger protein 4	1.24

est04a01	Unknown-50	1.24
est02f02	Unknown-28	1.24
CA368586	52 kDa repressor of the inhibitor of the protein kinase	1.24
est01g08	Unknown-17	1.24
EST1-3A_C04	Splicing factor, arginine/serine-rich 8	1.24
CA354559	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	1.24
CA352520	D-type cyclin-interacting protein 1	1.24
CA384587	Transcription factor Dp-1	1.24
CA366393	Mannan-binding lectin serine protease 2-1	1.23
est03d09	Unknown-40	1.23
EST1-3A_F12	Transposase-59	1.23
EXOB1_F10	Suppressor of SWI4 1 homolog	1.23
EXOB4_E01	Transposase-58	1.23
est02f09	Unknown-30	1.23
CA381625	Zinc finger protein 148	1.22
EXOB1_B07	PRPF39 protein	1.22
HST0001_G09	Unknown-218	1.22
est02d04	ADP-ribosylation factor-like protein 7	1.22
EXOB1_A01	Unknown-78	1.22
CA372345	High density lipoprotein-binding protein	1.22
EXOB4_C02	Unknown-127	1.22
EXOB3_D03	Unknown-111	1.22
utu03g02	Heat shock cognate 70 kDa	1.21
Hete0002_B07	Unknown-135	1.21
CA366462	Apoptosis regulator Bcl-X	1.21
CA359487	Protein phosphatase methylesterase 1	1.21
utu03g04	Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform	1.21
EXOB3_E09	N-myc downstream regulated protein-2	1.21
est01h09	Unknown-22	1.21
est04e04	MHC class 1b antigen	1.21
ENH2_F09	Beta-2-microglobulin-1	1.21
KVkm2_E07	Unknown-223	1.20
utu01a03	40S ribosomal protein S3-1	1.20
CA365040	FKBP12-rapamycin complex-associated protein	1.20
CR_10	14-3-3 A1	1.20
EXOB3_A12	Unknown-108	1.20
CA365230	Peroxisomal acyl-coenzyme A thioester hydrolase 1	1.19
CA363848	p53-regulated protein PA26	1.19
EXOB2_H08	Unknown-102	1.19
CA363438	Interferon-induced protein 44-3	1.19
P_57	RIB700	1.19
CA357820	Calponin 1	1.18
utu01f04	Actin, alpha skeletal 2	1.18
CA346488	p53-like transcription factor	1.18
CA385359	Serum amyloid P-component-2	1.18
utu04b08	Unknown-264	1.18

est03e09	Unknown-44	1.17
KVkm2_D03	Nuclear protein 1	1.17
utu03a02	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-7	1.17
est04f11	Translocon-associated protein, delta subunit precursor	1.17
CA378908	Early growth response protein 2	1.17
EXOB3_F12	Unknown-121	1.16
est03f07	Transposase-4	1.16
CA350930	Aryl sulfotransferase 2	1.16
P_22	Glucose transporter type 1	1.16
est04f07	Transposase-5	1.16
est03h05	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-2	1.15
EXOB2_G07	Septin 10	1.15
CA344820	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2	1.14
utu04h04	Thioredoxin-like protein p19 precursor	1.14
utu02d01	Unknown-241	1.14
P_47	cardiac peptide B	1.13
CA361101	Regulator of G-protein signaling 1-2	1.11
utu02c03	Protein phosphatase 2C gamma isoform	1.11
EXOB2_D11	E3 ligase for inhibin receptor	1.11
utu04c02	Unknown-265	1.11
EST1-3A_G09	Unknown-75	-1.11
EST1-3A_F10	14-3-3 B1-like	-1.11
EXOB3_D02	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	-1.11
utu03f12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	-1.11
est04f08	Telomerase-binding protein p23-1	-1.12
CA388407	DnaJ homolog subfamily A member 2	-1.13
EXOB1_B08	Unknown-82	-1.13
EXOB4_D01	Deoxyribonuclease II-1	-1.13
est01e06	Coronin-1B	-1.14
HK0002_B09	Transgelin	-1.14
EXOB4_E08	Cytochrome c oxidase subunit VIIa-related	-1.14
Hete0002_G07	Hypothetical-fish 40	-1.14
HK0002_A12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 15 kDa subunit	-1.14
utu04f01	40S ribosomal protein S9-2	-1.14
CA354833	Anti-silencing function 1B	-1.15
HK0001_G12	Quinone oxidoreductase	-1.15
est01g04	5-aminolevulinate synthase	-1.15
EXOB2_B04	Syntenin 1	-1.16
est04h11	Iodotyrosine dehalogenase protein	-1.16
utu04c11	Collagen alpha 1(I) chain-2	-1.16
EXOB2_E07	Serine protease EOS	-1.16
EXOB2_C02	Hypothetical-fish 35	-1.16
HK0003_H04	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit	-1.16
EST1-3A_C11	Cdk inhibitor p21 binding protein	-1.16
HKT0001_B03	Alpha 2 type I collagen-1	-1.17
HK0003_C03	Unknown-189	-1.17

HK0001_H08	Gastrointestinal glutathione peroxidase 2	-1.17
HST0001_C05	Cell division control protein 42 homolog	-1.18
KVkm2_A01	Unknown-219	-1.18
CA366564	Huntingtin	-1.19
EXOB3_G05	Actin, cytoplasmic 2	-1.19
EXOB3_G02	Organic anion transporter	-1.19
utu03c09	40S ribosomal protein S5	-1.19
est02c06	Heat shock protein 75 kDa-2	-1.19
est03d06	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	-1.19
utu04e07	60S ribosomal protein L39	-1.20
CA381244	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	-1.20
EXOB1_H09	ATP synthase beta chain-1	-1.20
HK0003_H02	Cathepsin L2	-1.20
EXOB2_B12	RING finger protein 103	-1.20
HK0003_E07	Myosin light chain 2-1	-1.20
utu02g02	40S ribosomal protein S21	-1.20
KVkm2_G09	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1	-1.20
HK0003_C08	Parvalbumin alpha-2	-1.21
HK0002_F05	Myosin heavy chain, skeletal, fetal	-1.21
EST1-3A_F01	Ependymin I	-1.21
HK0001_A11	Fumarate hydratase, mitochondrial precursor	-1.21
utu04e11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 precursor	-1.21
EXOB2_E01	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-2	-1.22
HK0001_D01	Ubiquitin	-1.22
HK0003_F09	Unknown-199	-1.22
ENH2_F03	Cathepsin K-1	-1.22
HK0003_C10	Over-expressed breast tumor protein-like	-1.22
HK0002_H08	TATA-binding protein associated factor 2N	-1.22
CA373890	Heat shock protein HSP 90-beta-1	-1.22
HK0003_C12	Unknown-191	-1.22
EXOB3_H02	Unknown-123	-1.22
EXOB2_D07	Ependymin related protein-1	-1.23
CA365039	CD63	-1.23
utu01b01	Unknown-230	-1.23
utu03f06	Chromosome segregation 1-like protein	-1.23
EXOB4_D05	Hypothetical-fish 19	-1.23
EXOB2_C10	Red cell acid phosphatase 1	-1.23
EXOB3_D06	Unknown-112	-1.23
HK0003_F05	28S ribosomal protein S16, mitochondrial precursor	-1.23
EXOB4_A03	Carbonic anhydrase	-1.24
HK0003_B05	FLJ14655	-1.24
CA351800	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	-1.24
EXOB2_F03	Nuclear cap binding protein subunit 2	-1.24
EXOB4_H05	Unknown-133	-1.24
HK0003_F10	Unknown-200	-1.24
HK0002_F03	Unknown-176	-1.24

EXOB2_D09	GWSC6486	-1.24
HK0003_D10	Hypothetical-fish 9	-1.24
est02b08	Peroxioredoxin 1-2	-1.25
utu01g11	Actin, alpha skeletal 3	-1.25
utu04d03	Fish-egg lectin	-1.25
EXOB4_A01	Cytoplasmic dynein light chain	-1.25
EXOB4_H07	Beta-galactosidase-related protein	-1.25
CA381566	Programmed cell death protein 6	-1.25
Hete0002_A06	40S ribosomal protein S11	-1.25
HK0001_F01	Complement factor H-1	-1.25
HK0003_E08	Unknown-194	-1.25
utu01c08	Unknown-233	-1.25
est04a04	Midkine precursor	-1.26
HK0003_C05	Unknown-190	-1.26
utu02a12	Brain protein 44-like protein	-1.26
EXOB3_F08	60S ribosomal protein L10-1	-1.26
EXOB2_E04	Unknown-97	-1.26
utu01d06	Deoxyribonuclease gamma precursor	-1.26
EXOB4_H08	Alanine-glyoxylate aminotransferase 1	-1.26
HK0003_B08	Unknown-186	-1.26
EXOB2_C12	BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3 like	-1.26
utu03h02	6-phosphofructokinase	-1.26
EXOB3_E01	Na/K ATPase alpha subunit-2	-1.26
HK0001_E07	Unknown-155	-1.26
ENH2_B05	60S ribosomal protein L13a-acute pahse protein	-1.27
HK0001_F04	Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	-1.27
EXOB2_H02	Serine/arginine repetitive matrix 1	-1.27
EXOB4_D09	Hypothetical-fish 7	-1.27
utu04f11	40S ribosomal protein S3-2	-1.27
EXOB3_G08	Fatty acid-binding protein-1	-1.27
HK0001_F09	Unknown-157	-1.27
EXOB4_G10	Keratin, type I cytoskeletal 9	-1.28
HK0001_H01	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain,	-1.28
EXOB4_F03	Cathepsin S	-1.28
HK0001_E11	Hypothetical-fish 43	-1.28
CA364424	Cyclophilin-40	-1.28
ENH2_E05	40S ribosomal protein S29	-1.28
HK0002_E09	Unknown-174	-1.28
EXOB1_F08	Unknown-88	-1.29
utu01c03	Unknown-232	-1.29
EXOB2_F08	CDC10 protein homolog	-1.29
CA367764	Calmodulin-1	-1.29
utu01b08	Unknown-231	-1.29
HK0001_D05	Ubiquitin-like protein SMT3A-2	-1.29
utu03e08	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	-1.30
HK0002_G06	Unknown-177	-1.30

EXOB3_F05	Proteasome subunit alpha type 7-1	-1.30
EXOB2_C01	Cofilin, muscle isoform	-1.30
EXOB3_D10	Na/K ATPase alpha subunit-1	-1.30
HK0001_A02	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	-1.30
EXOB4_E11	Annexin IV	-1.30
ENH2_B08	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	-1.30
utu01d11	Unknown-237	-1.31
CA362758	Cyclophilin-2	-1.31
utu03e05	Unknown-258	-1.32
est01e02	Thymosin beta-4-1	-1.32
F_126	DNA fragmentation factor 40 kDa subunit	-1.32
CA374698	High-glucose-regulated protein 8	-1.32
EST1-3A_B08	Unknown-67	-1.33
EXOB3_E10	Unknown-117	-1.33
HK0001_A03	Unknown-145	-1.33
utu04g06	Unknown-270	-1.33
HK0002_E04	39S ribosomal protein L45, mitochondrial precursor	-1.33
HK0003_F07	Unknown-198	-1.34
ENH2_D07	Ribosomal protein L35-2	-1.34
CR_1	14-3-3 B1	-1.34
HK0003_C07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	-1.35
EXOB4_F05	Rab GDP dissociation inhibitor beta	-1.35
est02f04	Tubulin alpha-3 chain	-1.35
utu01d02	Unknown-235	-1.35
HK0002_H11	Creatine kinase, B chain	-1.35
EXOB2_H06	High affinity immunoglobulin epsilon receptor alpha	-1.35
HK0003_D06	Mitochondrial ribosomal protein L1	-1.35
HK0001_A04	MIR-interacting saposin-like protein precursor	-1.36
HK0003_D02	Unknown-192	-1.36
utu01f03	Unknown-238	-1.36
ENH2_A03	60S ribosomal protein L15	-1.37
Hete0002_G08	Ribosomal protein L35-3	-1.37
utu01b12	40S ribosomal protein S9-1	-1.37
EXOB3_E07	F-actin capping protein alpha-1 subunit	-1.37
utu04d10	Unknown-268	-1.38
EXOB3_G04	Tyrosine-protein kinase HCK	-1.38
utu01e12	Zinc finger protein 228	-1.38
EXOB3_A04	Unknown-104	-1.38
HK0003_B03	Cytochrome c-2	-1.39
est03a01	Methyl-CpG binding protein 3b	-1.39
HK0002_G10	T-cell receptor alpha chain V region HPB-MLT precursor	-1.39
utu01h01	Unknown-239	-1.40
utu01e09	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(1)	-1.41
EXOB1_B04	Beta actin-1	-1.41
EXOB2_D01	Proteasome subunit alpha type 3	-1.41
est04e05	Glutathione peroxidase-gastrointestinal	-1.41

HK0003_C02	Collagen alpha 1(I) chain-1	-1.41
HK0002_H04	Unknown-179	-1.41
KVkm2_A09	60S ribosomal protein L35	-1.41
CA361443	Nucleolysin TIAR	-1.41
EXOB3_C12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit	-1.42
EXOB3_H08	Unknown-124	-1.42
est03c10	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	-1.42
EXOB1_D11	Dynein light chain 2, cytoplasmic	-1.42
HK0002_A01	Unknown-163	-1.43
EXOB2_A09	60S ribosomal protein L5-2	-1.43
EXOB1_E03	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	-1.43
EXOB2_D04	Xaa-Pro dipeptidase	-1.43
EXOB1_C10	Cytochrome P450 2K4-2	-1.44
HK0003_A10	Unknown-184	-1.44
HK0002_B01	60S ribosomal protein L8	-1.45
utu02a10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-3	-1.45
EST1-3A_E06	60S ribosomal protein L5-1	-1.45
EXOB2_B05	Hypothetical-fish 27	-1.46
CA364941	Annexin A1-1	-1.46
EXOB2_F01	Proteasome subunit alpha type 6	-1.47
EXOB3_B02	Hyperosmotic protein 21	-1.47
KVkm2_D08	60S ribosomal protein L18a	-1.47
HK0003_A04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-2	-1.47
EXOB2_B01	Nuclease sensitive element binding protein 1-1	-1.48
HK0003_F03	Unknown-196	-1.48
EXOB3_E11	Unknown-118	-1.48
EXOB4_A07	T-complex protein 1, gamma subunit	-1.49
utu01a06	Unknown-229	-1.49
EXOB2_A04	Hypothetical-fish 4	-1.49
EXOB4_A08	Lysozyme g-3	-1.50
EXOB3_B12	Unknown-109	-1.50
EXOB1_A03	Metallothionein A	-1.50
EXOB4_B11	40S ribosomal protein S30	-1.50
EXOB1_C06	Nucleolar protein Nop56-1	-1.51
EXOB2_D06	NADH dehydrogenase subunit 5-1	-1.51
CA358998	Cysteine-rich protein 1	-1.51
EST1-3A_G02	NADH dehydrogenase subunit 2	-1.51
EXOB3_G06	40S ribosomal protein S15-1	-1.51
ENH2_B12	Ribosomal protein L35-1	-1.51
EXOB2_A10	Unknown-92	-1.51
HK0002_G02	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial precursor	-1.54
HK0002_G11	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-1.54
CA344428	Glutathione peroxidase 4	-1.55
est04d09	60S ribosomal protein L37	-1.56
EXOB1_C04	40S ribosomal protein S14 (PRO2640)	-1.56
EST1-3A_F08	Heat shock protein HSP 90-beta-2	-1.56

EXOB3_B01	Cathepsin C-3	-1.57
utu01c12	Heat shock cognate 71 kDa protein	-1.57
KVkm2_F06	60S ribosomal protein L32-1	-1.57
utu04g03	Alpha 2 type I collagen-2	-1.58
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	-1.61
EXOB1_G12	Thioredoxin	-1.61
ENH2_E07	Unknown-3	-1.62
CA383222	G2/mitotic-specific cyclin B2	-1.63
EXOB3_A08	Ribosomal protein L11	-1.63
EXOB1_A06	ADP,ATP carrier protein T2	-1.64
KVkm2_G01	60S ribosomal protein L32-2	-1.64
HK0002_B02	60S ribosomal protein L35a-2	-1.65
EXOB2_C04	Transposase-60	-1.66
EXOB4_D02	Beta actin-2	-1.67
EXOB1_C08	Eukaryotic initiation factor 4A-I	-1.67
EST1-3A_E09	Cold inducible RNA binding protein-2	-1.67
CA364325	Peroxiredoxin 6	-1.67
utu01d07	Unknown-236	-1.68
HK0002_D09	Prothymosin alpha	-1.70
HKT0001_H06	60S ribosomal protein L18	-1.72
EXOB4_C11	High affinity Ig gamma Fc receptor I precursor	-1.73
est04b10	Cytochrome P450 2K4-1	-1.73
EXOB4_A11	Tubulin alpha-ubiquitous chain	-1.73
EST1-3A_F05	Heat shock 70 kDa protein 1	-1.74
utu02h04	40S ribosomal protein S6	-1.75
EXOB4_C05	Galectin-1	-1.76
EST1-3A_D03	60S ribosomal protein L23	-1.77
KVkm2_G04	60S ribosomal protein L32-3	-1.78
EXOB3_A09	Hyperosmotic glycine rich protein	-1.79
EXOB1_H08	ADP,ATP carrier protein 3	-1.79
HK0002_C07	60S ribosomal protein L17	-1.79
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	-1.82
EXOB2_C03	60S ribosomal protein L10-1	-1.82
HK0002_F06	Histone 3A-ATP synthase F0 6	-1.83
est03b12	Secretory granule proteoglycan core protein	-1.83
EXOB3_H12	Unknown-125	-1.83
utu04c03	60S ribosomal protein L4	-1.84
utu03b02	Ribosomal protein L6-2	-1.84
Hete0002_G11	Hypothetical-fish 23	-1.85
HKT0001_H07	60S ribosomal protein L37a	-1.85
HK0003_A03	Thymosin beta-4-2	-1.86
EXOB4_B03	Ribosomal protein L36a-like-1	-1.86
HK0001_H06	40S ribosomal protein S7	-1.86
utu02a06	Collagen a3(I)-1	-1.87
EXOB2_C05	Histone H2Ax	-1.88
Hete0002_E10	40S ribosomal protein S8	-1.88

