



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**Inmuno Caracterización del Transcriptoma del
Bazo de *Thunnus orientalis* Criado por Piscicultura**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Ana Paola López Reyes Guerrero

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

«INMUNO CARACTERIZACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DEL BAZO DE *Thunnus orientalis* CRIADO POR PISCICULTURA»

ANA PAOLA LÓPEZ REYES GUERRERO



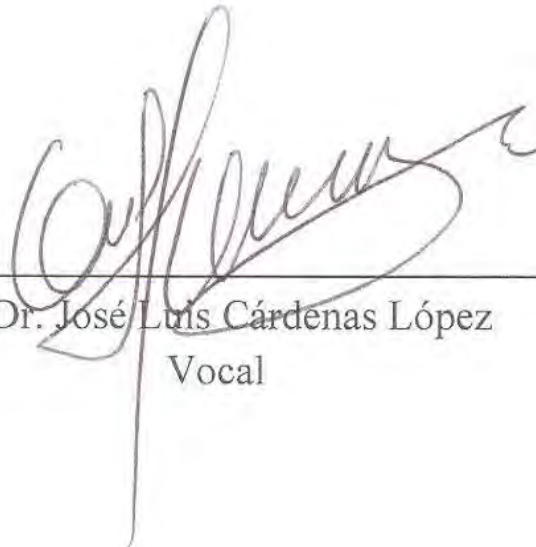
Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Director de tesis



Dra. Marina Ezquerria Brauer
Co-director



Dra. Olivieri Martínez Cruz
Vocal



Dr. José Luis Cárdenas López
Vocal

Hermosillo, Sonora

Septiembre, 2017

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Ana Paola López Reyes Guerrero
ANA PAOLA LÓPEZ REYES GUERRERO

Enrique Márquez Ríos
Dr. Enrique Márquez Ríos
Coordinador del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Septiembre, 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la beca de manutención otorgada para la realización de esta tesis, así como por el apoyo mediante el proyecto TEXAS A&M UNIVERSITY-CONACYT 2015-020 “*Immunogenetic assessment of the critically endangered totoaba fish to enhance survival and repopulation after hatchery rearing*”.

Agradezco a la UNISON, esta institución de enorme calidad, que me brindó el respaldo necesario para realizar diversas actividades y estancias durante estos años.

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores, por darme la oportunidad de trabajar con él, por el asesoramiento y la acertada orientación que recibí durante todas las etapas del presente trabajo de investigación. A los miembros de mi comité, Dra. Marina Ezquerro Brauer, Dra. Oliviert Martínez Cruz y Dr. José Luis Cárdenas López, por su disposición, por el conocimiento que me brindaron dentro y fuera de las aulas, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo, a pesar de tantas actividades que los ocupan.

Quiero agradecerle profundamente al Dr. Mike Criscitiello, por los conocimientos invaluable que me brindó para llevar a cabo esta investigación, por su gran paciencia para esperar a que este trabajo pudiera llegar a su fin. Gracias por su ayuda y por la confianza en mí depositada. Así como a la Universidad de Texas A&M por todas las facilidades otorgadas que me permitieron adquirir nuevos conocimientos. Y una especial mención a las personas cuya colaboración fue importante para el desarrollo del trabajo Thad Deiss por su ayuda en los ensayos de laboratorio y Kranti Konganti por su ayuda en temas bioinformáticos.

Al DIPA, a los excelentes profesores del programa de maestría, compañeros y a aquellas grandes personas que hacen posible el conocimiento en las aulas. Al Dr. Enrique Márquez Ríos, por su apoyo y guía para ingresar al posgrado y a la Dra. Ofelia Rouzaud Sáñez por siempre estar al pendiente tanto de los aspectos humanos, como académicos durante mi estadía. A María Socorro Favela Martínez y a María del Refugio Calderón por su paciencia,

orientación y calidez brindada. Y al Q.B.T.A. César Otero León por crear un excelente ambiente de trabajo y colaboración dentro del Laboratorio de Investigación en Alimentos.

Así mismo, le quiero agradecer a todos los que se convirtieron en una familia para mí durante mi estadía en Sonora. Primero a todos y cada uno de mis compañeros de generación: Rafael Dávila Flores, Jesús Fimbres Romero, Andrés Levy De la Torre, Juan Pedro López Córdova, Ángel Tapia Vásquez y a mi compañero de laboratorio. Manuel Carretas Valdez, por su invaluable ayuda, por ser tan amables, caballerosos y siempre estar al pendiente de mí cuando lo necesité. A mis amigas foráneas: Alma Ruelas Yanes y Liliana Pérez Pérez, por su hospitalidad, por escucharme, por sus consejos y por ser las mejores para entender ciertos problemas relacionados con la distancia.

A mis amigas del laboratorio, por ser no sólo un ejemplo de desarrollo profesional a seguir, sino también por haber hecho el papel de una familia en todo momento, por aceptarme tal cual soy a pesar de ser tan diferentes entre nosotras, por sus palabras de aliento, enseñanzas y confianza, por siempre crear el ambiente perfecto para la convivencia y por haber hecho de mi etapa de maestría un trayecto que nunca olvidaré, gracias, Dra. Idania Quintero Reyes, Machuy Moreno Vásquez, Emma Valenzuela Buitimea, Nallely Hoyos González, Leslie Chaidez Laguna, Elena Moreno Córdova, Brisa Ibarra Hernández, Isabel Arredondo Parada, Rosa López Enríquez y Jesús Rojas Salazar; aprendí mucho de todas ustedes y siempre las llevaré conmigo.

El agradecimiento más profundo, es para mis padres, Ana Lydia Guerrero Herrera y Rodrigo López Reyes Santiago, por su apoyo y cariño incondicional, comprensión, comunicación y guía desde México, por enseñarme a ir siempre tras de mis metas y no desistir hasta alcanzarlas, a mi hermano Rodrigo López Reyes Guerrero, por siempre creer en mí e impulsarme a lograr más y ser mejor.

Y por último a Débora Josette Gamiño Alvarez, por ser una gran inspiración y motivación; por estar a mi lado brindándome tu cariño y el ánimo necesario para continuar lo que había empezado.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada, a mis padres, por ser mi motor y un gran ejemplo a seguir. Porque son las personas a quienes más admiro por sus ganas de salir adelante, porque nunca se dejan derrumbar por los obstáculos que se les presenten. Por ser los mejores maestros de vida, y enseñarme con su ejemplo a ser perseverante, actuar responsablemente, con pasión y valor ante las metas que quiero alcanzar. Por su búsqueda constante, por siempre darnos las herramientas necesarias a mi hermano y a mí para superarnos y porque a ustedes les debo todo lo que soy ahora.

A mi hermano, porque aunque a veces diferimos de opinión, gustos o maneras de ver la vida sé que siempre estás ahí para mí, cuidándome y escuchándome.

A mis abuelas, Ana María Herrera González y Sofía Guadalupe Santiago Aguilar (Q.E.P.D.), por su sabiduría y por formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en diversos momentos.

Y a Josette, porque tu ayuda fue fundamental en este proyecto y por el ánimo que me brindas día con día para alcanzar nuevas metas tanto profesionales como personales.

RESUMEN

El suborden de los *Scombroidei* suele conocerse con el nombre de “atunes y especies afines”. Este suborden está compuesto de atunes, conocidos como atunes verdaderos, agujas o picudos y otras especies parecidas a los atunes. Dentro del género *Thunnus* podemos encontrar diferentes especies con una gran importancia económica. Como ejemplo, *Thunnus orientalis* genera una gran cantidad de ingresos en varias partes del mundo debido a su amplio mercado y comercio en diferentes presentaciones, tales como conservas y sashimi (pescado crudo considerado como un manjar en el Japón). Existen varias granjas encargadas de cultivar a estas diferentes especies a fin de cumplir con la demanda y las exigencias del mercado. Dentro de estas granjas es necesario mantener la calidad de los peces durante su cultivo, evitando que sufran del ataque de virus y bacterias. Por ello se busca implementar estrategias viables y aceptadas para prevenir el desarrollo de alguna enfermedad, donde uno de los primeros pasos para lograrlo es el conocimiento de los genes presentes en estos organismos.

La idea central de este trabajo fue la caracterización inmunológica del transcriptoma obtenido del atún *Thunnus orientalis*. Para la extracción del ácido ribonucleico (ARN) se utilizaron muestras del bazo, debido a que este órgano es representativo del sistema inmune. El ARN total se extrajo con un juego de reactivos comercial y su integridad fue evaluada. Posteriormente, se cuantificó y sintetizó la librería de secuencias de los transcritos, y finalmente, se generó el transcriptoma a través de diversas herramientas bioinformáticas.

Los principales resultados de este trabajo fueron la obtención de ARN de buena calidad para su secuenciación, de la cual se generaron 63,260,761 secuencias inicialmente. Después de un proceso de verificación de calidad y remoción de adaptadores de secuenciación, se obtuvieron 43,530,887 secuencias. Posteriormente, se realizó una ontología genética a partir de las secuencias obtenidas por Illumina utilizando como referencia el genoma de *Thunnus orientalis* reportado por otros investigadores, para después realizar una anotación del mismo.

Finalmente, se obtuvo un total de 1,742 genes vinculados a procesos del sistema inmunológico, que incluye cualquier proceso o receptor que pueda causar el funcionamiento del sistema inmune. Este trabajo proporciona resultados en la rama de la maricultura, lo cual contribuirá al desarrollo de estrategias biotecnológicas, como la elaboración de vacunas o implementación de inmunoterapia.

CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR	I
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA.....	IV
RESUMEN	V
CONTENIDO.....	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	X
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
CIENCIAS ÓMICAS	3
Transcriptómica.....	3
Elaboración de transcriptomas.....	5
PISCICULTURA DEL ATÚN.....	7
Definiciones y Clasificaciones de la Acuicultura	7
Piscicultura del Atún	8
CARACTERÍSTICAS Y PRINCIPALES ESPECIES DEL GÉNERO <i>THUNNUS</i>	13
Atún Aleta Azul del Pacífico <i>Thunnus orientalis</i>	14
IMPORTANCIA COMERCIAL DEL ATÚN	16
Mercado de Atún en México y Japón	16
SISTEMA INMUNE Y SU RELACIÓN CON LA PISCICULTURA	17
MECANISMOS INMUNOLÓGICOS EN PECES.....	19
Inmunidad Innata.....	19
Inmunidad Adaptativa	21
SISTEMA INMUNE EN PECES TELEÓSTEOS.....	22
Timo	22
Riñón.....	22
Tejido linfoide	24
Bazo.....	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28

ESPECÍMENES DE ATÚN	28
AISLAMIENTO DEL ARN TOTAL	28
CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN	29
Cuantificación de ARN	29
Evaluación de la Calidad e Integridad de ARN.....	29
ELABORACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN POR ILLUMINA	30
Elaboración de Librerías	30
Secuenciación por Illumina	30
OBTENCIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DE <i>THUNNUS ORIENTALIS</i>	31
Control de Calidad y Revisión de Datos.....	31
Ensamblaje y Mapeo	33
ONTOLOGÍA GÉNICA DEL TRANSCRIPTOMA DE <i>THUNNUS ORIENTALIS</i>	33
Anotación del Genoma	36
<i>Trinotate</i>	36
<i>InterProScan</i>	38
Filtración de lecturas y alineamiento.....	38
Conteo de lecturas	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN.....	41
OBTENCIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DE <i>THUNNUS ORIENTALIS</i>	45
Control de Calidad y Revisión de Datos.....	45
ONTOLOGÍA GÉNICA DEL TRANSCRIPTOMA DE <i>THUNNUS ORIENTALIS</i>	53
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

No.	Titulo	Página
1	Dogma central de la biología molecular.....	4
2	Tipos de cultivo según las fases de ciclo biológico.....	9
3	A) Producción de <i>Thunnus orientalis</i> por medio de la acuicultura, dentro de estos se incluyen <i>Thunnus thynnus</i> . B) <i>Thunnus maccoyii</i> C) <i>Thunnus albacares</i>	11
4	Imagen de las especies representativas del género <i>Thunnus</i> . A) <i>Thunnus albacares</i> B) <i>Thunnus orientalis</i> C) <i>Thunnus thynnus</i> D) <i>Thunnus macoyii</i>	15
5	Influencia del ambiente con la salud del pez.....	20
6	Localización de los principales órganos linfo-hematopoyéticos de peces teleósteos.....	23
7	Ejemplo de artefactos de secuenciación.....	34
8	Movilidad electroforética de ambas muestra de bazo de <i>T. orientalis</i> , donde se observa claramente las bandas de las subunidades del ARN ribosomal 18s y 28s.....	43
9	Electroferogramas de la muestras de bazo de <i>T. orientalis</i> , donde se muestran los picos de las subunidades 18 y 28s.....	44
10	Gráfica de FastQC del transcrito. En la figura A se muestra la cadena F y en la B la cadena R del transcrito, donde se observa una buena calidad de las bases presentes en el transcrito, con una ligera pérdida al final por el fenómeno denominado phasing.....	48
11	Gráfica de genes pertenecientes a los componentes celulares expresados en el bazo de <i>Thunnus orientalis</i>	56
12	Gráfica de genes que llevan a cabo una función molecular expresados en el bazo de <i>Thunnus orientalis</i>	58
13	Gráfica de genes que llevan a cabo un proceso biológico expresados en el bazo de <i>Thunnus orientalis</i>	59
14	Gráfica de genes involucrados en los procesos del sistema inmune, expresados en el bazo de <i>Thunnus orientalis</i>	61

LISTA DE TABLAS

No.	Titulo	Página
1	Toneladas capturadas de <i>Thunnus orientalis</i> , <i>Thunnus maccoyii</i> , <i>Thunnus albacares</i> por acuicultura y pesca por un periodo de 3 años.....	12
2	Puntuaciones de calidad de Phred.....	32
3	Parámetros utilizados durante el ensamblaje en Bowtie2, dentro de la plataforma Galaxy.....	35
4	Concentración y relación de absorbancia 260/280, obtenidos por el equipo Nanodrop.....	42
5	Datos de secuencias y estadísticas básicas.....	49
6	Parámetros utilizados por Bowtie2 en la plataforma de Galaxy.....	50
7	Resultados de Ontología genética por medio de WEGO.....	54
8	Procesos del sistema inmune.....	60

INTRODUCCIÓN

Una especie de pez que ha sido muy demandada por los mercados internacionales es el atún (*Thunnus spp.*), mismo que se obtiene de manera tradicional mediante captura en alta mar. Los atunes se encuentran dentro del suborden de los *Scombroidei* (Klawe, 1977; Collette y Nauen, 1983; Nakamura, 1985), del género *Thunnus*. Una de las especies comerciales más importantes dentro del mercado internacional es *Thunnus orientalis* (Gibbs y Collette, 1967). Sin embargo, en muchas ocasiones la calidad de la carne demandada dista de la requerida por muchos países, como el Japón (Zuleta y Becerra, 2013). Lo que llevó a establecer sistemas de cultivo en varias partes del mundo, incluyendo México, que buscan lograr la calidad deseada de estas especies.

Durante el cultivo de cualquier organismo marino uno de los principales retos es la prevención de enfermedades, ya que, una vez que esta se manifiesta puede no sólo ocasionar la merma del valor comercial del producto, sino su pérdida total o incluso el cierre de la granja. Una alternativa que puede ayudar a prevenir el desarrollo de enfermedades, o bien el cómo poder disminuir los efectos negativos del desarrollo de virus y bacterias en los sistemas de cultivo, es el conocimiento de la secuencia genética de las especies cultivadas y específicamente de los órganos responsables de activar el sistema inmune del organismo (Cruz *et al.*, 2002).

En el caso de los peces, uno de los órganos responsables de regular su sistema inmunológico es el bazo, el cual está involucrado activamente en la fagocitosis de los macrófagos y antígenos, y la eliminación de células sanguíneas debilitadas (Espenes *et al.*, 1995; Falk *et al.*, 1995).

A la fecha, se han realizado diferentes investigaciones con algunas especies criadas por piscicultura del género *Thunnus*, los cuales incluyen estudios genéticos sobre gónadas e hígado, con el fin de obtener datos para futuros estudios de biología molecular, pero orientados hacia estrategias reproductivas y de engorda. También se han reportado estudios transcriptómicos con tejido cardíaco para evaluar los efectos de la aclimatación a diferentes temperaturas (Jayasundara *et al.*, 2013).

Sin embargo, no existen estudios transcriptómicos evaluando la manera en que se expresa el sistema inmune de atún. Por ello, este trabajo se centra en el estudio transcriptómico y la caracterización de los genes del sistema inmune innato presentes en el bazo de *Thunnus orientalis*.

Este trabajo establece las bases para que en futuros estudios se lleven a cabo el desarrollo de marcadores y diagnósticos para esta especie criada en granjas. Así como un punto de lanzamiento para un mejor desarrollo de las intervenciones inmunológicas durante la cría industrial, incluyendo el desarrollo de vacunas, la mejora del crecimiento, la reducción de los períodos de engorde y la supervivencia de los peces cultivados.

ANTECEDENTES

Ciencias Ómicas

Debido a los recientes avances tanto en el campo de la biología, como en el campo de la bioinformática, se ha concebido una visión global de los procesos biológicos; que se ve reflejada en el desarrollo de las denominadas "ciencias ómicas". Estas ciencias aportan grandes avances en el conocimiento básico de los temas biológicos (Velarde-Salcedo y de la Rosa). Además, suponen un enorme desarrollo en el campo del análisis de la funcionalidad celular y en sus aplicaciones biotecnológicas. Las cuatro áreas más importantes son: genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica.

La genómica estudia los genomas de los individuos, incluyendo la secuenciación y análisis del ácido desoxiribunocléico (ADN). La transcriptómica por su parte, estudia y compara los ácidos ribunocleicos (ARN) y micro-ARN presentes en la célula, identificando los genes que se están expresando específicamente en un momento dado y el rol modulador que cumple el micro ARN. La proteómica estudia y compara cuali- y cuantitativamente el perfil de proteínas, presentes en un conjunto de células o tejidos, ya sea en presencia o ausencia de enfermedad. Y por último la metabolómica, que identifica y cuantifica todos los metabolitos presentes en una célula, tejido u organismo en un momento determinado. Como se puede apreciar, las "ómicas" son importantes como disciplinas en sí mismas, ya que nos ayudan a entender diferentes campos como la medicina, biotecnología, y nutrición (Heinner, 2015).

