



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Evaluación del efecto de la bacterina de *Enterococcus faecalis* sobre la expresión de proteínas relacionadas a la respuesta inmune de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) “tilapia del Nilo”**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga

**AUTOR**

Mónica Paola CRIOLLO JOAQUIN

**ASESORES**

Gustavo Adolfo SANDOVAL PEÑA

Eric Louis MIALHE MATONNIER

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Criollo, M. (2021). *Evaluación del efecto de la bacterina de Enterococcus faecalis sobre la expresión de proteínas relacionadas a la respuesta inmune de Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) "tilapia del Nilo"*. Tesis para optar el título de Bióloga Genetista Biotecnóloga. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0002-4860-7579
DNI o pasaporte del autor	47583182
Código ORCID del asesor	0000-0002-8392-9880
DNI o pasaporte del asesor	41020762
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Bioinformática y Biología Estructural (GIBIOBES)
Agencia financiadora	<p>País de la agencia financiadora : Perú</p> <p>Nombre y siglas de la agencia financiadora: FONDECYT</p> <p>Nombre del programa financiero: Círculo de Investigación en Biotecnología Molecular para el Desarrollo y la Sostenibilidad de los Sectores Acuícolas del Perú.</p> <p>Número de contrato: Asignación 132</p>
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Laboratorio de Biotecnología Molecular de IncaBiotec SAC, Tumbes, Perú.</p> <p>Coordenadas geográficas: Latitud de 3.5565° S, y longitud de 80.4271° W</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2017-2020
Disciplinas OCDE	<p>Bioquímica, Biología molecular</p> <p><a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a></p>



**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)**

**MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 8:05 horas del 04 de febrero de 2021, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/qhc-ghcs-for>, el jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **MÓNICA PAOLA CRIOLLO JOAQUIN**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200039478, la titulando expuso su tesis: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA BACTERINA DE *Enterococcus faecalis* SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA RESPUESTA INMUNE DE *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) “TILAPIA DEL NILO”,** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: APROBADO CON MÁXIMOS HONORES

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **MÓNICA PAOLA CRIOLLO JOAQUIN** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 10:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 04 de febrero de 2021.



Firmado digitalmente por MARIANO  
ASTOCONDOR Mauro Gilber FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 04.02.2021 10:01:43 -05:00

Dr. MAURO MARIANO ASTOCONDOR  
(PRESIDENTE)

Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA  
(ASESOR)

Mg. GUILLERMO ALVAREZ BEJAR  
(MIEMBRO)

Mg. ERASMO COLONA VALLEJOS  
(MIEMBRO)

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Quiero dedicar esta investigación a Dios, a mi familia, a mis profesores y a mis colegas que me apoyaron en este camino.

Agradezco enormemente el financiamiento otorgado por el Círculo de Investigación en Biotecnología Molecular para el Desarrollo y la Sostenibilidad de los Sectores Acuícolas del Perú (asignación 132-2015-FONDECYT) y la empresa IncaBiotec S.A.C. Adicionalmente agradezco a la Universidad Nacional de Tumbes y a sus docentes por las facilidades brindadas para el acceso a sus instalaciones.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ARN	Ácido ribonucleico
EF-Tu	Factor de elongación térmica inestable Tu
ESI	Electrospray ionization
CDON	Molécula de adhesión celular relacionada / regulada negativamente por oncogenes
MALDI-TOF-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight/time of flight
MPP3	Proteína de membrana, palmitoilada 3
MSP	Proteína específica masculina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Real-time polymerase chain reaction
RT	Retrotranscripción
RCF	Relative centrifugal force
RPM	Revolutions per minute
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar
WORMS	World Register of Marine Species

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1. Información biológica y acuícola de <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758) “tilapia del Nilo” .....	4
2.1.1. Taxonomía .....	4
2.1.2. Biología y características productivas de la tilapia .....	4
2.2. Enfermedades de la tilapia .....	6
2.2.1. Enfermedades virales .....	7
2.2.2. Enfermedades bacterianas.....	7
2.2.2.1. Enfermedad bacteriana causada por <i>Enterococcus faecalis</i> .....	9
2.3. Inmunidad de peces .....	10
2.3.1. Inmunidad innata .....	11
2.3.2. Inmunidad adquirida .....	12
2.3.3. Proteínas relacionadas al sistema inmunitario .....	14
2.3.3.1 Proteína de resistencia al mixovirus (Mx).....	14
2.3.4. Proteínas plasmáticas de respuesta de fase aguda.....	17
2.3.4.1. Hemopexina.....	17
2.3.4.2. Otras proteínas de respuesta de fase aguda .....	18
2.3.5. Inmunidad de tilapia contra <i>E. faecalis</i> .....	20
2.4. Vacunas en peces.....	21
2.4.1. Vacunación en peces .....	21
2.4.2. Métodos de vacunación.....	22
2.4.3. Métodos de inactivación de bacterias .....	23
2.5. Herramientas proteómicas para detectar proteínas diferencialmente reguladas...24	
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. Objetivo general .....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
4.1. Material biológico.....	26
4.2. Preparación de la bacterina .....	26
4.3. Definición de grupos y colecta de muestras.....	27
4.4. Detección de anticuerpos anti <i>Enterococcus faecalis</i> .....	28
4.5. Evaluación de la expresión del gen Mx por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR).....	29



4.6. Identificación de componentes humorales en el suero de tilapias por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF .....	30
4.6.1. Extracción de proteínas .....	30
4.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE).....	31
4.6.3. Digestión enzimática de proteínas en gel .....	31
4.6.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF.....	32
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
5.1. Respuesta inmune humoral adaptativa de las tilapias contra <i>Enterococcus faecalis</i> .....	33
5.2. Evaluación de la expresión del gen Mx.....	34
5.2.1. Eficiencia de la PCR en tiempo real (qPCR) del gen de la proteína Mx de unión al GTP inducible por interferón tipo I (Mx) .....	34
5.2.2. Eficiencia de la PCR en tiempo real (qPCR) del gen del factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ). .....	34
5.2.3. Evaluación del gen Mx en el tejido de riñón de tilapia.....	37
5.3. Cambios en el perfil de las proteínas séricas de tilapias inmunizadas con la bacterina de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	38
5.4. Componentes séricos de tilapia identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF.....	38
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>41</b>
6.1. Respuesta inmune adaptativa humoral de las tilapias contra <i>Enterococcus faecalis</i> .....	41
6.2. Evaluación de la expresión del gen Mx.....	42
6.3. Cambios en el perfil de las proteínas del suero e identificación de biomarcadores por herramientas proteómicas .....	43
6.4. Componentes séricos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF .....	45
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>55</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>80</b>

## RESUMEN

La tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* es la tercera especie de pez de agua dulce, más cultivada en todo el mundo. Sin embargo, esta actividad se ha visto afectada negativamente por el aumento de enfermedades. Frente a esto, el presente trabajo tuvo como objetivo demostrar el uso de *Enterococcus faecalis* inactivada (bacterina) con formalina para inducir un efecto protector en tilapias. Se inyectó la bacterina de *E. faecalis* en tilapia en tres dosis. Se detectaron niveles altos de anticuerpos específicos de tilapias contra *E. faecalis* con títulos máximos de 9.32 entre los 8 y 15 días post vacunación. La expresión génica de Mx de riñón de las tilapias inmunizadas, fue mayor que las tilapias controles a los 3 días después de la tercera dosis. Además, mediante el análisis proteómico sérico por SDS-PAGE acoplada a espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF, se encontró una banda alrededor de 95 kDa específicamente en los peces inmunizados, que fue identificada como hemopexina, cuya función principal es participar en el metabolismo del hierro y la respuesta de la fase aguda del sistema inmune. Asimismo, se identificaron las proteínas séricas de las bandas comunes; que participan en i) la activación del sistema del complemento (C3 y C1qC), ii) la eliminación de radicales libres (ceruloplasmina, alfa-2-macroglobulina y serotransferrina), iii) la modulación de la respuesta inmune (N4BP1 y apolipoproteína A-I), iv) la formación de coágulos (glicoproteína rica en histidina, alfa-1-antitripsina, fibrinógeno y quininógeno-1), v) la adhesión celular (fibronectina, CDON y MPP3), vi) el metabolismo (biotinidasa), vii) la determinación del sexo (MSPB, MSPC y lipocalina), y también se encontraron viii) proteínas bacterianas (EF-Tu de *Serratia spp.* y Gammaproteobacterias). Los resultados demostraron que la bacterina de *E. faecalis* indujo la producción de anticuerpos anti- *E. faecalis*, la expresión del gen Mx y la hemopexina en tilapia. Adicionalmente, la espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF permitió la identificación de proteínas de interés en el estudio del sistema inmunitario e identificación de patógenos de tilapias.

**Palabras claves:** *Oreochromis niloticus*, *Enterococcus faecalis*, gen Mx, hemopexina, MALDI-TOF-TOF.

## ABSTRACT

The Nile tilapia *Oreochromis niloticus* is the third most widely cultivated species of freshwater fish in the world. However, this activity has been negatively affected by the increase of diseases. Against this, the objective of present work was to demonstrate the use of inactivated *Enterococcus faecalis* (bacterin) with formalin to induce a protective effect in tilapia. The *E. faecalis* bacterin was injected into tilapia in three doses. High levels of tilapia-specific antibodies against *E. faecalis* were detected with titers peak of 9.32 in 8 and 15 days post vaccination. The kidney Mx gene expression of the immunized tilapia was higher than the control tilapia at 3 days after the third dose. Furthermore, through serum proteomic analysis by SDS-PAGE coupled to MALDI-TOF-TOF mass spectrometry, a band around 95 kDa was found specifically in immunized fish, which was identified as hemopexin, whose main function is to participate in iron metabolism and the acute phase response of the immune system. Also, the serum proteins of the common bands were identified; those participate in i) activation of the complement system (C3 and C1qC), ii) elimination of free radicals (ceruloplasmin, alpha-2-macroglobulin and serotransferrin), iii) modulation of the immune response (N4BP1 and apolipoprotein AI) , iv) clot formation (glycoprotein rich in histidine, alpha-1-antitrypsin, fibrinogen and quinogen-1), v) cell adhesion (fibronectin, CDON and MPP3), vi) metabolism (biotinidase), vii) sex determination (MSPB, MSPC and lipocalin), and too, viii) bacterial proteins (EF-Tu from *Serratia spp.* and Gammaproteobacteria) were also found. The results demonstrated that the *E. faecalis* bacterin induced the production of anti-*E. faecalis* antibodies, the expression of the Mx gene and hemopexin in tilapia. Additionally, MALDI-TOF-TOF mass spectrometry allowed the identification of proteins of interest in the study of the immune system and identification of tilapia pathogens.