EXOB4_F11	40S ribosomal protein S20	-1.90
EXOB3_C04	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-1	-1.91
utu04g04	Ribosomal protein L36a-like-2	-1.91
EXOB4_C10	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-1	-1.92
utu02h11	Ribosomal protein L13	-1.94
utu01d01	60S acidic ribosomal protein P1	-1.97
EXOB3_C07	60S ribosomal protein L7a-2	-1.97
est04c07	Ferritin heavy chain-2	-1.97
Hete0002_B08	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 3	-2.01
EXOB3_F10	Nuclease sensitive element binding protein 1-2	-2.01
utu01g04	Cytochrome oxidase subunit III-2	-2.04
utu02a08	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-2	-2.04
utu01h02	Cytochrome oxidase subunit III-3	-2.04
EXOB1_F01	60S ribosomal protein L35a-1	-2.07
EXOB3_E04	60S ribosomal protein L14	-2.07
est02a11	Ig kappa chain V-IV region B17-2	-2.07
HK0002_B07	Heat shock 70kDa protein 8	-2.07
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	-2.07
HKT0001_H05	Cytochrome b-3	-2.08
EXOB3_H05	Glucose-6-phosphate isomerase-2	-2.08
est02f05	Cytochrome c oxidase subunit III-4	-2.09
utu04g05	40S ribosomal protein S9-3	-2.10
HK0001_A12	40S ribosomal protein S2	-2.11
EXOB4_F02	Ribosomal protein S12	-2.12
utu02b09	60S acidic ribosomal protein P0	-2.13
KVkm2_D01	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	-2.13
EXOB2_G02	Profilin-1	-2.13
EXOB2_F12	60S ribosomal protein L7a-1	-2.13
est02g11	Cytochrome c oxidase subunit I-1	-2.14
HK0001_H03	60S ribosomal protein L26	-2.14
HK0003_A12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-1	-2.16
EXOB1_H12	NADH dehydrogenase subunit 4	-2.23
HK0002_D07	Unknown-172	-2.24
EXOB3_G03	60S acidic ribosomal protein P2	-2.31
EXOB2_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	-2.34
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	-2.37
ENH2_H06	Unknown-5	-2.46
est04c05	Ferritin heavy chain-1	-2.54
P_46	ATPase 6	-2.56
utu02b07	Cytochrome c oxidase subunit II	-2.64
KVkm2_H10	Unknown-227	-2.67
EST1-3A_H07	Cytochrome b-1	-2.86
est02h09	Nonhistone chromosomal protein HMG-17	-3.07
CA370329	Lysozyme C precursor	-3.08
EXOB1_C02	Unknown-83	-3.44
EXOB2_G01	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2	-3.56

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el riñón cefálico de truchas sometidas a la forma activa del virus IHN a las 24 horas de la infección.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	IHNV FC
CA343473	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	5.35
est04c02	Unknown-53	4.26
est02b02	PEST-containing nuclear protein	4.00
EXOB3_A01	Unknown-103	3.91
CA358107	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	3.69
EXOB4_H01	Unknown-132	3.63
HK0002_G04	Fructose-bisphosphate aldolase A	3.59
EXOB1_B03	Unknown-81	3.59
EXOB4_E09	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	3.55
HK0003_G05	Unknown-201	3.43
CA378361	Ubiquitin ligase SIAH1	3.43
est04f10	Hypothetical-fish 1	3.41
EST1-3A_G03	Unknown-74	3.40
CA378435	Protein phosphatase 2C delta isoform	3.35
HK0002_H10	Unknown-182	3.33
EXOB1_F02	Transcription regulator protein BACH1	3.28
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	3.26
EST1-3A_H05	Adenosine deaminase 3	3.21
HK0001_H12	Unknown-162	3.05
CA368716	Membrane-bound transcription factor site 2 protease	3.00
EST1-3A_H03	Unknown-76	2.99
CA351392	Guanine nucleotide exchange factor DBS	2.97
EXOB4_B09	Macrophage receptor MARCO	2.95
EXOB3_H07	Hypothetical-fish 6	2.92
EXOB3_A06	Programmed cell death 10	2.88
est04g12	Envelope protein	2.78
EXOB1_B02	Hypothetical-fish 34	2.78
est03e08	Hypothetical-fish 36	2.76
HK0002_H06	Unknown-180	2.74
CA384029	Chromobox protein homolog 4	2.73
KVkm2_A12	Unknown-220	2.72
EXOB3_A03	SEC13-related protein	2.68
EXOB1_H05	Transposase-6	2.65
CA342204	TNF receptor associated factor 3	2.64
KVkm2_H11	Unknown-228	2.58
CA366489	Multidrug resistance protein 3-1	2.57
est03f04	F-box/WD-repeat protein 11	2.55
CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	2.49
CA357820	Calponin 1	2.48

CA357173	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2-2	2.43
EST1-3A_F04	ReO_6-2	2.34
EXOB2_G11	Stanniocalcin-1	2.32
P_4	Myeloperoxidase	2.32
P_19	glucocorticoid receptor (GCR)	2.23
CA355893	DnaJ homolog subfamily B member 2	2.22
CA363978	Inhibitor of kappaB kinase gamma	2.21
est02a06	Axonal transporter of synaptic vesicles	2.19
est01a07	Unknown-7	2.15
KVkm2_H10	Unknown-227	2.12
HK0001_D12	Estrogen-responsive B box protein	2.11
EXOB3_H02	Unknown-123	2.10
CA363762	Cell death activator CIDE-B	2.08
HST0001_F09	Alpha-1-microglobulin\//bikunin-2	2.08
CA387146	Mannosidase alpha	2.07
CA376117	CD231	2.04
EXOB1_D03	5'-3' exoribonuclease 2	2.04
Hete0002_E09	Transposase-56	2.04
est02f02	Unknown-28	2.00
EXOB3_H04	Transposase-1	1.99
P_3	Epididymal secretory glutathione peroxidase	1.97
HK0002_C04	Apolipoprotein E-2	1.97
CA363723	Cyclin C	1.95
utu04e11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 precursor	1.94
est03d11	Unknown-42	1.94
HK0002_E09	Unknown-174	1.93
est01f09	High-mobility group protein 2-like 1	1.92
EXOB1_A01	Unknown-78	1.92
HK0003_E06	DnaJ homolog subfamily C member 9	1.91
EXOB3_E10	Unknown-117	1.90
utu03a02	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-7	1.88
HK0001_C01	Dermatan-4-sulfotransferase-1-2	1.87
P_7	Peptide methionine sulfoxide reductase	1.87
EXOB3_G01	Unknown-122	1.84
EXOB3_F12	Unknown-121	1.83
HK0001_E07	Unknown-155	1.83
EXOB3_F04	Unknown-119	1.82
EST1-3A_D05	Unknown-70	1.82
EXOB1_E12	Serine protease-like protein-3	1.81
CA378736	Tyrosine-protein kinase BTK	1.81
CA353121	GRB2-related adaptor protein 2	1.81
utu01e12	Zinc finger protein 228	1.80
utu03g11	Hypothetical-fish 12	1.80
HK0001_D09	Cytochrome P450 2F1	1.79
EXOB1_A07	Unknown-79	1.79
EST1-3A_E07	Unknown-72	1.78

EXOB2_B05	Hypothetical-fish 27	1.78
CA342227	Protein tyrosine kinase 2 beta	1.77
HK0002_C03	Unknown-168	1.76
CA354833	Anti-silencing function 1B	1.76
HK0001_C04	Unknown-150	1.75
utu01h01	Unknown-239	1.75
utu01c03	Unknown-232	1.74
utu01b05	Gamma crystallin B-1	1.74
HK0003_E08	Unknown-194	1.74
EXOB4_B01	Transferrin	1.74
HK0003_F04	Unknown-197	1.73
HK0002_B04	Phospholemman precursor	1.73
HK0001_C06	Prostaglandin D synthase homolog	1.72
utu02f06	Unknown-244	1.72
EXOB1_E09	Transposase-57	1.71
HK0002_H08	TATA-binding protein associated factor 2N	1.71
HK0003_C03	Unknown-189	1.70
EXOB1_F10	Suppressor of SWI4 1 homolog	1.70
CA381440	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	1.69
CA359043	NAD-dependent deacetylase sirtuin 5	1.68
EXOB4_E01	Transposase-58	1.68
HK0003_D10	Hypothetical-fish 9	1.66
EXOB3_H08	Unknown-124	1.66
utu03f06	Chromosome segregation 1-like protein	1.65
HK0002_B06	Troponin T-3, fast skeletal muscle	1.65
CA342760	47 kDa heat shock protein-2	1.65
HK0002_B09	Transgelin	1.65
HK0003_D01	Troponin C-1, skeletal muscle	1.65
EST1-3A_F09	Unknown-73	1.65
CA372345	High density lipoprotein-binding protein	1.64
EXOB1_D10	Unknown-85	1.64
EXOB2_H10	Leukotriene A-4 hydrolase	1.63
CA363944	Nuclear factor NF-kappa-B	1.63
CA341859	Nuclear factor kappa-B, subunit 1	1.63
HK0002_C02	Chromosome-associated kinesin KIF4A	1.62
utu04d04	Actin, alpha skeletal 4	1.61
HK0001_D10	Coagulation factor X precursor	1.61
utu02h05	Unknown-247	1.61
CA386429	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	1.61
EXOB3_F11	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-18 kDa	1.61
EXOB3_E06	Unknown-115	1.60
CA365505	Retinoblastoma-like protein 1	1.59
est04c06	Unknown-54	1.59
HK0001_C09	Unknown-151	1.58
F_126	DNA fragmentation factor 40 kDa subunit	1.58
HK0003_B01	Unknown-185	1.58

HK0003_F03	Unknown-196	1.58
EXOB3_F07	Unknown-120	1.57
EST1-3A_G09	Unknown-75	1.57
EST1-3A_E05	Hpa repeat-2	1.57
P_8	Glutathione reductase, mitochondrial-1	1.55
EXOB2_A04	Hypothetical-fish 4	1.55
utu01d02	Unknown-235	1.54
est03e07	Unknown-43	1.54
HK0003_C12	Unknown-191	1.52
utu01b08	Unknown-231	1.52
utu01f04	Actin, alpha skeletal 2	1.52
HK0002_C06	Unknown-169	1.52
P_2	Catalase	1.51
EST1-3A_C12	Coronin-1C	1.50
HK0002_A12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 15 kDa subunit	1.50
ENH2_F04	Unknown-4	1.50
utu02d06	Unknown-243	1.50
HKT0001_A11	Hypothetical-fish 11	1.49
Hete0002_C06	Hypothetical protein FLJ46057	1.48
utu03h06	Unknown-260	1.48
P_57	RIB700	1.48
P_10	Aryl hydrocarbon receptor	1.47
CA359963	Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein	1.47
HK0001_D05	Ubiquitin-like protein SMT3A-2	1.47
est01h06	Unknown-21	1.47
CA373890	Heat shock protein HSP 90-beta-1	1.47
utu01b01	Unknown-230	1.46
EXOB1_C12	Hypothetical-fish 31	1.46
CA349577	Tyrosine-protein kinase FRK	1.46
HK0003_C02	Collagen alpha 1(I) chain-1	1.45
HK0002_G11	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	1.45
EXOB1_H11	Hypothetical-fish 18	1.45
EXOB2_F07	T-cell lymphoma associated antigen se33-1	1.45
HK0003_F07	Unknown-198	1.45
EXOB4_G09	Histone H14	1.44
EXOB3_H12	Unknown-125	1.44
EXOB3_H01	Matrix metalloproteinase-13	1.44
CA363935	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 2	1.44
est01a10	Unknown-9	1.43
KVkm2_H07	Unknown-226	1.43
P_17	Nitric oxide synthase 2 (NOS2)	1.42
utu02c12	Unknown-240	1.42
HK0003_C07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	1.42
CA346979	MAPK/ERK kinase kinase 5-1	1.42
CA384452	Heat shock protein HSP 90-alpha	1.42

CR_2	14-3-3 B2	1.42
CA367029	Rho guanine nucleotide exchange factor 5	1.41
est03c07	Ig kappa chain V-I region WEA	1.41
CA354056	Nucleolysin TIA-1	1.41
est03a04	Transposase-3	1.41
EXOB4_H07	Beta-galactosidase-related protein	1.41
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	1.41
CA357899	Death-associated protein kinase 3	1.40
HK0003_B09	Complement factor H-2	1.40
HK0001_F01	Complement factor H-1	1.40
est03h05	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-2	1.40
utu01c08	Unknown-233	1.40
KVkm2_F02	SAC2 suppressor of actin mutations 2-like	1.40
CA357217	Ubiquitin ligase protein CHFR	1.40
EXOB1_G05	Unknown-89	1.40
P_49	HIF	1.39
EXOB1_B07	PRPF39 protein	1.39
CA353088	Cold-inducible RNA-binding protein-1	1.38
est04b11	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-1	1.38
est04a05	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	1.38
HK0003_H12	Unknown-203	1.38
CA357761	Galectin-3	1.37
EST1-3A_F07	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	1.37
P_54	VEGF4	1.37
CA384555	B-cell-specific coactivator OBF-1	1.37
est01g12	Megakaryocyte stimulating factor	1.36
est03d06	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	1.35
est02h12	Unknown-33	1.35
est03g05	Unknown-46	1.35
HK0002_H09	Unknown-181	1.35
EST1-3A_C08	Translin	1.35
P_53	Aryl hydrocarbon receptor	1.35
CA387854	Apoptosis inhibitor 5	1.35
CA380121	Telomerase reverse transcriptase	1.34
utu01g11	Actin, alpha skeletal 3	1.34
CA369440	NAD(P)H menadione oxidoreductase 1, dioxin-inducible	1.34
EXOB2_H02	Serine/arginine repetitive matrix 1	1.34
HK0001_C08	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-3	1.33
CA380746	Agrin	1.33
CA386899	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	1.33
KVkm2_C10	Mothers against decapentaplegic homolog 7	1.33
est03e10	Putative inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	1.33
EXOB2_H11	Glucose-6-phosphatase	1.32
utu04g06	Unknown-270	1.32
EST1-3A_H08	Sp1 transcriptional activation factor	1.32
CA366393	Mannan-binding lectin serine protease 2-1	1.32

CA358548	Polyadenylate-binding protein 4	1.32
est04e06	Caspase recruitment domain protein 4	1.32
est01f03	Deltex protein 1	1.31
HK0003_F05	28S ribosomal protein S16, mitochondrial precursor	1.31
EXOB2_E04	Unknown-97	1.31
CA363983	Cell growth regulator with RING finger domain 1	1.31
HK0003_A04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-2	1.31
EXOB3_F10	Nuclease sensitive element binding protein 1-2	1.30
EXOB2_B06	Unknown-93	1.30
HK0002_F03	Unknown-176	1.30
CA378743	Fibronectin precursor	1.30
EXOB4_D12	Hpa repeat-1	1.30
EXOB4_C02	Unknown-127	1.30
CA347565	Semaphorin sem2	1.29
CA366892	Unc-112 related protein 2	1.29
EXOB3_C10	G1/S-specific cyclin E1	1.29
EXOB3_B08	Hypothetical-fish 5	1.28
CA371052	Cyclin A2	1.28
HK0001_B07	Ovarian fibroin-like substance-2	1.28
est01c11	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] mitochondrial	1.28
CA375569	Serine/threonine-protein kinase Chk1	1.28
HK0003_F02	Unknown-195	1.28
EXOB2_H07	WD-repeat containing protein Ciao 1	1.28
CA361232	Dual specificity protein phosphatase 5	1.28
CA346925	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 E	1.28
KVkm2_E07	Unknown-223	1.28
CA352454	Semaphorin 4D	1.28
EXOB3_A07	Unknown-105	1.27
CA387866	Arachidonate 5-lipoxygenase-2	1.27
est03b11	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-1	1.27
CA385359	Serum amyloid P-component-2	1.27
EXOB3_A05	WD-repeat containing protein Ciao 1	1.27
HK0003_D08	Unknown-193	1.26
CA373506	Selenoprotein P	1.26
EXOB1_H01	Hypothetical-fish 42	1.26
HKT0001_G11	Nucleoside diphosphate kinase 3	1.26
EST1-3A_A01	Cytosolic nonspecific dipeptidase	1.26
CR_7	14-3-3 G1	1.26
EST1-3A_C04	Splicing factor, arginine/serine-rich 8	1.25
HK0003_A10	Unknown-184	1.25
EXOB2_B11	D-dopachrome tautomerase	1.25
EXOB1_B09	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	1.25
CA346849	Unc-13 homolog C	1.24
CA361342	Orphan nuclear receptor NR4A2	1.24
CA383564	Coatomer epsilon subunit 1	1.24
EST1-3A_A07	Unknown-64	1.24

CA365208	C-C chemokine receptor type 6	1.23
KVkm2_C04	Unknown-221	1.23
HK0001_F04	Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	1.22
EXOB4_A07	T-complex protein 1, gamma subunit	1.22
CA371435	Vasopressin-activated calcium-mobilizing receptor	1.22
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	1.20
CA358266	T-cell, immune regulator 1, isoform a	1.20
CA362134	T-cell leukemia virus enhancer factor	1.20
est04a01	Unknown-50	1.20
CA388006	MAPK/ERK kinase 6	1.19
EST1-3A_D11	Unknown-71	1.19
CA359048	Ran-binding protein 2	1.19
CR_10	14-3-3 A1	1.19
utu02g04	Glycogen phosphorylase-1	1.19
EXOB1_E10	Unknown-87	1.19
CA365100	Delta-6 fatty acid desaturase	1.18
HK0001_F09	Unknown-157	1.17
CA356454	Guanine nucleotide exchange factor	1.17
HKT0001_D01	Unknown-205	1.16
CA382570	Mitogen-activated protein kinase 13	1.16
est04f03	Unknown-59	1.16
EXOB2_D09	GWSC6486	1.16
HK0001_E06	Transposase-2	1.15
EST1-3A_E12	Hypothetical-fish 3	1.15
HK0001_B10	Unknown-148	1.15
CA375099	BCL2-associated athanogene 2	1.14
EXOB2_F08	CDC10 protein homolog	1.14
est04e07	Splicing factor, arginine/serine-rich 12-1	1.13
CA351800	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	1.12
est02c03	Hypothetical UPF0193 protein EVG1	1.11
CA376350	Serum amyloid P-component-1	1.09
CA373759	Lymphocyte antigen 75	1.08
CA342145	RNA binding motif protein 4	-1.12
utu02h08	Glutathione S-transferase P-2	-1.15
est04e08	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	-1.16
utu03h03	Nuclear RNA helicase	-1.16
Hete0002_E07	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-Embryonic beta-type globin2	-1.16
est04d01	Nuclear antigen H731	-1.16
est04a08	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	-1.17
est04f12	Hypothetical-fish 2	-1.18
utu01a06	Unknown-229	-1.19
EXOB4_F04	Unknown-129	-1.20
CA370369	Heat shock protein cognate 40	-1.20
CA364325	Peroxisredoxin 6	-1.20
CA350741	Cdc45	-1.20