Transcriptómica

La información genética se encuentra almacenada en el ADN y esta no puede ser utilizada sin ser antes transcrita en ARN. Posteriormente, el ARN mensajero (ARN) debe traducirse en proteínas con el fin de cumplir una función biológica. En la Figura 1 se muestra el dogma central de la biología molecular, donde se observa el contenido total de ADN de un organismo, el cual se conoce como genoma. Posteriormente, los genes del genoma se transcriben a ARN, donde a todo el contenido de ARN en un organismo, tejido o célula bajo una condición específica, se le llama transcriptoma. Y, por último, el ARNm se traduce en

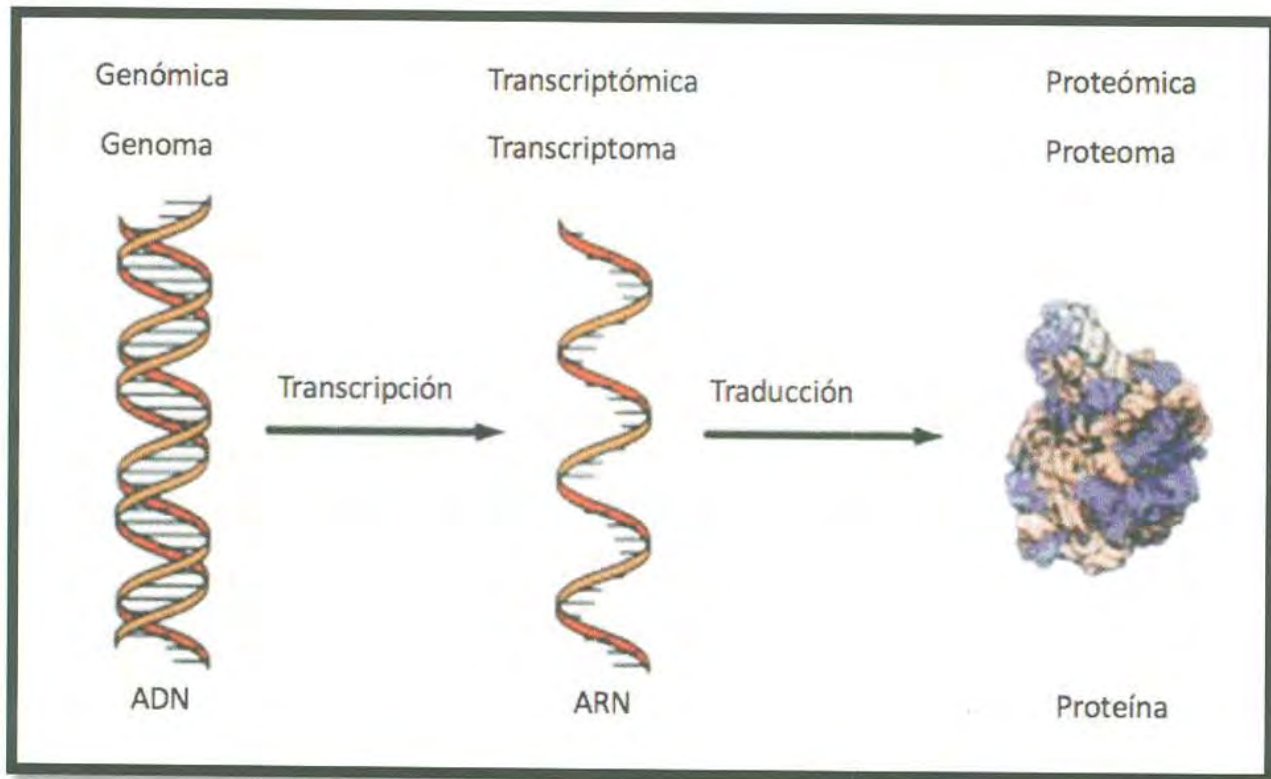


Figura 1. Dogma central de la biología molecular.

Fuente: Steinberg (2011)

proteínas, con lo se obtiene el proteoma (Martínez, 2000). La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de ARN mensajeros o transcritos presentes en una célula, tejido u organismo (Echenique *et al.*, 2004).

La transcripción es el paso inicial en la expresión génica, por lo tanto, una respuesta transcripcional es el reflejo de cómo los mecanismos celulares que se ven afectados por una condición. Esto quiere decir que, la cantidad de moléculas producidas de determinado ARNm depende de la función que éste tenga en un proceso celular específico o condición que se esté presentando en el momento (Soto y Carrascal, 2012). De esta manera, la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcrito bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen. Más aún, los niveles de ARNm pueden dar no solo una visión clara de patrones de expresión, sino también cuantificaciones altamente correlacionadas entre cambios en la abundancia de ARNm con cambios en la abundancia de proteínas (Lewin, 1996).

Elaboración de transcriptomas

Durante mucho tiempo, nuestro conocimiento acerca de la transcriptómica se derivó en gran parte de las predicciones de genes, por lo que la información obtenida era parcial o sesgada. Recientemente, la secuenciación de transcriptomas, ha mejorado, debido al surgimiento y el uso de las llamadas tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés), o secuenciación de ARN (ARN-seq). Las cuales, han comenzado a revelar la complejidad y dinámica del transcriptoma con un gran nivel de sensibilidad y exactitud (Edgar *et al.*, 2002).

El trabajar y reconstruir un transcriptoma a partir de lecturas cortas tiene muchos desafíos informáticos, ya que su ensamblaje implica juntar una gran variedad de lecturas cortas. Los conjuntos de datos obtenidos por medio de los NGS son muy grandes, y pueden ir de gigabases hasta terabases, lo que requiere que los sistemas informáticos tengan gran capacidad de memoria o muchos núcleos para ejecutar algoritmos paralelos (Soto y Carrascal, 2012).

Las estrategias por las cuales se puede realizar un ensamblaje de transcriptoma se divide en tres categorías: con un genoma de referencia, *de novo* o una estrategia que combina las dos anteriores (Ekblom y Wolf, 2014). Para este estudio se utilizó el método de alineación basados en un genoma de referencia, el cual se utiliza para encontrar ubicaciones de asignación potencial, ya sea, por coincidencia exacta o similitud de secuencia.

La transcriptómica es una poderosa herramienta que desenreda procesos mecánicos, revela modos de acción y vías de regulación, proporcionando una imagen dinámica de los sistemas biológicos, obteniendo diferentes estados de actividades biológicas en las células, tejidos u organismos enteros (NIH, 2016). Así pues, la transcriptómica y otras "ómicas" son el grupo de nuevas áreas de investigación aplicadas a sistemas biológicos, en este caso específico, a peces criados por medio de acuicultura.

La acuicultura la encontramos especializada en la producción de alimento, como un recurso necesario de la pesquería recreacional o comercial y como una herramienta necesaria para llevar a cabo los programas de conservación. Para que el desarrollo de la acuicultura sea sostenible se requiere la evaluación y el conocimiento de la diversidad genética de las especies con las cuales se trabajará. Los científicos deben intervenir y dirigir el ciclo de vida de una especie. En el momento que esto ocurre, se producen normalmente cambios irreversibles en los genes de la población (Gordillo y Mendez, 2013).

Estos cambios pueden ser deseados, lo que ocurre cuando los programas de cría selectiva son llevados a cabo para mejorar el crecimiento o para producir una mejor adaptación al ambiente de los criaderos. (Hackett y Alvarez, 2000; Burkhart, 2000). Para poder lograr todos estos cambios deseados, se utiliza la ayuda de diferentes ciencias, como las ciencias ómicas.

Piscicultura del Atún

La producción de alimentos acuáticos, en algunas especies, ha pasado de ser principalmente capturada a principalmente cultivada, aumentando así la producción de este tipo de especies. Este hecho, se alcanzó en 2014, cuando la contribución del sector de la acuicultura al suministro para el consumo humano superó por primera vez la de las especies silvestres (LA, 2016).

Definiciones y Clasificaciones de la Acuicultura

Para hablar de piscicultura primero se debe entender que la acuicultura es la producción controlada de especies de origen acuático para su posterior venta y consumo. Dentro de ella, existen dos clasificaciones: la acuicultura continental, la cual se refiere al cultivo de especies estrictamente de agua dulce, y la acuicultura marina o maricultura, referida al cultivo de especies con ciclo biológico, total o parcial en el océano (Hernández, 2005).

La acuicultura marina, es mucho más reciente, y tiene diferentes clasificaciones, según: organismos de cultivo, fase del ciclo biológico que abarque, ubicación de instalaciones y nivel de dependencia de la acción humana. Hablando específicamente de la especie con la que se trabaja, existen algunas clasificaciones, como: carcinocultura, producción controlada de crustáceos; malacocultura, cultivo de moluscos; alguicultura, producción de algas y finalmente la piscicultura o la producción controlada de peces (Orvay, 1993).

Los tipos de producción en acuicultura se pueden clasificar de acuerdo a las etapas del ciclo biológico que abarque el sistema productivo. De manera general y desde el punto de vista de la acuicultura, el ciclo biológico de cualquier especie consta de las siguientes fases: reproducción y producción de huevos, fase de larva y post-larva o alevín, fase juvenil y adulto. Dependiendo de las etapas que abarque del ciclo biológico, se pueden establecer la acuicultura integral y la parcial o de semicultivo (Orvay, 1993).

La acuicultura integral abarca todas las fases del ciclo biológico de las especies. Desde la reproducción hasta la venta de los individuos, alcanzada la talla comercial y aunque tiene el mayor rendimiento económico, también es el más encarecido desde puntos de vista de capital fijo y costos (Palomares, 2015).

Por parte de la acuicultura parcial o semicultivo, hace referencia a aquel sistema de acuicultura que sólo abarca algunas de las fases del ciclo biológico. Por lo que existen dos posibilidades: las granjas de cría y las granjas de engorde. En el primero la empresa se dedica a la producción masiva y venta de larvas y/o postlarvas. Mientras que, en el segundo, la empresa se dedica al engorde y comercialización de especies procedentes de una granja de cría o del medio. En la Figura 2 se presenta un esquema donde se muestran los ciclos que abarca cada una de estas granjas (Orvay, 1993). En esta tesis se trabajó con atún criado por medio de piscicultura, en acuicultura parcial o semicultivo, específicamente en granjas de engorde.

Piscicultura del Atún

El cultivo del atún comenzó en Canadá a finales de los años 60 en una granja japonesa, debido a la continua búsqueda de un atún altamente especializado, categorizado y con el contenido adecuado de grasa (SAGARPA, 2014).

Con esto, el aumento de los peces criados enviados al mercado japonés fue incrementando paulatinamente. A principios de los años noventa, el mercado japonés del *sashimi* del atún se había dividido en dos categorías: una para productos muy caros de alta calidad y otro para el precio y calidad popular. La primera categoría únicamente se servía en restaurantes de sushi o comida japonesa de primera clase, mientras que el resto era vendido a un precio muy reducido al público, restaurantes y supermercados (Andrés *et al.*, 2017).

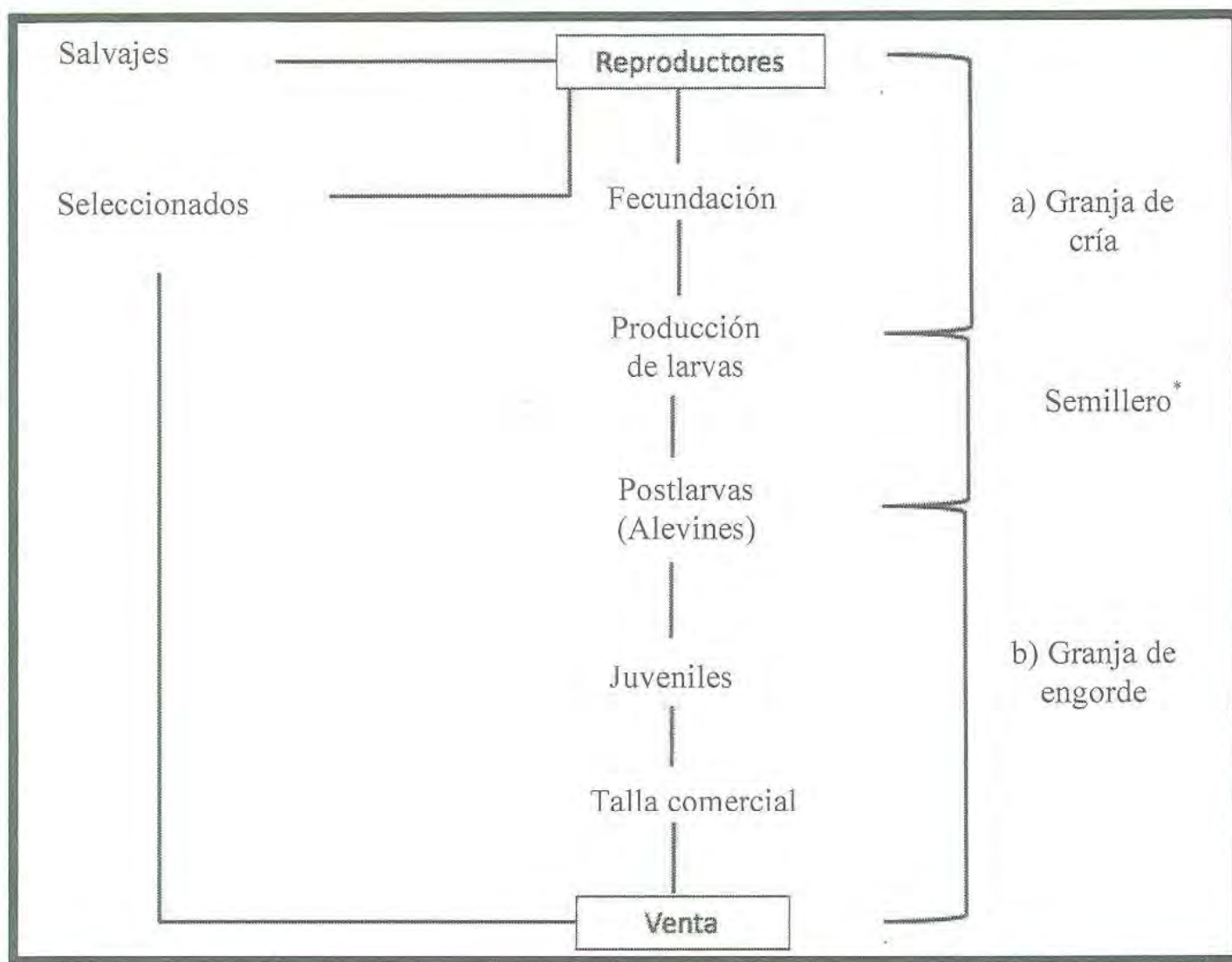


Figura 2. Tipos de cultivo según las fases de ciclo biológico.

Fuente: Orvay (1993)

Cultivo integral

Cultivo parcial: a) Granja de cría

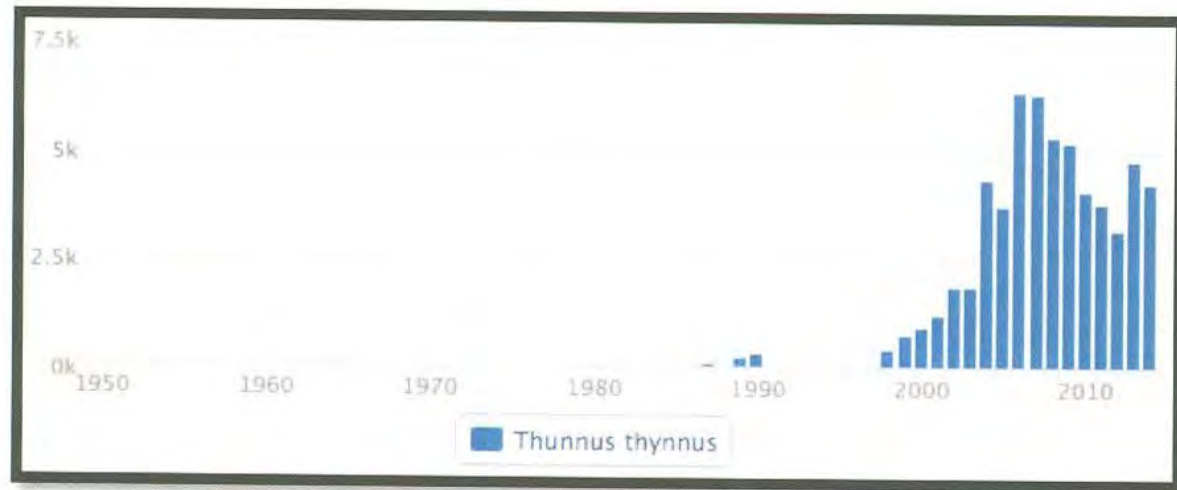
b) Granja de engorde

*La fase de semillero se refiere a instalaciones y un período de preengorde, hasta postlarva o alevín.

La piscicultura se ha desarrollado principalmente en países industrializados, donde se busca la producción de especies apreciadas dentro del ámbito alimenticio y que alcancen altos precios en el mercado, debido a la calidad que estas ofrecen (FAO, 2002). Revisando específicamente las ventajas sobre la crianza del atún por medio de la piscicultura, se encuentran la engorda, ya que de esta manera se puede obtener las características deseadas de los especímenes, como la cantidad de grasa; esperando que al menos exista un aumento del 25% de peso en los primeros meses de cultivo (LA, 2016).

En la Figura 3 y en la Tabla 1 se muestran algunas estadísticas de las especies comerciales de atún más importantes, dentro de ellas se encuentra atún aleta azul del Pacífico, *Thunnus orientalis*. En las estadísticas se observa que, durante los últimos años, la producción de especies sigue siendo mayor por medio de la pesca tradicional, sin embargo, los números de producción de la acuicultura, donde se incluye a la piscicultura, siguen en aumento (LA, 2016). A excepción de *Thunnus albacares*, con la cual se están realizando pruebas para poder incluirlas a mayor profundidad dentro de este campo (LA, 2016).