**Keywords:** *Oreochromis niloticus*, *Enterococcus faecalis*, Mx gene, hemopexin, MALDI-TOF-TOF.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es la tercera especie de pez, después de los ciprínidos y los salmónidos, más cultivada en todo el mundo, además es una de las especies de mayor consumo (Amal y Zamri-Saad, 2011; Atef *et al.*, 2016; Nandal y Pickering, 2004). Los productores más grandes de tilapia a nivel mundial son China, Egipto, Filipinas, Tailandia, Indonesia, Laos, Costa Rica, Ecuador, Colombia y Honduras, mientras que Estados Unidos es el principal importador, con un consumo de 225 000 toneladas métricas al año (Harvey, 2016). Para el Perú en el año 2017, la producción de tilapia fue de 3 042 toneladas métricas (PRODUCE, 2018).

Recientemente, esta actividad ha experimentado una intensificación y expansión significativa (Ghanem y Haggag, 2015, Soliman, 2017, PRODUCE, 2018). En los cultivos acuícolas, las poblaciones de peces con alta capacidad de carga, sea en estadios alevinaje, juveniles y adultos (extremadamente densas en las piscigranjas), provocan un aumento de enfermedades infecciosas (Toranzo *et al.*, 2005). Las bacterias son los principales agentes causantes de enfermedades en los peces de agua dulce en todo el mundo (Plumb, 1997, Zorrilla *et al.*, 2003). Entre ellas, la bacteria *Enterococcus faecalis*, un patógeno oportunista de peces, que causa la enfermedad septicémica hemorrágica en peces, con mortalidades de hasta 80% (El-Refaey, 2013, Abou El-Geit *et al.*, 2013, Petersen y Dalsgaard, 2003, Zahran *et al.*, 2019). Este patógeno ha sido reportado en Indonesia como causante de estreptococosis en la tilapia roja (Rizkiantino *et al.*, 2020).

Se ha demostrado el efecto protector inducido por la bacterina de *E. faecalis* contra patógenos de peces. Estudios recientes han sugerido que *E. faecalis* inactivada

por calor presenta un fuerte efecto inmunoestimulante sobre linfocitos T auxiliares CD4+ (Th1) en peces (Matsuura *et al.*, 2017) y un aumento significativo en el número de linfocitos y la protección contra el desafío de virus y bacterias en peces vacunados (Zhang *et al.*, 2016, Matsuura *et al.*, 2017). Además, se ha reportado su eficacia junto con otras cepas para el desarrollo de vacunas polivalentes contra *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* en tilapia (Abu-Elala *et al.*, 2019).

La vacunación como mecanismo de inmunización, es tal vez una de las herramientas más importantes para el control de enfermedades bacterianas de las especies, incluidos los peces, no solo por su potencial preventivo y correctivo sino también por sus bondades con el ambiente y con la salud pública que contrastan notoriamente con los tratamientos por antibióticos (Penagos *et al.*, 2008).

Por otro lado, el sistema de interferón tipo I (IFN) es un mecanismo de defensa antiviral rápido y potente en vertebrados (Samuel, 1991, Verrier *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2019). El IFN induce la expresión en células huésped de un número de proteínas que inhiben la traducción del ARN viral. Estas proteínas incluyen la 2',5'-oligoadenilato sintetasa, la proteína quinasa P1 y la proteína Mx (proteína Mx1 de unión a GTP inducida por interferón) (Stark *et al.*, 1998, Saxena *et al.*, 2018), siendo esta última más ampliamente estudiada, y se ha demostrado su efecto protector temprano *in vivo* e *in vitro* contra patógenos virales (Trobridge *et al.*, 2000, Collet *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2019, Noguera *et al.*, 2018) y bacterianos de peces, entre ellos *Streptococcus iniae* (El Aamri *et al.*, 2015), *Edwardsiella tarda* (Sun *et al.*, 2011), *Vibrio anguillarum* (Acosta *et al.*, 2004, Salinas *et al.*, 2004) y *Aeromonas hydrophila* (Roy *et al.*, 2016).

Los métodos para la inactivación de bacterias son diversos, entre ellos se encuentran la inactivación por calor y formalina (Matsuura *et al.*, 2017, Nayak *et al.*, 2014). En un estudio se demostró que *Nocardia seriolae* inactivada con

formalina (bacterina) aumentó el número de células T CD4+ y células T CD8+ en el riñón de *Carassius langsdorfii* y aumentó la protección contra *N. seriolae* (Nayak *et al.*, 2014).

La proteómica es una herramienta post-genómica que permite la comprensión de sistemas biológicos complejos implicados en la patología y fisiología de las especies (Bendixen *et al.*, 2011, Forné *et al.*, 2009, Eckersall *et al.*, 2011, Rodrigues *et al.*, 2012). Se ha reportado el uso electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) acoplada a espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF o ESI para la identificación y evaluación del perfil proteómico de las tilapias inoculadas con *Aeromonas hydrophila* (Charlie-Silva *et al.*, 2019), de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Nynca *et al.*, 2014, Morro *et al.*, 2020) y en tiburón nodriza *Ginglymostoma cirratum* (Criscitiello *et al.*, 2019). En el presente trabajo se utilizó la electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) acoplada a espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF para identificar proteínas inmunitarias específicas como biomarcadoras en los peces inmunizados. Además, dicha técnica fue útil para identificar proteínas presentes en el suero que son de importancia biológica y aún no han sido caracterizadas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Información biológica y acuícola de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) “tilapia del Nilo”

#### 2.1.1. Taxonomía

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertenece a la familia Cichlidae, Orden Perciformes. La clasificación taxonómica según la WORMS (<http://www.marinespecies.org>) es:

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Chordata

**Subphylum:** Vertebrata

**Superclase:** Gnathostomata

**Clase:** Actinopterygii

**Orden:** Perciformes

**Familia:** Cichlidae

**Subfamilia:** Pseudocrenilabrinae

**Género:** *Oreochromis*

**Especie:** *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

#### 2.1.2. Biología y características productivas de la tilapia

La tilapia del Nilo es una especie de pez de agua dulce, nativa de África y Medio Oriente (Trewavas, 1983) que crece a temperaturas entre 20 a 35 °C (FAO, 2020).

Las etapas de desarrollo de la tilapia del Nilo *O. niloticus* comprenden el periodo embrionario que abarca desde la fertilización hasta la eclosión; el periodo larvario que empieza desde la eclosión hasta la absorción del saco embrionario, el periodo de alevinaje que inicia con la absorción del saco embrionario hasta alcanzar un peso de aproximadamente 10 gramos (g), el periodo juvenil que inicia cuando la tilapia alcanza un peso de 10 g hasta 200 g y el periodo de adultez que inicia cuando la tilapia alcanza un peso superior a 200 g (FAO, 2020, Fujimura y Okada, 2007, Mustapha y Atolagbe, 2018).

En piscigranjas, la madurez sexual la alcanzan a la edad de 5 ó 6 meses. El desove comienza cuando la temperatura alcanza 24 °C. El proceso de apareamiento empieza cuando el macho establece un territorio, excava un nido y vigila su territorio. La hembra sexualmente madura desova en el nido y tras la fertilización por el macho, la hembra recoge los huevos en su boca, los incuba y cría a los alevines hasta que se absorbe el saco vitelino por alrededor de 2 semanas, luego de este tiempo, la hembra expulsa los alevines al ambiente acuático (FAO, 2020).

La tilapia es reproductora asincrónica, y no es necesario el uso de hormonas para inducir el desove, ya que éste se da a lo largo de todo el año a temperaturas de 24 a 30 °C (Alvarenga y França, 2009). La reproducción se desarrolla en estanques, tanques o hapas (corrales de red). La proporción de siembra entre hembras y machos es de hasta 4:1 (Bautista *et al.*, 1988). La densidad de siembra de los reproductores es variable, oscilando entre 0.3 - 0.7 kg/m<sup>2</sup> en tanques pequeños o de 0.2 - 0.3 kg/m<sup>2</sup> en estanques (FAO, 2020).

La mayoría de los agricultores optan por mantener solo tilapias macho en la etapa de crecimiento, ya que son más rentable debido a un mayor crecimiento y, por lo tanto, ahorra más tiempo y energía. Para ello, se utilizan técnicas de reversión sexual para producir únicamente crías de tilapia macho, y esto es posible debido a que la tilapia



adquiere su diferenciación sexual varios días después de la absorción del saco vitelino. Por lo tanto, se suministra hormona masculina (17  $\alpha$  Metilttestosterona, MT) a las tilapias hembra en el alimento diariamente por un mes y se desarrollan como machos fenotípicos (Golan y Levavi-Sivan B, 2014, Singh, 2013). Las crías capturadas en instalaciones de una incubadora requieren tamizarse por una malla de 3.2 mm para separar a los peces >14 mm, que ya son demasiado grandes para una reversión sexual exitosa. MT es mezclada con el alimento comercial pulverizado que contiene >40% de proteína, disolviéndola en etanol al 95 -100%, lo que mezclado al alimento crea una concentración de MT de 60 mg /kg después de que se ha evaporado el alcohol. Además, se almacena en un lugar seco y oscuro, debido a que los andrógenos se degradan cuando se exponen a la luz natural o a altas temperaturas. Las crías se siembran en hapas o tanques con recambio de agua a densidades de entre 3 000 y 4 000/m<sup>2</sup>. Inicialmente la tasa de alimentación es de 20 - 30% del peso corporal por día para el crecimiento de los alevines y disminuye gradualmente hasta un 10 - 20% hacia el final de la tercera o cuarta semana del período de reversión sexual. Las crías cuyo sexo ha sido revertido alcanzan un peso promedio de 0.2 g después de 3 semanas y de 0.4 g después de la cuarta semana. La eficacia promedio de la reversión sexual varía del 95 al 100%, dependiendo de la intensidad de administración (FAO, 2020).

## **2.2. Enfermedades de la tilapia**

En los últimos años, algunos patógenos bacterianos y virales oportunistas de peces han sido identificados como los agentes causales de brotes severos en las instalaciones de acuicultura de la tilapia (Plumb, 1997, Zorrilla *et al.*, 2003, Amal y Zamri-Saad, 2011, *Eyngor et al.*, 2014, Bacharach *et al.*, 2016, Dong *et al.*, 2017). Además, la resistencia de las bacterias patógenas a los antibióticos es de gran preocupación en el manejo de enfermedades bacterianas en todo el mundo (Rahman *et. al.*, 2017, Salamaga *et al.*, 2017).