EXOB3_G03	60S acidic ribosomal protein P2	-1.20
EXOB3_G09	Ornithine decarboxylase antizyme-2	-1.20
CA349350	Serum/glucocorticoid-regulated kinase	-1.21
EXOB4_G02	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-2	-1.21
CA382425	B-cell translocation gene 1-2	-1.21
est01b05	Ribonuclease Ok2	-1.22
HK0002_E11	Calpain 2, large [catalytic] subunit precursor	-1.22
utu04b09	Complement factor H-3	-1.24
CA349860	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	-1.24
utu01h05	Troponin T-2, fast skeletal muscle	-1.24
CA345105	Aldehyde dehydrogenase 7	-1.24
utu04d02	Beta enolase-5	-1.24
P_46	ATPase 6	-1.24
CA384637	60 kDa heat shock protein-1	-1.25
est01g04	5-aminolevulinate synthase	-1.25
HK0003_H04	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit	-1.26
utu03g10	Cathepsin D	-1.26
est02a08	Lipin 2	-1.27
utu03c09	40S ribosomal protein S5	-1.27
est03f09	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit, mitochondrial precursor	-1.27
est04d04	Unknown-57	-1.28
CA373525	Cytochrome B-245 heavy chain-2	-1.28
est01e09	Seryl-tRNA synthetase	-1.29
est01e05	Glutathione S-transferase, mitochondrial	-1.29
EXOB2_C10	Red cell acid phosphatase 1	-1.29
HK0003_A12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-1	-1.29
HK0003_C11	Tropomyosin alpha 3 chain-1	-1.29
CA371001	Very-long-chain acyl-CoA synthetase	-1.30
est02e04	Membrane associated progesterone receptor component 2	-1.30
utu02b04	Troponin C-2, skeletal muscle	-1.30
utu04c11	Collagen alpha 1(I) chain-2	-1.30
CA380028	StAR-related lipid transfer protein 3	-1.30
CA387513	Connective tissue growth factor	-1.30
EXOB4_B11	40S ribosomal protein S30	-1.31
HK0001_D07	Unknown-153	-1.31
EXOB1_F01	60S ribosomal protein L35a-1	-1.31
EXOB4_F10	Transcobalamin I precursor	-1.32
CA350333	Ras activator RasGRP	-1.32
HK0002_B02	60S ribosomal protein L35a-2	-1.32
EXOB1_E04	Ubiquitin-like protein SMT3A-1	-1.32
est03h09	Unknown-49	-1.32
EST1-3A_F08	Heat shock protein HSP 90-beta-2	-1.33
EST1-3A_G07	COP9 signalosome complex subunit 6	-1.34
utu01f03	Unknown-238	-1.34
utu04b04	Hypothetical-fish 32	-1.35

est04a04	Midkine precursor	-1.35
HK0001_F05	Unknown-156	-1.35
KVkm2_F06	60S ribosomal protein L32-1	-1.35
est01g07	Proteasome activator complex subunit 2	-1.35
EXOB3_E08	Unknown-116	-1.36
EXOB1_D11	Dynein light chain 2, cytoplasmic	-1.36
EXOB2_E03	14-3-3B1	-1.36
CA371363	Glucose-6-phosphate isomerase-1	-1.37
HK0002_C07	60S ribosomal protein L17	-1.38
CA388461	NF-kappaB inhibitor alpha-3	-1.39
EXOB2_A09	60S ribosomal protein L5-2	-1.39
utu03d10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-5	-1.39
EXOB3_G04	Tyrosine-protein kinase HCK	-1.39
EXOB2_E01	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-2	-1.39
EXOB2_B04	Syntenin 1	-1.40
CA368961	78 kDa glucose-regulated protein precursor	-1.40
est02e09	Ig heavy chain V-III region HIL	-1.40
CA368739	BCL2-associated athanogene 1	-1.40
EXOB2_B01	Nuclease sensitive element binding protein 1-1	-1.41
EXOB4_A11	Tubulin alpha-ubiquitous chain	-1.41
est02f06	Unknown-29	-1.42
CA377672	Defender against cell death 1	-1.42
est04f07	Transposase-5	-1.42
est02d09	Basic leucine-zipper protein BZAP45-1	-1.43
est01c06	ADP-ribosylation factor 4	-1.43
EXOB2_D04	Xaa-Pro dipeptidase	-1.43
utu02a06	Collagen a3(I)-1	-1.43
HKT0001_C09	Malate dehydrogenase, mitochondrial-1	-1.44
CA345232	Similar to GTP-binding protein ragB	-1.44
HK0002_B10	B-cell receptor-associated protein BAP37-2	-1.44
EXOB4_E11	Annexin IV	-1.44
est02a09	Gap junction alpha-3 protein	-1.45
CA371300	Acid ceramidase precursor	-1.45
est04f08	Telomerase-binding protein p23-1	-1.46
CA381566	Programmed cell death protein 6	-1.46
HKT0001_H06	60S ribosomal protein L18	-1.46
KVkm2_D01	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	-1.46
CR_5	14-3-3 E1	-1.47
EXOB2_E10	Adenosine kinase 3	-1.47
est01e02	Thymosin beta-4-1	-1.47
est02c08	Nicotinamide riboside kinase 2	-1.48
EXOB3_A11	Unknown-107	-1.48
Hete0002_G11	Hypothetical-fish 23	-1.48
EXOB4_F08	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	-1.49
EXOB3_C04	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-1	-1.49
utu03g04	Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform	-1.50

est02f12	Proteasome subunit beta type 9 precursor	-1.50
EXOB2_C01	Cofilin, muscle isoform	-1.50
HST0001_C07	Unknown-213	-1.50
HKT0001_H07	60S ribosomal protein L37a	-1.50
EXOB4_B03	Ribosomal protein L36a-like-1	-1.50
CA379787	Cyclin G1	-1.50
EXOB1_C02	Unknown-83	-1.50
EST1-3A_C11	Cdk inhibitor p21 binding protein	-1.51
CA359569	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	-1.51
EXOB4_E04	Elongation factor 1-beta	-1.51
CA383795	Allograft inflammatory factor-1	-1.51
ENH2_B05	60S ribosomal protein L13a-acute pahse protein	-1.52
EXOB1_H12	NADH dehydrogenase subunit 4	-1.53
HK0003_G01	Creatine kinase, M-2	-1.54
utu03h02	6-phosphofructokinase	-1.54
utu01c12	Heat shock cognate 71 kDa protein	-1.54
HKT0001_G12	Malate dehydrogenase, mitochondrial-2	-1.55
EXOB3_C07	60S ribosomal protein L7a-2	-1.55
EXOB3_G06	40S ribosomal protein S15-1	-1.56
est04h11	Iodotyrosine dehalogenase protein	-1.56
HK0003_E07	Myosin light chain 2-1	-1.56
EST1-3A_B03	Hypothetical-fish 44	-1.56
CA347646	GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor	-1.56
F_122	ARP2/3 complex 21 kDa subunit	-1.57
EXOB3_F08	60S ribosomal protein L10-1	-1.57
utu02e04	ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor	-1.58
utu02g02	40S ribosomal protein S21	-1.58
utu04f06	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-2	-1.60
EST1-3A_A12	Unknown-65	-1.61
P_47	cardiac peptide B	-1.61
EXOB1_C08	Eukaryotic initiation factor 4A-I	-1.62
est03b03	Cathepsin C-2	-1.62
EXOB1_B04	Beta actin-1	-1.63
KVkm2_A01	Unknown-219	-1.63
EXOB4_G12	Unknown-131	-1.64
EXOB4_F03	Cathepsin S	-1.65
CA344428	Glutathione peroxidase 4	-1.65
utu03b02	Ribosomal protein L6-2	-1.66
ENH2_B12	Ribosomal protein L35-1	-1.68
CA362691	N-myc downstream regulated protein-1	-1.69
ENH2_B08	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	-1.70
utu02a10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-3	-1.73
CA367764	Calmodulin-1	-1.73
EXOB3_B01	Cathepsin C-3	-1.74
EST1-3A_H07	Cytochrome b-1	-1.74
ENH2_F10	ATP synthase lipid-binding protein	-1.75

EXOB2_G12	Tolloid-like protein (nephrosin)-2	-1.75
KVkm2_D08	60S ribosomal protein L18a	-1.77
EXOB3_H05	Glucose-6-phosphate isomerase-2	-1.77
EXOB3_D10	Na/K ATPase alpha subunit-1	-1.77
Hete0002_E10	40S ribosomal protein S8	-1.78
CA370661	Barrier-to-autointegration factor	-1.78
utu02h04	40S ribosomal protein S6	-1.79
HK0001_E10	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	-1.80
HK0002_G02	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial precursor	-1.82
HK0003_A03	Thymosin beta-4-2	-1.84
est02f08	Serine protease-like protein-1	-1.84
est01d09	Selenoprotein T-1	-1.84
EXOB1_E03	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	-1.85
utu02b09	60S acidic ribosomal protein P0	-1.86
utu04a06	Creatine kinase, M-3	-1.87
ENH2_A03	60S ribosomal protein L15	-1.87
EXOB4_C11	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I precursor	-1.88
EXOB2_H01	Unknown-100	-1.89
utu03e06	Parvalbumin alpha-3	-1.89
EXOB2_A07	Unknown-91	-1.90
HK0001_A12	40S ribosomal protein S2	-1.91
EXOB3_B12	Unknown-109	-1.92
EXOB1_A06	ADP,ATP carrier protein T2	-1.92
utu03h09	Unknown-262	-1.93
HK0002_G03	Histone H10	-1.93
EXOB2_D05	Matrix metalloproteinase 9-2	-1.93
est04f01	Polyposis locus protein 1	-1.95
utu01e09	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(1)	-1.96
EST1-3A_E06	60S ribosomal protein L5-1	-1.96
HK0001_H03	60S ribosomal protein L26	-2.00
utu03e08	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	-2.01
est01b09	Tolloid-like 2 protein (nephrosin)	-2.05
EXOB2_C03	60S ribosomal protein L10-1	-2.08
utu01g04	Cytochrome oxidase subunit III-2	-2.08
ENH2_E05	40S ribosomal protein S29	-2.08
CA362758	Cyclophilin-2	-2.09
utu01g10	Keratin, type II cytoskeletal 8	-2.09
KVkm2_A09	60S ribosomal protein L35	-2.10
utu01h02	Cytochrome oxidase subunit III-3	-2.11
EXOB2_G02	Profilin-1	-2.12
utu02h11	Ribosomal protein L13	-2.13
est04d09	60S ribosomal protein L37	-2.13
utu01d01	60S acidic ribosomal protein P1	-2.13
HK0001_H06	40S ribosomal protein S7	-2.14
est02g07	Ig mu heavy chain disease protein	-2.14

EXOB3_A08	Ribosomal protein L11	-2.15
CA348284	CCAAT/enhancer binding protein beta	-2.16
est02f05	Cytochrome c oxidase subunit III-4	-2.18
EXOB1_C04	40S ribosomal protein S14 (PRO2640)	-2.18
CA367787	Bax inhibitor-1	-2.20
ENH2_H06	Unknown-5	-2.21
est02g11	Cytochrome c oxidase subunit I-1	-2.21
EXOB2_A01	MHC class II invariant chain-like protein 1	-2.22
HK0002_D09	Prothymosin alpha	-2.24
Hete0002_G08	Ribosomal protein L35-3	-2.25
est03g08	Cathepsin Z precursor	-2.25
utu02a12	Brain protein 44-like protein	-2.28
est04c07	Ferritin heavy chain-2	-2.29
EXOB4_A08	Lysozyme g-3	-2.29
EXOB4_H06	Alpha-globin 1-3	-2.30
EXOB2_F12	60S ribosomal protein L7a-1	-2.30
utu04h11	Myosin light chain 2-2	-2.32
EST1-3A_G02	NADH dehydrogenase subunit 2	-2.32
CA370329	Lysozyme C precursor	-2.34
HK0002_F05	Myosin heavy chain, skeletal, fetal	-2.36
utu02b07	Cytochrome c oxidase subunit II	-2.36
EXOB4_F02	Ribosomal protein S12	-2.36
HK0002_B01	60S ribosomal protein L8	-2.41
EXOB1_H06	CC chemokine SCYA110-2	-2.42
Hete0002_A06	40S ribosomal protein S11	-2.44
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	-2.45
est04c05	Ferritin heavy chain-1	-2.48
EST1-3A_B08	Unknown-67	-2.53
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	-2.56
EST1-3A_E09	Cold inducible RNA binding protein-2	-2.57
EXOB4_C05	Galectin-1	-2.63
est02h09	Nonhistone chromosomal protein HMG-17	-2.64
EXOB4_F11	40S ribosomal protein S20	-2.70
EXOB3_E04	60S ribosomal protein L14	-2.73
est03a08	Cytochrome c-1	-2.84
EXOB3_F09	MHC class I heavy chain-1	-2.87
EXOB3_A09	Hyperosmotic glycine rich protein	-2.90
EXOB2_C05	Histone H2Ax	-2.91
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	-2.91
est03c04	Matrix metalloproteinase-9	-2.92
CA365039	CD63	-2.93
EXOB3_A04	Unknown-104	-2.93
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	-2.93
Hete0002_B08	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 3	-2.93
EXOB4_C10	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-1	-2.94
est03b12	Secretory granule proteoglycan core protein	-2.97

EXOB4_H05	Unknown-133	-3.00
ENH2_F03	Cathepsin K-1	-3.01
utu04g04	Ribosomal protein L36a-like-2	-3.04
est01e10	Tolloid-like protein (nephrosin)-1	-3.11
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	-3.11
est04b10	Cytochrome P450 2K4-1	-3.17
utu04g03	Alpha 2 type I collagen-2	-3.20
utu01a03	40S ribosomal protein S3-1	-3.22
HKT0001_H03	Microtubule-associated protein RP/EB	-3.24
utu04g05	40S ribosomal protein S9-3	-3.27
EST1-3A_D03	60S ribosomal protein L23	-3.32
EXOB1_H08	ADP,ATP carrier protein 3	-3.43
EST1-3A_F05	Heat shock 70 kDa protein 1	-3.54
EXOB1_A03	Metallothionein A	-3.55
EXOB2_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	-3.55
HST0001_C03	Plasminogen precursor-2	-3.56
EXOB3_E01	Na/K ATPase alpha subunit-2	-3.76
HK0001_D01	Ubiquitin	-3.83
HK0002_B07	Heat shock 70kDa protein 8	-4.24
Hete0002_A07	Metallothionein-IL	-4.50
utu02a08	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-2	-4.73
est02a11	Ig kappa chain V-IV region B17-2	-4.84
utu02c02	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-1	-4.97
utu04f11	40S ribosomal protein S3-2	-6.00
est03c10	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	-7.41
est01c04	Unknown-11	-8.11
HK0002_D07	Unknown-172	-8.74

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el riñón cefálico de truchas sometidas a la forma activa del virus IHN a las 72 horas de la infección.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	IHNV FC
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	15.48
est02a11	Ig kappa chain V-IV region B17-2	10.06
EXOB4_D02	Beta actin-2	9.60
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	9.58
HK0003_A03	Thymosin beta-4-2	7.56
est02f08	Serine protease-like protein-1	6.41
est02h09	Nonhistone chromosomal protein HMG-17	6.00
est03c04	Matrix metalloproteinase-9	5.91
est01e06	Coronin-1B	5.51
est02g07	Ig mu heavy chain disease protein	5.44
EXOB4_H05	Unknown-133	5.24
est01e02	Thymosin beta-4-1	5.17
EXOB3_D02	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	4.60
EXOB2_A01	MHC class II invariant chain-like protein 1	4.44
EXOB3_H01	Matrix metalloproteinase-13	4.34
EXOB1_A05	Ribosomal protein L6-1	4.33
EST1-3A_F05	Heat shock 70 kDa protein 1	4.27
EXOB2_G02	Profilin-1	4.00
HKT0001_H03	Microtubule-associated protein RP/EB	3.95
CA370329	Lysozyme C precursor	3.91
est01b09	Tolloid-like 2 protein (nephrosin)	3.84
utu02a08	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-2	3.84
est02f04	Tubulin alpha-3 chain	3.83
est04c05	Ferritin heavy chain-1	3.83
EXOB3_A09	Hyperosmotic glycine rich protein	3.79
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	3.75
EXOB4_F11	40S ribosomal protein S20	3.73
EXOB2_G12	Tolloid-like protein (nephrosin)-2	3.70
est01c03	Histone H33-3	3.65
utu04g05	40S ribosomal protein S9-3	3.58
Hete0002_E10	40S ribosomal protein S8	3.48
EST1-3A_D03	60S ribosomal protein L23	3.39
EXOB1_H08	ADP,ATP carrier protein 3	3.35
EXOB2_D05	Matrix metalloproteinase 9-2	3.20
est04c07	Ferritin heavy chain-2	3.19
EXOB3_B12	Unknown-109	3.09
utu01a03	40S ribosomal protein S3-1	3.04