A



B



C



Figura 3. A) Producción de *Thunnus orientalis* por medio de la acuicultura, dentro de estos se incluyen *Thunnus thynnus*. B) *Thunnus maccoyii* C) *Thunnus albacares*.

Fuente: LA (2016)

Tabla 1. Toneladas capturadas de *Thunnus orientalis*, *Thunnus maccoyii*, *Thunnus albacares* por acuicultura y pesca por un periodo de 3 años.

Especies	Año	Acuicultura	Pesca
<i>Thunnus orientalis</i>	2014	4,253	14,336
	2013	4,772	14,525
	2012	3,210	12,355
	2011	5,800	9,200
<i>Thunnus maccoyii</i>	2014	7,544	11,051
	2013	7,484	11,147
	2012	7,087	10,252
	2011	5,800	9,200
<i>Thunnus albacares</i>	2014	61	1,466,606
	2013	170	1,339,494
	2012	38	1,352,459
	2011	-	1,218,525

Fuente: LA (2016)

Características y Principales Especies del Género *Thunnus*

El suborden de los *Scombroidei* suele conocerse con el nombre de “atunes y especies afines” (Klawe, 1977; Collette y Nauen, 1983; Nakamura, 1985). Este suborden está compuesto de atunes, conocidos como atunes verdaderos, agujas o picudos y otras especies parecidas a los atunes. Por lo tanto, el término “atún” incluye diversos tipos de peces; algunos pertenecen al género *Thunnus* y son considerados como verdaderos atunes, como el caso de: atún aleta azul (*Thunnus thynnus*), atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y la albacora (*Thunnus alalunga*). Existen otras especies, que, por su semejanza morfológica con los atunes, se incluyen para fines estadísticos dentro de esta pesquería, como la macarela (*Scomber*), sierra (*Scomberomorus*) y petos (*Acanthocybium*) (Gibbs y Collette, 1967).

Los atunes son peces con características morfológicas que les permiten ser buenos nadadores. Tienen cuerpo fusiforme, cabeza pronunciada en forma de pirámide triangular y boca relativamente pequeña con respecto al desarrollo del cráneo. Esta fisiología les permite nadar grandes distancias y alcanzar altas velocidades de hasta 70 kilómetros por hora. Las escamas que cubren su dura y muy resistente piel son pequeñas, poco evidentes y lisas, mientras que su piel está lubricada con un mucus que reduce la fricción con el agua (Cort, 1976).

Presentan dos aletas dorsales muy próximas, rígidas y robustas y una caudal fuerte con forma de arco terminado en dos zonas puntiagudas que le dan aspecto de media luna. Su coloración es típica de los peces pelágicos con el dorso azul oscuro y el vientre blanco, plateado con reflejos irisados, mientras que las aletas van del pardo al amarillo (De y Puerto, 2010).

Dentro del género *Thunnus* se encuentran dos diferentes grupos, conocidos como atún aleta amarilla y atún aleta azul, clasificación se basa en sus características anatómicas. Especies tropicales como, atún de aleta negra (*T. atlanticus*), atún cola larga (*T. tonggol*) y atún aleta amarilla (*T. albacares*), son miembros del grupo de atún aleta amarilla. Dentro del grupo del atún aleta azul podemos encontrar al atún aleta azul del Pacífico (*T. orientalis*), el atún patudo

(*T. obesus*), el atún aleta azul del Norte (*T. thynnus*) y el atún aleta azul del Sur (*T. maccoyii*). Algunas de estas especies se pueden apreciar en la Figura 4 (Gibbs y Collette 1967).

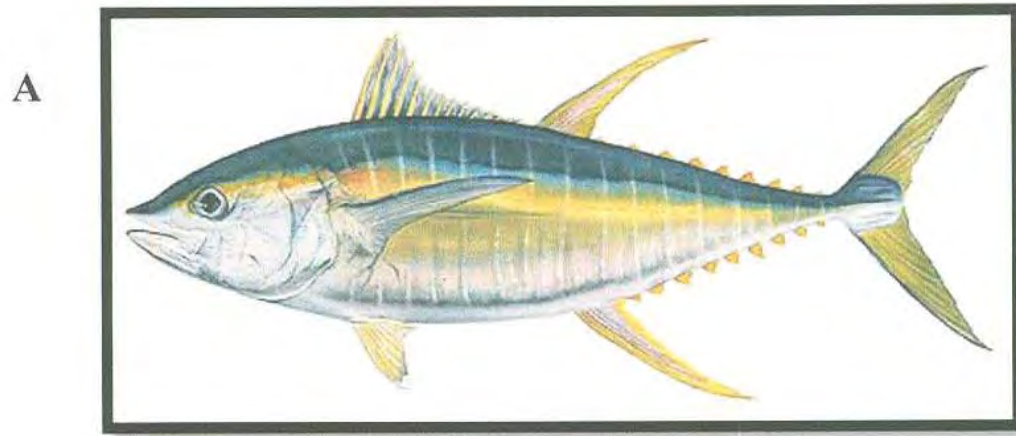
Debido a las diferentes distribuciones alopátricas, pero limitada por la falta de distinción morfológica entre el atún rojo del Atlántico y del Pacífico, hizo que los taxonomistas los consideraran como dos subespecies diferentes, conocidas como: *Thunnus thynnus* y *Thunnus orientalis*, respectivamente (Jones y Silas, 1960; Iwai y Nakamura, 1964; Iwai *et al.*, 1965).

Atún Aleta Azul del Pacífico *Thunnus orientalis*

El atún aleta azul del Pacífico, *Thunnus orientalis* (Figura 4B) pertenece a la familia Scombridae y suele alcanzar a menudo 300 kg de peso (Foreman, 1990). Es una especie altamente migratoria, grande y pelágica, que se distribuye en el Océano Pacífico Norte, migrando al hemisferio sur (Bayliff, 1994). Su alimentación consiste principalmente en calamares y peces pequeños, cangrejos rojos pelágicos y krill.

Esta especie representa uno de los recursos pesqueros más importantes y con un alto valor comercial en el mercado mundial, incluyendo países como Japón, Taiwán, Estados Unidos y México; por lo que, debido a su valor y demanda esta es criada por medio de piscicultura además de ser capturada por diferentes métodos como el troll, el palangre, la cerquería y la red de arrastre (Rooker *et al.*, 2001).

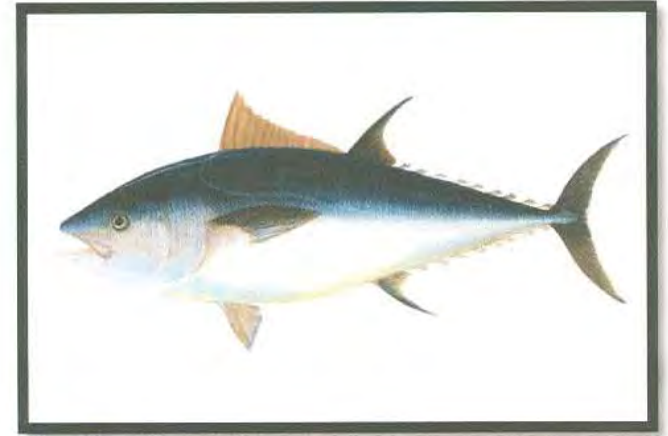
En el 2011, el atún aleta azul del Pacífico no se consideró como una especie amenazada, dentro de la lista roja (González *et al.*, 2012) por lo que no se despertó la menor preocupación. Fue hasta el año 2014, cuando se clasificó como una especie amenazada (Carnevale y Collette, 2014) y su estatus fue aumentado hasta ser considerada como una especie vulnerable, estado en el cual se encuentra actualmente. Lo cual se cree es debido a la sobrepesca que se produce desde hace ya varios años (Menashes, 2011).



B



C



D

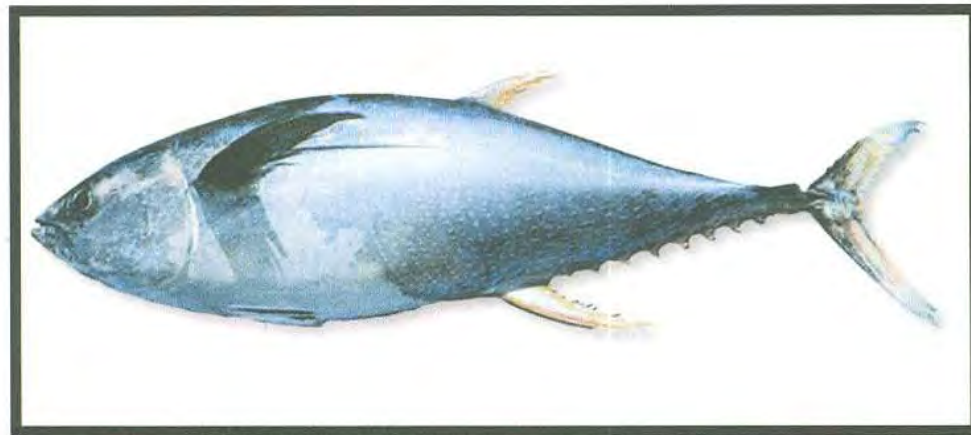


Figura 4. Imagen de las especies representativas del género *Thunnus*. A) *Thunnus albacares* B) *Thunnus orientalis* C) *Thunnus thynnus* D) *Thunnus macoyii*.

Fuente: González, Rodríguez, Mancina, y Ramos (2012)

Aproximadamente el 80% de los atunes de aleta azul del Pacífico y Atlántico se consumen en Japón, particularmente en forma de *sashimi* y sushi, dichos productos pueden llegar a alcanzar precios muy altos (Sekiyama, 2017).

Importancia Comercial del Atún

Los atunes, tienen una gran importancia económica a nivel mundial, un intenso comercio internacional en la industria de las conservas y la preparación de *sashimi*, pescado crudo considerado como un manjar en el Japón (Sekiyama, 2017).

Mercado de Atún en México y Japón

Actualmente Japón, es la tercera economía más grande del mundo, en términos de PIB nominal y poder adquisitivo. A pesar de ser uno de los mercados más exigentes en términos de calidad, sanidad e higiene, importa aproximadamente el 65% de sus necesidades de cereales y otros cultivos como hortalizas y frutas, y el resto lo destina a productos cárnicos y procesados. Específicamente hablando de la pesca comercial, Japón se sitúa en segundo lugar en el mundo detrás de China, ya que representa casi el 15% de las capturas mundiales (Coates, 2015).

Japón es el mayor mercado mundial para los túnidos de calidad *sashimi*. Por lo cual diferentes mercados como el mexicano, el español, el panameño y el neozelandés buscan exportar diversas especies de atún.

México por su parte lidera el mercado por sus exportaciones de *Thunnus orientalis* a Japón, en diferentes presentaciones, como fresco, refrigerado y congelado. Posteriormente, es consumido en la comida tradicional en *sashimi* y sushi. Los principales competidores para México en este mercado son Corea, España, Canadá y Croacia (Andrés *et al.*, 2017).

A pesar de los cuidados para lograr la calidad deseada por el mercado internacional, suelen existir algunos problemas dentro de las granjas., como, el surgimiento numerosos problemas patológicos que afecta el sistema inmune de los peces, poniendo en peligro el ciclo de la vida y su posterior reproducción (de Anda *et al.*, 2013).

Sistema Inmune y su Relación con la Piscicultura

Las enfermedades pueden representar un gran problema dentro de las granjas piscícolas, ya que puede bajar el valor del producto o incluso hacerlo invendible, causando así grandes pérdidas financieras debido a cuarentenas estatales y federales o a la erradicación de algunos peces.

Durante la producción de peces, las enfermedades pueden ser generadas por las siguientes causas: biológicas, como virus, bacterias, hongos y parásitos; físico-químicas, las cuales se refieren a intervalos inadecuados de los parámetros ambientales como la temperatura, el pH, la concentración de sólidos suspendidos y la concentración de compuestos nitrogenados. Por otra parte, se encuentran las enfermedades nutricionales, las cuales se dan por una subalimentación por cantidad o calidad, así como toxicidad generada por manejo inadecuado de alimentos. Y las últimas son las denso-dependientes, por el uso de densidades de cultivo inadecuadas (Allison, 2011).

Las patologías de origen infecciosas son las enfermedades que se producen por acción de microorganismos que se introducen en el cuerpo o tejido del pez y crean una infección o infestación. Entre dichos agentes patógenos se encuentran los virus, bacterias, protozoos, hongos y gusanos.

Dichas enfermedades se pueden esparcir de corral en corral o de granja en granja, por medio de la transferencia de algún pez, persona o equipo infectado (Sadler y Goodwin, 2007). Por lo cual para prevenir esto se deben seguir las buenas prácticas acuícolas y tener un seguimiento rutinario.

En el caso de enfermedades causadas por la alimentación, Bendich (1996) afirmó que la deficiencia de nutrientes aumenta la susceptibilidad de enfermedades infecciosas, así como la influencia de sobrevivir a infecciones o estrés físico. La baja calidad del alimento suministrado al pez está determinada por la escasa disponibilidad de nutrientes necesaria en la ración,

formulación y procesado inadecuado del producto, carencia de conocimiento, comprensión de las necesidades nutricionales del pez y almacenamiento inapropiado del producto. Los síntomas característicos que se presentan en la deficiente calidad del alimento están relacionados con la desnutrición. Esta puede identificarse en el pez, por signos como la pérdida de condición corporal y peso, malformaciones del esqueleto, crecimiento lento y problemas reproductivos.

En la piscicultura existe la continua búsqueda de la optimización de los recintos acuáticos disponibles para el logro de mayores beneficios económicos, en donde se cree que es mejor utilizar la mayor densidad de carga, es decir, el mayor número de peces por unidad de área o volumen posible. Sin embargo, el hacinamiento de los peces hace más propicia la aparición de enfermedades. Las altas densidades en las granjas, inducen condiciones de estrés, debilitando el sistema inmunológico y estimulando una mayor propagación de los patógenos ya que les resulta más fácil encontrar hospederos (Wu, 1991).

A esta alta densidad se deben sumar la cantidad de desechos del metabolismo de este gran número de peces, amoníaco y nitrito específicamente. Todos estos pueden producir efecto tóxico sobre su salud si se acumulan en niveles elevados, conduciendo al animal a la muerte o una patología branquial crónica. Dicha situación se presentará en lugares donde la calidad del agua sea mala debido a las densidades altas de peces (Wu, 1995).

La piscicultura puede ser un desarrollo sostenible, siempre que se tengan en cuenta muchos puntos, como la selección correcta de ubicación de la granja, control de la densidad de las poblaciones y una formulación adecuada de los alimentos. En la actualidad, con el fin de tener estos cuidados, se utiliza la aplicación de modeladores informáticos para la gestión de la maricultura, con los cuales se puede evaluar el impacto ambiental, así como llevar a cabo monitores constantes (Iregui *et al.*, 2000).

Las enfermedades dentro de las granjas piscícolas, se presentan por la interacción de diferentes variables. Los peces cohabitan o están infectados de numerosos agentes patógenos sin generarle la enfermedad, esta situación se establece por un equilibrio entre la resistencia del huésped, el pez, y el agente patógeno. Esta condición se verá afectada cuando existan factores

de estrés suficientemente importantes, para que el animal enferme (Ayambo y Elvira, 2014). En la Figura 5, se observan todos aquellos factores que pueden modificar el estado fisiológico, así como la salud del pez durante la acuicultura.

Debido a todos estos cambios o daños que se pueden presentar en las defensas de estos organismos, es necesario comprender como funciona su sistema inmune.

Mecanismos Inmunológicos en Peces

La respuesta inmune en los vertebrados, donde se incluyen a los peces, se divide en dos tipos: en una respuesta temprana que ocurre a las horas del contacto con el patógeno y una respuesta tardía que se mide en término de días (Medzhitov y Janeway, 1997).

Los peces óseos poseen sistemas inmunitarios capaces de llevar a cabo respuestas humorales y celulares, tanto innatas como específicas. El primero, la inmunidad innata o inespecífica, consiste en una serie de mecanismos que pueden eliminar los patógenos del organismo o bloquear su entrada. Sus componentes están divididos en componentes físicos, factores celulares y humorales (Uribe *et al.*, 2011). Por otra parte, los mecanismos específicos requieren, al igual que en los mamíferos, una inducción por parte del antígeno, una discriminación de los elementos propios y extraños, una especificidad hacia el antígeno y una memoria inmunológica (Lara, 1997).

Inmunidad Innata

Muchas especies de peces son organismos de vida libre ya durante los estados embrionarios de su vida. Por lo tanto, dentro del ambiente acuático deben tener mecanismos para protegerse de una gran variedad de microorganismos. En consecuencia, durante un período prolongado estos dependen de su sistema inmune innato, el cual comienza su desarrollo a una edad embrionaria temprana (Rombout *et al.*, 2005).