### 2.2.1. Enfermedades virales

**El virus de la tilapia de lago (TiLV).** Se reportó la presencia de un nuevo virus de ARN de tipo Ortomixovirus conocido como el virus de tilapia de lago (TiLV). Este patógeno emergente ha ocasionado mortalidades en un rango de 10-90% de tilapias cultivadas y silvestres en Israel, Ecuador, Colombia (*Eyngor et al.*, 2014, *Ferguson et al.*, 2014, *Bacharach et al.*, 2016, *Tsofack et al.*, 2016, *Del-Pozo et al.*, 2017), Egipto (*Fathi et al.*, 2017, *Nicholson et al.*, 2017), Tailandia (*Dong et al.*, 2017a, 2017b, *Surachetpong et al.*, 2017), Filipinas (OIE 2017), Taiwán (FIS 2017), India (*Behera et al.*, 2018), Malasia (*Amal et al.*, 2018), Uganda, Tanzania (*Mugimba et al.*, 2018) y Perú (SANIPES, 2018).

**Virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón (ISKNV).** Este virus ha sido reportado en África donde se informaron patrones inusuales de mortalidad muy alta (> 50% de producción) en los sistemas de cultivo intensivo de tilapia en jaulas a lo largo del lago Volta en Ghana. Los peces afectados mostraron oscurecimiento, nado errático y distensión abdominal con ascitis asociada. Las observaciones histopatológicas de tejidos extraídos de peces moribundos en diferentes granjas revelaron la presencia de lesiones indicativas de infección viral. Los resultados fueron confirmados por PCR (*Ramírez-Paredes et al.*, 2019a).

### 2.2.2. Enfermedades bacterianas

**Septicemia hemorrágica.** Es causada por *Aeromonas* móviles como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas veronii* y especies relacionadas (*Dong et al.*, 2017). La infección experimental con cepas de *Aeromonas* reveló que altas dosis pueden matar hasta el 100% de los cultivos de tilapia (*Dong et al.*, 2017). Se caracteriza por la pérdida del equilibrio, nado letárgico, respiración en superficie, necrosis ulcerosa, exoftalmia, hemorragia interna, así como inflamación de aletas y piel (*Austin et al.*, 2012, *Algammal et al.*, 2020).

**Vibriosis.** Es causada por *Vibrio anguillarum* (Bhanumathi *et al.*, 2010), *Vibrio vulnificus* (Mahmud *et al.*, 2010, Lo *et al.*, 2014, Cho *et al.*, 2018) y otras especies. Su sintomatología es similar a la septicemia hemorrágica; causados por estrés y mala calidad del agua (Mahmud *et al.*, 2010).

**Columnaris.** Es causado por *Flavobacterium columnare*. La infección es un patógeno común en alevines de tilapia (Mehrabi *et al.*, 2014). Se caracteriza por aletas deshilachadas y/o manchas irregulares blanquizcas y grises en la piel y/o aletas; lesiones necróticas en branquias (Austin *et al.*, 2012).

**Edwardsiellosis.** Es causada por *Edwardsiella tarda* (Miniero *et al.*, 2018) y *Edwardsiella anguillarum* (Oh *et al.*, 2020). Se caracteriza por pocos síntomas externos; líquido sanguinolento en cavidad corporal; hígado pálido y manchado; bazo inflamado y rojo intenso; riñón inflamado y blando (FAO, 2020). Asimismo, se ha descrito meningitis necrótica, encefalitis y vasculitis con necrosis fibrinoide de las paredes de los vasos sanguíneos, así como la formación de una estructura en forma de placa en el cerebro (Iregui *et al.*, 2012). Al analizar microscópicamente, se ha detectado apoptosis de linfocitos durante la etapa inicial de la septicemia generalizada (Pirarat *et al.*, 2007). Su tratamiento es por antibiótico en alimentos.

**Streptococcosis.** Es causada por *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* y *Lactococcus garviae*. Se producen signos clínicos como septicemia, meningoencefalitis, pérdida de apetito, emaciación, letargo, sangrado difuso en piel y órganos internos, exoftalmia con opacidad y hemorragia de ojos, nado letárgico y errático; distensión abdominal y alta mortalidad en la tilapia afectada (Mehrabi *et al.*, 2014).

**Enterococcosis.** Es causada por *Enterococcus sp.*, que se ha convertido en uno de los patógenos importantes de los peces, que impacta severamente las prácticas de la acuicultura en todo el mundo (Martins *et al.*, 2008). La incidencia de enfermedades de peces causadas por *Enterococcus sp.*, han sido reportada en el pez de cola amarilla

*Seriola quinqueradiata* en Japón (Kusuda y Salati, 1993), en el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Nieto *et al.*, 1995) y en la tilapia *Oreochromis niloticus* (Plumb y Hanson, 2010). Se caracteriza por nado letárgico y errático; pigmentación oscura en la piel; exoftalmia con opacidad y hemorragia de ojos; distensión abdominal; opérculo difuso y hemorrágico, alrededor de la boca, ano y base de aletas; bazo agrandado y ennegrecido (Kusuda y Salati, 1993, Nieto *et al.*, 1995, Plumb y Hanson, 2010).

#### **2.2.2.1. Enfermedad bacteriana causada por *Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis*, una bacteria Gram positiva, es un patógeno oportunista de peces (Osman *et al.*, 2017). Ha sido reconocida como un agente causante de la enfermedad septicémica hemorrágica en peces con mortalidades de hasta 80% (Zahran *et al.*, 2019) y se ha reportado como un patógeno causante de infección estreptocócica en la tilapia en Egipto (Khafagy *et al.*, 2009, El-Refaey, 2013, Abou El-Geit *et al.*, 2013, Osman *et al.*, 2017) y Tailandia (Petersen y Dalsgaard, 2003) y en peces cultivados en Bangladesh (Rahman *et al.*, 2017). Los signos clínicos incluyen letargo, anorexia, exoftalmia, distensión abdominal, hemorragia en la piel y en la base de las aletas (Saad *et al.*, 2015, Rahman *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta la fecha, no hay reportes de esta bacteria en tilapias de Perú, pero sí en langostinos (Saavedra, 2016). Por lo tanto, el co-cultivo de tilapias y langostinos, puede generar una transferencia horizontal de patógenos (Zhou *et al.*, 2019, Dolka *et al.*, 2020).

Finalmente, la *E. faecalis* muestra resistencia contra una amplia gama de antibióticos (Arias y Murray, 2012, Rahman *et al.*, 2017, Salamaga *et al.*, 2017). Se ha reportado que *E. faecalis* transporta genes de resistencia a antibióticos, lo cual representa un alto riesgo para el medio acuático y la salud pública (Díaz Pérez *et al.*, 2010, Ceci *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2019). Frente a esto, el presente trabajo tuvo como objetivo demostrar el uso de *E. faecalis* inactivada para inducir un efecto protector temprano en tilapias en lugar del uso de antibióticos, que puedan generar cepas patógenas resistentes.

### 2.3. Inmunidad de peces

Los peces poseen un sistema inmune con muchos componentes similares que los vertebrados superiores, y también con componentes y funciones especiales, como los centros melanomacrófagos y el sistema inmune de mucosas (Penagos *et al.*, 2008).

Los centros melanomacrófagos (CMMs) son acumulaciones nodulares muy compactas de los melanomacrófagos (MMs) que se observan principalmente en el riñón, el bazo y el hígado de peces. Los MMs tienen una pigmentación oscura debido al alto contenido de lipofuscina, melanina y hemosiderina (Agius y Roberts, 2003, Vigliano, *et al.*, 2006). Las primeras descripciones propusieron que los CMMs funcionan tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar que los CMMs desempeñan un papel en la inmunidad adaptativa de los peces (Steinel y Bolnick, 2017). Finalmente se ha observado que los CMMs de peces vacunados, infectados o cuando son sometidos a contaminantes ambientales, aumentan de tamaño y número (Agius y Roberts, 2003, Steinel y Bolnick, 2017).

El sistema inmune de mucosas actúa en la inmunidad innata y adaptativa. Los peces presentan el tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) que se subdivide en tejido linfóide asociado al intestino (GALT), tejido linfóide asociado a la piel (SALT) y tejido linfóide asociado a branquias (GIALT) (Salinas *et al.*, 2011). Se ha reportado un sistema inmune innato de mucosas desde los primeros estadios de vida de los peces con propiedades defensivas como la activación y aumento en número y tamaño de las células del moco branquial e intestinal en respuesta a las infecciones bacterianas o contaminantes presentes en el agua (Penagos *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que respuestas inmunes adquiridas en los SALT de la tilapia del Nilo participaron en la resistencia contra la infección por *Gyrodactylus cichlidarum*, lo que evidenció la participación de la inmunidad de la mucosa en los peces contra la infección

monogénica (Zhi *et al.*, 2020). Además, se han descrito sistemas inmunitarios adaptativos de la mucosa en teleósteos, se ha reportado una clase de inmunoglobulina presente en mucosas (IgT o IgZ) (Rombout *et al.*, 2014).

### **2.3.1. Inmunidad innata**

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa en peces. Este incluye las barreras físicas como las superficies mucosas y la piel con un amplio rango de sustancias asociadas como el moco, además leucocitos (monocitos, macrófagos, células dendríticas, granulocitos y células asesinas naturales) (Fischer *et al.*, 2013, Penagos *et al.*, 2008) y proteínas relevantes para el sistema inmunológico que inhiben el crecimiento de microorganismos infecciosos, como los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs), los péptidos antimicrobianos (AMP), las moléculas del complemento, los miembros de la familia de la lectina y las citoquinas (interferones, interleucinas, factores de necrosis tumoral y quimiocinas) (Zhu *et al.*, 2013).

La primera línea de defensa está representada por los macrófagos, cuya función principal innata es de tipo fagocítica y secreción de citoquinas proinflamatorias, aparecen en los eventos tempranos de inflamación en diferentes enfermedades. Asimismo, existen leucocitos granulares en peces llamados neutrófilos, eosinófilos y basófilos por sus características tintoriales. Los neutrófilos tienen funciones fagocíticas, quimiotácticas y bactericidas. Los eosinófilos de los peces se encuentran asociadas al tejido conectivo especialmente en el tracto gastrointestinal y las branquias, pero también en la piel, el corazón y el sistema nervioso central incluido el nervio óptico; y aparecen en los procesos inflamatorios (Penagos *et al.*, 2008).

Los PRRs detectan la estructura molecular conservada de un patógeno, conocido como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), e inducen la subsiguiente

inmunidad del huésped a través de múltiples vías de señalización que contribuyen a la erradicación del patógeno (Zhu *et al.*, 2013).