EXOB3_D08	Histone H33-2	3.01
est01e10	Tolloid-like protein (nephrosin)-1	2.98
ENH2_H06	Unknown-5	2.97
EST1-3A_E06	60S ribosomal protein L5-1	2.97
Hete0002_B08	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 3	2.96
utu04g04	Ribosomal protein L36a-like-2	2.93
HK0002_B01	60S ribosomal protein L8	2.89
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	2.87
EXOB1_H06	CC chemokine SCYA110-2	2.84
EST1-3A_B03	Hypothetical-fish 44	2.82
utu03g02	Heat shock cognate 70 kDa	2.81
CA371363	Glucose-6-phosphate isomerase-1	2.81
EXOB4_F03	Cathepsin S	2.80
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	2.79
est03b12	Secretory granule proteoglycan core protein	2.77
CA358998	Cysteine-rich protein 1	2.75
EXOB2_D06	NADH dehydrogenase subunit 5-1	2.74
HK0002_B07	Heat shock 70kDa protein 8	2.70
Hete0002_A06	40S ribosomal protein S11	2.70
utu01d01	60S acidic ribosomal protein P1	2.70
ENH2_A03	60S ribosomal protein L15	2.67
CA362758	Cyclophilin-2	2.61
HK0001_A12	40S ribosomal protein S2	2.54
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	2.52
EXOB3_G05	Actin, cytoplasmic 2	2.52
utu02h04	40S ribosomal protein S6	2.52
utu04f11	40S ribosomal protein S3-2	2.51
est04g12	Envelope protein	2.49
EST1-3A_E09	Cold inducible RNA binding protein-2	2.42
KVkm2_D08	60S ribosomal protein L18a	2.41
EXOB4_D12	Hpa repeat-1	2.41
EST1-3A_F10	14-3-3 B1-like	2.39
CA373525	Cytochrome B-245 heavy chain-2	2.39
KVkm2_G11	60S ribosomal protein L7	2.39
KVkm2_A01	Unknown-219	2.38
est03h05	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-2	2.35
KVkm2_F01	Unknown-224	2.35
utu01g04	Cytochrome oxidase subunit III-2	2.33
EST1-3A_F08	Heat shock protein HSP 90-beta-2	2.33
EXOB3_C04	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-1	2.27
EXOB1_C04	40S ribosomal protein S14 (PRO2640)	2.25
est03g08	Cathepsin Z precursor	2.24
est01c04	Unknown-11	2.22

utu03c12	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-4	2.20
est03f08	Transaldolase	2.19
utu02b08	High mobility group protein 2	2.19
KVkm2_A09	60S ribosomal protein L35	2.11
HK0001_H03	60S ribosomal protein L26	2.11
est02a02	Fibrillarin	2.10
KVkm2_G04	60S ribosomal protein L32-3	2.09
est02f06	Unknown-29	2.09
est02g11	Cytochrome c oxidase subunit I-1	2.08
est04a08	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	2.08
EXOB4_F02	Ribosomal protein S12	2.04
utu04g03	Alpha 2 type I collagen-2	2.02
EXOB2_C01	Cofilin, muscle isoform	2.01
EXOB2_H01	Unknown-100	1.98
KVkm2_F06	60S ribosomal protein L32-1	1.98
utu03b02	Ribosomal protein L6-2	1.97
est04e05	Glutathione peroxidase-gastrointestinal	1.94
EXOB3_E04	60S ribosomal protein L14	1.94
EXOB1_A07	Unknown-79	1.93
est04f07	Transposase-5	1.93
EXOB3_D12	Unknown-113	1.91
EXOB3_A08	Ribosomal protein L11	1.91
utu03e05	Unknown-258	1.90
EXOB4_C10	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-1	1.90
EXOB4_A11	Tubulin alpha-ubiquitous chain	1.89
est04c01	ARP2/3 complex 34 kDa subunit	1.89
EXOB2_A11	Tubulin alpha-1 chain	1.88
EXOB4_C05	Galectin-1	1.87
HK0002_D07	Unknown-172	1.87
est02f09	Unknown-30	1.86
KVkm2_E02	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-2	1.86
HK0001_H06	40S ribosomal protein S7	1.85
est02b08	Peroxiredoxin 1-2	1.85
EXOB2_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	1.84
utu02h11	Ribosomal protein L13	1.84
utu02b09	60S acidic ribosomal protein P0	1.83
EXOB3_H05	Glucose-6-phosphate isomerase-2	1.81
ENH2_E05	40S ribosomal protein S29	1.81
est04f01	Polyposis locus protein 1	1.81
EXOB4_D05	Hypothetical-fish 19	1.80
Hete0002_F02	Cytokeratin 19	1.80
EXOB2_G10	Histone H33-1	1.78
KVkm2_G01	60S ribosomal protein L32-2	1.78

EXOB2_C05	Histone H2Ax	1.77
CA348284	CCAAT/enhancer binding protein beta	1.76
EXOB2_B01	Nuclease sensitive element binding protein 1-1	1.75
CA351800	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	1.75
CA372345	High density lipoprotein-binding protein	1.74
EXOB1_H05	Transposase-6	1.73
EXOB3_E03	Unknown-114	1.72
EXOB4_C11	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I precursor	1.71
EXOB1_B04	Beta actin-1	1.71
HK0001_D01	Ubiquitin	1.68
CA364941	Annexin A1-1	1.68
Hete0002_E09	Transposase-56	1.67
EXOB2_C03	60S ribosomal protein L10-1	1.66
utu01h02	Cytochrome oxidase subunit III-3	1.64
CA365039	CD63	1.64
EXOB2_F12	60S ribosomal protein L7a-1	1.63
utu01g10	Keratin, type II cytoskeletal 8	1.61
CA345232	Similar to GTP-binding protein ragB	1.60
Hete0002_G11	Hypothetical-fish 23	1.59
CA368961	78 kDa glucose-regulated protein precursor	1.58
est04d09	60S ribosomal protein L37	1.57
Hete0002_E07	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-Embryonic beta-type glo- bin2	1.55
est04b10	Cytochrome P450 2K4-1	1.55
est02f12	Proteasome subunit beta type 9 precursor	1.54
EXOB2_B12	RING finger protein 103	1.54
CA380028	StAR-related lipid transfer protein 3	1.53
utu02a12	Brain protein 44-like protein	1.53
CA383564	Coatomer epsilon subunit 1	1.53
utu03d10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-5	1.53
EST1-3A_D05	Unknown-70	1.52
est03h08	Beta-hexosaminidase alpha chain precursor	1.52
EXOB1_H12	NADH dehydrogenase subunit 4	1.51
est03a11	ReO_6-1	1.50
EXOB4_G09	Histone H14	1.49
CA367764	Calmodulin-1	1.49
EXOB3_C07	60S ribosomal protein L7a-2	1.49
utu03g08	Unknown-259	1.47
est01c08	14-3-3C2	1.47
P_46	ATPase 6	1.47
EXOB1_G12	Thioredoxin	1.46
CA350741	Cdc45	1.46
utu02b07	Cytochrome c oxidase subunit II	1.45

est01c06	ADP-ribosylation factor 4	1.45
est02f05	Cytochrome c oxidase subunit III-4	1.45
utu02c03	Protein phosphatase 2C gamma isoform	1.45
CR_1	14-3-3 B1	1.44
CA383222	G2/mitotic-specific cyclin B2	1.44
utu01g11	Actin, alpha skeletal 3	1.42
EST1-3A_B08	Unknown-67	1.41
CA354559	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	1.40
EXOB3_G04	Tyrosine-protein kinase HCK	1.40
KVkm2_D01	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	1.38
EXOB2_C10	Red cell acid phosphatase 1	1.38
EXOB1_E03	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	1.38
EXOB1_E04	Ubiquitin-like protein SMT3A-1	1.38
CA349380	LPS binding protein	1.37
est04a04	Midkine precursor	1.37
CA347646	GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor	1.36
CA379787	Cyclin G1	1.36
ENH2_B08	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	1.36
EXOB2_E03	14-3-3B1	1.35
est03b11	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-1	1.34
EXOB2_B04	Syntenin 1	1.34
F_122	ARP2/3 complex 21 kDa subunit	1.33
est01g09	Synapse associated protein	1.33
KVkm2_A12	Unknown-220	1.31
CA367787	Bax inhibitor-1	1.30
EXOB4_A08	Lysozyme g-3	1.29
CA384637	60 kDa heat shock protein-1	1.29
est03e10	Putative inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	1.29
utu01f04	Actin, alpha skeletal 2	1.29
EXOB2_H12	Coatmer epsilon subunit 2	1.27
utu04d02	Beta enolase-5	1.26
CA354715	Membrane copper amine oxidase	1.25
CA361101	Regulator of G-protein signaling 1-2	1.25
CR_5	14-3-3 E1	1.25
CA382570	Mitogen-activated protein kinase 13	1.24
utu02e04	ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor	1.24
EXOB2_E10	Adenosine kinase 3	1.24
est01d09	Selenoprotein T-1	1.23
EXOB2_D10	Unknown-96	1.22
EXOB3_A11	Unknown-107	1.21
est03c07	Ig kappa chain V-I region WEA	1.21
HK0002_G02	Creatine kinase, sarcomeric mitochondrial precursor	1.20
EST1-3A_F12	Transposase-59	1.20

EXOB2_E01	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-2	1.19
EST1-3A_G09	Unknown-75	1.18
CA384587	Transcription factor Dp-1	1.13
HK0003_A04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-2	-1.13
CA359761	PTB domain adaptor protein CED-6	-1.14
HK0002_A12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 15 kDa subunit	-1.15
CA357761	Galectin-3	-1.16
EXOB3_D06	Unknown-112	-1.18
est04h03	Unknown-62	-1.18
HK0003_G10	Unknown-202	-1.21
utu02d01	Unknown-241	-1.21
CA359487	Protein phosphatase methylesterase 1	-1.22
EXOB1_H02	Triosephosphate isomerase	-1.22
EXOB2_C07	Splicing factor, arginine/serine-rich 12-2	-1.22
EXOB2_B05	Hypothetical-fish 27	-1.23
EXOB2_H02	Serine/arginine repetitive matrix 1	-1.23
HK0002_C04	Apolipoprotein E-2	-1.23
CA351992	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein alpha-2	-1.24
HK0003_F05	28S ribosomal protein S16, mitochondrial precursor	-1.25
CA342691	Lanosterol synthase	-1.25
HK0001_D07	Unknown-153	-1.26
CA359906	Cytochrome P450 4F3	-1.27
CA363870	Thioredoxin-like protein 4A	-1.27
EST1-3A_D01	Tissue factor pathway inhibitor 2 precursor	-1.27
utu04a06	Creatine kinase, M-3	-1.27
CA363944	Nuclear factor NF-kappa-B	-1.28
EXOB4_D09	Hypothetical-fish 7	-1.28
HK0001_B04	TGF beta-inducible nuclear protein 1	-1.28
HK0002_H01	Unknown-178	-1.28
CA376709	Protein activator of the interferon-induced protein kinase	-1.29
HK0002_H04	Unknown-179	-1.29
est04c06	Unknown-54	-1.31
	Full-length cDNA clone CS0DC006YH13 of Neuroblastoma of	
HK0001_A10	Homo sapiens	-1.31
HK0002_C02	Chromosome-associated kinesin KIF4A	-1.31
EXOB1_F08	Unknown-88	-1.31
EXOB3_E09	N-myc downstream regulated protein-2	-1.32
EXOB1_D08	Ribosome biogenesis protein Nop10	-1.32
EXOB2_F01	Proteasome subunit alpha type 6	-1.32
CA380121	Telomerase reverse transcriptase	-1.33
HK0001_C01	Dermatan-4-sulfotransferase-1-2	-1.33
HK0003_H10	Brain protein 44	-1.33
HK0003_C12	Unknown-191	-1.34

EXOB1_G04	Splicing factor 3B subunit 1	-1.34
HK0003_C10	Over-expressed breast tumor protein-like	-1.35
CA373506	Selenoprotein P	-1.35
HK0001_D10	Coagulation factor X precursor	-1.35
HST0001_C03	Plasminogen precursor-2	-1.35
EXOB3_F04	Unknown-119	-1.35
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	-1.35
CA365505	Retinoblastoma-like protein 1	-1.36
CA363645	Frizzled 8 precursor	-1.37
HK0001_C04	Unknown-150	-1.37
EXOB2_A06	Nucleolar protein Nop56-2	-1.37
EST1-3A_B09	Lysozyme g-2	-1.38
HK0003_F10	Unknown-200	-1.38
CA348539	Serine/threonine-protein kinase 17A	-1.38
utu02a06	Collagen a3(I)-1	-1.38
CA385359	Serum amyloid P-component-2	-1.39
utu03g11	Hypothetical-fish 12	-1.39
HK0001_C06	Prostaglandin D synthase homolog	-1.39
EST1-3A_H06	Transcription factor jun-B-1	-1.39
EST1-3A_A10	Septin 7 (CDC10 protein homolog)	-1.39
EXOB1_G05	Unknown-89	-1.39
CR_8	14-3-3 G2	-1.40
HK0001_D05	Ubiquitin-like protein SMT3A-2	-1.40
EST1-3A_A01	Cytosolic nonspecific dipeptidase	-1.40
HK0003_G01	Creatine kinase, M-2	-1.40
HK0001_C09	Unknown-151	-1.41
EST1-3A_F07	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	-1.41
CA359963	Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein	-1.42
CA352381	Protein kinase C, alpha type	-1.42
HK0001_G05	Hypothetical-fish 26	-1.43
EXOB3_C03	Unknown-110	-1.43
HK0003_E04	Hypothetical-fish 10	-1.43
utu04g06	Unknown-270	-1.44
EST1-3A_H12	Hypothetical-fish 39	-1.44
CA368411	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, isoform 1	-1.44
utu03e11	Troponin I, slow skeletal muscle	-1.45
HK0003_B08	Unknown-186	-1.46
HK0001_B10	Unknown-148	-1.48
EXOB4_C02	Unknown-127	-1.48
HK0001_F09	Unknown-157	-1.48
HK0003_D08	Unknown-193	-1.48
EXOB3_G08	Fatty acid-binding protein-1	-1.49

EXOB1_F01	60S ribosomal protein L35a-1	-1.49
EST1-3A_C04	Splicing factor, arginine/serine-rich 8	-1.49
EXOB4_G02	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-2	-1.49
HK0001_F03	HIRA-interacting protein 5	-1.49
CA343473	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	-1.50
utu01b01	Unknown-230	-1.50
est01f09	High-mobility group protein 2-like 1	-1.50
utu03d06	Retinoic acid receptor responder 3-2	-1.51
EXOB2_A02	Nucleoside diphosphate kinase, mitochondrial precursor	-1.51
CA375106	Protein-tyrosine sulfotransferase 1	-1.51
est02f02	Unknown-28	-1.52
ENH2_D07	Ribosomal protein L35-2	-1.52
KVkm2_E07	Unknown-223	-1.53
utu02c12	Unknown-240	-1.54
EXOB2_A10	Unknown-92	-1.54
CA364325	Peroxiredoxin 6	-1.54
HK0003_E01	Plasminogen precursor-1	-1.54
utu01d08	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2B	-1.55
est01c11	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] mitochondrial	-1.55
EXOB3_G02	Organic anion transporter	-1.56
utu01b08	Unknown-231	-1.56
HK0003_H12	Unknown-203	-1.56
CA352454	Semaphorin 4D	-1.57
HK0001_E07	Unknown-155	-1.57
CA357899	Death-associated protein kinase 3	-1.60
utu02c02	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-1	-1.61
HK0001_G11	Unknown-161	-1.61
CA387146	Mannosidase alpha	-1.61
CA366564	Huntingtin	-1.62
CA373295	Apoptosis response zinc finger protein	-1.63
HK0003_F02	Unknown-195	-1.64
HK0001_G12	Quinone oxidoreductase	-1.64
EST1-3A_F09	Unknown-73	-1.65
EXOB4_B01	Transferrin	-1.65
utu04e07	60S ribosomal protein L39	-1.66
CA386899	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	-1.66
CA376117	CD231	-1.66
CA381440	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	-1.67
HK0002_B08	Unknown-166	-1.67
HK0001_F02	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1.67
HK0001_H05	Angiotensin I converting enzyme	-1.68
HK0001_C02	Unknown-149	-1.68
est01a10	Unknown-9	-1.68

est01e08	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	-1.70
CA363723	Cyclin C	-1.71
CA354833	Anti-silencing function 1B	-1.71
est02b12	Dermatan-4-sulfotransferase-1-1	-1.72
CR_11	DNA fragmentation factor alpha subunit	-1.72
HK0002_C06	Unknown-169	-1.73
HK0001_D09	Cytochrome P450 2F1	-1.73
EXOB1_A01	Unknown-78	-1.76
EXOB1_F10	Suppressor of SWI4 1 homolog	-1.76
utu03f06	Chromosome segregation 1-like protein	-1.76
P_8	Glutathione reductase, mitochondrial-1	-1.77
P_9	Glutathione S-transferase P	-1.78
HK0002_A04	Unknown-164	-1.79
CA349577	Tyrosine-protein kinase FRK	-1.79
CA378736	Tyrosine-protein kinase BTK	-1.80
EST1-3A_H10	Cytohesin binding protein HE	-1.80
HK0001_C12	Unknown-152	-1.82
est03g09	UDP-glucose 4-epimerase	-1.83
EXOB3_F07	Unknown-120	-1.83
EXOB3_F11	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-18 kDa	-1.84
est04b11	Galectin-9 (VHSV-induced protein)-1	-1.85
HKT0001_A11	Hypothetical-fish 11	-1.85
P_17	Nitric oxide synthase 2 (NOS2)	-1.86
EXOB2_D01	Proteasome subunit alpha type 3	-1.90
HK0003_C07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	-1.92
CA346979	MAPK/ERK kinase kinase 5-1	-1.92
HK0003_E07	Myosin light chain 2-1	-1.93
EXOB4_D10	Prosaposin	-1.93
EXOB3_G09	Ornithine decarboxylase antizyme-2	-1.95
CA342227	Protein tyrosine kinase 2 beta	-1.96
CA342760	47 kDa heat shock protein-2	-1.99
CA358548	Polyadenylate-binding protein 4	-2.04
HST0001_F09	Alpha-1-microglobulin/bikunin-2	-2.06
EXOB4_A10	Unknown-126	-2.07
KVkm2_F02	SAC2 suppressor of actin mutations 2-like	-2.10
CA363935	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 2	-2.10
EST1-3A_E07	Unknown-72	-2.10
P_3	Epididymal secretory glutathione peroxidase	-2.10
HK0003_D02	Unknown-192	-2.25
utu04f03	NB thymosin beta	-2.27
P_10	Aryl hydrocarbon receptor	-2.32
CA363978	Inhibitor of kappaB kinase gamma	-2.36
HK0002_D04	Unknown-171	-2.39

CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	-2.43
EXOB4_E08	Cytochrome c oxidase subunit VIIa-related	-2.47
HK0001_E11	Hypothetical-fish 43	-2.47
CA355893	DnaJ homolog subfamily B member 2	-2.50
CA363762	Cell death activator CIDE-B	-2.53
Hete0002_C06	Hypothetical protein FLJ46057	-2.55
HK0003_A02	Cation-transporting ATPase	-2.55
P_7	Peptide methionine sulfoxide reductase	-2.58
EXOB3_H07	Hypothetical-fish 6	-2.58
EXOB3_A06	Programmed cell death 10	-2.60
HK0002_C03	Unknown-168	-2.72
HK0002_H06	Unknown-180	-2.86
CA342204	TNF receptor associated factor 3	-2.89
EXOB3_G01	Unknown-122	-2.98
EXOB1_F02	Transcription regulator protein BACH1	-2.99
KVkm2_H11	Unknown-228	-3.01
EXOB3_F09	MHC class I heavy chain-1	-3.02
HK0003_G05	Unknown-201	-3.04
CA351392	Guanine nucleotide exchange factor DBS	-3.13
P_4	Myeloperoxidase	-3.19
est01a07	Unknown-7	-3.44
est03e08	Hypothetical-fish 36	-3.60
CA366489	Multidrug resistance protein 3-1	-3.78
CA378435	Protein phosphatase 2C delta isoform	-3.87
CA357173	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 2-2	-3.93
P_19	glucocorticoid receptor (GCR)	-4.24
CA358107	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	-4.25
EXOB4_B09	Macrophage receptor MARCO	-4.42
EXOB1_B02	Hypothetical-fish 34	-4.48
HK0002_G04	Fructose-bisphosphate aldolase A	-4.80
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	-4.93
EST1-3A_H03	Unknown-76	-5.18
est03f04	F-box/WD-repeat protein 11	-5.28
CA368716	Membrane-bound transcription factor site 2 protease	-5.31
CA384029	Chromobox protein homolog 4	-5.47
EXOB3_A01	Unknown-103	-5.54
EXOB4_H01	Unknown-132	-5.99
EST1-3A_H05	Adenosine deaminase 3	-6.23
EXOB1_B03	Unknown-81	-6.29
HK0001_H12	Unknown-162	-6.44
HK0002_H10	Unknown-182	-6.59
est04c02	Unknown-53	-6.62
EXOB4_E09	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	-6.63