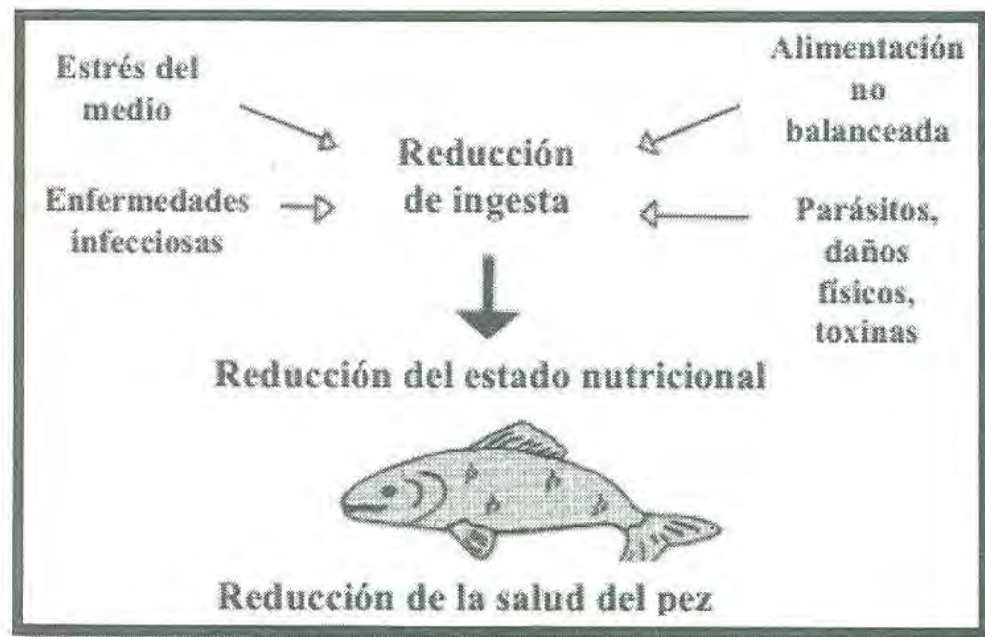


Figura 5. Influencia del ambiente con la salud del pez.

Fuente: Bendich (1996)

La inmunidad inespecífica no tiene la capacidad de discriminar entre distintos agentes extraños, aunque sí es capaz de reconocer estructuras patrón asociadas a patógenos conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) (Medzhitov y Janeway, 1997).

Estos PAMPs están presentes en la superficie de diferentes microorganismos, como polisacáridos, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ADN bacteriano, ARN viral (Magnadóttir, 2006). Su reconocimiento se da a través de los receptores conocidos como receptores reconocedores de patrones (PRR); los cuales se expresan fundamentalmente en la superficie de las células, en compartimentos intracelulares, en el torrente circulatorio y en fluidos tisulares, los cuales entran en contacto con el patógeno durante la infección (Moreno y Sanchez-Ibarrola, 2003).

Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa o adquirida, al contrario que la innata, se estimula tras el contacto con un determinado agente extraño. Esta respuesta se incrementa en magnitud tras cada exposición y una de sus características fundamentales es la capacidad de discriminar entre distintos agentes, aunque sean prácticamente iguales (Martínez *et al.*, 2000). Dicha especificidad va asociada a la capacidad de recordar y por lo tanto el segundo contacto con el mismo antígeno produce una respuesta más fuerte y más rápida. Esto es lo que se conoce como memoria inmunológica en donde los anticuerpos tienen un papel relevante. Los mecanismos fundamentales de la respuesta adaptativa están mediados por dos tipos de células: los linfocitos B y los linfocitos T (Medzhitov y Janeway, 1997).

Sistema Inmune en Peces Teleósteos

Los peces son vertebrados exclusivamente acuáticos y son animales ectodermos, ya que su temperatura corporal depende exclusivamente de la temperatura del medio en el que se hallan. (Atiénzar *et al.*, 2011). El sistema inmunológico de los peces teleósteros carece de médula ósea y de ganglios linfáticos. Por lo tanto, existen cuatro órganos que han adquirido la denominación de órganos linfo-hemato-poyéticos: timo, riñón, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas o intestino (Gutiérrez, 2010). La distribución de estos órganos se esquematiza en la Figura 6.

Timo

El timo en los peces se caracteriza por poseer la forma de una cápsula que rodea el tejido linfoide de la corteza. La estructura del timo es muy variable en teleósteos, y en ocasiones no es posible observar una diferencia clara entre la corteza y este órgano (Bowden, *et al.*, 2005). Este es responsable de la producción de células T y puede considerarse como una agregación de macrófagos que promueven la proliferación de encapsulados de células T (Davis *et al.*, 2002). En el también pueden encontrarse células mioides, células del tipo de los macrófagos y células granulares eosinofílicas (Zapata, *et al.*, 1992; Ferguson, 1989).

Riñón

Aparece como una hoja de tejido en posición dorsal, unida a las paredes de la cavidad general del cuerpo del pez mediante el mesotelio y parte de tejido conectivo (Ferguson, 1989). El riñón en los peces teleósteos es el equivalente a la médula ósea en los vertebrados, y es el mayor sitio de hematopoyesis hasta la edad adulta (Zapata, *et al.*, 2006). Estructuralmente, la parte anterior del riñón está compuesto por una red de fibras reticulares que proporcionan soporte para el tejido linfático (Secombes y Ellis, 2012; Press y Evensen, 1999).

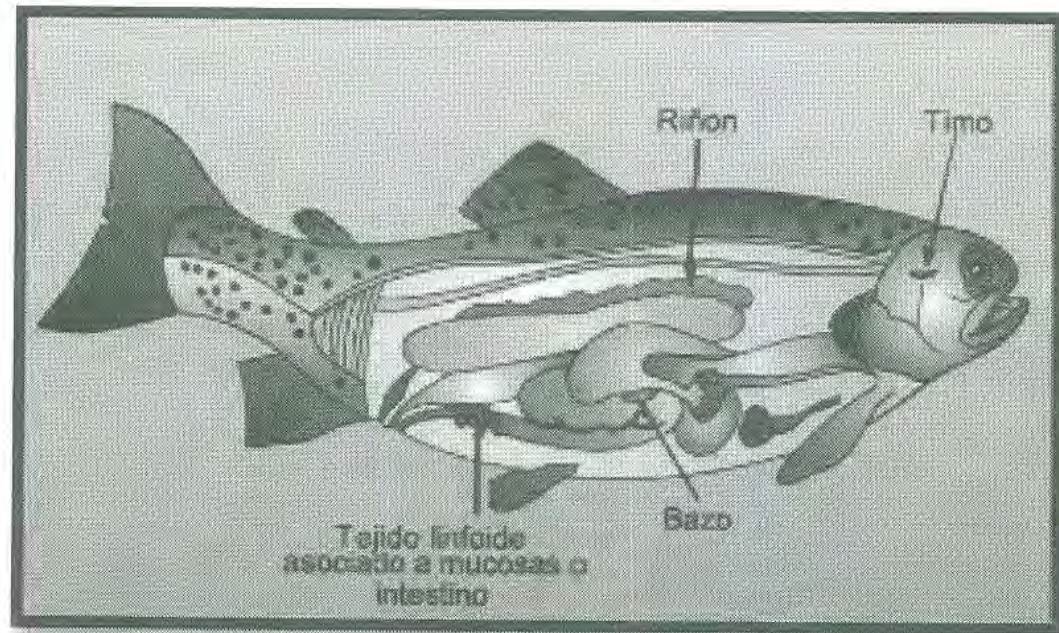


Figura 6. Localización de los principales órganos linfo-hematopoyéticos de peces teleósteos.

Fuente: Gutiérrez (2010)

Las células que se encuentran en el riñón anterior son principalmente macrófagos, que se agregan en estructuras denominadas centros melanomacrófagos (MMC, por sus siglas en inglés), así como células linfoides (Press y Evensen, 1999).

Tejido linfoide

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) se considera como órgano linfoide, debido a que cumple importantes funciones defensivas (Georgopoulou y Vernier, 1986). Está conformado por linfocitos de diferente tamaño, por células plasmáticas, macrófagos, algunos tipos de granulocitos y eosinófilos (Gutiérrez, 2010).

Bazo

Es un órgano abdominal, que suele ser único, aunque en ocasiones pueden encontrarse dos o más bazos menores. Está bien definido por una cápsula fibrosa, pero no presenta diferenciación alguna entre pulpa blanca y pulpa roja, característico del bazo de los mamíferos. Está compuesto por un sistema de elipsoides esplénicos, MMC y tejido linfoide (Ferguson, 1989).

Las células a lo largo de las paredes están involucradas activamente en la fagocitosis de los macrófagos, antígenos y eliminación de células sanguíneas debilitadas (Espenes *et al.*, 1995; Falk *et al.*, 1995). Por lo general, en forma de anticuerpos o productos metabólicos, los antígenos pueden ser detenidos durante largos períodos de tiempo, lo cual tiene un papel importante en la memoria inmunológica (Uribe *et al.*, 2011).

El aumento de la actividad industrial ha hecho que los peces criados en granjas sean susceptibles a diversos agentes patógenos, incluidos virus, bacterias y parásitos, que han dado lugar a graves enfermedades infecciosas y a grandes pérdidas económicas. Para reducir el impacto de la enfermedad, el conocimiento sobre el sistema inmunológico y los mecanismos de defensa contra patógenos en peces es esencial para el establecimiento de medidas efectivas

en el control de enfermedades. Un ejemplo más específico, es la identificación de genes y vías inmunes; como, de moléculas inmunitarias, tales como péptidos antimicrobianos y citocinas. En estudios anteriores se han descubierto e identificado genes inmunes relevantes de las bibliotecas de cDNA (Aoki *et al.*, 2011), como algunos que codifican los receptores de células T (Aoki y Hirono, 2006), el gen del sensor citosólico (Ohtani *et al.*, 2011) o el interferón (IRF9) (Hu *et al.*, 2014).

Así mismo otros autores aplicaron la ontología de genes, con el fin de categorizar los productos génicos y estandarizar su representación entre especies, sobre transcriptomas recién ensamblados de peces criados. Huang, *et al.* (2014), reportaron que en el transcriptoma obtenido de *Paralichthys olivaceus*, se identificó de 1,563 unigenes asociados con el sistema inmunológico que se asignaron a 15 vías de señalización inmune.

Mientras que Tran *et al.* (2015), después de la exposición de *Megalobrama amblycephala* con *Aeromonas Hydrophila* reportaron, realizaron un análisis de su transcriptoma, reportando que los unigenes estaban relacionados con los términos: 1) uniones, 2) actividad catalítica, y 3) de receptor, en la categoría relacionada con función molecular. En la categoría de componentes celulares, los genes se asociaron con los términos: 1) célula, 2) parte celular, y 3) organelo. Y hablando específicamente del sistema inmune, las dos subcategorías, dentro de las cuales se encontraron más unigenes fueron en 1) respuesta al estímulo y 2) proceso del sistema inmune; implicadas en la respuesta a estímulos químicos, estrés y estímulos externos.

HIPÓTESIS

Al ser el bazo un órgano relacionado al sistema inmune y de defensa de varios organismos, este órgano en *Thunnus orientalis* criado en piscicultura presentará genes vinculados tanto a la respuesta inmune como a la de diversos sistemas de defensa, el cual puede ser usado como fuente para la obtención y expresión de dichos genes.

OBJETIVO GENERAL

Ensamblar el transcriptoma del bazo y caracterizar los genes del sistema inmune de *Thunnus orientalis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y purificar ARN total a partir de muestras de bazo de *Thunnus orientalis*.
- Evaluar la integridad del ARN para asegurar la obtención de librerías de ADNc y secuencias de alta calidad.
- Secuenciar y ensamblar el transcriptoma del bazo de *Thunnus orientalis*, por medio del uso de diversas herramientas bioinformáticas.
- Caracterizar genes del sistema inmune a partir de los transcritos del bazo, por medio de la comparación de las secuencias obtenidas con diversas bases de datos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes de Atún

La especie empleadas en el presente estudio fue *Thunnus orientalis* o atún aleta azul. Los especímenes fueron criados en Ensenada, Baja California. Al momento de la captura el peso y la longitud furcal era de 16.2 ± 6.5 kg y 96.3 ± 14.3 cm respectivamente; los cuales fueron eviscerados inmediatamente. Las muestras de bazo, principal órgano representativo del sistema inmune, fueron congeladas en nitrógeno líquido por separado en reactivo estabilizador de ARN, y fueron enviadas en hielo seco a Texas A&M University (College Station, Texas) donde se almacenaron a -80 °C.

Aislamiento del ARN Total

Para la extracción del ARN total, se utilizó el método reportado por Austbo, et al (2014), por medio del Kit RNeasy Mini (Quiagen, Hilden, Alemania). Para este proceso se pesaron 30 mg de bazo y se agregaron 350 μ L de Buffer RLT (Tiocianato de guanidina y β mercapto-etanol), para lograr la lisis celular y degradación de proteínas con liberación de ácidos nucleicos. Posteriormente, se centrifugó a 15,000 rpm, durante 5 min; se recuperó el sobrenadante, se agregó 500 μ L de etanol al 70%, se transfirió a una mini columna de RNeasy, y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 seg. Para evitar la contaminación por ADN genómico se agregaron 80 μ L de la solución formada por 10 μ l de DNasas I stock y 70 μ l de Buffer RDD, ambas incluidas en el kit, y se incubó por 15 min. A continuación, para lograr la afinidad entre el ARN y la membrana de sílica, la muestra se lavó con 350 μ L de Buffer RW1 (Sal de guanidina) y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 seg; se lavó con 500 μ L de Buffer RPE para limpiar residuos de sales, volviendo a centrifugar a las condiciones anteriores. Por último, se agregaron 30 μ L de agua libre de ARNasas directamente en la columna, y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min, obteniendo el ARN total. Las muestras se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

Cuantificación y Evaluación de la integridad del ARN

Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN total se realizó en un equipo Nanodrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, E.U.A.). Se tomó 1 μL de muestra de ARN total y se realizó una lectura espectrofotométrica a una relación de 260/280 nm.

Evaluación de la Calidad e Integridad de ARN

Las muestras de ARN se prepararon con las indicaciones del fabricante (Agilent, Technologies, Inc. E.U.A.). Brevemente, se colocaron 5 μL de buffer muestra para ARN, el cual contiene una matriz de gel y colorante requerido para la electroforesis, y se colocó 1 μL de cada muestra, posteriormente se agitó por 1 min y se centrifugó por 30 seg a 2000 rpm. Las muestras se desnaturalizaron a 72 °C por 3 min, se incubaron 2 min en hielo y se centrifugó 30 seg. Las muestras, el chip de electroforesis y las micropuntas para dosificar se colocaron dentro del equipo Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Inc, E.U.A.).

Finalmente se realizaron lecturas para la obtención de la calidad e integridad del ARN. La integridad de las muestras es determinada mediante el RIN (número de integridad de ARN, por sus siglas en inglés), un algoritmo que selecciona características específicas de los electroferogramas obtenidos por TapeStation, las cuales aportan información acerca de la integridad del ARN.

Elaboración de Librerías y Secuenciación por Illumina

Elaboración de Librerías

La elaboración de librerías se refiere a la conversión del ARN mensajero (ARNm) presente en un determinado tejido en ADN complementario (ADNc), así como a la obtención de fragmentos de ácidos nucleicos con adaptadores en ambos extremos para su posterior secuenciación; para esto se utilizó el kit de preparación de muestras ARN Illumina® TruSeq® v2 (Illumina, Inc., E.U.A.)

El primer paso consistió en la purificación de ARNs mensajeros por medio de micro esferas magnéticas unidas a fragmentos oligo(dT) para aislar ARNm poliadenilado. Con los fragmentos obtenidos de ARNm, se sintetizó la primera cadena sencilla de ADNc utilizando transcriptasa reversa e iniciadores aleatorios. Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de una segunda cadena de ADNc, para obtener ADNc de doble hebra. El ADNc bicatenario llevó un proceso de reparación final por medio de reacciones con actividad exonucleasa sobre los extremos salientes 3' y 5'. Se le añadió una base "A" a uno de los extremos, mientras que el otro se fosforiló para su posterior ligación a los adaptadores de secuenciación; los cuales poseen un nucleótido "T" en el extremo 3', para propiciar la unión del fragmento de ADNc con el adaptador.

Finalmente, se realizó un PCR para enriquecer selectivamente los fragmentos de ADNc que tienen adaptadores en ambos extremos.

Secuenciación por Illumina

El proceso de secuenciación se llevó a cabo por medio del equipo Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc., E.U.A.). La librería de fragmentos de ADNc con adaptadores de secuenciación en los extremos fueron cargados en una celda de flujo, la cual contenía oligonucleótidos

complementarios a los adaptadores unidos a su superficie; uniéndose de esta manera mediante emparejamiento de bases. A continuación, se llevó a cabo la extensión de puente para obtener una alta cantidad de copias, a partir de la librería antes creada.

Por medio de un proceso llamado disociación se eliminaron la mitad de las copias antes creadas, obteniendo cadenas en un solo sentido, 5`a 3`; obteniendo grupos o clústers. Por último, un adaptador de secuenciación se unió a la cadena para que se llevara a cabo la secuenciación por síntesis, en la cual después de la incorporación de nucleótidos, una fuente láser excita a los fluoróforos, y un sensor óptico exploró la celda de flujo para capturar colores que representan las bases recién añadidas en cada grupo (Soto y López, 2012).

Los dos procedimientos anteriores fueron realizados por medio de un servicio en las instalaciones del AgriLife Research and Extension Center de la Universidad de Texas A&M.

Obtención del Transcriptoma de *Thunnus orientalis*

Control de Calidad y Revisión de Datos

Para realizar tanto la limpieza como el ensamblaje de las secuencias obtenidas; se utilizó Galaxy¹ (E.U.A.), una plataforma web, abierta para la investigación biomédica intensiva de datos. Como primer paso, se revisaron los datos estadísticos por medio de FastQC, herramienta que tiene como objetivo proporcionar un reporte con las estadísticas básicas de la secuencia y otro con la calidad de las bases obtenidas durante la secuenciación. Estas calidades están representadas en el Score de calidad de Phred, en donde:

$$Q = -10 \log_{10}P$$

Donde Q es definida como la propiedad que está logarítmicamente relacionada con la probabilidad de tener una base con error de secuenciación. La representación numérica de esto se encuentra en la Tabla 2.

¹ <https://galaxyproject.org>

Tabla 2. Puntuaciones de calidad de Phred.

Score de calidad Phred	Probabilidad de una base incorrecta	Precisión de la base
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1000	99.9%
40	1 en 10,000	99.99%
50	1 en 100,000	99.999%

Puntaje de calidad Phred es una medida de calidad de la identificación de nucleobases generadas durante el proceso de secuenciación automatizada.

Posteriormente, se utilizó una herramienta de Galaxy denominada "Remove sequencing artifacts", lo cual se refiere a la eliminación de los artefactos de secuenciación utilizados para identificar a cada una de las muestras dentro de Illumina, estos se identifican por ser una continua repetición de cierto número de bases, como se ve en el ejemplo de la Figura 7.