Los péptidos antimicrobianos naturales (AMP) pueden ingresar directamente a la célula bacteriana para interactuar con los objetivos intracelulares y así interferir el crecimiento y el metabolismo bacteriano, desempeñando un papel en la muerte bacteriana (Zhu *et al.*, 2013).

Los sistemas del complemento consisten en varias proteínas plasmáticas diferentes cuyas interacciones juegan un papel esencial en la lucha contra los patógenos. Hay tres formas diferentes de activar el complemento en la superficie de los patógenos invasores: la vía clásica, la vía de la lectina de unión a manosa y la vía alternativa. Aunque el inicio de cada enfoque depende de diferentes elementos, todos producen los mismos efectos antiinfecciosos: (1) opsonización o inducción de la fagocitosis de patógenos por los fagocitos con receptores del complemento debido al gran número de proteínas del complemento activadas generadas y unidas covalentemente con el patógeno invasor; (2) reclutamiento de células fagocíticas a sitios de inflamación y promoción de su activación; y (3) formación de complejos de ataque a la membrana para perforar las membranas celulares de los patógenos, provocando así su muerte (Zhu *et al.*, 2013).

Las citocinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular que a menudo están glicosiladas y son secretadas por células inmuno-relacionadas activadas tras la inducción por diversos patógenos, como componentes parasitarios, bacterianos o virales. Se dividen en interferones (IFN), interleucinas (IL), factor de necrosis tumoral (TNF), factores estimulantes de colonias y quimiocinas (Zhu *et al.*, 2013).

### **2.3.2. Inmunidad adquirida**

La inmunidad adquirida es la segunda línea de defensa. Los órganos que asumen este papel son el timo, el riñón y el bazo. La inmunidad adquirida puede ser dividida en celular

y humoral, donde están involucrados los linfocitos T y B respectivamente (Penagos *et al.*, 2008).

La inmunidad celular adquirida, involucra la citotoxicidad adaptativa mediada por células, que requiere moléculas clave expresadas en linfocitos T citotóxicos (CTL) y células diana. Los CTL matan las células huésped que albergan patógenos intracelulares mediante la unión de su receptor de células T (TCR) y su correceptor CD8 a un complejo de MHC de clase I y péptido unido a la célula huésped infectada. Alternativamente, los antígenos extracelulares son captados por células presentadoras de antígenos profesionales como macrófagos, células dendríticas y células B para procesar esos antígenos y presentar los péptidos resultantes en asociación con MHC de clase II a células T auxiliares CD4 + (Fischer *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2013).

Por otro lado, la inmunidad humoral adquirida en peces involucra el reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes a células B diferenciadas en células de memoria y células plasmáticas que responden para producir y secretar anticuerpos antígeno-específicos. Los peces son capaces de producir inmunoglobulinas de tipo IgM, que pueden tener una estructura tetramérica en varias especies de teleósteos (Ambrosius, 1966, Clem, 1971, Parra *et al.*, 2013) o como pentamérica o monomérica en condriictios (Clem *et al.*, 1967, Sigel y Clem, 1966); están compuestas por cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras de gran heterogeneidad (Ambrosius, 1966). Adicionalmente, se han identificado tres isotipos de Ig diferentes (IgD, IgT e IgZ) en los peces teleósteos (Zhu *et al.*, 2013, Mashoof y Criscitiello, 2016, Velázquez *et al.*, 2018). Las inmunoglobulinas son producidas principalmente por células plasmáticas. Se pueden encontrar en su forma secretada como anticuerpos en el plasma, el moco y la bilis (Velázquez *et al.*, 2018), o en su forma unida a la membrana en la superficie de las células B donde actúan como receptores (BCR) de antígenos (Salinas *et al.*, 2011).



### **2.3.3. Proteínas relacionadas al sistema inmunitario**

#### **2.3.3.1 Proteína de resistencia al mixovirus (Mx)**

Las proteínas Mx (proteína Mx de unión al GTP inducible por interferón tipo I ó GTPasa inducible por interferón tipo I) son miembros de la familia de las grandes GTPasas, una gran familia de enzimas hidrolasas que se unen al nucleótido guanosina trifosfato (GTP) y lo hidrolizan a guanosina difosfato (GDP) (Verhelst *et al.*, 2013); generalmente están presentes en todos los vertebrados, incluso en peces, se ha reportado que la proteína Mx de trucha de nieve *Schizothorax richardsonii* y de la carpa *Labeo rohita*, posee similitud estructural con los homólogos de mamíferos (Saxena *et al.*, 2018, Das *et al.*, 2019). Además, se sabe que aparecen en una o tres isoformas (Verhelst *et al.*, 2013) y son inducibles por el sistema de interferón tipo I (IFN I) (Robertsen, *et al.*, 2006) e IFN tipo II (Velázquez *et al.*, 2017).

Las proteínas Mx tienen un dominio de GTPasa N-terminal (dominio G), un dominio medio (MD) y un dominio efector de GTPasa C-terminal (GED). La unión e hidrólisis de GTP tiene lugar en el dominio G altamente conservado entre las GTPasas (Verhelst *et al.*, 2013), mientras que el GED es responsable del reconocimiento de los objetivos virales en mamíferos y peces (Verhelst *et al.*, 2013, Von Der Malsburg *et al.*, 2011, Mitchell *et al.*, 2012, Saxena *et al.*, 2018). Las proteínas Mx, forman una estructura de anillo que podrían actuar como llaves que consumen energía para desmontar la estructura objetivo viral (Verhelst *et al.*, 2013). Se conservan evolutivamente e inhiben una amplia gama de virus, probablemente al reconocer grandes estructuras virales que poseen un grado de simetría e iteración (Haller *et al.*, 2010). En este sentido, las proteínas Mx podrían considerarse moléculas de reconocimiento de patrones con una función efectora antiviral directa (Verhelst *et al.*, 2013).

Por otro lado, el efecto protector temprano de la proteína Mx ha sido establecido *in vivo* e *in vitro* en varias especies de peces en respuesta a patógenos virales (Trobridge *et*

*al.*, 2000, Liu *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2019, Noguera *et al.*, 2018) y bacterianos (Roy *et al.*, 2016). El salmón del Atlántico *Salmo salar* codifica múltiples proteínas Mx, que puede suprimir el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) (Collet *et al.*, 2015). Aproximadamente el 99% de las truchas inyectadas con una cepa altamente virulenta del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), pudieron expresar el gen Mx a las 48 h después de la infección (Trobridge *et al.*, 2000). Además, el gen Mx se indujo significativamente durante 120 h después de la infección por el virus de la necrosis del bazo y el riñón (ISKNV) en el pez mandarín *Siniperca chuatsi* (Li *et al.*, 2019). Adicionalmente, frente a patógenos bacterianos como *Streptococcus iniae* (El Aamri *et al.*, 2015), *Edwardsiella tarda* (Sun *et al.*, 2011) y *Vibrio anguillarum* (Salinas *et al.*, 2004, Acosta *et al.*, 2004), la expresión del gen Mx se reguló positivamente. En el pez ciprínido *Cirrhinus Mrigala*, luego de la infección con *Aeromonas hydrophila*, los niveles de expresión del gen Mx en riñón más altos fueron en el día 5 y posteriormente se redujo (Roy *et al.*, 2016). En lubina europea *Dicentrarchus labrax* ante la infección por *Streptococcus iniae*, la proteína Mx aumentó, alcanzando niveles detectables a las 48 h después de la infección (El Aamri *et al.*, 2015).

Por otro lado, se han estudiado factores inmunoestimulantes físicos y químicos sobre la expresión del gen Mx. En las tilapias juveniles sometidas al estrés por frío se observó la expresión positiva del gen Mx en esplenocitos y leucocitos del riñón (Velmurugan *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que el  $\beta$ -glucano puede modular los genes relacionados con el sistema inmune (Mx) en la tilapia del Nilo juveniles (Salah *et al.*, 2017). Adicionalmente, un ARN bicatenario (dsRNA) sintético poliinosinico: ácido policitidílico (Poly I: C) indujo la expresión del gen Mx *in vitro* e *in vivo* en trucha (Wang *et al.*, 2019), en *Labeo rohita* (Das *et al.*, 2019), en las células de embrión natural de lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* (células HINAE) (Lin *et al.*, 2005) y en las células renales y del bazo del pez roca *Oplegnathus fasciatus* (Hong *et al.*, 2016).

Además, mientras que en las bacterias Gram positivas, el peptidoglicano, la hidrolasa de peptidoglicano, los ácidos teicoicos, la cápsula, el antígeno polisacárido enterocócico y las proteínas superficiales bacterianas, son los responsables de la expresión del genes relacionados al sistema inmunitario (Teng *et al.*, 2002, Geiss-Liebisch *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2016, Salamaga *et al.*, 2017, Wolf y Underhill, 2018, Smith *et al.*, 2019); en la bacterias Gram negativas se han reportado varios componentes bacterianos responsables de la inducción del gen Mx, entre ellos el lipopolisacárido (LPS), el ADN cromosomal y la proteína de membrana externa (Acosta *et al.*, 2004, Bravo *et al.*, 2011, Bravo *et al.*, 2013, Roy *et al.*, 2016), y en el caso de infección viral ha sido establecido que la transcripción del gen Mx está relacionada a las glicoproteínas virales (Acosta *et al.*, 2005).

Por otra parte, las bacterias inactivadas (bacterinas) también inducen la expresión del gen Mx en peces (Acosta *et al.*, 2004, Grasso *et al.*, 2015). Se demostró que una bacterina de *Vibrio anguillarum* disponible en el mercado, destinada a la vacunación por inmersión, es un potente inductor de la expresión del gen Mx en el salmón del Atlántico *Salmo salar L.*, y la respuesta fue dependiente de la dosis y temperatura (Acosta *et al.*, 2004). Además, la bacterina de *Vibrio anguillarum* administrada por inyección intraperitoneal en salmón del Atlántico *Salmo salar L.* resultó en una fuerte inducción de Mx en los días 2 y 3, desapareciendo en el día 6 (Salinas *et al.*, 2004). Por último, la vacuna inactivada con luz UV y administrada por inmersión contra el patógeno marino *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* estimuló la expresión del gen Mx en el pez dorado *Sparus aurata* (Grasso *et al.*, 2015).

En resumen, la proteína Mx es ampliamente estudiada y se ha demostrado su efecto protector temprano contra patógenos de peces, por ello, el presente trabajo se centró en investigar la expresión Mx en el tejido de riñón anterior, después de la inducción con bacterina de *E. faecalis* en tres dosis.