Genes expresados en la trucha (riñón, IHNV, 72h)

est02b02	PEST-containing nuclear protein	-6.85
est04f10	Hypothetical-fish 1	-7.01
EST1-3A_G03	Unknown-74	-7.55
CA378361	Ubiquitin ligase SIAH1	-7.82
EXOB2_G11	Stanniocalcin-1	-9.69

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el riñón cefálico de truchas expuestas a LPS durante 24 horas.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	LPS FC
est03d11	Unknown-42	8.42
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	4.54
EXOB1_H05	Transposase-6	3.16
EXOB2_D06	NADH dehydrogenase subunit 5-1	2.76
est02g07	Ig mu heavy chain disease protein	2.73
est02a11	Ig kappa chain V-IV region B17-2	2.71
EST1-3A_G09	Unknown-75	2.32
CA383564	Coatmer epsilon subunit 1	2.25
est04e04	MHC class 1b antigen	2.24
EST1-3A_F12	Transposase-59	2.12
HK0002_D09	Prothymosin alpha	2.03
est02e09	Ig heavy chain V-III region HIL	2.00
EXOB4_D12	Hpa repeat-1	1.99
HK0003_E06	DnaJ homolog subfamily C member 9	1.96
HK0003_E08	Unknown-194	1.90
est04g12	Envelope protein	1.90
HK0002_H08	TATA-binding protein associated factor 2N	1.79
CA387665	Cytochrome P450 2J2	1.79
est01h01	Unknown-19	1.76
est03b11	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-1	1.68
utu04d10	Unknown-268	1.65
HK0003_F03	Unknown-196	1.64
EXOB4_E01	Transposase-58	1.62
P_4	Myeloperoxidase	1.55
EXOB1_A07	Unknown-79	1.55
P_53	Aryl hydrocarbon receptor	1.53
EXOB3_H10	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	1.50
est04c10	Unknown-56	1.47
EXOB2_E02	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein	1.44
est03a01	Methyl-CpG binding protein 3b	1.39
CA373890	Heat shock protein HSP 90-beta-1	1.39
utu03d08	Reverse transcriptase	-1.40
EXOB3_C04	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-1	-1.72
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	-1.86
utu03c12	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-4	-1.99
EXOB2_A01	MHC class II invariant chain-like protein 1	-2.02
CA364941	Annexin A1-1	-2.08
CA363438	Interferon-induced protein 44-3	-2.14
EXOB2_D07	Ependymin related protein-1	-2.28
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	-2.42

EST1-3A_D08	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-6	-2.49
EXOB1_H06	CC chemokine SCYA110-2	-2.55
EST1-3A_H06	Transcription factor jun-B-1	-2.89
est03f08	Transaldolase	-2.91
EXOB2_H01	Unknown-100	-2.91
est02f08	Serine protease-like protein-1	-2.97
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	-3.96
CA371363	Glucose-6-phosphate isomerase-1	-4.35
HST0001_D08	Beta-globin	-4.46
est04e05	Glutathione peroxidase-gastrointestinal	-4.54
est01c04	Unknown-11	-6.17
EXOB2_D05	Matrix metalloproteinase 9-2	-6.63
est01e10	Tolloid-like protein (nephrosin)-1	-6.69
CA348284	CCAAT/enhancer binding protein beta	-7.36
est03c04	Matrix metalloproteinase-9	-7.44
EXOB2_G12	Tolloid-like protein (nephrosin)-2	-9.26
EST1-3A_B03	Hypothetical-fish 44	-14.01
EXOB3_H01	Matrix metalloproteinase-13	-17.18

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el riñón cefálico de truchas expuestas a LPS durante 72 horas.Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	LPS FC
est03d11	Unknown-42	3.81
est03e02	Hypothetical-fish 15	3.39
est04e04	MHC class 1b antigen	3.17
EXOB2_H06	High affinity immunoglobulin epsilon receptor alpha	2.73
CA387837	Nucleolar protein NAP57	2.27
EXOB4_C11	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I precursor	2.15
ENH2_F09	Beta-2-microglobulin-1	1.99
EXOB2_A09	60S ribosomal protein L5-2	1.80
HST0001_C05	Cell division control protein 42 homolog	1.72
EXOB3_F09	MHC class I heavy chain-1	1.71
est01g04	5-aminolevulinate synthase	1.58
CA371001	Very-long-chain acyl-CoA synthetase	1.48
CA384637	60 kDa heat shock protein-1	1.47
CA383222	G2/mitotic-specific cyclin B2	1.42
CA359569	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1.21
utu01g04	Cytochrome oxidase subunit III-2	-1.36
est01a03	Unknown-6	-1.57
utu01g11	Actin, alpha skeletal 3	-1.64
CA371363	Glucose-6-phosphate isomerase-1	-1.68
utu03e05	Unknown-258	-1.75
CA364941	Annexin A1-1	-1.78
EXOB4_D02	Beta actin-2	-1.83
EXOB4_D05	Hypothetical-fish 19	-1.86
CA353121	GRB2-related adaptor protein 2	-1.89
CR_5	14-3-3 E1	-1.90
est04c10	Unknown-56	-2.04
CA367764	Calmodulin-1	-2.13
est03c04	Matrix metalloproteinase-9	-2.21
HKT0001_E07	Actin, alpha skeletal 1	-2.28
est01f03	Deltex protein 1	-2.37
est01e02	Thymosin beta-4-1	-2.73
EXOB3_G05	Actin, cytoplasmic 2	-2.78
EST1-3A_D08	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-6	-3.14
EST1-3A_B03	Hypothetical-fish 44	-3.16
CA348284	CCAAT/enhancer binding protein beta	-3.22
CA374193	Chemokine receptor CXCR4	-3.71
utu04f08	Actin, alpha skeletal 5	-3.81
KVkm2_F01	Unknown-224	-4.21
est01f01	DNA-binding protein inhibitor ID-1	-4.64
est02f08	Serine protease-like protein-1	-4.64

Genes expresados en la trucha (riñón, LPS, 72h)

EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	-5.52
EXOB3_H01	Matrix metalloproteinase-13	-5.88
EXOB2_H01	Unknown-100	-12.08
est01e10	Tolloid-like protein (nephrosin)-1	-12.97
EXOB2_G12	Tolloid-like protein (nephrosin)-2	-13.47

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el hígado de truchas expuestas a LPS durante 24 horas.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	LPS FC
EXOB4_D02	Beta actin-2	1.95
HK0001_G11	Unknown-161	1.92
CA381199	94 kDa glucose-regulated protein	1.65
ENH2_B05	60S ribosomal protein L13a-acute pahse protein	1.64
EST1-3A_F08	Heat shock protein HSP 90-beta-2	1.58
Hete0002_B08	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 3	1.54
ENH2_C10	Collagen alpha 1(VIII) chain precursor	1.53
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	1.53
CA370329	Lysozyme C precursor	1.52
HK0003_B09	Complement factor H-2	1.43
EST1-3A_B08	Unknown-67	1.43
EXOB3_C12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit, mitochondrial precursor	1.40
Hete0002_H06	Ribosomal protein S2	1.39
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	1.36
CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	1.32
est01b05	Ribonuclease Ok2	1.31
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	1.31
utu02e12	Periostin precursor	1.31
EXOB3_A08	Ribosomal protein L11	1.30
est04c05	Ferritin heavy chain-1	1.30
utu04g04	Ribosomal protein L36a-like-2	1.30
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	1.29
EXOB4_F02	Ribosomal protein S12	1.27
MOGE_17		1.27
utu01d07	Unknown-236	1.25
utu03g02	Heat shock cognate 70 kDa	1.25
HK0002_H10	Unknown-182	1.24
EXOB1_C02	Unknown-83	1.23
HK0002_C07	60S ribosomal protein L17	1.23
utu04g05	40S ribosomal protein S9-3	1.22
HK0003_H04	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit	1.19
est04c02	Unknown-53	1.19
HK0003_H02	Cathepsin L2	1.18
EST1-3A_C06	Hypothetical-fish 38	1.18
HK0001_D07	Unknown-153	1.17
CA366892	Unc-112 related protein 2	1.16
EXOB3_E10	Unknown-117	1.12
HK0003_G05	Unknown-201	1.10
utu01e12	Zinc finger protein 228	-1.14

HK0002_H04	Unknown-179	-1.14
utu04e11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 precursor	-1.14
est01g08	Unknown-17	-1.16
EXOB3_C04	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-1	-1.16
EXOB1_C08	Eukaryotic initiation factor 4A-I	-1.18
EXOB2_E01	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-2	-1.18
EXOB3_H05	Glucose-6-phosphate isomerase-2	-1.18
CA376574	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1	-1.19
utu01d02	Unknown-235	-1.19
ENH2_H06	Unknown-5	-1.19
EXOB3_H12	Unknown-125	-1.20
est03d11	Unknown-42	-1.20
HK0003_F09	Unknown-199	-1.20
HK0001_D12	Estrogen-responsive B box protein	-1.25
Hete0002_D09	Bromodomain protein CELTIX1	-1.30
ENH2_G12	Serum albumin precursor	-1.33
EST1-3A_H10	Cytohesin binding protein HE	-1.35
HK0003_F02	Unknown-195	-1.35
KVkm2_H10	Unknown-227	-1.35
Hete0002_G08	Ribosomal protein L35-3	-1.37
ENH2_D07	Ribosomal protein L35-2	-1.39
utu01f03	Unknown-238	-1.40
Hete0002_D07	Unknown-141	-1.40
CA382259	Complement receptor 1-2	-1.41
HK0001_F01	Complement factor H-1	-1.43
Hete0002_F10	Unknown-144	-1.44
EXOB2_A02	Nucleoside diphosphate kinase, mitochondrial precursor	-1.46
utu04b09	Complement factor H-3	-1.46
ENH2_H01	Beta-2-microglobulin-2	-1.47
CA373506	Selenoprotein P	-1.48
ENH2_F09	Beta-2-microglobulin-1	-1.50
CA376350	Serum amyloid P-component-1	-1.56
est03c10	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	-1.63
HK0002_D07	Unknown-172	-1.69
EXOB3_A02	Alpha-1-microglobulin/bikunin-1	-1.72
ENH2_F04	Unknown-4	-1.77
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	-1.92
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	-1.94
CA346849	Unc-13 homolog C	-1.94
CA348325	BAG-family molecular chaperone regulator-4	-2.11

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el hígado de truchas expuestas a LPS durante 72 horas.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	LPS FC
EXOB2_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	3.25
ENH2_B05	60S ribosomal protein L13a-acute pahse protein	3.04
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	3.02
est02g11	Cytochrome c oxidase subunit I-1	2.82
CA348325	BAG-family molecular chaperone regulator-4	2.05
CA346849	Unc-13 homolog C	2.01
HK0003_B09	Complement factor H-2	1.87
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	1.77
est03c10	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2	1.71
est02f08	Serine protease-like protein-1	1.64
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	1.59
KVkm2_A01	Unknown-219	1.49
EXOB3_B01	Cathepsin C-3	-1.47
EXOB1_B09	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-1.52
EXOB1_F08	Unknown-88	-1.55
EXOB1_A03	Metallothionein A	-1.58
EST1-3A_F07	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	-1.67
EST1-3A_E07	Unknown-72	-1.77
EST1-3A_H06	Transcription factor jun-B-1	-2.08
HK0001_G11	Unknown-161	-2.44

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en las bránquias de doradas alimentadas con una dieta inmunoestimulante rica en vitaminas antioxidantes (C y E) y extractos de levadura durante cuatro semanas.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	Dieta IS FC
HKT0001_B03	Alpha 2 type I collagen-1	4.64
CA343143	NF-kappaB inhibitor alpha-1	4.40
est03b03	Cathepsin C-2	4.02
utu01e09	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(1)	3.47
utu02a06	Collagen a3(I)-1	3.01
utu02b11	Collagen a3(I)-2	2.68
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	2.68
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	2.48
EXOB4_F03	Cathepsin S	2.47
est04b04	Cytokeratin 8	2.20
CA385697	X-box binding protein 1	2.08
utu01g10	Keratin, type II cytoskeletal 8	2.05
HK0003_A03	Thymosin beta-4-2	2.04
EST1-3A_D03	60S ribosomal protein L23	2.01
utu02a08	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-2	2.00
utu03h10	Tropomyosin alpha 3 chain-3	1.90
CA379977	MHC class II alpha chain	1.89
EXOB1_A05	Ribosomal protein L6-1	1.86
EXOB1_H08	ADP,ATP carrier protein 3	1.86
utu02b07	Cytochrome c oxidase subunit II	1.85
CA349364	Cathepsin K-2	1.84
CA373890	Heat shock protein HSP 90-beta-1	1.80
CA360060	T-complex protein 1, subunit 3	1.76
CA351949	CD45	1.75
CA379787	Cyclin G1	1.74
Hete0002_F02	Cytokeratin 19	1.74
Hete0002_E07	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-Embryonic beta-type globin2	1.73
CA384559	B-cell receptor CD22-2	1.73
CA353365	Heat shock 70kD protein 9B-1	1.72
EXOB2_F12	60S ribosomal protein L7a-1	1.70
CA356384	Toll-like receptor 20a	1.68
HK0003_G01	Creatine kinase, M-2	1.67
HK0001_D01	Ubiquitin	1.62
CA362419	Complement component C6	1.62
est04b12	Leucine-rich repeats and calponin domain containing 4	1.61
utu03e08	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	1.60
EXOB4_D09	Hypothetical-fish 7	1.59
ENH2_E05	40S ribosomal protein S29	1.58
CA374472	X-linked interleukin-1 receptor accessory 2	1.58

EXOB1_A06	ADP,ATP carrier protein T2	1.58
EXOB3_D02	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	1.56
est02a11	Ig kappa chain V-IV region B17-2	1.55
HK0001_H06	40S ribosomal protein S7	1.55
EXOB4_C10	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-1	1.55
CA346979	MAPK/ERK kinase kinase 5-1	1.54
HK0002_B01	60S ribosomal protein L8	1.54
est01e06	Coronin-1B	1.53
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	1.51
utu01h02	Cytochrome oxidase subunit III-3	1.50
utu01b12	40S ribosomal protein S9-1	1.50
est02f05	Cytochrome c oxidase subunit III-4	1.49
est01e02	Thymosin beta-4-1	1.49
utu01g04	Cytochrome oxidase subunit III-2	1.49
KVkm2_F01	Unknown-224	1.49
HK0003_C11	Tropomyosin alpha 3 chain-1	1.48
Hete0002_F10	Unknown-144	1.48
utu02e02	Tropomyosin alpha 3 chain-2	1.48
EXOB3_G05	Actin, cytoplasmic 2	1.47
EXOB3_F08	60S ribosomal protein L10-1	1.47
utu01a03	40S ribosomal protein S3-1	1.47
CA386553	Dedicator of cytokinesis protein 2	1.45
utu01f03	Unknown-238	1.45
EST1-3A_F08	Heat shock protein HSP 90-beta-2	1.44
EST1-3A_E06	60S ribosomal protein L5-1	1.44
HST0001_D08	Beta-globin	1.44
HK0001_A12	40S ribosomal protein S2	1.44
utu03a06	Elongation factor 1-alpha 2	1.44
Hete0002_G11	Hypothetical-fish 23	1.43
CA371809	Suppressor of initiator codon mutations, related sequence 1 (Translation factor	1.43
EXOB3_E04	60S ribosomal protein L14	1.42
CA365571	Lysyl oxidase homolog 2	1.41
EXOB2_G04	Selenide water dikinase 2-1	1.41
EXOB4_F11	40S ribosomal protein S20	1.41
utu04h11	Myosin light chain 2-2	1.41
KVkm2_G04	60S ribosomal protein L32-3	1.40
Hete0002_B08	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 3	1.40
Hete0002_E10	40S ribosomal protein S8	1.40
utu02b09	60S acidic ribosomal protein P0	1.40
CA384463	B-cell translocation gene 1-1	1.40
CA342145	RNA binding motif protein 4	1.39
utu04g04	Ribosomal protein L36a-like-2	1.39
est04d09	60S ribosomal protein L37	1.39
est04c07	Ferritin heavy chain-2	1.38
HKT0001_H07	60S ribosomal protein L37a	1.38

EXOB4_D02	Beta actin-2	1.37
EST1-3A_H03	Unknown-76	1.36
HK0002_H10	Unknown-182	1.36
Hete0002_G08	Ribosomal protein L35-3	1.36
utu04f08	Actin, alpha skeletal 5	1.36
EST1-3A_F05	Heat shock 70 kDa protein 1	1.36
utu03b02	Ribosomal protein L6-2	1.36
CA359321	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac ex- changer 1 protein	1.35
EST1-3A_H05	Adenosine deaminase 3	1.35
Hete0002_H06	Ribosomal protein S2	1.35
KVkm2_G01	60S ribosomal protein L32-2	1.35
CA359892	Transposase-8	1.35
EXOB3_A08	Ribosomal protein L11	1.35
Hete0002_A06	40S ribosomal protein S11	1.34
CA384513	MAPK/ERK kinase kinase kinase 4-2	1.33
CA359569	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1.33
HK0001_H03	60S ribosomal protein L26	1.32
KVkm2_F06	60S ribosomal protein L32-1	1.32
utu03c09	40S ribosomal protein S5	1.32
CA360163	Tyrosine-protein kinase SYK	1.31
utu01g11	Actin, alpha skeletal 3	1.31
KVkm2_A09	60S ribosomal protein L35	1.31
utu02h11	Ribosomal protein L13	1.30
CA366800	Transposase-45	1.30
EXOB3_B12	Unknown-109	1.30
utu02g02	40S ribosomal protein S21	1.29
CA350956	Interferon regulatory factor 1-1	1.29
KVkm2_G09	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1	1.29
CA356429	NACHT-, LRR- and PYD-containing protein 2	1.28
HK0002_B02	60S ribosomal protein L35a-2	1.28
EXOB2_A09	60S ribosomal protein L5-2	1.28
ENH2_D02	Receptor for activated C kinase	1.28
HK0002_B07	Heat shock 70kDa protein 8	1.28
utu04g05	40S ribosomal protein S9-3	1.27
CA376758	Mitogen-activated protein kinase 6	1.27
EXOB3_E01	Na/K ATPase alpha subunit-2	1.27
utu01f04	Actin, alpha skeletal 2	1.26
CA368189	MAPK/ERK kinase kinase 6	1.25
EXOB1_C02	Unknown-83	1.24
CA347646	GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor	1.24
EXOB4_E04	Elongation factor 1-beta	1.24
CA366558	Steroid hormone receptor ERR2	1.23
CA382275	Egl nine homolog 2	1.23
HST0001_E03	Cyclophilin-3	1.22
EXOB2_B01	Nuclease sensitive element binding protein 1-1	1.21