Ensamblaje y Mapeo

Una vez que los artefactos de secuenciación fueron removidos, se convirtió el formato de los datos a fastqsanger, por medio de la herramienta de FASTQ Groomer y así garantizar que los datos fueran compatibles con los reconocidos por Bowtie2², una herramienta para alinear y mapear secuencias a una referencia, en este caso se utilizó el genoma reportado por Nakamura *et al.* (2013), el cual consta de un total de 26,433 genes de proteínas a partir de 16,802 scaffolds ensamblados.

Para comenzar con la alineación y mapeo de secuencias, por medio de Bowtie2, dentro de la misma plataforma de Galaxy, se fijaron una lista de parámetros o requisitos específicos, los cuales se pueden ver en la Tabla 3. Bowtie2 busca asignar una localización específica a cada una de las subdivisiones de entre la totalidad de las lecturas, tanto el fragmento R1 como su complemento reverso, mientras que estas son alineadas con el genoma de referencia, cumpliendo con todos los parámetros especificados. Al finalizar el proceso de ensamblaje, se obtuvieron un archivo, en dos diferentes en formatos, Sam y Bam respectivamente.

Ontología Génica del Transcriptoma de *Thunnus orientalis*

Con el fin de conocer los atributos que presentaba el transcriptoma ya ensamblado, se realizó una ontología génica, ya que por medio de esta podemos conocer la función biológica de los genes, su rol en los procesos biológicos y su posible localización en componentes celulares. Todos los siguientes pasos se llevaron a cabo por línea de comandos.

² <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml>

```
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
AAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Figura 7. Ejemplo de artefactos de secuenciación.

Fuente: usegalaxy.org

Tabla 3. Parámetros utilizados durante el ensamblaje en Bowtie2, dentro de la plataforma Galaxy.

Librería y su configuración durante el ensamblaje	
Tipo de librería	Pair-end
Longitud de fragmento	Min. 0 Max.1000
Orientación de los fragmentos (R1 y R2)	--fr
Permitir comportamiento variado	No
Permitir comportamiento discordante	No
Permitir coincidencia	Si
Permitir inclusión	Si
Rechazo de reproducción de alineaciones traslapadas	No
Selección de genoma de referencia	
Método de análisis	
<i>Ajustar opciones de entrada</i>	No
<i>Ajustar opciones de ensamblaje</i>	Si
Número de mismatches permitidos	1
Longitud mínima de las subdivisiones	22
Función sobre el intervalo entre subdivisiones	S,1,1.15
Función sobre el % de N en las subdivisiones	L,0,0.15
Número de gaps permitidos	1
Modo de alineación	--end to --end
Función de score mínimo para validar el proceso	L,-0.6,-0.6
<i>Ajustar opciones de salida</i>	SAM/BAM

Utilizar Bowtie 2 en Galaxy permite salidas en formato BAM, lo que permite la interoperación con un gran número de otras herramientas disponibles en este sitio. La mayoría de la información en esta página se deriva del manual de Bowtie2.

Anotación del Genoma

Como primer paso se descargó el ensamblaje de genoma y transcriptoma del atún aleta azul del Pacífico, *Thunnus orientalis*, del Instituto Nacional de Investigaciones de Ciencias Pesqueras. A continuación, se utilizó Trinotate³ versión 3.0.2 e InterProScan⁴ versión 5.21-60.0 para anotar funcionalmente los modelos predichos de genes.

Trinotate

Trinotate es una plataforma diseñada para realizar una anotación funcional, por medio de la búsqueda de homología con secuencias reportadas en bases de datos como SwissProt e identificación de dominio de proteínas, con HMMER y PFAM. Para utilizar Trinotate siguieron los pasos reportados en <https://trinotate.github.io/> que continuación se mencionan:

1. Por medio de la siguiente línea de comandos se descargó una base de datos boilerplate la cual viene precargada con datos funcionales de Swissprot y PFAM, para ser utilizados en la elaboración de un alineamiento múltiple (BLAST) y la búsqueda del dominio de proteínas respectivamente.

```
$TRINOTATE_HOME/admin/Build_Trinotate_Boilerplate_SQLite_db.pl Trinotate
```

una vez que este pasó se completó, se obtuvieron las siguientes bases de datos:

```
Trinotate.sqlite  
uniprot_sprot.pep  
Pfam-A.hmm.gz
```

³ <https://trinotate.github.io/>

⁴ <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>

2. Posteriormente se llevó a cabo la instalación de BLAST+⁵, por medio de las líneas de comandos, reportadas por la NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52640/>:

<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/LATEST/>

a continuación, se utilizó la siguiente línea de comandos para realizar un Blast con la base de datos de Uniprot:

```
blastx -query Trinity.fasta -db uniprot_sprot.pep -num_threads 8 -max_target_seqs 1 -outfmt 6  
> blastx.outfmt6
```

3. Como siguiente paso se ejecutó HMMER para identificar dominios de proteínas, por medio de la siguiente línea de comandos:

```
hmmsearch --cpu 8 --domtblout TrinotatePFAM.out Pfam-A.hmm transdecoder.pep > pfam.log
```

4. A continuación, se utilizaron 2 diferentes líneas de comandos con el fin de realizar búsquedas específicas como:

Predicción de péptidos señal:

```
signalp -f short -n signalp.out transdecoder.pep
```

Predicción de péptidos señal:

```
tmhmm --short < transdecoder.pep > tmhmm.out
```

⁵ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download

InterProScan

InterProScan proporciona análisis funcional de las proteínas, clasificándolas en familias y así como llevando a cabo la predicción de dominios y sitios importantes, para lograr esto se ejecutó el siguiente comando en el Cluster de Computo de Alto Rendimiento de la Universidad de Texas A&M:

```
interproscan -pa -goterms -iprlookup -i tuna_proteins.fa
```

Como siguiente paso se combinaron las anotaciones generadas anteriormente por Trinotate y InterProScan, obteniendo una nueva anotación en formato GFF.

```
create_unified_gene_models.pl tuna_proteins.fa.tsv trinotate_annotation_report.xls tuna_augustus.gff  
gene > tuna_augustus_w_annotations.gff
```

Filtración de lecturas y alineamiento

Para ambos procesos se ejecutaron diferentes comandos en el Cluster de Computo de Alto Rendimiento de la Universidad de Texas A&M. Una vez que hemos anotado los modelos de los genes predichos, se realizó el recuento de lectura por gen. Primeramente, se filtraron las lecturas de Illumina para cualquier adaptador de secuenciación y cebadores usando Trimmomatic⁶. Luego se utilizó el algoritmo de alineación HISAT2⁷ para alinear las lecturas de RNA-Seq con el genoma de referencia PBFT. Finalmente, se contaron las lecturas por gen utilizando la herramienta featuresCounts y se realizó la normalización log2 usando DESeq2⁸.

⁶http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/TrimmomaticManual_V0.32.pdf

⁷ <https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>

⁸ <https://bioconductor.riken.jp/packages/3.0/bioc/html/DESeq2.html>


```
/share/apps/Trimmomatic/Trimmomatic-0.36/trimmomatic-0.36.jar PE -threads 16 03-PBFT-  
W2_R1.fastq.gz 03-PBFT-W2_R2.fastq.gz 03-PBFT-W2_R1.filtered.fq.gz 03-PBFT-  
W2_R1.unpaired.fq.gz 03-PBFT-W2_R2.filtered.fq.gz 03-PBFT-W2_R2.unpaired.fq.gz  
ILLUMINACLIP:/share/apps/Trimmomatic/Trimmomatic-0.36/adapters/TruSeq3-PE-  
2.fa:2:30:10 HEADCROP:5 LEADING:20 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:5:20  
MINLEN:50
```

Para el alineamiento se utilizó HISAT2, el cual es un programa de alineamiento rápido y sensible para mapear lecturas de secuenciación de próxima generación a una población de genomas de referencia.

```
hisat2 -p 16 --rna-strandness RF -x /data/konganti/projects/mcristiciello/tuna_scaffolds -1 03-  
PBFT-W2_R1.filtered.fq.gz -2 03-PBFT-W2_R1.filtered.fq.gz -S 03-PBFT.sam
```

Conteo de lecturas

Con el fin de contar lecturas de ARN, se utilizó el programa FeatureCounts, que proporciona un conteo total de lecturas mapeadas con respecto a características genómicas tales como genes, exones, promotor, cuerpos génicos, contenedores genómicos y localizaciones cromosómicas, entre otras.

```
featureCounts -p -t gene -g ID -s 2 -Q 10 -a  
/data/konganti/projects/mcristiciello/tuna_augustus_w_annotations.gff -o ../counts/PBFT-  
featureCounts.txt -T 16 --minOverlap 5 ../reads/03-PBFT.sorted.sam ../reads/04-  
PBFT.sorted.sam
```

Para extraer solamente las regiones mapeadas se utilizó el comando:

```
grep -v '#' ../counts/PBFT-featureCounts.txt | cut -f 1,7,8 | tail -n +2 > ../counts/PBFT-  
featureCounts.counts.txt
```

Repitiendo los dos pasos de conteo anteriores para ambas las muestras.

A continuación, se combinaron los recuentos de lectura por gen por muestra manualmente en una tabla con la primera columna siendo ID de gen y la segunda columna que se lee contó para 03-PBFT. Dicho archivo con formato texto se utilizó para DESeq2.

DESeq2 se utilizó para normalizar a log₂ los recuentos de lectura. Los siguientes pasos se utilizaron en el entorno R:

```
# Read count table
library(DESeq2)
countData=as.matrix(read.table(file="PBFT-featureCounts.counts.txt", sep="\t",
row.names=1, as.is=TRUE))
condition=factor(c("PBFT", "PBFT"))
deseq_dataset_from_htseq=DESeqDataSetFromMatrix(countData, DataFrame(condition),
design = ~ 1)