#### **2.3.4. Proteínas plasmáticas de respuesta de fase aguda**

Las respuestas inflamatorias sistémicas de mamíferos y peces óseos se deben principalmente a la regulación ascendente y descendente coordinadas de las proteínas plasmáticas de fase aguda (Marancik *et al.*, 2013). Después de una lesión tisular, las células inflamatorias (neutrófilos, y macrófagos) secretan citocinas en el torrente sanguíneo, lo que estimula a los hepatocitos a producir proteínas, que están directamente involucradas en los mecanismos de defensa del cuerpo. Éstas se conocen como proteínas de fase aguda (APP) y sus niveles plasmáticos pueden modularse rápidamente al inicio de la inflamación (Charlie-Silva *et al.*, 2019).

##### **2.3.4.1. Hemopexina**

La hemopexina en los teleósteos generalmente se conoce como proteína de 65 kDa asociada a la aclimatación a temperatura cálida (Wap65) o proteína similar a la hemopexina de mamíferos, tiene dos isoformas (Wap65-1 y Wap65-2) y ha sido estudiada a nivel genético por varios grupos (Chang *et al.*, 2017). La hemopexina es una glicoproteína sérica producida principalmente en el hígado con alta afinidad por el hemo. Su función principal es participar en el metabolismo del hierro que elimina el hemo que se libera en el plasma y lo transporta al hígado. De igual modo, se ha reportado que la hemopexina participa en la inflamación como una proteína de fase aguda y su producción está regulada por las citocinas proinflamatorias (Wicher y Fries, 2010, Díaz-Rosales *et al.*, 2014, Chang *et al.*, 2017, Kwon y Ghil, 2017, Criscitiello *et al.*, 2019).

Cuando se libera el hemo de eritrocitos dañados, no sólo proporciona una fuente de hierro para las bacterias invasoras, sino que también es altamente tóxico debido a su capacidad para catalizar la formación de radicales libres. La hemopexina (Hx) se une al hemo libre con una afinidad muy alta y, por lo tanto, protege las células contra la toxicidad del hemo, secuestra el hemo de los patógenos y ayuda a conservar el valioso hierro (Dooley *et al.*, 2010).

Se ha reportado la hemopexina como un nuevo biomarcador inmune, luego que se encontrara sobreexpresada en el hígado del pez rape *Chanos chanos* sometido a estrés hipotérmico e inyección con LPS (Chang *et al.*, 2017). La expresión del gen Wap65 es inducida por diversos inductores de estrés fisiológico, como el aumento de la temperatura del agua, la respuesta inmune y la exposición a metales pesados (Kwon y Ghil, 2017). En el pez gordo Kumgang *Rhynchocypris kumgangensis*, ambas isoformas (Wap65-1 y Wap65-2) han sido reportadas como proteínas multifuncionales que podrían servir como biomarcadores útiles para evaluar el estrés fisiológico y las respuestas asociadas (Kwon y Ghil, 2017). Es más, se ha descubierto que la hemopexina de peces se sobreexpresa significativamente durante la infección viral (Braceland *et al.*, 2013) y durante las infecciones bacterianas en el salmón del Atlántico *Salmo salar* (Tsoi *et al.*, 2004) y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Bayne *et al.*, 2001). Además, se ha reportado que la hemopexina ha sido regulada positivamente en rayas amarillas *Urolophus hannah* después de la inyección intraperitoneal con una bacterina de *Vibrio* comercial (Marancik *et al.*, 2013).

#### **2.3.4.2. Otras proteínas de respuesta de fase aguda**

La modulación de las proteínas de la fase aguda (APPs) responde a estímulos inflamatorios y cambian su concentración en el plasma. Las tilapias luego de la inoculación con *Aeromonas hydrophila*, presentaron aumento de APP plasmáticas positivas como ceruloplasmina, haptoglobina, alfa-2-macroglobulina y complemento C3, así como disminución de las APPs negativas como albúmina y transferrina (Charlie-Silva *et al.*, 2019). Del mismo modo, la raya amarilla *Urolophus hannah* después de la inyección intraperitoneal con una bacterina de *Vibrio* comercial, presentó APP plasmáticas reguladas positivamente, que fueron, los factores de complemento, el factor X y la protrombina y las APPs reguladas a negativamente incluyendo transferrina, apolipoproteína B, cofactor 2 de heparina, alfa2-macroglobulina y varios factores de crecimiento (Marancik *et al.*, 2013). Además, el pez subantártico *Eleginops maclovinus*

desafiado con *Piscirickettsia salmonis* mostró niveles de expresión de ferritina-H, ceruloplasmina, hepcidina y haptoglobina específicos de tejido que variaron en relación con la cepa bacteriana inyectada y el momento del muestreo (Martínez *et al.*, 2017).

Por otro lado, han sido identificadas algunas APPs del plasma sanguíneo y seminal de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Nynca *et al.*, 2014, Morro *et al.*, 2020) y del tiburón nodriza *Ginglymostoma cirratum* (Criscitiello *et al.*, 2019), entre ellas transferrinas, apolipoproteínas, componente C3 del complemento, albúmina sérica y alfa-1-anti proteínas (Nynca *et al.*, 2014, Criscitiello *et al.*, 2019, Morro *et al.*, 2020).

Las transferrinas (TFs) se encuentran en los fibroblastos del páncreas y los músculos esqueléticos, por lo que es posible que las serotransferrinas encontradas sean una isoforma de las transferrinas intracelulares de unión a la membrana que se filtraron a la circulación debido al daño tisular (Braceland *et al.*, 2013). Además, las TFs son glicoproteínas que se unen al hierro, y participan en la defensa del huésped contra la infección patógena, privando de hierro a los patógenos invasores y activando las respuestas antimicrobianas en los macrófagos. Se ha reportado que la expresión de la transferrina de *Oreochromis niloticus* (OnTF) se incrementó significativamente en el hígado, el bazo y riñón tras la infección causada por un patógeno bacteriano Gram positivo (*Streptococcus agalactiae*) y un patógeno bacteriano Gram negativo (*Aeromonas hydrophila*), demostrando así que la transferrina de tilapia podría estar involucrada en la defensa del huésped contra la infección bacteriana (Yin *et al.*, 2018).

La apolipoproteína A-I es una de las proteínas circulantes más abundantes observadas en los teleósteos. Su función principal es la unión y transporte de lípidos. Sin embargo, se conocen otras funciones defensivas antivirales, antimicrobianas y antiinflamatorias (Villarroel *et al.*, 2007, Whyte *et al.*, 2007).

### **2.3.5. Inmunidad de tilapia contra *Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva, que contiene una pared celular de peptidoglicano. El componente de la pared celular bacteriana peptidoglicano es un excelente ejemplo de un patrón molecular conservado asociado a patógeno (PAMP) para el cual el sistema inmune innato ha desarrollado mecanismos de detección. Las modificaciones estructurales sutiles al peptidoglicano pueden influir en la capacidad del sistema inmune innato para detectar bacterias y pueden permitir que las bacterias evadan o alteren las defensas del huésped (Wolf y Underhill, 2018). Se han reportado que los mutantes de *E. faecalis* con largas cadenas de peptidoglicano son más susceptibles a la fagocitosis y no pueden causar letalidad en el modelo de infección del pez cebra (Salamaga *et al.*, 2017).

Por otro lado, una propiedad de *E. faecalis* que contribuye a la aparición de infecciones es su resistencia al sistema inmunitario innato del hospedero. Los polímeros de la superficie celular, incluidos los ácidos teicoicos (AT), la cápsula y el antígeno de polisacárido enterocócico (EPA) confieren evasión de la fagocitosis y resistencia a la activación del complemento (Teng *et al.*, 2002, Geiss-Liebisch *et al.*, 2012). El EPA es un polisacárido que contiene ramnosa que se encuentra en la superficie celular de todos los *Enterococcus*. *E. faecalis* también muestra una resistencia intrínsecamente alta a la lisozima, un componente clave del sistema inmune innato que representa una primera línea de defensa contra los patógenos. Se ha reportado que la patogenicidad de *E. faecalis* depende de la decoración del EPA, el cual le confiere resistencia frente a los antimicrobianos y a la fagocitosis (Smith, 2019).

Finalmente, se han reportado mecanismos de defensa de la tilapia contra *E. faecalis* (Argayosa *et al.*, 2009, Matsuura *et al.*, 2017). Y el uso de bacterinas de *E. faecalis* ha demostrado ser efectivo para desencadenar la respuesta inmunitaria innata y adaptativa

celular en peces y una protección temprana contra patógenos bacterianos y viral de peces (Abu-Elala *et al.*, 2019; Matsuura *et al.*, 2017).

## **2.4. Vacunas en peces**

### **2.4.1. Vacunación en peces**

Las vacunas para peces pueden reducir significativamente las pérdidas específicas relacionadas con enfermedades, lo que resulta en la disminución de los costos unitarios generales y una producción más predecible. Además, las vacunas para peces tienen ventajas sobre los antibióticos porque son materiales biológicos naturales que no dejan residuos en el producto o el medio ambiente y, por lo tanto, no inducen una cepa resistente del organismo a la enfermedad (Vinitnantharat *et al.*, 1999).

La vacunación se utiliza en la acuicultura comercial de especies como el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el besugo (*Sparus aurata*), la barramundi (*Lates calcarifer*), la tilapia (*Tilapia spp*), el rodaballo (*Scophthalmus maximus L.*), el jurel (*Seriola quinqueradiata*), el medregal violáceo y dorado (*Seriola dumereli*), el jurel rayado (*Pseudocaranx dentex*) y el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (Hastefnl *et al.*, 2005, Adams, 2019, Munang'andu *et al.*, 2019 ). Sin embargo, mientras que en la maricultura del salmón del atlántico, la vacunación ha sido muy exitosa para controlar enfermedades bacterianas; la vacunación de especies de aguas cálidas, particularmente de tilapias es aún poco desarrollada y la mayoría de vacunas producidas son experimentales (Adams, 2019).

Actualmente, se dispone principalmente de vacunas comerciales de bacterinas inactivadas con formalina contra una amplia variedad de patógenos bacterianos Gram negativos como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Yersinia ruckerii*, *Aeromonas hydrophila*, entre otros (Van, 2018), y contra los Gram positivos como



*Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* (Van, 2018; Adams, 2019). Además, se utilizan vacunas experimentales contra diferentes enfermedades en peces (Hastefnl *et al.*, 2005). Finalmente, se disponen de vacunas vivas atenuadas contra *Edwardsiella ictaluri* y *Flavobacterium columnare* para la inmunización de *Ictalurus punctatus* “pez gato” de cultivo (Gudding *et al.*, 2013).