EXOB4_F02	Ribosomal protein S12	1.21
est04c10	Unknown-56	1.20
Hete0002_E03	60S ribosomal protein L36	1.20
utu02c02	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-1	1.20
est04c02	Unknown-53	1.19
CA369467	5-lipoxygenase activating protein	1.18
utu04d10	Unknown-268	1.18
utu04d04	Actin, alpha skeletal 4	1.18
CA378361	Ubiquitin ligase SIAH1	1.17
ENH2_B12	Ribosomal protein L35-1	1.15
EXOB3_G03	60S acidic ribosomal protein P2	1.15
CA357261	Cathepsin F	1.15
utu02h04	40S ribosomal protein S6	1.15
CA381199	94 kDa glucose-regulated protein	1.14
EXOB4_B09	Macrophage receptor MARCO	1.13
EXOB4_H05	Unknown-133	1.13
HK0002_C07	60S ribosomal protein L17	1.12
EXOB3_A01	Unknown-103	1.12
CA382694	MHC class II regulatory factor RFX1	1.12
CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	1.10
EXOB4_B03	Ribosomal protein L36a-like-1	1.07
HK0002_G11	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-1.08
HK0001_G12	Quinone oxidoreductase	-1.10
EXOB3_H12	Unknown-125	-1.11
ENH2_D07	Ribosomal protein L35-2	-1.11
utu01b05	Gamma crystallin B-1	-1.12
EXOB2_C04	Transposase-60	-1.13
HK0003_G05	Unknown-201	-1.14
EXOB3_F10	Nuclease sensitive element binding protein 1-2	-1.14
HK0002_B06	Troponin T-3, fast skeletal muscle	-1.14
HK0003_A04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-2	-1.14
CA368283	MAPK/ERK kinase kinase 1-2	-1.16
HK0003_G10	Unknown-202	-1.17
EXOB3_D10	Na/K ATPase alpha subunit-1	-1.18
CA359170	Metallothionein B	-1.18
EXOB2_E04	Unknown-97	-1.18
HK0003_F07	Unknown-198	-1.18
EXOB4_F05	Rab GDP dissociation inhibitor beta	-1.18
EXOB2_A04	Hypothetical-fish 4	-1.18
utu01c03	Unknown-232	-1.19
CA385071	Sodium/bile acid cotransporter	-1.19
HK0002_F05	Myosin heavy chain, skeletal, fetal	-1.19
CA376813	CC chemokine SCYA110-1	-1.20
EXOB1_H11	Hypothetical-fish 18	-1.20
CA361151	Annexin A1-2	-1.20
CA355245	Hypoxia-inducible factor 1 alpha-2	-1.21

est02c06	Heat shock protein 75 kDa-2	-1.21
CA354801	MAPK/ERK kinase kinase 1-1	-1.21
EXOB4_H07	Beta-galactosidase-related protein	-1.21
utu01d06	Deoxyribonuclease gamma precursor	-1.22
utu01c08	Unknown-233	-1.22
est02h09	Nonhistone chromosomal protein HMG-17	-1.23
HK0003_H12	Unknown-203	-1.23
EXOB2_B05	Hypothetical-fish 27	-1.23
CA348743	Sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3	-1.23
EXOB2_E01	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-2	-1.23
est01e08	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	-1.23
HK0002_G10	T-cell receptor alpha chain V region HPB-MLT precursor (Fragment)	-1.24
EXOB3_E10	Unknown-117	-1.24
HK0002_D02	Unknown-170	-1.24
HK0001_C01	Dermatan-4-sulfotransferase-1-2	-1.24
HK0001_G11	Unknown-161	-1.24
HK0003_B05	FLJ14655	-1.25
HK0003_E08	Unknown-194	-1.25
EXOB3_D06	Unknown-112	-1.25
HK0002_C06	Unknown-169	-1.25
est03b11	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-1	-1.25
EXOB4_H08	Alanine-glyoxylate aminotransferase 1	-1.25
HK0003_F09	Unknown-199	-1.26
CA359784	Heat shock protein 4	-1.27
CA346821	Transposase-11	-1.27
EXOB2_F01	Proteasome subunit alpha type 6	-1.27
CA372428	Leukotriene B4 receptor 1	-1.27
EXOB3_H08	Unknown-124	-1.28
CA358882	DeltaB	-1.28
CA388407	DnaJ homolog subfamily A member 2	-1.28
HK0003_E06	DnaJ homolog subfamily C member 9	-1.28
est02b12	Dermatan-4-sulfotransferase-1-1	-1.28
CA379612	NF-kappaB inhibitor alpha-2	-1.28
EXOB1_D10	Unknown-85	-1.28
HK0003_A12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-1	-1.28
HK0003_B01	Unknown-185	-1.29
CA377504	Cold autoimmune inflammatory syndrome 1 protein	-1.29
HK0003_E07	Myosin light chain 2-1	-1.29
HK0003_C10	Over-expressed breast tumor protein-like	-1.29
CA374603	IL-8 receptor	-1.30
utu01d11	Unknown-237	-1.30
HK0001_D12	Estrogen-responsive B box protein	-1.30
CA352451	Transposase-21	-1.30
CA365505	Retinoblastoma-like protein 1	-1.30
CA386271	Telomerase-binding protein p23-2	-1.30

CA363822	Heat shock factor 2-2	-1.30
HK0003_D10	Hypothetical-fish 9	-1.30
CA384501	MAP kinase kinase 4	-1.30
HK0002_A12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 15 kDa subunit	-1.30
CA349338	Unknown-275	-1.31
HK0001_F10	Unknown-158	-1.31
est04c06	Unknown-54	-1.31
EXOB1_D03	5'-3' exoribonuclease 2	-1.31
HK0003_C08	Parvalbumin alpha-2	-1.31
EXOB3_F12	Unknown-121	-1.31
CA383795	Allograft inflammatory factor-1	-1.31
HK0001_D10	Coagulation factor X precursor	-1.31
CA350804	Unknown-277	-1.32
EXOB3_A04	Unknown-104	-1.32
HK0002_H05	Trans-2-enoyl-CoA reductase	-1.32
est03g09	UDP-glucose 4-epimerase	-1.32
HK0003_E04	Hypothetical-fish 10	-1.33
CA366512	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	-1.33
CA385699	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	-1.33
HK0001_F11	PNAS-106	-1.33
HK0002_F01	Unknown-175	-1.33
HK0001_F09	Unknown-157	-1.33
CA341823	Superoxide dismutase [Cu-Zn] extracellular	-1.33
HK0002_E09	Unknown-174	-1.34
EXOB2_G01	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2	-1.34
HK0001_C09	Unknown-151	-1.34
CA347342	Transposase-14	-1.34
EXOB4_E01	Transposase-58	-1.34
EXOB1_B12	All-trans-13,14-dihydroretinol saturase	-1.34
CA363676	Complement factor B/C2-B	-1.34
EXOB3_F04	Unknown-119	-1.35
HK0001_F02	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1.35
EXOB2_H02	Serine/arginine repetitive matrix 1	-1.35
HK0003_C03	Unknown-189	-1.35
HK0001_E07	Unknown-155	-1.36
HK0002_B09	Transgelin	-1.36
CA383545	ReO_6-5	-1.36
HK0001_F01	Complement factor H-1	-1.37
HK0001_B10	Unknown-148	-1.37
CA344428	Glutathione peroxidase 4	-1.37
utu01b01	Unknown-230	-1.37
utu02h05	Unknown-247	-1.37
HK0001_D09	Cytochrome P450 2F1	-1.37
CA382454	Heat-shock protein beta-3	-1.37
HKT0001_H05	Cytochrome b-3	-1.37
est03d06	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	-1.38

HK0003_C07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	-1.38
CA367619	Programmed cell death protein 8, mitochondrial precursor	-1.38
utu02b08	High mobility group protein 2	-1.38
HK0002_C04	Apolipoprotein E-2	-1.39
HK0002_C03	Unknown-168	-1.39
CA355055	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs	-1.39
CA358347	Transposase-31	-1.39
CA357761	Galectin-3	-1.40
utu01e12	Zinc finger protein 228	-1.40
CA385359	Serum amyloid P-component-2	-1.40
HK0002_C02	Chromosome-associated kinesin KIF4A	-1.40
utu04e11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 precursor	-1.41
CA376213	TNF receptor associated factor 1	-1.41
EXOB2_D07	Ependymin related protein-1	-1.41
CA379928	ReO_6-4	-1.42
HK0002_F03	Unknown-176	-1.42
KVkm2_D03	Nuclear protein 1	-1.42
HK0001_A03	Unknown-145	-1.42
CA364325	Peroxiredoxin 6	-1.43
HK0001_C02	Unknown-149	-1.43
CA384134	G1/S-specific cyclin D2	-1.44
HK0002_D09	Prothymosin alpha	-1.44
CA344707	Cyclophilin-1	-1.44
CA368739	BCL2-associated athanogene 1	-1.45
EXOB4_H04	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	-1.45
est01e10	Tolloid-like protein (nephrosin)-1	-1.45
CA353031	MAPK7 interacting protein	-1.45
est01c08	14-3-3C2	-1.45
HK0002_D04	Unknown-171	-1.46
CA370333	Melanoma derived growth regulatory protein	-1.46
utu04h04	Thioredoxin-like protein p19 precursor	-1.46
CA358968	Complement component C3-3-2	-1.46
CA371052	Cyclin A2	-1.47
EXOB4_A11	Tubulin alpha-ubiquitous chain	-1.48
CA360960	Cytochrome P450 1A1	-1.48
EXOB3_A03	SEC13-related protein	-1.49
HK0003_B09	Complement factor H-2	-1.49
CA361754	Glutathione S-transferase theta 1	-1.49
est02f04	Tubulin alpha-3 chain	-1.49
HK0003_F05	28S ribosomal protein S16, mitochondrial precursor	-1.51
est01g07	Proteasome activator complex subunit 2	-1.51
est04c01	ARP2/3 complex 34 kDa subunit	-1.53
HK0003_E01	Plasminogen precursor-1	-1.56
CA376574	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1	-1.57
utu01d07	Unknown-236	-1.58
CA376422	Interferon-induced protein 44-2	-1.59

CA386899	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	-1.59
CA352876	MAPK/ERK kinase kinase 5-2	-1.59
EXOB2_D01	Proteasome subunit alpha type 3	-1.59
CA356055	Transposase -63	-1.62
HK0001_C12	Unknown-152	-1.63
HK0002_D07	Unknown-172	-1.63
CA363935	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 2	-1.64
HK0002_E04	39S ribosomal protein L45, mitochondrial precursor	-1.66
EXOB2_A11	Tubulin alpha-1 chain	-1.74
CA361535	CC chemokine SCYA106	-1.79
HK0003_D06	Mitochondrial ribosomal protein L1	-1.89
HK0001_C05	Eukaryotic translation initiation factor 5	-2.37
est03e03	Poly(RC) binding protein 2	-2.82
est03d11	Unknown-42	-3.59
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	-3.82
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	-4.65
utu04c06	Cytokeratin 17-3	-4.93
EST1-3A_C12	Coronin-1C	-5.24
EXOB1_C06	Nucleolar protein Nop56-1	-6.61

Lista de genes expresados diferencialmente ($p < 0.01$) en el riñón cefálico de doradas alimentadas con una dieta inmunoestimulante rica en vitaminas antioxidantes (C y E) y extractos de levadura durante cuatro semanas.

Se indican los valores de expresión sobre la expresión basal (FC, *Fold Change*).

clon ID	Nombre	Dieta IS FC
utu04h11	Myosin light chain 2-2	6.06
est01g04	5-aminolevulinate synthase	5.71
HK0001_E10	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	5.50
EXOB2_B10	Hemoglobin beta chain	5.45
utu03g04	Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform	4.71
est04c05	Ferritin heavy chain-1	4.31
utu04f06	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-2	4.27
CA343700	CXC chemokine receptor transcript variant B	4.10
Hete0002_C10	Creatine kinase, M-1	4.02
CA346488	p53-like transcription factor	3.98
CA360089	Transposase-33	3.98
utu01h05	Troponin T-2, fast skeletal muscle	3.90
utu02c02	Myosin heavy chain, skeletal, adult 1-1	3.88
est04c07	Ferritin heavy chain-2	3.85
utu04a06	Creatine kinase, M-3	3.53
utu03b03	Beta enolase-2	3.41
Hete0002_E07	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-Embryonic beta-type globin2	3.35
CA379787	Cyclin G1	3.28
est02e09	Ig heavy chain V-III region HIL	3.10
HST0001_C04	Hemoglobin alpha chain	3.08
HK0003_G01	Creatine kinase, M-2	3.00
HST0001_C02	Alpha-globin I-1	2.86
CA365876	Aminolevulinate, delta-, synthetase 1-2	2.86
est03d10	Unknown-41	2.81
ENH2_H06	Unknown-5	2.74
CA373890	Heat shock protein HSP 90-beta-1	2.63
ENH2_B05	60S ribosomal protein L13a-acute pahse protein	2.62
EXOB1_A05	Ribosomal protein L6-1	2.60
est02c08	Nicotinamide riboside kinase 2	2.58
EXOB2_B11	D-dopachrome tautomerase	2.52
HST0001_D04	Alpha-globin I-2	2.40
CA376549	ADAMTS-3	2.37
est04c08	Unknown-55	2.33
CA387524	Bone morphogenetic protein 1	2.21
HST0001_D08	Beta-globin	2.19
utu01g10	Keratin, type II cytoskeletal 8	2.19
CA381045	Aminolevulinate, delta-, synthetase 1-2	2.17

Hete0002_C07	Unknown-139	2.12
utu01a03	40S ribosomal protein S3-1	2.10
CA375569	Serine/threonine-protein kinase Chk1	2.08
CA375106	Protein-tyrosine sulfotransferase 1	2.08
HKT0001_B03	Alpha 2 type I collagen-1	2.08
est02b08	Peroxiredoxin 1-2	2.06
CA342430	Ig kappa chain V-III region VG	2.02
EXOB1_A06	ADP,ATP carrier protein T2	2.00
EST1-3A_F05	Heat shock 70 kDa protein 1	1.98
utu01e09	Embryonic alpha-type globin2+collagen alpha 2(1)	1.96
est04b04	Cytokeratin 8	1.96
utu04f01	40S ribosomal protein S9-2	1.95
CA348053	Ferritin H-3	1.93
CA385697	X-box binding protein 1	1.92
EXOB3_F08	60S ribosomal protein L10-1	1.92
est01f12	DNA-directed RNA polymerase II 23 kDa polypeptide	1.90
EXOB3_B12	Unknown-109	1.89
HK0001_H06	40S ribosomal protein S7	1.87
CA384463	B-cell translocation gene 1-1	1.86
est02a11	Ig kappa chain V-IV region B17-2	1.85
CA388409	Peroxiredoxin 4	1.85
utu02a08	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-2	1.83
Hete0002_B08	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 3	1.83
KVkm2_F01	Unknown-224	1.83
EXOB4_G09	Histone H14	1.83
HK0002_B07	Heat shock 70kDa protein 8	1.82
HKT0001_A11	Hypothetical-fish 11	1.81
EXOB4_H06	Alpha-globin 1-3	1.79
utu03a12	Unknown-249	1.78
CA374472	X-linked interleukin-1 receptor accessory 2	1.78
CA379977	MHC class II alpha chain	1.78
EXOB4_E12	Annexin 5	1.77
ENH2_D02	Receptor for activated C kinase	1.77
Hete0002_A06	40S ribosomal protein S11	1.77
CA342145	RNA binding motif protein 4	1.77
utu02a06	Collagen a3(I)-1	1.77
utu03a06	Elongation factor 1-alpha 2	1.76
EXOB4_H05	Unknown-133	1.75
EST1-3A_D03	60S ribosomal protein L23	1.75
EST1-3A_F08	Heat shock protein HSP 90-beta-2	1.75
EXOB1_H08	ADP,ATP carrier protein 3	1.75
CA385829	Lysozyme g-1	1.75
CA342311	Tyrosine-protein kinase ZAP-70	1.74
HK0002_B01	60S ribosomal protein L8	1.74
EXOB3_A08	Ribosomal protein L11	1.73
CA371809	Suppressor of initiator codon mutations, related sequence 1	1.73