# Run DESeq
deC1=DESeq(deseq_dataset_from_htseq)
colnames(deC1)=c("03-PBFT", "04-PBFT")
deC2=deC1[ rowSums(counts(deC1)) > 1, ]
deC2 = rlog(deC2)
```

Por último, para realizar la ontología génica y obtener tablas y gráficas de la misma se utilizó WEGO, <http://wego.genomics.org.cn>, en la cual se introdujo el archivo obtenido de pasos anteriores, indicando el formato del mismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN

Para establecer la pureza de las muestras analizadas es importante llevar a cabo lecturas a dos longitudes de onda, a 260 nm que indica las bases presentes en los ácidos nucleicos, y a 280 nm los aminoácidos aromáticos. Por lo que la relación entre la absorbancia a 260/280 nm indica la presencia de proteínas en la muestra de ARN. Si los valores de la relación 260/280 oscila entre 2.0 y 2.2 se considera que las muestras poseen una pureza óptima, mientras que valores menores a 1.7 indican una pureza aceptable (Desjardins y Conklin, 2010). Partiendo de esto, las muestras de ARN obtenidas del atún poseían un grado de pureza aceptable en el presente trabajo (Tabla 4). En cuanto a la concentración del ARN, esta fue la adecuada para la síntesis del ADNc.

El aislar ARN con la mayor integridad y pureza posible es esencial para su análisis y secuenciación, donde se busca reflejar la expresión de transcritos de ARN en el momento de la extracción del tejido (Soto y López, 2012). Esto se logra tanto evitando una posible contaminación por ADN o RNasas, que causen la degradación del RNA durante y después de la extracción.

En la Figura 8 se muestran las imágenes del gel de electroforesis obtenido por el equipo TapeStation, donde se observan los fragmentos de ARN separados por su diferente peso molecular. Específicamente, la presencia de las franjas correspondientes a las subunidades del ARN ribosomal 18s y 28s, demuestran que el ARN extraído tiene la integridad adecuada para ser utilizado en los siguientes pasos de secuenciación.

En los electroferogramas (Figura 9) de ambas muestras se observa el RIN, o número de integridad, el cual se mide dentro de una escala de valores entre el 0 y el 10, siendo 10 una integridad óptima. En este caso los valores que se obtuvieron fueron 6.1 y 7.8, respectivamente. Aunque no son valores tan altos o cercanos a 10, se decidió trabajar con ellas debido a la claridad de las franjas en el gel de electroforesis.

Tabla 4. Concentración y relación de absorbancia 260/280, obtenidos por el equipo Nanodrop*.

# de muestra	Relación 260/280	Concentración (ng/ μ l)
1	2.08	435
2	2.07	309
Promedio	2.075	372

*En la segunda columna de la tabla se observan los valores correspondientes a la relación 260/280, por medio de los cuales conocemos la pureza del ARN total. Mientras que en la tercera columna se observa la concentración (ng/ μ L) de cada una de las muestras de bazo de la cual se extrajo el ARN.

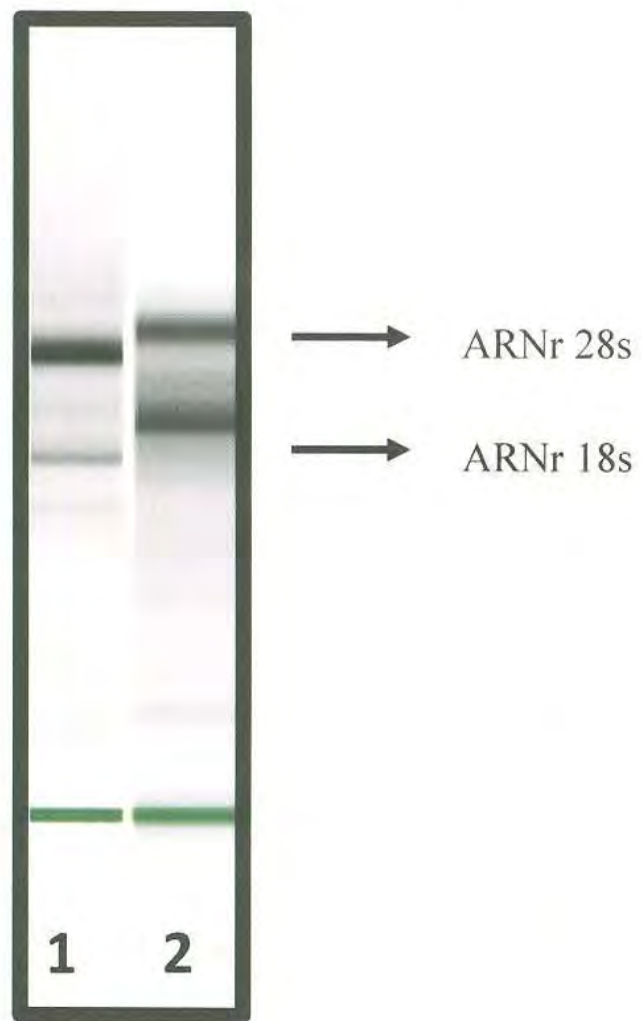
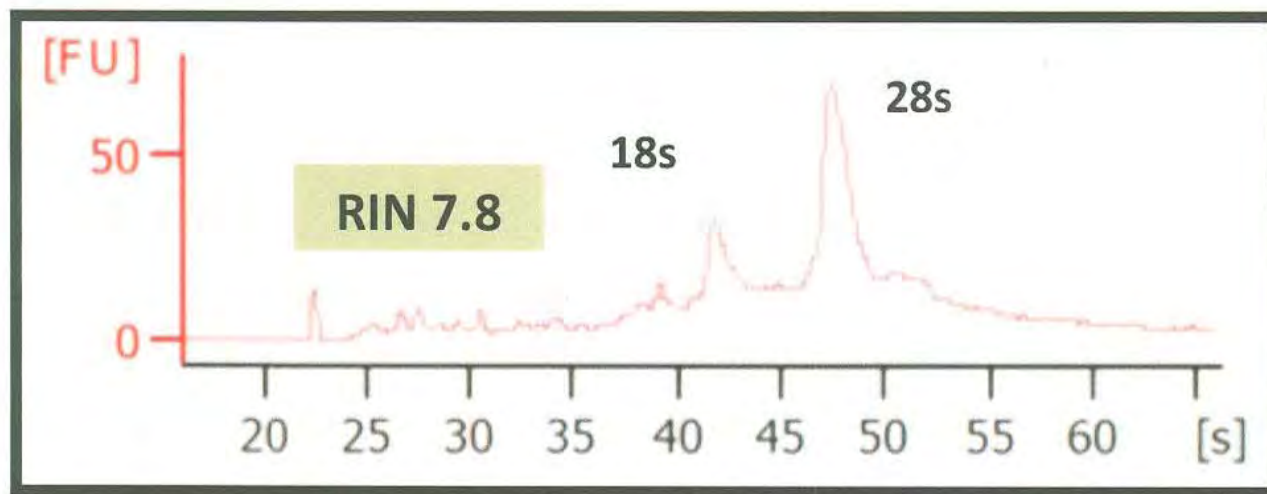


Figura 8. Movilidad electroforética de ambas muestra de bazo de *T. orientalis*, donde se observa claramente las bandas de las subunidades del ARN ribosomal 18s y 28s.

A



B

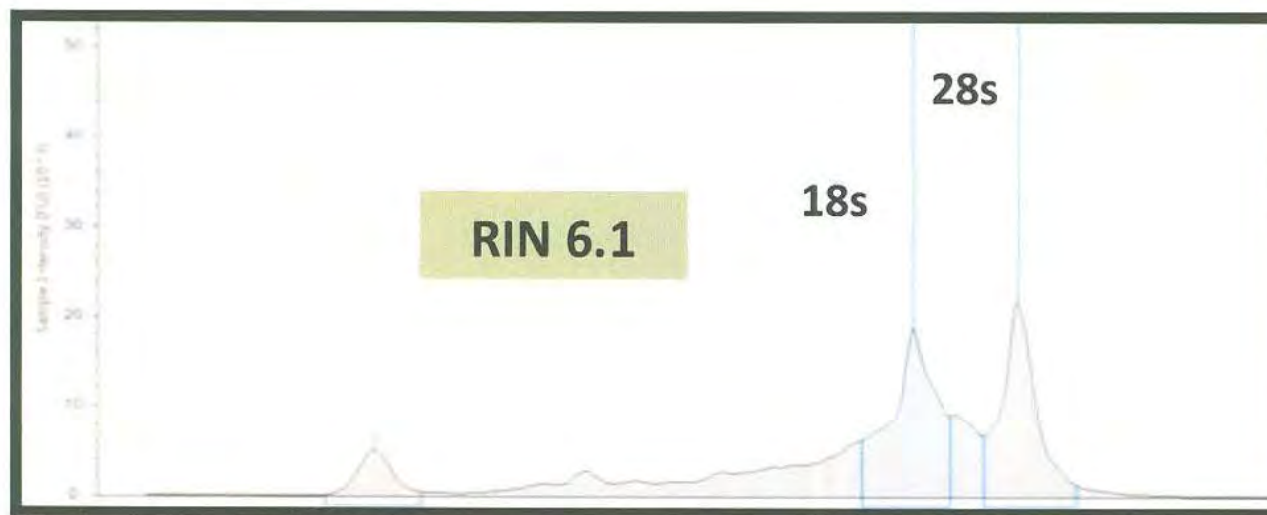


Figura 9. Electroferogramas de la muestras de bazo de *T. orientalis*, donde se muestran los picos de las subunidades 18s y 28s.

Obtención del Transcriptoma de *Thunnus orientalis*

Control de Calidad y Revisión de Datos

Antes de realizar el ensamblaje es necesario realizar controles de calidad de los archivos de secuencias obtenidos por Illumina, por medio del algoritmo FastQC. Este procedimiento genera un conjunto de análisis para verificar si los datos tienen algún problema antes de proseguir con el análisis, o si por el contrario cumplen los estándares de calidad aportados por el sistema. Debido al resultado de este análisis se decidió trabajar sólo con una de las muestras, ya que presentó una mejor calidad.

Por medio de FastQC se obtuvieron las gráficas de la Figura 10, en las cuales se representan la calidad de las bases presentes en las secuencias obtenidas por Illumina. En el eje *x*, se encuentra la posición que ocupan las bases dentro de la secuencia (0-75), con respecto a las calidades representadas en el Score de calidad de Phred (0-36) en el eje *y*.

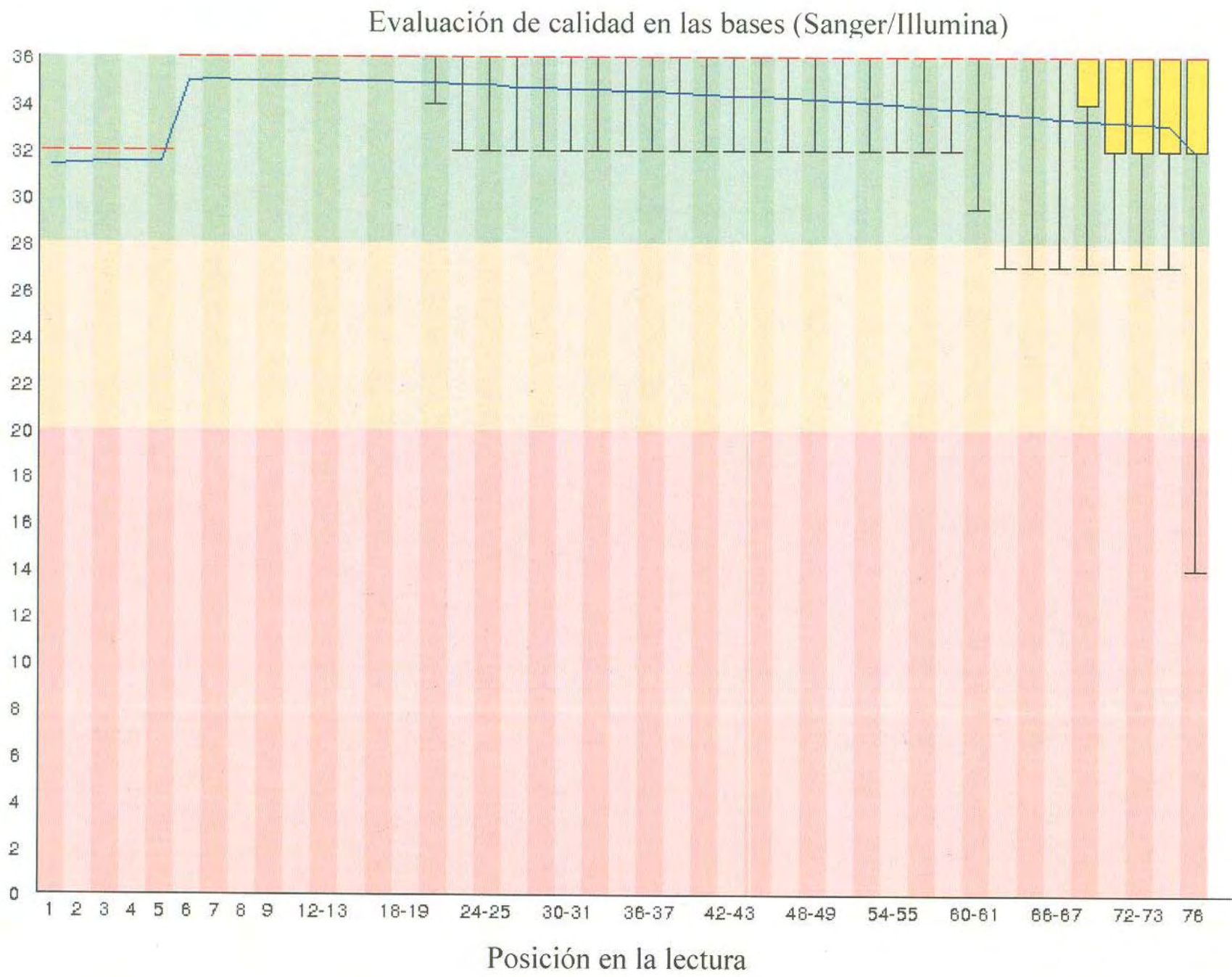
La Figura 10-A, correspondiente a la cadena F del transcrito, muestra que la calidad presentada por las bases hasta la posición 60-61 es alta, ya que se observa en la región verde correspondiente a una muy buena calidad, con una $Q=30$. Después de esta región, la calidad disminuye a intermedia, $Q=28$. La la Figura 10-B, para la cadena R, la calidad es muy buena hasta las posiciones 42-43, después de esto la calidad baja a intermedia, llegando hasta una $Q=22$, mientras que en las últimas bases se obtuvo una mala calidad. Este patrón es normal cuando se trabaja con tecnologías de secuenciación de nueva generación, ya que son caracterizados por una alta eficiencia en las bases iniciales y una progresiva pérdida de esta calidad. Esto se debe a un fenómeno llamado “*phasing*”, donde el bloqueador que permite que sólo se agregue una base a la vez durante la secuenciación, eventualmente no es removido correctamente y la lectura del siguiente fragmento no puede continuar correctamente (Wu *et al.*, 2015).

Así mismo, se obtuvieron estadísticas básicas de la secuencia generada por Illumina, dichos datos se pueden observar en la sección Datos de secuenciación en la Tabla 5. La plataforma de Illumina generó 63,260,761 secuencias, con un contenido total de GC del 47.49%. Después de

remover los artefactos de secuenciación se usó Bowtie2, modificando algunos parámetros específicos, explicados en la Tabla 6. Para esta tesis se utilizó como genoma de referencia de *Thunnus orientalis* reportado por Nakamura *et al.* (2013), que cuenta con un total de 26,433 de genes codificados para proteínas provenientes de 16,802 familias de plegamiento o *scaffolds*.

El programa Bowtie2 generó 43,530,887 secuencias. De ese número de secuencias 64.6% se alinearon de manera exactamente concordante una vez, y 4.2% más de una vez, obteniendo un 68.82% de concordancia. Se obtuvieron 50,570 *scaffolds*, con un contenido total de GC de 53.9%. El contenido alto de GC% es característico de especies de teleósteos, y este podría ser causado por la evolución genética y factores ambientales como la temperatura del agua, la velocidad de flujo, la extensión de la luz en diferentes profundidades de agua durante el largo período evolutivo después de la divergencia del antepasado común de los peces (Han y Zhao, 2008). Sin embargo, es posible que la principal razón sea la temperatura del agua, que hace una diferencia en los genomas de los peces que viven a altas temperaturas (40 °C) y los que viven a temperaturas más bajas (20 °C) (Costantini *et al.*, 2015).

A



B

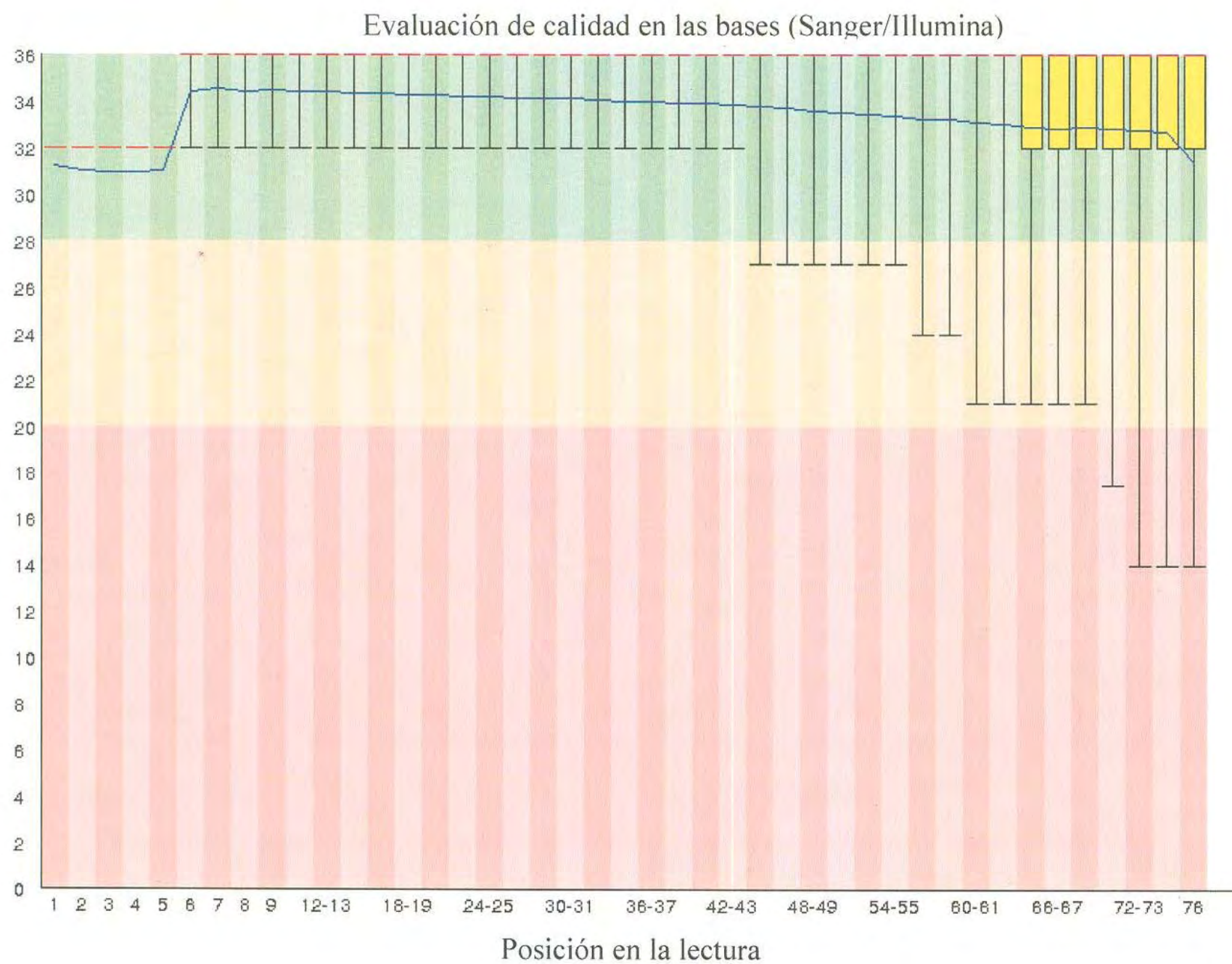


Figura 10. Gráfica de FastQC del transcrito. En la figura A se muestra la cadena F y en la B la cadena R del transcrito, donde se observa una buena calidad de las bases presentes en el transcrito, con una ligera pérdida al final por el fenómeno denominado phasing.

Tabla 5. Datos de secuencias y estadísticas básicas.

Datos de secuenciación		
Secuencias totales	63,260,761	
	Frec.	%
Lecturas totales %A	1,206,972,855	25.3
Lecturas totales %C	1,156,787,310	24.2
Lecturas totales %G	1,111,096,036	23.3
Lecturas totales %T	1,300,663,341	27.2
Lecturas totales %GC	2,267,883,346	47.49
Secuencias limpias, alineadas y mapeadas		
	Lecturas	%
Alineamientos concordantes 1 vez	40,864,392	64.6
Alineamientos concordantes >1 vez	2,938,495	4.2
Alineamientos concordantes	43,530,887	68.82
Alineamientos concordantes 0 veces	19,729,874	31.2
Más largo (bp)	13,854	
Más corto (bp)	32	
Secuencias finales		
Número de scaffolds analizados	50,570	
Número de secuencias totales	43,530,887	
	Frec.	%
Transcritos analizados %A	895,154,411	24.3
Transcritos analizados %C	989,402,296	26.9
Transcritos analizados %G	994,339,459	27.0
Transcritos analizados %T	798,231,770	21.7
Transcritos analizados %GC	1,983,741,755	53.9

En esta tabla se muestran los números obtenidos durante el proceso de secuenciación, la limpieza y ensamblaje del transcriptoma, como hasta el número final de secuencias obtenidas.

Tabla 6. Parámetros utilizados por Bowtie2 en la plataforma de Galaxy.

Librerías y su configuración en el ensamblaje

Tipo de librería

Las muestras son de este tipo debido a que se trabajó con el método de secuenciación Illumina, en el cual ambos extremos de cada secuencia se amplifican: obtenido dos lecturas por fragmento (R1 y R2). La primera lectura en orientación hacia adelante y la segunda lectura con orientación de inverso complemento, por lo que son de tipo extremos pareados.

Longitud de fragmento

Se decidió establecer un rango de 0-1000 bp, esto causaba que Bowtie2 actuara más lento, pero a su vez nos permitía obtener una mayor cobertura de bases entre en cada uno de los extremos.

Orientación de los fragmentos

Con la orientación elegida “-fr” nos referimos al formato y/o posible dirección que deben tener las dos lecturas por fragmento obtenidas candidata de ya que R2 debe ser el complemento inverso de R1.

No permitir comportamiento variado

Por defecto, Bowtie2 requiere que ambas partes (R1 y R2) se alineen de forma única, pero al habilitar esta opción da la oportunidad de encontrar alineaciones para cada una de ellas individualmente con respecto al genoma de referencia, lo cual arrojaría una cantidad de datos enorme y con una menor organización a la deseada o controlada por los demás parámetros.

Permitir comportamiento discordante

Esta opción se habilitó debido a que permite la búsqueda de las cadenas R1 y R2 sin importar la dirección, esto funciona debido a que al llevarse a cabo una amplificación en puente dentro de Illumina podría ocurrir que estas se inviertan.

R.S.T 200 012

Permitir coincidencia

Este se refiere a la posibilidad de que uno de los extremos sobrepase el del otro fragmento.

Permitir inclusión

Si una alineación de pareja contiene la otra, se considerará como concordante.

Permitir traslape

Si las alineaciones se superponen una con la otra, se considerará como concordante.

Método de análisis

Ajustar opciones de entrada

Esta opción nos permitía cambiar o modificar ciertas características de los archivos iniciales, pero debido a que ya se había revisado tanto la calidad, los formatos, y la organización de los archivos, no se tuvo la necesidad de modificar estas opciones.

Ajustar opciones de ensamblaje

Número de apareamientos incorrectos (mismatches) permitidos

Esta función está relacionada con las siguientes cuatro, por lo que se buscó un balance entre la sensibilidad, las posibles pérdidas de información y la velocidad. Dentro de esta opción se eligió el tener un apareamiento incorrecto dentro de mis subdivisiones. Aunque de esta manera se podría tener menos especificidad, se obtendría mayor información incluso para futuros estudios sobre polimorfismo.

Longitud mínima de las subdivisiones

Para poder leer toda la información se realizan alineamientos múltiples, y este valor representa la longitud mínima por cada alineamiento que se haga con respecto al genoma de referencia.

Función sobre el intervalo entre subdivisiones