#### **2.4.2. Métodos de vacunación**

Las vacunas para peces se pueden administrar de la misma manera que se inmunizan a los animales de sangre caliente. Los peces se pueden inmunizar por inmersión, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal y por vía oral mezclando vacunas con el alimento. Los peces también responden a la vacuna de la misma manera que lo hacen otros animales, pero dado que los peces son animales de sangre fría, la respuesta a la vacuna depende en gran medida de la temperatura del agua (Vinitnantharat *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2012).

En la vacunación por inmersión los peces son sumergidos en una solución vacunal concentrada durante un período corto de tiempo, de 30 segundos a 2 minutos, el antígeno se absorbe a través de la piel y/o las branquias. Sin embargo, en este método se necesita proteger los antígenos, ya que se pueden degradar en el agua y en algunos casos induce bajos niveles de protección (Vinitnantharat *et al.*, 1999).

La vacunación oral es el método ideal de inmunización en la acuicultura por la factibilidad para la vacunación masiva de diferentes especies de peces de cultivo. Asimismo, estimula la inmunidad en las mucosas (Embregts y Forlenza, 2016). Sin embargo, este método dificulta determinar la dosis consumida por cada pez y tiene baja eficacia inmunológica, debido en parte a la degradación del antígeno en el duro entorno gástrico, al entorno intestinal altamente tolerogénico y al diseño inadecuado de la vacuna (Embregts y Forlenza, 2016).

La vacunación intraperitoneal induce alta protección y asegura una dosis idéntica en todos los individuos, además permite la adición de adyuvantes que estimulan la protección por más tiempo. La principal limitación de este enfoque, es que carece de la capacidad para dilucidar el mecanismo de protección de la vacuna en los portales de entrada de bacterias en los órganos mucosos y la prevención de patología en los órganos diana, además el estrés excesivo que induce en los peces y la poca viabilidad en peces pequeños. (Munang'andu *et al.*, 2016).

La vacunación intramuscular se lleva a cabo en vacunas experimentales con bacterinas y vacunas de DNA (Penagos *et al.*, 2008). Los peces con vacunación intramuscular mostraron inflamación inducida por la vacuna con formación de granulomas y un número creciente de células parecidas a granulocitos eosinofílicos y producción de IgM en el sitio de inyección de la vacuna (Erkinharju *et al.*, 2019). Además, la inyección intramuscular de vacunas podría ser factible para proporcionar protección inmunológica en peces, pero se requiere más trabajo para identificar los adyuvantes óptimos (Erkinharju *et al.*, 2017).

#### **2.4.3. Métodos de inactivación de bacterias**

Los métodos para la inactivación de bacterias son diversos, entre ellos se encuentran la inactivación por calor y formalina. Hallazgos sugieren que *E. faecalis* inactivada por calor induce la inmunidad celular en peces (Matsuura *et al.*, 2017). Asimismo, el método de inactivación con formalina ha demostrado ser efectivo. En un estudio se demostró que *Nocardia seriolae* inactivada con formalina aumentó el número de células T CD4+ y células T CD8+ en el riñón en *Carassius langsdorfii* y aumentó la protección contra aquella bacteria patógena (Nayak *et al.*, 2014). La metodología aplicada en este estudio fue la inactivación de bacterias por formalina.

## 2.5. Herramientas proteómicas para detectar proteínas diferencialmente reguladas

Se ha utilizado la electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) y bidimensional (2D-PAGE) para el estudio del perfil proteómico plasmático en varias especies de peces. Se ha reportado el uso electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) acoplada a MALDI-TOF-TOF o ESI-LC-MS para la identificación y evaluación del perfil proteómico en las tilapias inoculadas con *Aeromonas hydrophila* (Charlie-Silva *et al.*, 2019), en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Nynca *et al.*, 2014, Morro *et al.*, 2020) y en el tiburón nodriza *Ginglymostoma cirratum* (Criscitiello *et al.*, 2019).

Asimismo, se ha descrito el uso de electroforesis bidimensional (2D-PAGE) asociada a marcadores fluorescentes o etiquetas isobáricas (iTRAQ) acoplada a espectrometría de masas para el estudio proteómico plasmático cuantitativo en la raya amarilla *Urobatis jamaicensis* después de la inyección intraperitoneal con una bacterina de *Vibrio* comercial (Marancik *et al.*, 2013), en la carpa *Cyprinus carpio* L. expuesta a cambios de temperatura (Dietrich *et al.*, 2018) y en la carpa *Labeo rohita* expuesta a arsénico (Banerjee *et al.*, 2017).

A pesar de dichos reportes, el empleo de esta metodología en la investigación en acuicultura aún sigue siendo limitada (Rodrigues *et al.*, 2012). En el presente trabajo se utilizó la espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF para identificar proteínas biomarcadoras inmunitarias específicas de los peces inyectados con *E. faecalis*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la bacterina de *Enterococcus faecalis* sobre la expresión de proteínas relacionadas a la respuesta inmune de tilapias juveniles para la protección frente a las enfermedades bacterianas.

#### 3.2. Objetivos específicos

Detectar los anticuerpos IgM anti *Enterococcus faecalis* en tilapias mediante ensayos de aglutinación en placa.

Evaluar la inducción del gen Mx en tilapias inmunizadas con la bacterina de *Enterococcus faecalis* utilizando RT-qPCR.

Identificar proteínas inmunitarias como biomarcadoras en las tilapias inmunizadas con la bacterina de *Enterococcus faecalis* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

Se emplearon ejemplares juveniles de tilapia del Nilo procedentes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Los ejemplares fueron machos fenotípicos, revertidos sexualmente mediante el suministro diario de la hormona masculina 17  $\alpha$  Metiltestosterona en el alimento por un mes, según lo indicado por el proveedor. Se utilizaron 46 peces de aproximadamente 20 g y 10 cm, divididos en dos grupos de 23 individuos cada grupo. Se mantuvieron en tinas de 60 L con agua de clorada, aireación constante por piedra difusora y un sifoneo diario de 25 % del volumen de agua (Figura S1). La temperatura fue mantenida a 27 °C y ciclos naturales de luz y oscuridad de 14 h de luz y 10 h de oscuridad (Fujimura y Okada, 2007). Los parámetros físico-químicos del agua fueron medidos mediante kits colorimétricos (nutrafin test) (Figura S2). Las cantidades de amoníaco total se mantuvieron entre 0 - 0.3 mg/L, los nitratos entre 0 – 10 mg/L, los nitritos entre 0 – 0.3 mg/L y el pH entre 7 - 7.5, de acuerdo a recomendado para el cultivo de tilapia (Begum *et al.*, 2014, Makori *et al.*, 2017). Los peces fueron alimentados con alimento balanceado comercial “Tilapia 40” marca Aquatech (<http://aquatech.pe/>), que contiene 40% de proteína, 5% de grasa y 4% de fibra, cuyo tamaño de pellet es 2 x 2 mm. La tasa de alimentación utilizada fue 4% de la biomasa. Para la manipulación de los peces fuera del agua se utilizó como anestésico el isoeugenol a 13 mg/L (acuestrol®), añadiéndose en el agua con abundante aireación.

### 4.2. Preparación de la bacteria

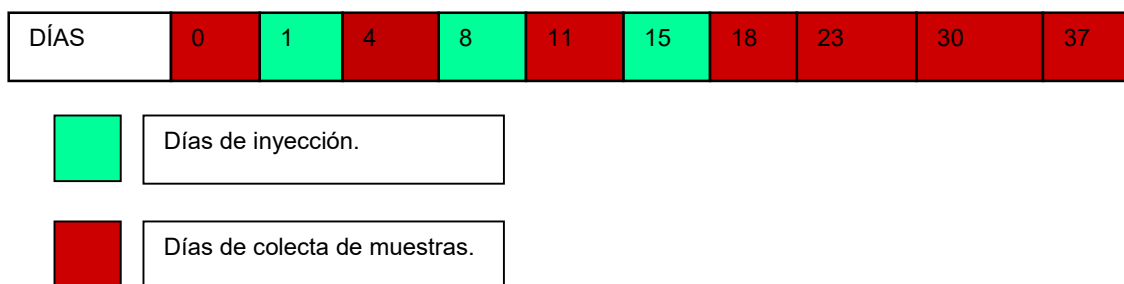
La bacteria *Enterococcus faecalis* del cepario de IncaBiotec SAC (Tumbes, Perú) aislada previamente de *Litopenaeus vannamei* (Saavedra, 2016) fue identificada mediante la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S. El ADN bacteriano fue extraído utilizando el método del shock térmico (Dashti *et al.*, 2009), luego se amplificó con cebadores bacterianos universales 16SrRNA-F518 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-

3' y 16SrRNA-R800 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'. Después de la amplificación, se sometieron a electroforesis 8 µL del producto de PCR, mostrando un tamaño de 1500 pb. Los amplicones se enviaron a secuenciar a Macrogen, USA. La secuencia resultante fue comparada con la base de datos no redundante del NCBI (Figura S3).

Se colocaron 100 µL de cultivo de *Enterococcus faecalis* en 900 µL de caldo Luria Bertani (LB) por 22 h. Luego el cultivo se transfirió a 7 mL de caldo LB por 8 h. Posteriormente, se realizó el conteo de colonias en placa (agar LB). Se inactivó con 3 mL de formalina al 10% (concentración final 3%) "overnight" a temperatura ambiente (Abu-Elala *et al.*, 2019). Finalmente, se lavó tres veces con 3 mL de solución salina fisiológica (SSF) (Tabla S1). Se centrifugó en cada lavado a 2 000 RPM. El precipitado fue resuspendido en 4 mL de SSF.

#### **4.3. Definición de grupos y colecta de muestras**

Los juveniles de tilapia (n = 46) fueron asignados a 2 grupos de 23 individuos por grupo (inmunizado y control). El grupo inmunizado, fue inyectado vía intramuscular con 10<sup>8</sup> UFC de bacterina de *E. faecalis* en un volumen de 100 µL en 3 dosis en los días 1, 8 y 15 días, mientras que el grupo control fue inyectado con 100 µL de SSF. Posteriormente, se realizó la colecta de suero y riñón de los peces (n=2) en los días 0, 1, 8, 15, 18, 23, 30 y 37 (Figura 1). El suero se obtuvo mediante la colecta de 200 µL de sangre del corazón por punción cardiaca en microtubos de 1.5 mL. Los microtubos se centrifugaron a 1000 RCF por 10 minutos para la separación del suero del resto de contenido sanguíneo y fue almacenado a -20 °C hasta su uso. El tejido de riñón de las tilapias se obtuvo por la disección del pez previamente sacrificado con una sobredosis de anestesia. Los tejidos fueron conservados en preservante de ácidos nucleicos (Tabla S1).



**Figura 1.** Esquema de inmunización de las tilapias. Los días 1, 8 y 15 fueron los días de inyección de la bacterina de *Enterococcus faecalis* en tilapias, mientras que los días 0, 4, 11, 18, 23, 30 y 37 fueron los días de colecta suero y tejidos.