CA381199	94 kDa glucose-regulated protein	1.72
EXOB2_F12	60S ribosomal protein L7a-1	1.72
EXOB4_C10	Ubiquitin and ribosomal protein S27a-1	1.72
CA358548	Polyadenylate-binding protein 4	1.71
CA384513	MAPK/ERK kinase kinase kinase 4-2	1.70
est02g11	Cytochrome c oxidase subunit I-1	1.70
CA363852	Double stranded RNA adenosine deaminase RED2	1.68
Hete0002_G08	Ribosomal protein L35-3	1.67
CA359321	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	1.64
est02f05	Cytochrome c oxidase subunit III-4	1.64
Hete0002_E10	40S ribosomal protein S8	1.64
utu03b02	Ribosomal protein L6-2	1.63
EXOB2_A09	60S ribosomal protein L5-2	1.63
CA380028	StAR-related lipid transfer protein 3	1.63
CA346979	MAPK/ERK kinase kinase 5-1	1.62
EXOB3_D02	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	1.62
EXOB4_D09	Hypothetical-fish 7	1.61
HK0001_A12	40S ribosomal protein S2	1.60
Hete0002_H06	Ribosomal protein S2	1.60
EXOB3_G05	Actin, cytoplasmic 2	1.59
EXOB1_E08	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-1	1.59
EXOB2_G04	Selenide water dikinase 2-1	1.57
est04f07	Transposase-5	1.57
EXOB3_E04	60S ribosomal protein L14	1.57
utu01f03	Unknown-238	1.57
CA348209	Transposase-16	1.57
CA362419	Complement component C6	1.56
utu01b12	40S ribosomal protein S9-1	1.55
ENH2_E05	40S ribosomal protein S29	1.54
HST0001_B05	Tumor differentially expressed protein 1	1.54
HK0003_A03	Thymosin beta-4-2	1.52
utu04d05	Unknown-267	1.52
HK0002_B02	60S ribosomal protein L35a-2	1.51
KVkm2_G04	60S ribosomal protein L32-3	1.51
EXOB2_F08	CDC10 protein homolog	1.51
CA360163	Tyrosine-protein kinase SYK	1.49
CA356429	NACHT-, LRR- and PYD-containing protein 2	1.48
est04c10	Unknown-56	1.48
utu01g04	Cytochrome oxidase subunit III-2	1.47
HK0003_A02	Cation-transporting ATPase	1.47
CA384059	Proliferating cell nuclear antigen	1.47
Hete0002_D05	Fatty acid-binding protein-2	1.47
est02f04	Tubulin alpha-3 chain	1.46
HK0001_H03	60S ribosomal protein L26	1.46
utu02b07	Cytochrome c oxidase subunit II	1.46

CA366800	Transposase-45	1.45
CA383827	Zinc finger DHHC domain containing protein 13	1.43
CA373770	Procathepsin L-2	1.43
CA357109	Tumour necrosis factor receptor	1.43
KVkm2_G01	60S ribosomal protein L32-2	1.43
CA356384	Toll-like receptor 20a	1.43
utu02h11	Ribosomal protein L13	1.42
CA359569	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1.40
utu02b09	60S acidic ribosomal protein P0	1.40
CA347646	GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor	1.39
KVkm2_G09	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1	1.39
CA368189	MAPK/ERK kinase kinase 6	1.39
KVkm2_F06	60S ribosomal protein L32-1	1.39
EXOB4_F11	40S ribosomal protein S20	1.38
utu03g02	Heat shock cognate 70 kDa	1.38
CA360060	T-complex protein 1, subunit 3	1.38
EST1-3A_E06	60S ribosomal protein L5-1	1.36
EXOB4_F02	Ribosomal protein S12	1.36
EXOB2_B01	Nuclease sensitive element binding protein 1-1	1.36
KVkm2_A09	60S ribosomal protein L35	1.36
Hete0002_F10	Unknown-144	1.35
CA359344	Transposase-32	1.35
est04d09	60S ribosomal protein L37	1.35
utu01d01	60S acidic ribosomal protein P1	1.34
CA377140	Complement component C8 beta chain	1.34
utu04d10	Unknown-268	1.34
EXOB3_C07	60S ribosomal protein L7a-2	1.33
utu03b06	Unknown-250	1.33
CA343485	C-Fos protein	1.32
est01e02	Thymosin beta-4-1	1.32
utu04f08	Actin, alpha skeletal 5	1.32
utu01g11	Actin, alpha skeletal 3	1.31
Hete0002_F02	Cytokeratin 19	1.31
EXOB2_G09	Cytochrome c oxidase subunit I-2	1.29
est02h03	Alpha-2,8-sialyltransferase 8F	1.29
CA386553	Dedicator of cytokinesis protein 2	1.29
CA350711	B-cell lymphoma/leukemia 11A	1.29
utu04e07	60S ribosomal protein L39	1.28
CA359892	Transposase-8	1.28
Hete0002_E03	60S ribosomal protein L36	1.27
CA345232	Similar to GTP-binding protein ragB	1.26
CA366558	Steroid hormone receptor ERR2	1.25
HK0001_D01	Ubiquitin	1.24
utu03c09	40S ribosomal protein S5	1.24
EXOB2_C03	60S ribosomal protein L10-1	1.23
KVkm2_G11	60S ribosomal protein L7	1.23

utu02g02	40S ribosomal protein S21	1.23
HKT0001_H07	60S ribosomal protein L37a	1.22
CA366403	Heat shock 27 kDa protein-1	1.22
EXOB4_A11	Tubulin alpha-ubiquitous chain	1.22
EXOB4_B11	40S ribosomal protein S30	1.22
Hete0002_C05	Calmodulin-2	1.21
est03h05	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A-2	1.21
utu02h04	40S ribosomal protein S6	1.19
CA376758	Mitogen-activated protein kinase 6	1.18
HK0002_H10	Unknown-182	1.18
utu01f04	Actin, alpha skeletal 2	1.17
ENH2_B12	Ribosomal protein L35-1	1.17
EXOB3_G03	60S acidic ribosomal protein P2	1.15
utu04d04	Actin, alpha skeletal 4	1.15
utu01h02	Cytochrome oxidase subunit III-3	1.12
HK0002_C07	60S ribosomal protein L17	1.12
utu04g04	Ribosomal protein L36a-like-2	1.11
CA385871	Jagged2	1.09
CA381721	Fibroblast growth factor receptor 2	-1.08
HK0001_G12	Quinone oxidoreductase	-1.10
HK0001_H05	Angiotensin I converting enzyme	-1.11
est04c02	Unknown-53	-1.11
HK0001_A04	MIR-interacting saposin-like protein precursor	-1.12
EXOB1_F01	60S ribosomal protein L35a-1	-1.12
utu01b05	Gamma crystallin B-1	-1.15
CA344428	Glutathione peroxidase 4	-1.15
EXOB1_A03	Metallothionein A	-1.16
EXOB2_G10	Histone H33-1	-1.16
EXOB4_B09	Macrophage receptor MARCO	-1.16
HK0001_A05	Unknown-146	-1.17
CA368283	MAPK/ERK kinase kinase 1-2	-1.18
CA381226	ATF-like basic leucine zipper transcriptional factor B-ATF	-1.19
CA384501	MAP kinase kinase 4	-1.19
EXOB2_E01	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-2	-1.20
CA359784	Heat shock protein 4	-1.21
HK0003_A10	Unknown-184	-1.22
HKT0001_A08	Antifreeze protein LS-12	-1.22
HK0001_C04	Unknown-150	-1.22
utu01c03	Unknown-232	-1.22
HK0002_F05	Myosin heavy chain, skeletal, fetal	-1.22
CA350038	Transposase-18	-1.23
CA376813	CC chemokine SCYA110-1	-1.23
HK0002_D02	Unknown-170	-1.23
est02b02	PEST-containing nuclear protein	-1.23
utu01h01	Unknown-239	-1.23
HK0002_B06	Troponin T-3, fast skeletal muscle	-1.23

HK0002_H09	Unknown-181	-1.23
HK0001_A10	Full-length cDNA clone CS0DC006YH13 of Neuroblastoma of Homo sapiens	-1.24
HK0003_F09	Unknown-199	-1.24
EXOB3_H05	Glucose-6-phosphate isomerase-2	-1.25
EXOB3_D10	Na/K ATPase alpha subunit-1	-1.25
CA362758	Cyclophilin-2	-1.25
HK0003_G05	Unknown-201	-1.25
CA344745	B-cell receptor CD22-1	-1.25
HK0002_G11	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-1.25
HK0003_G10	Unknown-202	-1.26
CA359170	Metallothionein B	-1.26
CA369467	5-lipoxygenase activating protein	-1.26
CA385699	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	-1.27
utu01d07	Unknown-236	-1.27
HK0001_D05	Ubiquitin-like protein SMT3A-2	-1.27
EXOB3_H12	Unknown-125	-1.27
CA349627	Hypoxia-inducible factor 1 alpha-1	-1.28
CA388407	DnaJ homolog subfamily A member 2	-1.28
EXOB2_A10	Unknown-92	-1.28
HK0002_H08	TATA-binding protein associated factor 2N	-1.28
EXOB2_A04	Hypothetical-fish 4	-1.28
HK0002_H05	Trans-2-enoyl-CoA reductase	-1.28
EXOB3_E06	Unknown-115	-1.29
CA358968	Complement component C3-3-2	-1.29
HK0003_A04	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-2	-1.29
HK0001_G11	Unknown-161	-1.29
EXOB3_G08	Fatty acid-binding protein-1	-1.30
HK0002_H04	Unknown-179	-1.30
EXOB2_F03	Nuclear cap binding protein subunit 2	-1.30
EXOB3_B01	Cathepsin C-3	-1.30
utu01b08	Unknown-231	-1.31
est02h09	Nonhistone chromosomal protein HMG-17	-1.31
EST1-3A_A09	Serine protease-like protein-2	-1.31
EXOB3_D06	Unknown-112	-1.31
CA355245	Hypoxia-inducible factor 1 alpha-2	-1.31
HK0003_D01	Troponin C-1, skeletal muscle	-1.31
HK0003_E07	Myosin light chain 2-1	-1.32
HK0003_C10	Over-expressed breast tumor protein-like	-1.32
CA363676	Complement factor B/C2-B	-1.32
HK0002_G10	T-cell receptor alpha chain V region HPB-MLT precursor (Fragment)	-1.32
EXOB2_E04	Unknown-97	-1.32
HK0003_H02	Cathepsin L2	-1.33
EXOB3_E10	Unknown-117	-1.33
HK0003_B09	Complement factor H-2	-1.33

EXOB1_B02	Hypothetical-fish 34	-1.33
CA347342	Transposase-14	-1.33
HK0003_A12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-1	-1.33
CA358882	DeltaB	-1.34
HK0003_F10	Unknown-200	-1.34
EXOB3_C03	Unknown-110	-1.34
HK0003_B05	FLJ14655	-1.34
est02b12	Dermatan-4-sulfotransferase-1-1	-1.34
CA366512	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	-1.35
HK0002_G04	Fructose-bisphosphate aldolase A	-1.35
EXOB3_B02	Hyperosmotic protein 21	-1.35
HK0002_G06	Unknown-177	-1.35
CA361151	Annexin A1-2	-1.35
HK0003_H12	Unknown-203	-1.35
EXOB3_F10	Nuclease sensitive element binding protein 1-2	-1.36
EXOB1_H11	Hypothetical-fish 18	-1.36
EXOB3_D08	Histone H33-2	-1.36
HK0002_A12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 15 kDa subunit	-1.37
utu01d11	Unknown-237	-1.37
est02c06	Heat shock protein 75 kDa-2	-1.37
HK0002_B04	Phospholemman precursor	-1.37
EXOB3_A03	SEC13-related protein	-1.37
CA383094	Regulator of G-protein signaling 1-1	-1.37
CA355516	Transposase-26	-1.38
HK0003_B03	Cytochrome c-2	-1.38
HK0001_F10	Unknown-158	-1.38
HK0001_F11	PNAS-106	-1.38
CA353031	MAPK7 interacing protein	-1.39
CA365505	Retinoblastoma-like protein 1	-1.39
CA355799	MHC class I heavy chain-like	-1.39
CA370691	Cytochrome P450 27	-1.39
EXOB3_C12	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit, mitochondrial precursor	-1.39
CA350804	Unknown-277	-1.39
est01e10	Tolloid-like protein (nephrosin)-1	-1.40
HK0001_A11	Fumarate hydratase, mitochondrial precursor	-1.40
EXOB1_H09	ATP synthase beta chain-1	-1.40
EXOB3_H02	Unknown-123	-1.40
CA382454	Heat-shock protein beta-3	-1.40
EXOB4_H04	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	-1.40
CA346821	Transposase-11	-1.40
EXOB2_C04	Transposase-60	-1.41
CA355055	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs	-1.41
HK0001_F03	HIRA-interacting protein 5	-1.41
utu01d06	Deoxyribonuclease gamma precursor	-1.42
CA370333	Melanoma derived growth regulatory protein	-1.42

EXOB2_A05	14 kDa phosphohistidine phosphatase	-1.42
CA383545	ReO_6-5	-1.42
EXOB3_H08	Unknown-124	-1.42
utu01b01	Unknown-230	-1.42
CA364325	Peroxiredoxin 6	-1.42
HK0001_C06	Prostaglandin D synthase homolog	-1.42
CA379928	ReO_6-4	-1.43
HK0003_F07	Unknown-198	-1.43
CA376422	Interferon-induced protein 44-2	-1.43
CA363822	Heat shock factor 2-2	-1.44
CA386271	Telomerase-binding protein p23-2	-1.44
est02f02	Unknown-28	-1.44
utu01d02	Unknown-235	-1.44
HK0003_C08	Parvalbumin alpha-2	-1.44
EXOB3_A04	Unknown-104	-1.45
HK0001_C09	Unknown-151	-1.45
utu01c08	Unknown-233	-1.45
CA374135	CCL4	-1.45
EXOB3_A01	Unknown-103	-1.45
EXOB2_G01	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2	-1.46
EXOB1_E09	Transposase-57	-1.46
EXOB2_B05	Hypothetical-fish 27	-1.46
CA371052	Cyclin A2	-1.46
EXOB2_D01	Proteasome subunit alpha type 3	-1.46
HK0001_D12	Estrogen-responsive B box protein	-1.47
HK0001_A03	Unknown-145	-1.47
CA373607	Matrix metalloproteinase-2	-1.47
EXOB3_F11	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-18 kDa	-1.47
est03g09	UDP-glucose 4-epimerase	-1.47
utu04e11	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2 precursor	-1.47
CA349338	Unknown-275	-1.47
HK0003_C07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	-1.48
CA383564	Coatomer epsilon subunit 1	-1.48
HK0001_D09	Cytochrome P450 2F1	-1.48
EST1-3A_G02	NADH dehydrogenase subunit 2	-1.48
utu02h05	Unknown-247	-1.48
HK0003_E08	Unknown-194	-1.49
HK0003_C02	Collagen alpha 1(I) chain-1	-1.49
CA367619	Programmed cell death protein 8, mitochondrial precursor	-1.49
HK0003_E04	Hypothetical-fish 10	-1.49
CA341823	Superoxide dismutase [Cu-Zn] extracellular	-1.49
HK0002_F03	Unknown-176	-1.50
EXOB2_D07	Ependymin related protein-1	-1.50
HK0001_F09	Unknown-157	-1.50
HK0002_C04	Apolipoprotein E-2	-1.51
CA380426	Cytokine inducible SH2-containing protein 5	-1.51

HK0003_B01	Unknown-185	-1.51
CA344707	Cyclophilin-1	-1.51
HK0003_F05	28S ribosomal protein S16, mitochondrial precursor	-1.51
HK0002_D09	Prothymosin alpha	-1.52
EXOB4_H07	Beta-galactosidase-related protein	-1.52
EXOB4_E01	Transposase-58	-1.52
HK0002_C03	Unknown-168	-1.52
EXOB1_D10	Unknown-85	-1.52
est04c06	Unknown-54	-1.53
CA379612	NF-kappaB inhibitor alpha-2	-1.53
HK0001_C01	Dermatan-4-sulfotransferase-1-2	-1.53
CA361535	CC chemokine SCYA106	-1.54
EXOB2_H02	Serine/arginine repetitive matrix 1	-1.54
est01g07	Proteasome activator complex subunit 2	-1.54
EXOB2_D06	NADH dehydrogenase subunit 5-1	-1.54
HK0003_D10	Hypothetical-fish 9	-1.54
CA366489	Multidrug resistance protein 3-1	-1.54
EXOB1_D03	5'-3' exoribonuclease 2	-1.54
HKT0001_H05	Cytochrome b-3	-1.55
CA377504	Cold autoinflammatory syndrome 1 protein	-1.55
HK0001_E07	Unknown-155	-1.55
EXOB4_H08	Alanine-glyoxylate aminotransferase 1	-1.55
EXOB2_F01	Proteasome subunit alpha type 6	-1.56
EXOB1_B12	All-trans-13,14-dihydroretinol saturase	-1.56
CA372428	Leukotriene B4 receptor 1	-1.56
CA368739	BCL2-associated athanogene 1	-1.56
CA358347	Transposase-31	-1.57
KVkm2_D03	Nuclear protein 1	-1.57
CA352451	Transposase-21	-1.57
CA376574	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1	-1.58
CA357761	Galectin-3	-1.59
HK0002_F01	Unknown-175	-1.59
ENH2_F09	Beta-2-microglobulin-1	-1.59
CA361754	Glutathione S-transferase theta 1	-1.60
HK0001_D10	Coagulation factor X precursor	-1.60
EXOB1_E12	Serine protease-like protein-3	-1.61
HK0001_F01	Complement factor H-1	-1.61
CA386899	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	-1.61
EXOB3_F04	Unknown-119	-1.61
EXOB1_B09	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	-1.61
CA376213	TNF receptor associated factor 1	-1.62
HK0001_F02	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-1.62
HK0002_D07	Unknown-172	-1.63
CA372952	Survival of motor neuron-related splicing factor 30	-1.64
HK0003_C03	Unknown-189	-1.64
HK0003_E01	Plasminogen precursor-1	-1.64

est01c03	Histone H33-3	-1.64
CA380457	Aminopeptidase N	-1.64
HK0002_C02	Chromosome-associated kinesin KIF4A	-1.66
CA374603	IL-8 receptor	-1.66
HK0002_E04	39S ribosomal protein L45, mitochondrial precursor	-1.66
CA370435	Caspase 2	-1.66
HK0003_E06	DnaJ homolog subfamily C member 9	-1.67
CA359643	Derlin-1	-1.68
est03d06	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	-1.69
CA373295	Apoptosis response zinc finger protein	-1.70
utu01e12	Zinc finger protein 228	-1.70
CA363935	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa protein-interacting protein 2	-1.71
HK0002_E09	Unknown-174	-1.72
HK0002_D04	Unknown-171	-1.72
EXOB3_F05	Proteasome subunit alpha type 7-1	-1.75
HK0001_E06	Transposase-2	-1.76
HK0003_D06	Mitochondrial ribosomal protein L1	-1.77
EST1-3A_E12	Hypothetical-fish 3	-1.77
EXOB1_F02	Transcription regulator protein BACH1	-1.78
EXOB3_G02	Organic anion transporter	-1.79
CA356055	Transposase -63	-1.83
EXOB3_F12	Unknown-121	-1.84
CA341859	Nuclear factor kappa-B, subunit 1	-1.86
HK0003_D08	Unknown-193	-1.86
utu03f12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	-1.87
EXOB1_F10	Suppressor of SWI4 1 homolog	-1.93
EXOB1_C12	Hypothetical-fish 31	-1.97
EXOB1_F11	CD9	-1.99
CA344100	Galectin like 1	-2.03
CA368203	Transposase-55	-2.13
EXOB1_B03	Unknown-81	-2.21
EXOB1_D11	Dynein light chain 2, cytoplasmic	-2.24
EXOB1_A07	Unknown-79	-2.29
EST1-3A_C12	Coronin-1C	-2.33
CA373506	Selenoprotein P	-2.36
est03e03	Poly(RC) binding protein 2	-2.64
HK0003_A11	Apolipoprotein A-I-1	-2.75
CA355527	Adenosine kinase 2	-2.75
est03e05	Hypothetical protein LOC122618	-3.20
est03d11	Unknown-42	-3.28
EST1-3A_B03	Hypothetical-fish 44	-4.34
utu04c03	60S ribosomal protein L4	-8.99
est04b01	Similar to rRNA (Vangl2)	-9.97
utu04g09	Unknown-271	-14.72
CA377768	Phospholipase D1	-26.64