La ventaja de trabajar con esta función radica en que no sólo se fija un único valor para comenzar con una nueva subdivisión “semilla” sino que depende del largo de cada una de las subdivisiones encontradas, el espacio que debe dejar para comenzar con la siguiente lectura.

Función sobre el % de N en las subdivisiones

Dentro de esta función se prefirió trabajar con el rango más bajo, permitiendo tener mayor especificidad entre las bases presentes en los fragmentos y los presentes en la referencia y sensibilidad.

Número de desfases (gaps) permitidos

Solamente se permitió un gap por cada subdivisión, con el fin de tener una mayor especificidad.

Modo de alineación

--end to -end, se eligió esta función ya que se deseaba que tanto R1 como R2 se alinearan en al menos una región con el genoma de referencia.

Función de evaluación mínimo para validar el proceso

Si después de cumplir con todos los parámetros de alineación antes mencionados, la región cumple con la función default para los modos de alineación --end to -end esa región será válida.

Ajustar opciones de salida

Guardar como archivo tipo SAM y BAM.

Parámetros de Bowtie2 que permiten fijar las características de las librerías; el método de análisis deseado, así como las opciones de entrada, ensamblaje y salida.

Ontología Génica del Transcriptoma de *Thunnus Orientalis*

Siguiendo los pasos reportados en la metodología, se obtuvieron un total de 132 millones de lecturas de pares de extremo de 75 pb y bases de baja calidad, de ambas muestras de bazo de *Thunnus orientalis*. Usando Trimmomatic, quedaron aproximadamente 117 millones de lecturas filtradas. Las lecturas de RNA-Seq se alinearon con el nuevo montaje de genoma de atún usando HISAT2 versión 2.0.5 (Kim *et al.*, 2015). Los conteos de genes crudos se generaron con el paquete featuresCounts (Liao *et al.*, 2013) mientras se descartaban asignaciones de lectura ambiguas. Los recuentos de lectura normalizados se generaron usando DESeq2 (Love *et al.*, 2014) siguiendo las directrices recomendadas por los autores.

Para realizar la Ontología Génica se utilizó el software WEGO. Finalmente obtuvimos un total de 16,810 transcriptos. Los resultados mostraron que estaban principalmente involucrados en tres funciones biológicas: 45.5% de genes anotados a "proceso biológico", 20.4% a "componente celular" y 34.1% a "función molecular". Las tres categorías de genes se dividieron en 44 subgrupos dependiendo su función biológica como se puede ver en la Tabla 7.

La categoría de componentes celulares (Figura 11) se refiere al desglose parte por parte de las células, describiendo niveles de estructuras subcelulares y complejos macromoleculares. Como se puede observar en las subclasificaciones en el bazo *Thunnus orientalis* se detectó la expresión más alta de genes en los componentes celulares y organelos. Así, 15,187 genes fueron asignados a los componentes celulares (cualquier región constituyente de una célula), en donde se localiza la lamellipodia, que son proyecciones de actina presentes en células de peces y ranas, diferentes membranas, diversos complejos como el translocon y la ubiquitina, así como genes relacionados con la cadena de electrones y sus complejos. Para los organelos 11,722 genes fueron asignados, que incluye ribosoma, retículo endoplásmico, centriolo, centrosoma, núcleo, entre otros.

Tabla 7. Resultados de Ontología genética por medio de WEGO.

	Genes asociados	Porcentaje de genes
Componentes celulares		
Célula	15187	90.3
Envolturas	1045	6.2
Región extracelular	2961	17.6
Partes de la región extracelular	2534	15.1
Complejo macromolecular	4079	24.3
Lumen de la membrana	3586	21.3
Organelos	11722	69.7
Partes del organelo	7612	45.3
Virión	1	0.0
Función molecular		
Actividad antioxidante	52	0.3
Actividad de proteínas auxiliares de transporte	105	0.6
Uniones	12877	76.6
Actividad catalítica	6103	36.3
Actividad quimioatrayente	14	0.1
Actividad quimiorepelente	9	0.1
Actividad del portador de electrones	44	0.3
Actividad reguladora de enzimas	1238	7.4
Actividad de la metalochaperona	5	0.0
Actividad del transductor molecular	1428	8.5
Etiquetas de proteínas	7	0.0
Actividad de estructura molecular	564	3.4
Actividad reguladora de transcripción	998	5.9
Actividad reguladora de translación	123	0.7
Actividad de transporte	1249	7.4

Procesos biológicos		
Adhesión biológica	1052	6.3
Regulación biológica	8992	53.5
Muerte celular/tejido	1387	8.3
Componente celular de biogénesis	2116	12.6
Componente de organización celular	4989	29.7
Procesos celulares	13796	82.1
Muerte celular	53	0.3
Procesos de desarrollo	5527	32.9
Establecimiento de localización	3881	23.1
Crecimiento	576	3.4
Procesos del sistema inmune	1742	10.4
Localización	4911	29.2
Locomoción	1229	7.3
Procesos metabólicos	9810	58.4
Procesos de multiorganismos	630	3.7
Procesos multicelulares	6618	39.4
Pigmentación	8469	50.4
Respuesta a estímulos	4089	24.3
Proceso rítmico	282	1.7
Reproducción viral	350	2.1

Dentro de la tabla se pueden observar las tres clasificaciones utilizadas por WEGO, que son: Componentes celulares, función molecular y procesos biológicos y sus respectivas subclasificaciones.

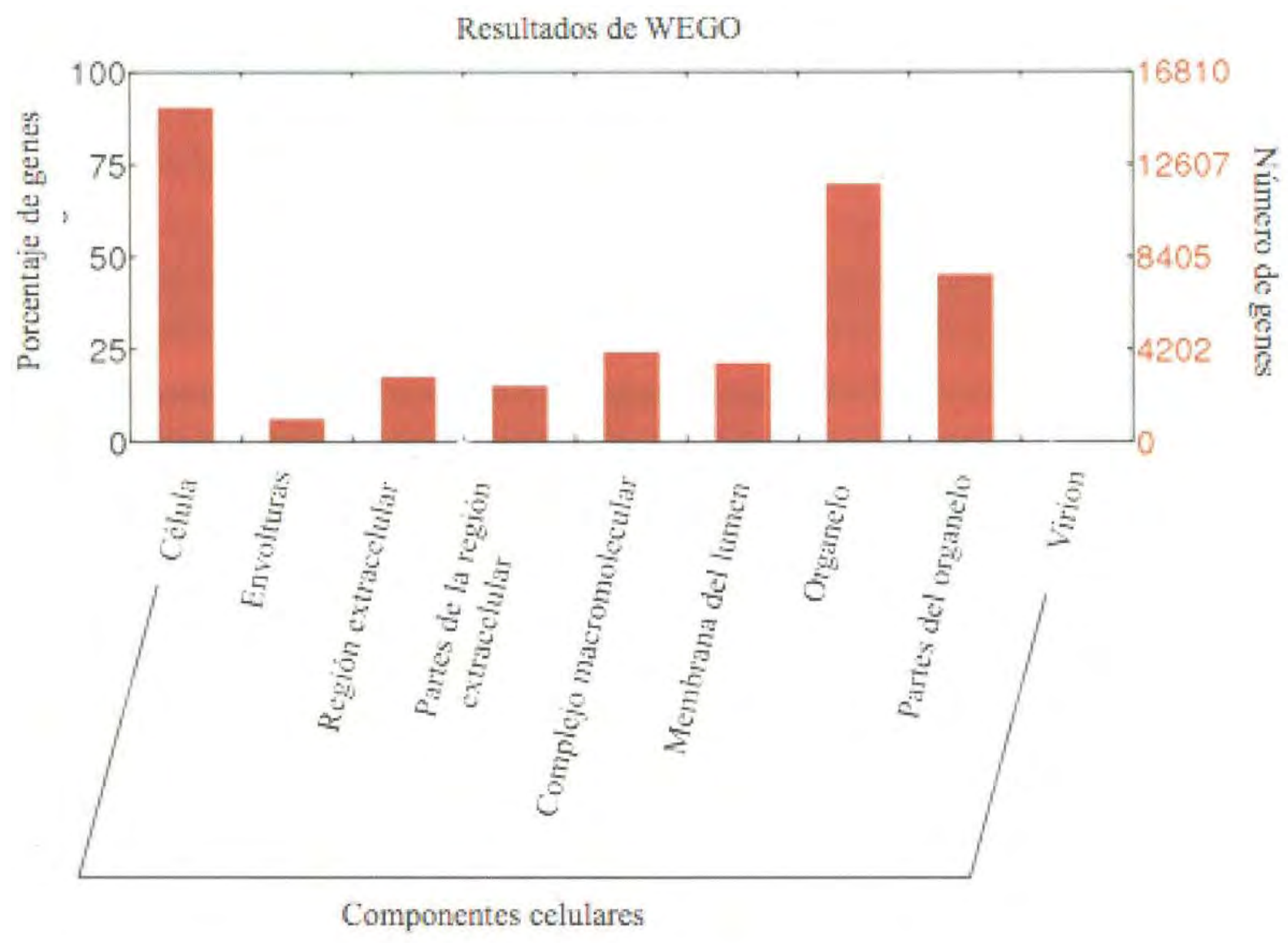


Figura 11. Gráfica de genes pertenecientes a los componentes celulares expresados en el bazo de *Thunnus orientalis*.

Las funciones moleculares (Figura 12) se refieren al trabajo que realizan dentro de las moléculas; como diversas actividades de transporte, unión, regulación y estructura. En la categoría de función molecular, 12,877 genes fueron asignados a funciones de unión, esto se refiere al gran número de interacciones selectivas, como, por ejemplo, entre péptidos, proteínas, carbohidratos o antígenos. Por otra parte 6,103 genes corresponden a la actividad catalítica, que involucra actividad de enzimas como transferasas, hidrolasas, ligasas, liasas e isomerasas, entre otras.

Un proceso biológico es una serie reconocida de eventos o funciones; es una colección de eventos a nivel celular con un principio y un final definidos. La categoría de procesos biológicos (Figura 13) se detectó que 13,796 genes son asignados al subgrupo de procesos celulares (crecimiento, comunicación, muerte celular, respuesta celular a estímulo) y un total de 1,742 a procesos del sistema inmunológico (cualquier proceso o receptor que pueda causar el funcionamiento del sistema inmune).

El bazo es un órgano relacionado con la respuesta inmune, por lo que los resultados obtenidos muestran una visión más profunda de la biología molecular del sistema inmunológico en *Thunnus orientalis*. Así mismo se encontró que los genes relevantes para el sistema inmune eran homólogos a los conocidos en otros vertebrados, incluyendo los elementos más importantes de la inmunidad innata y adaptativa, así como a la diversificación somática de receptores, incluyendo la diversificación del receptor de células T y genes de inmunoglobulina, y la activación de leucocitos. En el estudio se detectaron genes relacionados a cualquier proceso de respuesta de un organismo a una potencial amenaza interna o invasiva (Figura 14 y Tabla 8). Así como de procesos de regulación de eventos como: generación de mastocitos y leucocitos, quimiotaxis de macrófagos, y de regulación de células asesinas naturales. Estos eventos son importantes en la respuesta humoral, antimicrobiana, antiviral, activación del complemento, y frente a tumores. También se muestran en la Figura 14 a las moléculas de procesamiento y presentación del antígeno (MHC I, MHC II, TAP), así como otras moléculas implicadas en respuestas inmunitarias como las funciones efectoras de células T, células B y otros linfocitos.

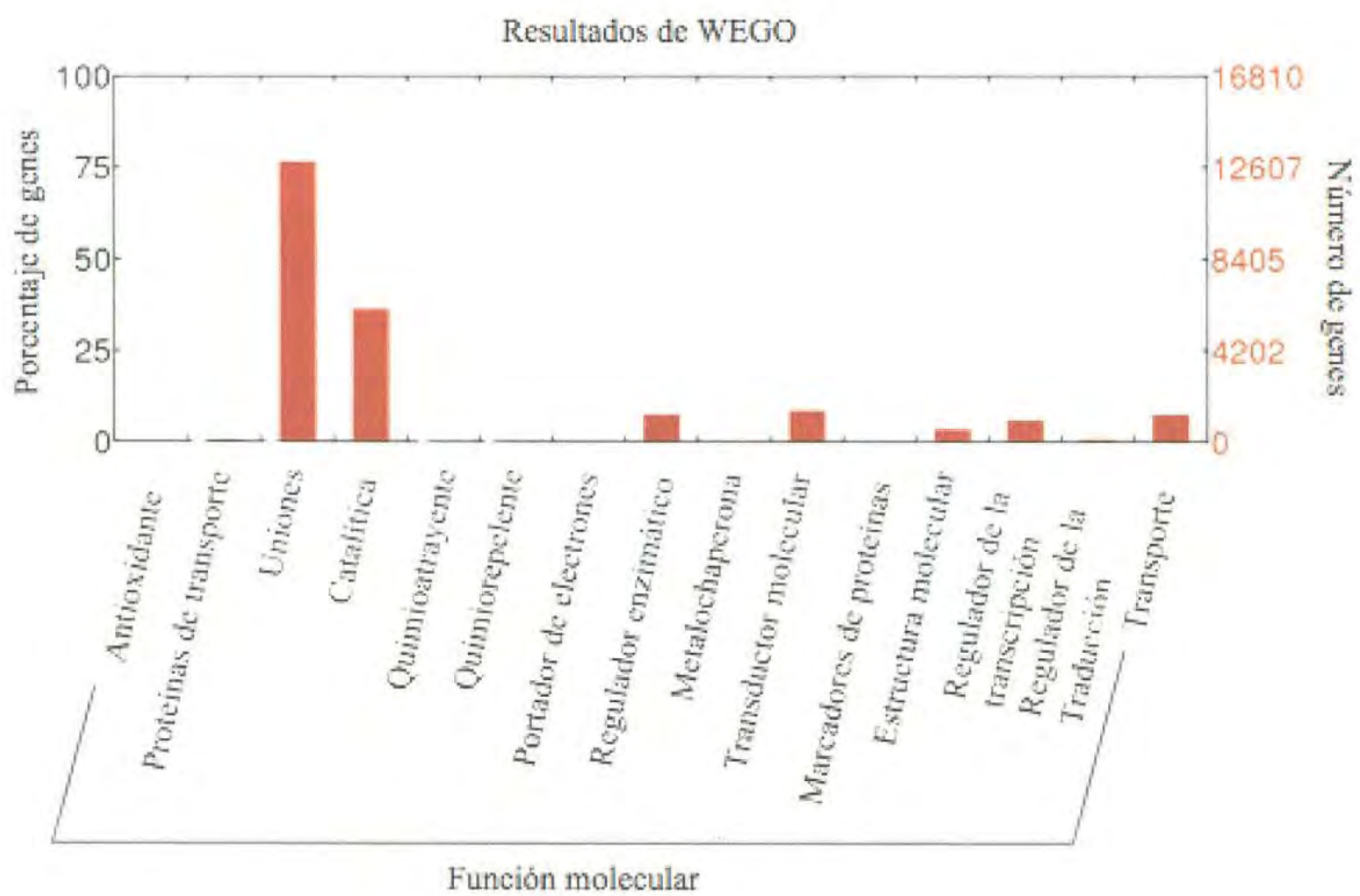


Figura 12. Gráfica de genes que llevan a cabo una función molecular expresados en el bazo de *Thunnus orientalis*.

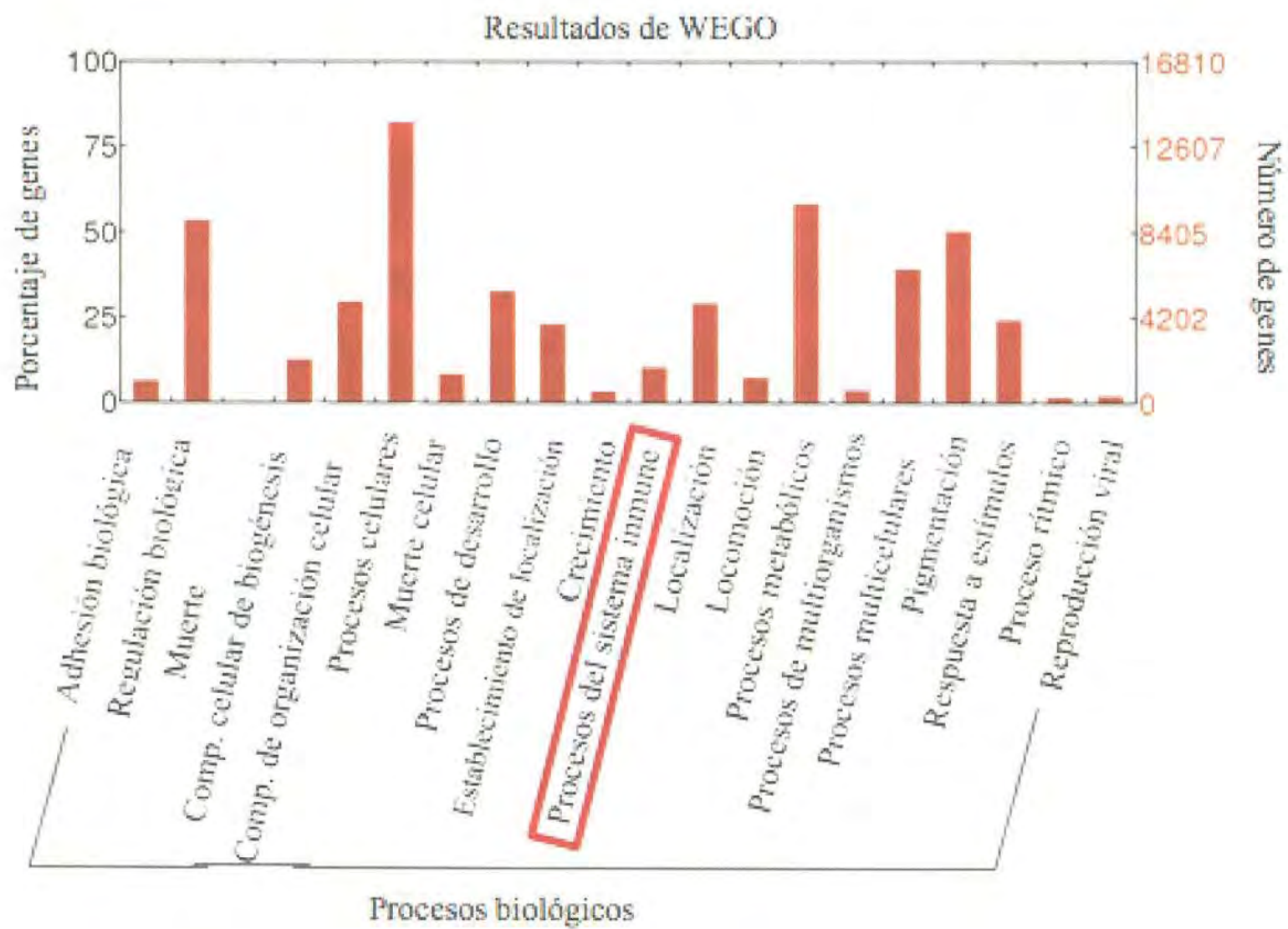


Figura 13. Gráfica de genes que llevan a cabo un proceso biológico expresados en el bazo de *Thunnus orientalis*.

Tabla 8. Procesos del sistema inmune.

	Genes asociados	Porcentaje de genes
Células B	4	0.0
Células T	22	0.1
Activación de la respuesta inmune	267	1.6
Tratamiento y representación del antígeno	102	0.6
Proceso inmune efector	477	2.8
Respuesta inmune	1056	6.3
Desarrollo del sistema inmune	662	3.9
Activación de leucocitos	661	3.9
Homeostasis de los leucocitos	65	0.4
Migración de leucocitos	173	1.0
Coestimulación de linfocitos	779	4.6
Diversificación somática de inmuno receptores	49	0.3
Tolerancia a la inducción	10	0.1

Lista de genes involucrados en el proceso del sistema inmune obtenidos en WEGO.

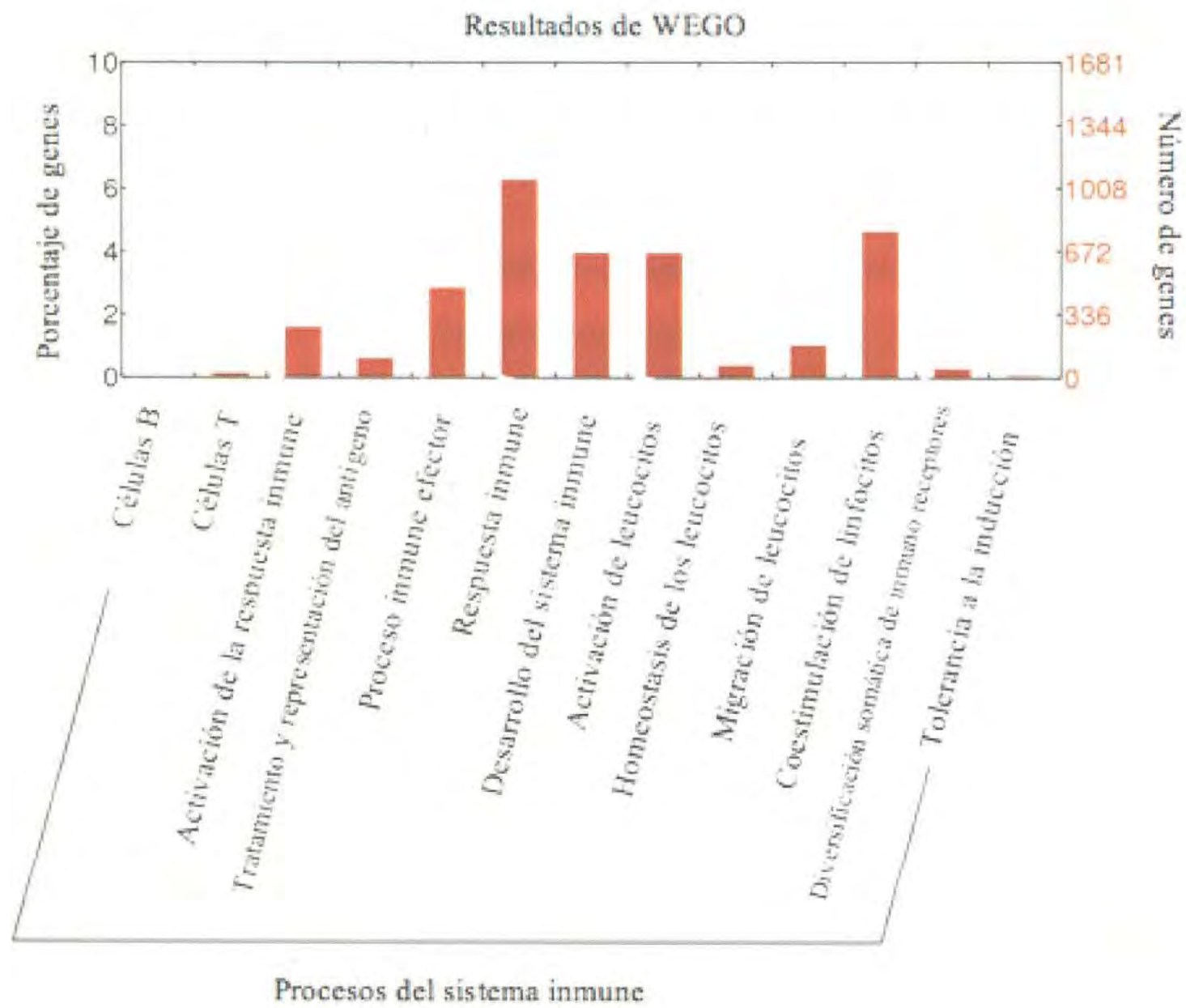


Figura 14. Gráfica de genes involucrados en los procesos del sistema inmune, expresados en el bazo de *Thunnus orientalis*.

Conclusiones

El tejido de bazo de atún expresa genes que codifican para moléculas biológicamente activas con diversas funciones fisiológicas y de defensa. El protocolo seguido permitió establecer la ontología genética del bazo de *Thunnus orientalis*, donde el perfil de expresión génica del tejido mostró que 16,810 transcripciones de las secuencias generadas por Illumina se relacionan con alguna función biológica.

El uso de nuevas tecnologías de secuenciación masiva representa una excelente plataforma para estudios genómicos a nivel de transcriptoma. La aplicación de la tecnología Illumina y la utilización de RNA-seq para realizar la secuenciación de transcriptoma del bazo de atún *Thunnus orientalis*, ofreció ciertas ventajas como el de no requerir una gran cantidad de muestra y con gran selectividad, por lo que los datos obtenidos presentaron una cobertura buena de transcritos y una precisión alta con respecto a los niveles de expresión génica obtenidas por PCR.

Realizar estudios sobre el perfil de transcriptomas es un método útil para evaluar la importancia relativa de los genes expresados en una célula, tejido u organismo bajo una condición específica, así como para la comprensión de las actividades celulares en un organismo, tales como metabolismo, desarrollo, crecimiento o en este caso defensa inmune y enfermedad. Por lo que los datos generados en este trabajo representan una base importante para emprender futuros estudios que aborden el desarrollo de inmunoterapias o vacunas

Recomendaciones

El número de genes relacionados con el sistema inmunológico por ontología genética se considera bajo, por lo que en futuros estudios sería interesante aplicar sistemas de inmunoestimulación artificial en los peces, a fin de aumentar dicho valor.

Al ser la expresión génica diferencial un factor clave que impulsa la divergencia fenotípica, la determinación de cuándo y dónde la expresión génica ha ocurrido en los organismos requiere un método cuantitativo. Por lo que, confirmar las diferencias de expresión génica por qRT-PCR sería un trabajo para continuar.

Por último, estudiar con más la filogenética de las secuencias de atún es importante, ya que enriquece la comprensión de cómo los genes, los genomas, las especies y las mismas secuencias moleculares evolucionan.

REFERENCIAS

- Allison, E. H. (2011). Aquaculture, fisheries, poverty and food security.
- Andrés, I. S., Rosas, E. L. G., y Aguilar, M. P. P. (2017). LA RELACIÓN COMERCIAL JAPÓN MÉXICO: UNA PERSPECTIVA PARA LAS NEGOCIACIONES. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 2(1), 1629-1633.
- Aoki, T., Hirono, I. (2006). Immune relevant genes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 1(1), 115-121.