#### 4.4. Detección de anticuerpos anti *Enterococcus faecalis*

La presencia de anticuerpos específicos anti *E. faecalis* fue evaluada por la técnica de microaglutinación (reacción de aglutinación entre el antígeno particulado (suspensión de *Enterococcus faecalis*) y las IgM tetraméricas presentes en el suero hiperinmune).

La titulación de anticuerpos se determinó según el método de Li *et al.*, 2016. Brevemente, 50 µL de muestras de suero se diluyeron en serie en buffer fosfato salino (PBS) (Tabla S1) y se colocaron en una placa de microlitros de 96 pocillos (fondo redondeado). Luego, 50 µL de la suspensión bacteriana (DO 600 nm aproximadamente 1,0) fue mezclada con la dilución del suero y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 4 horas. El suero inicialmente fue diluido 1:10 y a partir de este se realizaron diluciones seriadas hasta 1:1280. El control negativo corresponde a 50 µL de PBS + 50 µL de la suspensión bacteriana. El control positivo corresponde a 50 µL de suero positivo conocido diluido 1:10 más 50 µL de la suspensión bacteriana. La reacción de aglutinación se observó visualmente, donde la última dilución de suero que mostraba grumos visibles (aglutinación) como niebla se consideró como el título de aglutinación expresado como  $\log_2(x + 1)$  de la inversa de la dilución de suero más alta que mostraba aglutinación visible en comparación con el control positivo.

#### **4.5. Evaluación de la expresión del gen Mx por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR)**

El ARN total fue extraído a partir del tejido de riñón anterior de 2 peces por grupo usando trizol (Trizol reagent, Thermo Scientific), y luego un tratamiento con ADNasa I (Thermo Scientific) para eliminar la contaminación con ADN genómico. A partir del ARN se realizó la transcripción inversa utilizando Oligo-dT18 como cebador mediante el kit de síntesis de la primera hebra de ADNc, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Thermo Scientific). La hebra de ADNc se utilizó para el análisis de la expresión del gen Mx mediante PCR en tiempo real.

Los cebadores para los genes de la proteína Mx de unión al GTP inducible por interferón tipo I o GTPasa inducible por interferón tipo I (Mx) y el factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ) fueron diseñados utilizando la herramienta *Primer Blast* del NCBI, con la secuencia consenso obtenida del alineamiento de secuencias codificantes del gen Mx o gen EF1 $\alpha$  de teleósteos en el programa MEGA 7 (Tabla 1).

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25  $\mu$ L utilizando el kit de PCR cuantitativa Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), acorde a las instrucciones del fabricante con las siguientes especificaciones: 0.2  $\mu$ M de cada cebador Mx-fw1 y Mx-rev1 o EF1aFish FW y EF1aFishREV (Tabla 1) y 1  $\mu$ L de ADNc. Los ciclos de amplificación de la PCR en tiempo real fueron, una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización inicial a 95 °C por 15 segundos (s), una etapa de elongación a 54 °C ó 60 °C por 30 s para los genes Mx y EF1 $\alpha$ , respectivamente y una etapa de extensión a 72 °C por 30 s. Un análisis de la curva de melting fue realizado al final de cada perfil térmico de qPCR para verificar la especificidad de los productos. La medición de la fluorescencia y la determinación de los valores del ciclo de umbral (Ct) fueron realizados en el termociclador StepOne™ de Applied Biosystems (Life



technologies). La eficiencia (E) de cada reacción de qPCR para los genes Mx y EF1 $\alpha$  fue determinada por la pendiente generada por series de ADNc diluidas 10 veces con cinco puntos de dilución medidos por triplicado. Se utilizó la siguiente ecuación:  $E = 10^{-1/m}$ , donde m es la pendiente. La muestra utilizada para la realización de la curva estándar fue T11V1R (ADNc de riñón de la tilapia inmunizada con *E. faecalis* colectada en el día 11). Las diluciones fueron 1,1/5,1/25,1/125,1/625, 1/3125. La cuantificación relativa (RQ) fue calculada de acuerdo a Pfaffl (2001) con el software StepOne™ v2.2.2 (Life Technologies).

**Tabla 1. Lista de cebadores utilizados para evaluar la expresión del gen Mx**

GEN	Cebador	Secuencia	Long.	Tm (°C)	Amp. (pb)
<b>MX</b>	Mx-fw1	5' CAA GAA ACC ATC AGC TTG GT 3'	20	60.8	211
	Mx-rev1	5' TGA CGA TCA TGT AGC CCT T 3'	19	60.7	
<b>EF1<math>\alpha</math>.</b>	EF1aFish FW	5'AGA CTT CAT CAA GAA CAT GAT CAC TG 3'	26	63.6	190
	EF1aFish REV	5'CTC GGT GGA GTC CAT CTT GTT 3'	21	63.8	

Long. (Longitud). Tm (temperatura de melting). Amp. (Tamaño de amplicón).

#### **4.6. Identificación de componentes humorales en el suero de tilapias por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF**

##### **4.6.1. Extracción de proteínas**

Las proteínas se precipitaron en una proporción suero: acetona de 2:5, y se sedimentaron por centrifugación a 13 000 RPM por 15 minutos a 4 °C. El sedimento fue

lavado con acetona y resuspendido en un buffer con alto contenido de úrea (Tabla S1) más 1  $\mu\text{L}$  de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM, ayudado por sonicación por 6 minutos a 56 °C.

#### **4.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE)**

El contenido de proteínas se evaluó mediante el fraccionamiento electroforético en un sistema vertical mediante el método SDS-PAGE al 12% (Tabla S2), con el gel preparado según lo descrito por Laemmli (1970).

Se añadió por pocillo, 20  $\mu\text{L}$  de la solución de proteínas en buffer de carga (Tabla S1) en una proporción 1.5:1, que fueron tratadas previamente a 95°C por 5 minutos. El tiempo de corrida electroforética fue de 3 horas con un voltaje de 90 V.

La visualización del gel se realizó mediante la tinción con azul brillante de Coomassie, para lo cual, se colocó el gel en agua destilada por 10 minutos, luego se sumergió en solución de fijación (50% de metanol, 10% ácido acético) por 20 minutos y pasado este tiempo, se transfirió a la solución de tinción (50% de metanol, 10% de Ácido acético, 0.1% de azul de Coomassie) por 4 horas. Finalmente, para la visualización se decoloró con solución de lavado (45% de metanol y 10% de ácido acético) por 30 minutos y luego se transfirió a un recipiente con agua destilada.

#### **4.6.3. Digestión enzimática de proteínas en gel**

Las bandas de proteínas se escindieron del gel de SDS-PAGE y se realizó la digestión enzimática con tripsina de acuerdo a Shevchenko *et al.*, 2006. Para tal fin, las bandas se decoloraron adicionando 100  $\mu\text{L}$  de buffer de bicarbonato de amonio 100 mM y acetonitrilo 100% en una proporción 1:1 y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos con agitaciones ocasionales. Las bandas fueron centrifugadas brevemente a

200 RCF por 10 segundos y el buffer fue removido y reemplazado por 50  $\mu$ L de acetronitrilo 100%, y se incubaron, a temperatura ambiente por 10 minutos, con agitaciones ocasionales.

La digestión enzimática se llevó a cabo con la adición de 25  $\mu$ L de buffer Tripsina (Tabla S1) y un ciclo de incubación a 4 °C por 2 horas y a 37 °C por 6 horas. Finalizado el proceso de digestión enzimática, se realizó un spin y se colectó una alícuota de 3  $\mu$ L, que fue mezclada con 3  $\mu$ L de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -CHCA), y luego fue colocada en la placa MALDI-TOF-TOF por duplicado.

Adicionalmente, las muestras fueron sometidas a una extracción de péptidos luego de la digestión enzimática, mediante la adición de 50  $\mu$ L de buffer de extracción (Tabla S1) e incubación a 37 °C por 15 minutos. Se homogenizaron las muestras por 30 segundos y se sonicaron por 5 minutos. Se colectó una alícuota de 10  $\mu$ L por muestra y se dejó secar hasta que se eliminó todo el contenido. Finalmente, se agregó 3  $\mu$ L de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en H<sub>2</sub>O grado HPLC y se mezcló con 3  $\mu$ L de matriz  $\alpha$ -CHCA. Se adicionó 1  $\mu$ L por duplicado en la placa MALDI-TOF-TOF.

#### **4.6.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF**

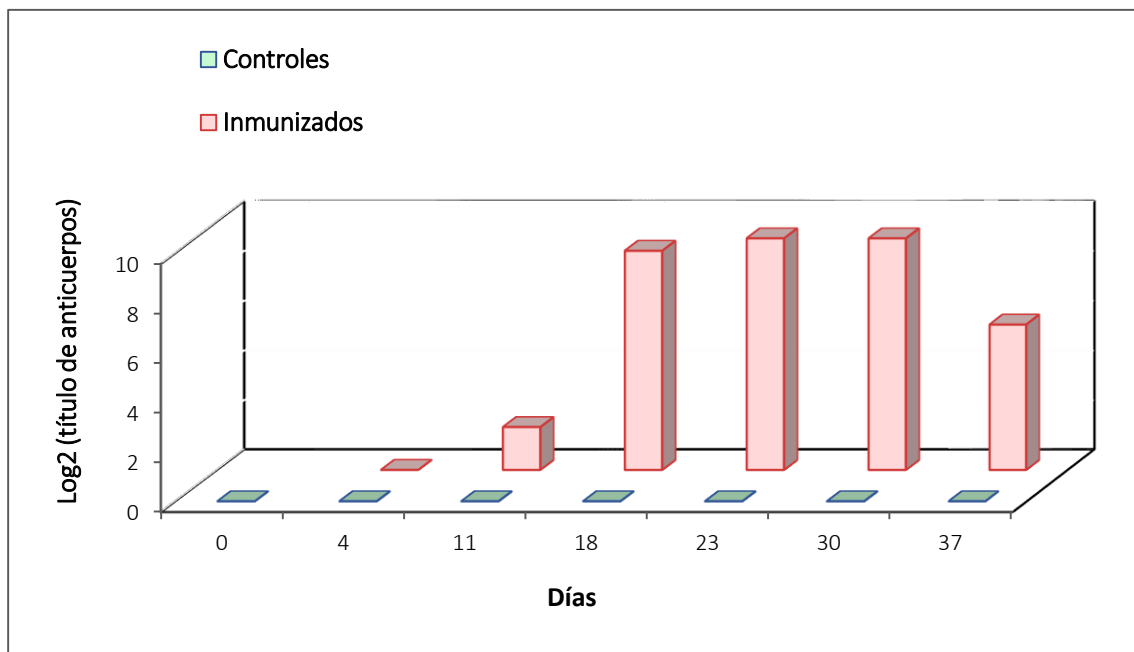
El análisis de proteínas se obtuvo a partir de un sistema analizador proteómico MALDI-TOF-TOF (5800, AB SCIEX System) acorde a Bringans *et al.*, 2008. Los espectros fueron captados en modo MS reflector positivo con un láser Nd: YAG de 349 nm con una intensidad de 2800 J/cm<sup>2</sup> y una velocidad de 600  $\mu$ m/segundo, 750 disparos dentro de un rango de masas entre 800-4000 m/z, y procesados en el programa Protein Pilot™ 4.5 con el algoritmo Paragon™ con una confianza de 80%, utilizando la base de datos de proteínas de peces UNIPROT.