RT-qPCR de genes selectos

RT PCR cuantitativa

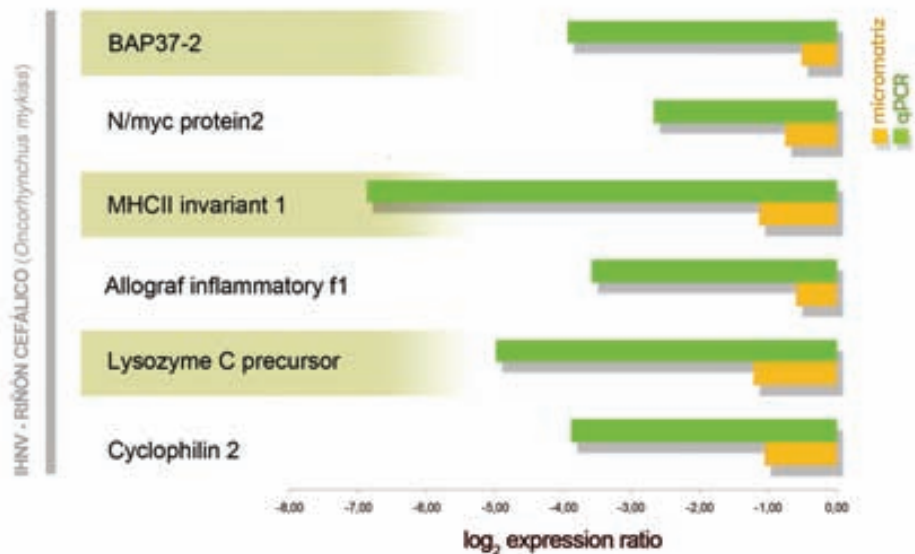
Se diseñaron cebadores específicos para amplificar fragmentos de 194-305 pares de bases. Para el procesamiento del ARN se utilizó la DNAsa RNAsa-free (Promega) y para la síntesis de ADNc la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) cebada con oligo(dT). Los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete de reactivos Dynamo SYBR Green (Finnzymes) en el sistema de análisis ABI Prism 7700 (Amersham-Pharmacia). Para la cuantificación de la expresión de ARNm mediante Real Time PCR (RT-qPCR), se diluyó el ADN, a razón de 1:50 para el ADN diana y a razón de 1:100 para el 18S, y se utilizó como plantilla para los cebadores Fw (*forward*) y Rv (*reverse*). En cada pocillo se incluyeron 10 μ l de iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 500 nM de cebadores Fw y Rv y 5 μ l de ADN en un volumen final de 20 μ l por pocillo. Se incluyeron controles sin ADNc y con ARN. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un sistema MyiQ thermocycler (BioRad) siguiendo un protocolo general de desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización de 10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C, seguidos de un ciclo de fusión de 81 ciclos (de 55 °C a 95 °C). Todas las muestras se procesaron por triplicado y se midió la fluorescencia al final de cada fase de extensión. Para el cálculo de los niveles de expresión relativa para cada gen se utilizó una variación del método ΔC_T en la que se empleó un gen de referencia. Los valores de C_t (umbral de ciclo) para cada muestra se expresaron como el grado de diferencia calculado en relación a los controles no sujetos a tratamientos experimentales y normalizados para cada gen en función de los obtenidos para el 18S.

En las gráficas que siguen se muestran los resultados de la comparación de los niveles de expresión obtenidos mediante análisis de micromatriz y RT-qPCR de algunos de los genes que, utilizando aquella metodología, mostraron una expresión diferencial significativa. Dados los problemas de semejanza habituales en la comparación de los resultados en una y otra metodologías (véanse [331-335] y la discusión en el capítulo 6 *Análisis exploratorio del transcriptoma de la dorada (Sparus aurata) mediante la plataforma de micromatriz de ADNc SFA 2.0*) y con la finalidad de abarcar un número razonable de genes, se optó por escoger los genes a validar en función no sólo de la consistencia de su expresión diferencial (estableciéndose el valor de corte para la significación en $p < 0.05$ ó $p < 0.01$), sino también de la intensidad de la misma (utilizando valores de regulación al alza o a la baja cercanos o superiores a 1.5FC como criterio mínimo) y de la función fisiológica descrita para cada uno.

Comparación de la expresión genética mediante micromatriz y RT PCR cuantitativa para genes selectos en el riñón cefálico de truchas infectadas con IHNV.

Se indican los cebadores utilizados para evaluar cada gen en diferentes puntos muestrales, así como el logaritmo en base 2 de los valores de la relación de la expresión genética entre los tratamientos experimentales obtenida para cada gen en la RT PCR cuantitativa (verde) y la plataforma de micromatriz (naranja), así como el valor de intensidad de cambio (FC) para cada transcrito (azul).

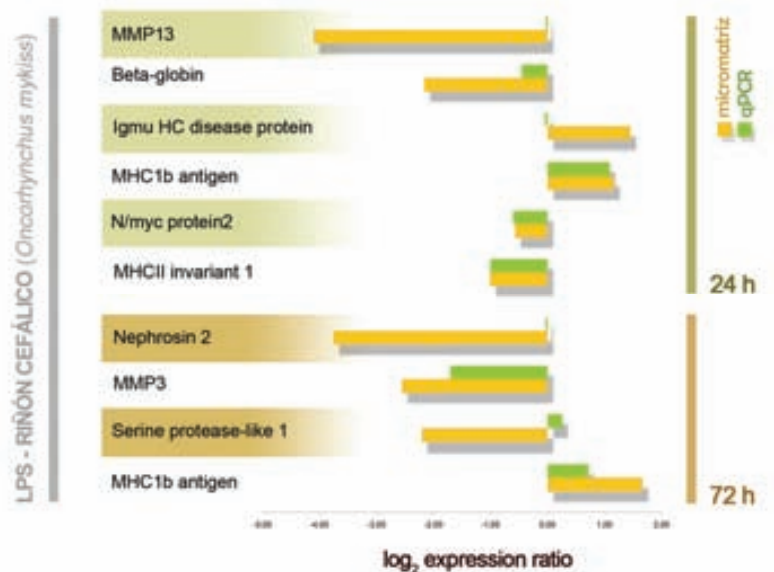
IHNV- RIÑÓN CEFÁLICO (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	(CA362758) Cyclophilin-2				Fwd (5'-3'): CTTTCATCTGCACTGCTAACA Rev (5'-3'): TAAGGGAGGGGTAGAAGGAA
	24h	-2.09	-2.09	-3.90	
	(CA370329) Lysozyme C precursor				Fwd (5'-3'): ATGGATGGCTACGCTGGAAAC Rev (5'-3'): AACACCACACGCTTGGCACAAC
	24h	-2.34	-2.34	-5.00	
	(CA383795) Allograft inflammatory factor-1				Fwd (5'-3'): GCAAGGAGGGAAAGCATTGCG Rev (5'-3'): AACAGAACGTGTCTCGTGCAGC
	24h	-1.51	1.51	-3.59	
	(EX0B2 A01) MHC class II invariant chain-like protein 1				Fwd (5'-3'): TTGAGAGAACTGGACGC Rev (5'-3'): TGGTGCCCTGGATGACTTTG
	24h	-2.33	-2.22	-6.89	
	(EX0B3 E09) N-myc downstream regulated protein-2				Fwd (5'-3'): CTTTCATCTGCACTGCTAACA Rev (5'-3'): TAAGGGAGGGGTAGAAGGAA
	24h	-1.02	-1.69	-2.68	
	(HK0002_B10) B-cell receptor-associated protein BAP37-2				Fwd (5'-3'): TTGCTGGTGCTGGGAATAGG Rev (5'-3'): TCACTGGGGTAGAAACCTGTCCG
	24h	-1.44	-1.44	-3.95	



Comparación de la expresión genética mediante micromatriz y RT PCR cuantitativa para genes selectos en el riñón cefálico de truchas expuestas a LPS.

Se indican los cebadores utilizados para evaluar cada gen en diferentes puntos muestrales, así como el logaritmo en base 2 de los valores de la relación de la expresión genética entre los tratamientos experimentales obtenida para cada gen en la RT PCR cuantitativa (verde) y la plataforma de micromatriz (naranja), así como el valor de intensidad de cambio (FC) para cada transcrito (azul).

LPS- RIÑÓN CEFÁLICO (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	(EX0B2 A01) MHC class II invariant chain-like protein 1				
	24h	-1.02	-2.02	-1.00	Fwd (5'-3'): TTGAGAGAACTTGGACGC Rev (5'-3'): TGGTGCCCTGGATGACTTTG
	(EX0B3 E09) N-myc downstream regulated protein-2				
	24h	-0.57	-1.48	-0.60	Fwd (5'-3'): CTTTCATCTGCACTGCTAACA Rev (5'-3'): TAAGGGAGGGGTAGAAGGAA
	(est04e04) MHC class 1b antigen				
	24h	1.16	2.24	1.09	Fwd (5'-3'): ATGCCAGACAGGTCCATTTC Rev (5'-3'): GCACAGAAGCGTTTCAATCA
	(est02g07) Ig mu heavy chain disease protein				
	24h	-1.45	2.73	-0.05	Fwd (5'-3'): TGC GTGTTTGAGAACAAGC Rev: ATGACATCGCACACAAGCTC
	(HST0001_D08) Beta-globin				
	24h	-2.16	-4.46	-0.45	Fwd (5'-3'): GAGGCAGCTCCACCAGTAAC Rev (5'-3'): ATTTTCAGGGTGTGGCTGAC
LPS- RIÑÓN CEFÁLICO (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	(EX0B3_H01) Matrix metalloproteinase-13				
	24h	-4.10	-17.18	-0.04	Fwd (5'-3'): GCTGAGGTGGACAACCTCCAT Rev (5'-3'): AGCTGAAGCTGAAGGACTCG
	(est04e04) MHC class 1b antigen				
	72h	1.67	3.17	0.72	Fwd (5'-3'): ATGCCAGACAGGTCCATTTC Rev (5'-3'): GCACAGAAGCGTTTCAATCA
	(est02f08) Serine protease like protein-1				
	72h	-2.21	-4.64	0.26	Fwd (5'-3'): ACCAAAAACATGCTGTGTGC Rev (5'-3'): CCCTCCATTTGAAGTGATCC
	(EX0B3_H01) Matrix metalloproteinase-13				
	72h	-2.56	-5.88	-1.71	Fwd (5'-3'): GCTGAGGTGGACAACCTCCAT Rev (5'-3'): AGCTGAAGCTGAAGGACTCG
	(EX0B2_G12) Tollold-like protein (nephrosin)-2				
	72h	-3.75	-13.47	-0.04	Fwd (5'-3'): CCAACAGCATTGAGGAGGAT Rev (5'-3'): AGGACTTCTGCCACTTGAT

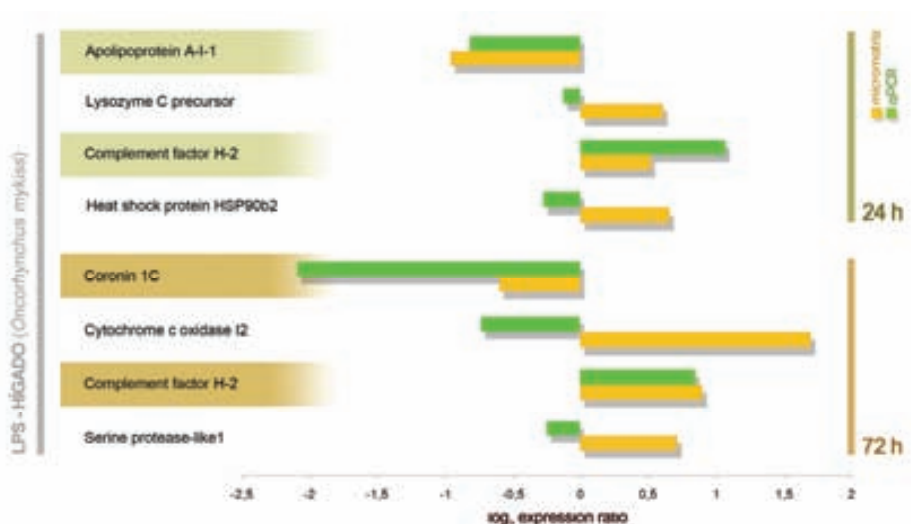


Comparación de la expresión genética mediante micromatriz y RT PCR cuantitativa para genes selectos en el hígado de truchas expuestas a LPS.

Se indican los cebadores utilizados para evaluar cada gen en diferentes puntos muestrales, así como el logaritmo en base 2 de los valores de la relación de la expresión genética entre los tratamientos experimentales obtenida para cada gen en la RT PCR cuantitativa (verde) y la plataforma de micromatriz (naranja), así como el valor de intensidad de cambio (FC) para cada transcrito (azul).

LPS- HÍGADO (*Oncorhynchus mykiss*)

(EST1-3A_F08) Heat shock protein HSP 90-beta-2				
24h	0.66	1.58	-0.27	Fwd (5'-3'): CACAATGGGCTACATGATGG Rev (5'-3'): CCTGTAGATGCGGTTGGAGT
(HK0003_B09) Complement factor H-2				
24h	0.52	1.43	1.07	Fwd (5'-3'): CACTGTGGACGAAGAGCTGA Rev (5'-3'): ATTGGCAATGAGGCAAGTTC
(CA370329) Lysozyme C precursor				
24	0.61	1.52	-0.13	Fwd (5'-3'): ATGGATGGCTACGCTGGAAAC Rev (5'-3'): AACACCACACGCTTGGCACAAC
(HK0003_A11) Apolipoprotein A-I-1				
24h	-0.96	-1.94	-0.82	Fwd (5'-3'): GCGCAGACACTAACGCACTA Rev (5'-3'): TGAAGCACACGGCTATCTTG
(est02f08) Serine protease like protein-1				
72h	0.72	1.64	-0.25	Fwd (5'-3'): ACCAAAAACATGCTGTGTGC Rev (5'-3'): CCCTCCATTTGAAGTGATCC
(HK0003_B09) Complement factor H-2				
72h	0.90	1.87	0.85	Fwd (5'-3'): TTGAGAGAACTTGGACGC Rev (5'-3'): TGGTGCCCTGGATGACTTTG
(EX0B2_G09) Cytochrome c oxidase subunit I-2				
72h	1.70	3.25	-0.73	Fwd (5'-3'): GCGGGTACTGGATGAACAGT Rev (5'-3'): TGAGAGATGGCTGGAGGTTT
(EST1-3A_C12) Coronin-1C				
72h	-0.60	-1.51	-2.09	Fwd (5'-3'): AGTGGTGCGAGCGAGTAAGT Rev (5'-3'): GACAGGTCCCGTATGACCAC



Comparación de la expresión genética mediante micromatriz y RT PCR cuantitativa para genes selectos en las branquias y el riñón cefálico de doradas alimentadas durante cuatro semanas con una dieta inmunoestimulante.

Se indican los cebadores utilizados para evaluar cada gen en diferentes puntos muestrales, así como el logaritmo en base 2 de los valores de la relación de la expresión genética entre los tratamientos experimentales obtenida para cada gen en la RT PCR cuantitativa (verde) y la plataforma de micromatriz (naranja), así como el valor de intensidad de cambio (FC) para cada transcrito (azul).

Inmunoestimulantes- BRANQUIAS (B) y RIÑÓN CEFÁLICO (RC) (*Sparus aurata*)

(HST0001_D04) Alpha-globin I-2				
B	1.31	2.48	1.00	Fwd (5'-3'): TCTGTCCAGCCTCAGCGAAC Rev (5'-3'): CATGGCAATGACCAGCATGA
(HK0003_A11) Apolipoprotein A-I-1				
B	-1.93	-3.82	-2.00	Fwd (5'-3'): AACGATTACCGCACCCCTGCT Rev (5'-3'): TCTCCTCCACGTTGGCTTGA
(CA359170) Metallothionein B				
B	-0.24	-1.18	-0.26	Fwd (5'-3'): CCTGCACATGCACAACTGC Rev (5'-3'): TGTCGCACGTCTTCCCTTTG
(est02f04) Tubulin alpha-3 chain				
B	0.58	-1.49	0.92	Fwd (5'-3'): CCTTGAACGTGGACCTGACG Rev (5'-3'): TCGAAGCAGGCATTGGTGAT
(CA379977) MHC class II alpha chain				
B	0.92	1.89	2.18	Fwd (5'-3'): TCCTGGACCAAGAACGGACA Rev (5'-3'): CCTGGTCAGTGGCTCCTTCA
(HST0001_D04) Alpha-globin I-2				
RC	1.26	2.40	2.68	Fwd (5'-3'): TCTGTCCAGCCTCAGCGAAC Rev (5'-3'): CATGGCAATGACCAGCATGA
(HK0003_A11) Apolipoprotein A-I-1				
RC	-1.46	-2.75	-1.01	Fwd (5'-3'): AACGATTACCGCACCCCTGCT Rev (5'-3'): TCTCCTCCACGTTGGCTTGA
(Hete0002_D05) Fatty acid-binding protein				
RC	-0.37	-1.30	-1.74	Fwd (5'-3'): TCGGCAAGGAGGCTGAAATC Rev (5'-3'): GTGGCAGAACTTGCCGGTCT
(CA359170) Metallothionein B				
RC	-0.34	-1.26	1.51	Fwd (5'-3'): CCTGCACATGCACAACTGC Rev (5'-3'): TGTCGCACGTCTTCCCTTTG
(est02f04) Tubulin alpha-3 chain				
RC	0.55	1.46	2.62	Fwd (5'-3'): CCTTGAACGTGGACCTGACG Rev (5'-3'): TCGAAGCAGGCATTGGTGAT
(CA379977) MHC class II alpha chain				
RC	0.83	1.78	2.49	Fwd (5'-3'): TCCTGGACCAAGAACGGACA Rev (5'-3'): CCTGGTCAGTGGCTCCTTCA