- Aoki, T., Hirono, I., Kono, H., Hikima, J. I., y Jung, T. S. (2011). Microarray technology is an effective tool for identifying genes related to the aquacultural improvement of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 6(1), 39-43.
- Atiénzar, E., Ballesté, J., Castro, L., Fariza, I., Marcos, A., Medel, R., Ruiz, J., Ros, M., y San José, N. (2011). Materiales didácticos de Biología, guía práctica de Maturira.
- Austbø, L., Aas, I. B., König, M., Weli, S. C., Syed, M., Falk, K., y Koppang, E. O. (2014). Transcriptional response of immune genes in gills and the interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon challenged with infectious salmon anaemia virus. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(1), 107-114.
- Ayambo, H., y Elvira, L. (2014). Cambios en la recurrencia e intensidad de las masas de aire frío-friaje y su efecto en el comportamiento de los peces de la actividad piscícola en la carretera Iquitos-Nauta.
- Bayliff, W. H. (1994). A review of the biology and fisheries for northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, in the Pacific Ocean. *FAO Fisheries Technical Paper (FAO)*.
- Bendich, A. (1996). Antioxidant vitamins and human immune responses. *Vitamins and hormones*, 52, 35-62.
- Bowden, T. J., Cook, P., y Rombout, J. H. W. M. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 413-427.
- Burkhart, J. G. (2000). Fishing for mutations. *Nature Biotechnology*, 18(1), 21-23.

- Carnevale, G., y Collette, B. B. (2014). *Zappaichthys harzhauseri*, gen. et sp. nov., a new Miocene toadfish (Teleostei, Batrachoidiformes) from the Paratethys (St. Margarethen in Burgenland, Austria), with comments on the fossil record of batrachoidiform fishes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 34(5), 1005-1017.
- Coates, D. (2015). Inland capture fishery statistics of Southeast Asia: current status and information needs. *RAP publication*, 11, 114
- Collette, B. B., y Nauen, C. E. (1983). *FAO species catalogue. Volume 2. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date* (No. 125).
- Cort, J. L. Datos biológicos del Atún rojo, *Thunnus thynnus*. Del golfo de Vizcaya y resultado de las campabas de 1975 y 1976 en el Puerto de Fuenterrabia.
- Costantini, M., Auletta, F., & Bernardi, G. (2007). Isochore patterns and gene distributions in fish genomes. *Genomics*, 90(3), 364.
- Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Marín-Zaldivar, L. F., Guajardo-Barbosa, C., Nieto-López, M., y Salinas-Miller, A. (2002). Historia y estatus actual de la digestibilidad y algunas características fisicoquímicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de nutrición acuícola*, 3, 1-22.
- Davis, J. M., Clay, H., Lewis, J. L., Ghori, N., Herbomel, P., y Ramakrishnan, L. (2002). Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*, 17(6), 693-702.
- DE, M. D. C., y Puerto, A. E. (2010). Documento SAC-01-11.
- De Anda-Montañez, J., García de León, F., Zenteno-Savín, T., Balart, E. F., Méndez Rodríguez, L. C., Bocanegra Castillo, N., y Rodríguez Jaramillo, M. C. (2013). Estado de salud y estatus de conservación de la (s) poblacion (es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción. *Primera etapa convenio: FB1508/HK050/10. La Paz BCS: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad p111*.
- Desjardins, P., y Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (45).

- Edgar, R., Domrachev, M., y Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*, 30(1), 207-210.
- Ekblom, R., y Wolf, J. B. (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary applications*, 7(9), 1026-1042.
- Espenes, A., Press, C. M., Dannevig, B. H., y Landsverk, T. (1995). Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and tissue research*, 282(1), 41-48.
- Fao. (2012). *El Estado Mundial de la agricultura y la alimentación*. Food & Agriculture Org
- Falk, B., Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Schooley, K. A., & Lynch, D. H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 181(1), 71-77.
- Ferguson, H. W. (1989). *Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*. Iowa State University Press.
- Foreman, T. J. (1990). Giant bluefin off Southern California, with a new California size record. *Calif. Fish. Game*, 76, 181-186.
- Gibbs Jr, R. H., y Collette, B. B. (1967). Comparative anatomy and systematics of the tunas, genus *Thunnus*.
- González Alonso, H., Rodríguez Schettino, L., Rodríguez, A., Mancina, C. A., y Ramos García, I. (2012). Libro rojo de los vertebrados de Cuba.
- Gordillo, G., y Méndez, O. (2013). Seguridad y Soberanía Alimentaria: Un documento base para discusión. *Santiago, Chile: FAO, RLAC*.
- Gutiérrez, J. (2010). Inmunología Veterinaria. *Manual Moderno. México, DF ISBN, 978-607*
- Hackett, P. B., y Alvarez, M. C. (2000). The molecular genetics of transgenic fish. *Recent advances in marine biotechnology. Volume 4: Aquaculture. Part B: Fishes.*, 77-145.
- Han, L., y Zhao, Z. (2008). Comparative analysis of CpG islands in four fish genomes. *Comparative and functional genomics*
- Heinner, G. (2015). Hacia la medicina personalizada: implicancias de las ciencias básicas y las "ómicas" en la práctica clínica. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4), 629-632.

- Heinner, G. (2015). Hacia la medicina personalizada: implicancias de las ciencias básicas y "ómicas" en la práctica clínica. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4), 629-632.
- Hernandez-Cruz, C. M. (2015). Diversificación de especies en acuicultura.
- Hu, G. B., Zhao, M. Y., Lin, J. Y., Liu, Q. M., & Zhang, S. C. (2014). Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factor 9 (IRF9) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & shellfish immunology*, 39(2), 138-144.
- Huang, L., Li, G., Mo, Z., Xiao, P., Li, J., & Huang, J. (2015). De Novo assembly of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) spleen transcriptome to identify putative genes involved in immunity. *PloS one*, 10(2), e0117642.
- Iregui Castro, C. A., Hernández, E., Jiménez, Á., Pulido, A., Rey, A. L., Comas, J., y Rodríguez, M. (2000). Manual de sanidad piscícola.
- Iwai, T., y Nakamura, I. (1964). Branchial skeleton of the bluefin tuna, with special reference to the gill rays. *Bull Misaki Mar Biol Inst Kyoto Univ*, 6, 21-25.
- Iwai, T., Nakamura, I., Matsubara, K., y Gibbs, R. H. (1965). *Taxonomic study of the tunas*. Bureau of Commercial Fisheries, Ichthyological Laboratory, US National Museum.
- Jayasundara, N., Gardner, L. D., y Block, B. A. (2013). Effects of temperature acclimation on Pacific, bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) cardiac transcriptome. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(9), R1010-R1020.
- Jones, S., y Silas, E. G. (1960). Indian tunas—a preliminary review, with a key for their identification. *Indian Journal of Fisheries*, 7(2), 369-93.
- Kim, D., Langmead, B., y Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast-spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 12(4), 357-360.
- Klawe, W. L. (1977). What is a tuna. *Mar. Fish. Rev*, 39(11), 1-5.
- LA, C. A., y LA, A. Y. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- Lara, A. L. (1997). Inmunología de peces. *Encuentros en la Biología* (40), 3.
- Lewin, B. (1996). Genes VI. *International Student Edition*, Oxford University. 1260.
- Liao, Y., Smyth, G. K., y Shi, W. (2013). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137-151.
- Martínez, J. G. (2000). Sistema de información genómico: Extensión del módulo de carga e integración de información genómica.
- Martínez, R. C., Rosales, M. G., y Robinson, R. (2000). Respuestas inmunes innata y adaptativa. *Medisan*, 4(2), 64-74.
- Medzhitov, R., y Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*, 9(1), 4-9.
- Menashes, E. H. (2011). Fisheries of the Pacific region; western Pacific region. *Federal Register*, 76, 28422.
- Moreno, C., y Sanchez-Ibarrola, A. (2003). Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario.
- Nakamura, I. (1985). *FAO species catalogue. v. 5: Billfishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date.*
- Nakamura, Y., Mori, K., Saitoh, K., Oshima, K., Mekuchi, M., Sugaya, T., y Yasuike, M. (2013). Evolutionary changes of multiple visual pigment genes in the complete genome of Pacific bluefin tuna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), 11061-11066.
- National Institutes of Health. (2016). About NIH. 2015. *Certificates of Confidentiality (CoC)* URL: <https://humansubjects.nih.gov/coc/index> [WebCite Cache].
- Ohtani, M., Hikimara, J. I., Kondo, H., Hirono, I., Jung, T. S., y Aoki, T. (2011). Characterization and antiviral function of a cytosolic sensor gene, MDA5, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(5), 554-562.
- Orvay, F. C. (1993). *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción* (Vol. 4). Edicions Universitat Barcelona.
- Octavio Palomares, A. (2015). Estudio de la viabilidad técnica y económica de una granja acuícola dedicada al cultivo de especies marinas.

- Press, C. M., y Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 309-318.
- Rombout, J., Huttenhuis, H., Picchiatti, S., y Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 441-455.
- Rooker, J. R., Secor, D. H., Zdanowicz, V. S., y Itoh, T. (2001). Discrimination of northern bluefin tuna from nursery areas in the Pacific Ocean using otolith chemistry. *Marine Ecology Progress Series*, 218, 275-282.
- Sadler, J., y Goodwin, A. (2007). *Disease prevention on fish farms*. Southern Regional Aquaculture Center.
- SAGARPA. (2014). Segundo Informe 2013-2014.
- SAGARPA. (2015). Segundo Informe 2013-2014.
- Secombes, C. J., y Ellis, A. E. (2012). The immunology of teleosts. *Fish Pathology, Fourth Edition*, 144-166.
- Sekiyama, T. (2017). An Examination of Sustainable Management of Pacific Bluefin Tuna Stock. *Journal of Environmental Protection*, 8(01), 26.
- Soto Sedano, J. C., y López Carrascal, C. E. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2).
- Tran, N. T., Gao, Z. X., Zhao, H. H., Yi, S. K., Chen, B. X., Zhao, Y. H., ... & Wang, W. M. (2015). Transcriptome analysis and microsatellite discovery in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 45(1), 72-82.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., y Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10), 486-503.
- Velarde-Salcedo, A. J., y de la Rosa, A. P. B. Tecnologías “ómicas” en las ciencias ambientales y en la búsqueda de biomarcadores moleculares. *w Pfeng*, 83.
- Wu, Q. (1991). Benthon(sic) inhabited in eastern Taihu Lake and its pen fish farming area and preliminary assessment and division of the environment quality. *Transactions of oceanology and limnology/Haiyang Huzhao Tongbao. Qingdao*, (4), 64-72.
- Wu, R. S. S. (1995). The environmental impact of marine fish culture: towards a sustainable future. *Marine pollution bulletin*, 31(4), 159-166.

- Wu, L., Wen, C., Qin, Y., Yin, H., Tu, Q., Van Nostrand, J. D., ... y Zhou, J. (2015). Phasing amplicon sequencing on Illumina- Miseq for robust environmental microbial community analysis. *BMC microbiology*, 15(1), 125.
- Zapata, A. G., Varas, A., y Torroba, M. (1992). Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunology today*, 13(4), 142-147.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., & Cortes, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 126-136.
- Zuleta, L. A., y Becerra, A. (2013). El mercado del atún en Colombia.