Para la calibración del equipo se utilizó un kit de masas estándares (Mass Standards AB SCIEX TOF/TOF™ Instruments). Las secuencias no detectadas por el programa Protein Pilot™, fueron analizadas mediante Protein BLAST.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Respuesta inmune humoral adaptativa de las tilapias contra *Enterococcus faecalis*

Luego de las tres dosis de inmunizaciones (días 1, 8 y 15), mediante los ensayos de aglutinación en placa se detectaron títulos de anticuerpos de  $1.73 \pm 2.45$ ,  $8.82 \pm 0.71$ ,  $9.32 \pm 0.00$ ,  $9.32 \pm 0.00$  y  $5.86 \pm 2.08$  en los días 11, 18, 23, 30 y 37, respectivamente. Los títulos de anticuerpos máximos fueron alcanzados en los días 23 y 30 (8 y 15 días después de la tercera dosis, respectivamente), donde se reportaron títulos de 9.32 en el grupo de peces inmunizados, mientras que en grupo control no se detectó reacción de aglutinación. En el día 37 (22 días después de la tercera dosis), los títulos de anticuerpos disminuyeron en el grupo inmunizado en  $5.86 \pm 2.08$ . (Figura 2).



**Figura 2.** Titulación de anticuerpos aglutinantes del suero de las tilapias inmunizadas con la bacterina de *E. faecalis*.

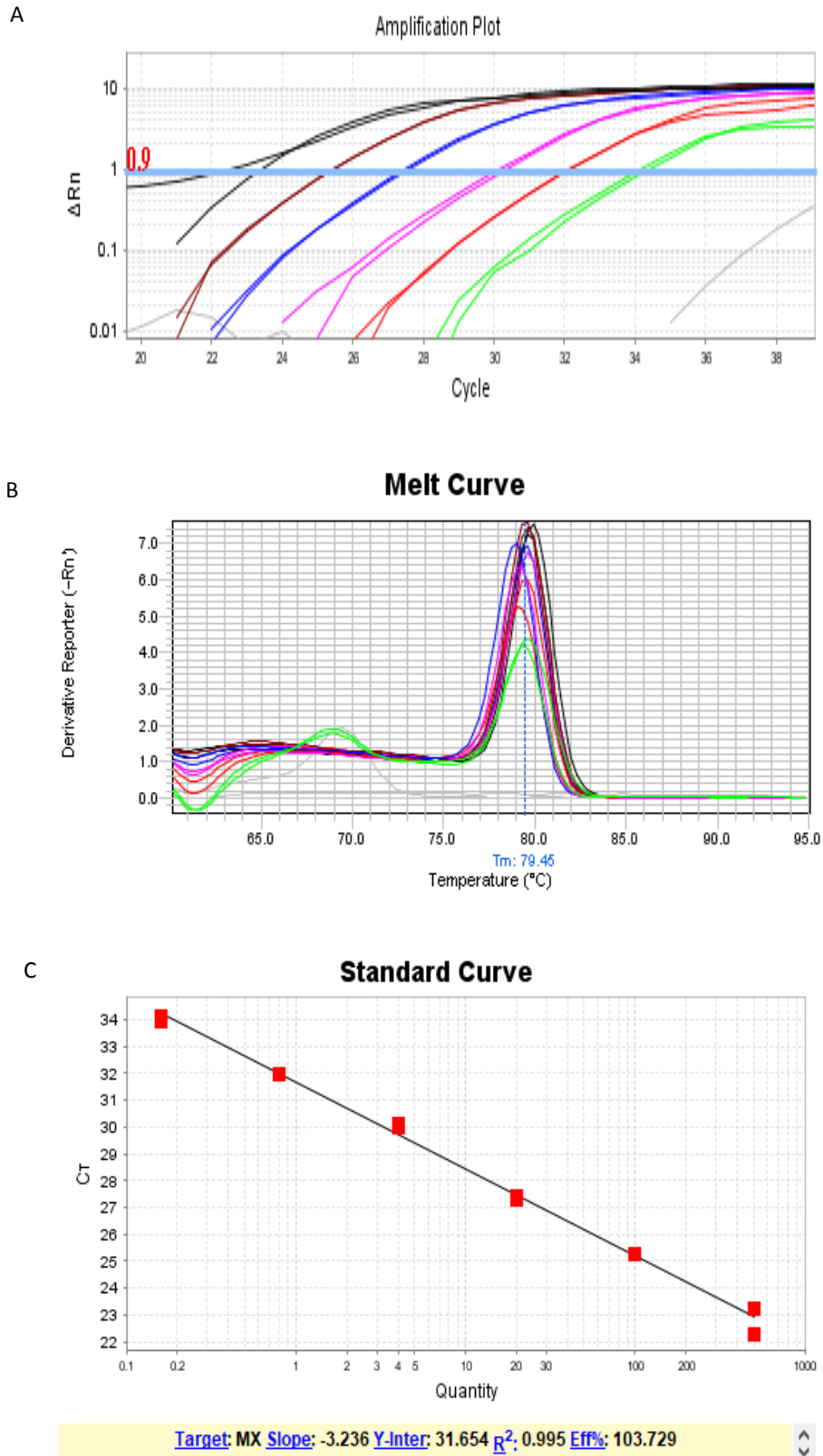
## **5.2. Evaluación de la expresión del gen Mx**

### **5.2.1. Eficiencia de la PCR en tiempo real (qPCR) del gen de la proteína Mx de unión al GTP inducible por interferón tipo I (Mx)**

Para la curva estándar de la reacción de qPCR del gen Mx, las diluciones fueron 1, 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125. Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado para cada punto de la curva; sin embargo, se eliminaron los puntos atípicos, quedando cada punto por duplicado. La eficiencia resultó 103.7%, que está en el rango óptimo de eficiencia (90-110%) para el análisis de la qPCR (Livak y Schmittgen, 2001). El coeficiente de determinación  $R^2$  resultó 0.995, lo que indica que hay una relación de linealidad entre las diluciones. La temperatura de melting ( $T_m$ ) promedio resultó 79.46°C (Figura 3).

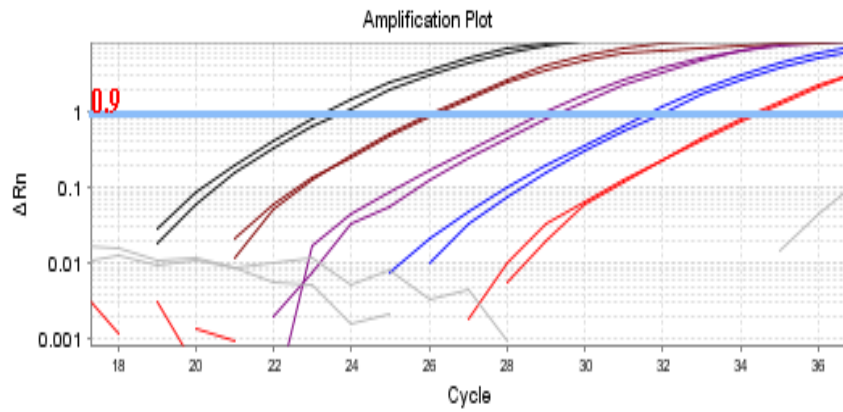
### **5.2.2. Eficiencia de la PCR en tiempo real (qPCR) del gen del factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ).**

Para la curva estándar de la reacción de qPCR del gen EF1 $\alpha$ . Las diluciones fueron 1, 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, y 1/3125. Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado para cada punto de la curva; sin embargo, se eliminaron los puntos atípicos, quedando cada punto por duplicado. Luego se eliminó todos los datos de la dilución 1/3125 porque a esa concentración se observó dimerización de la muestra. La eficiencia calculada fue 79.61 %, que es un valor bajo para el análisis de la qPCR por el método estándar de Livak y Schmittgen, 2001; por lo cual se optó por aplicar el método de Paff (2001) para el análisis de datos de la qPCR de la expresión del gen Mx del tejido de riñón de tilapia. La temperatura de melting ( $T_m$ ) promedio resultó 83.97°C (Figura 4).

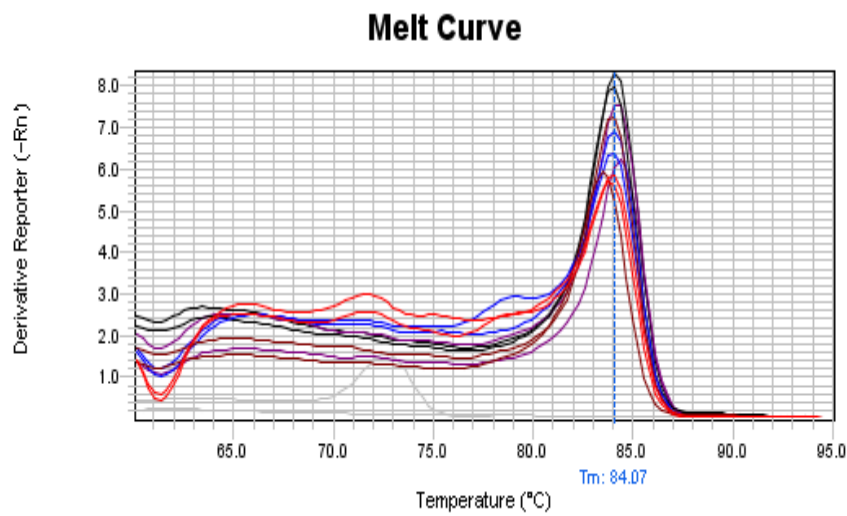


**Figura 3.** Curva estándar del gen Mx. A: Escala logarítmica. B: Curva de melting. C: curva estándar. Diluciones 1 (color negro), 1/5(color marrón), 1/25 (color azul) 1/125 (color lila), 1/625 (color rojo) y 1/3125 (color verde).

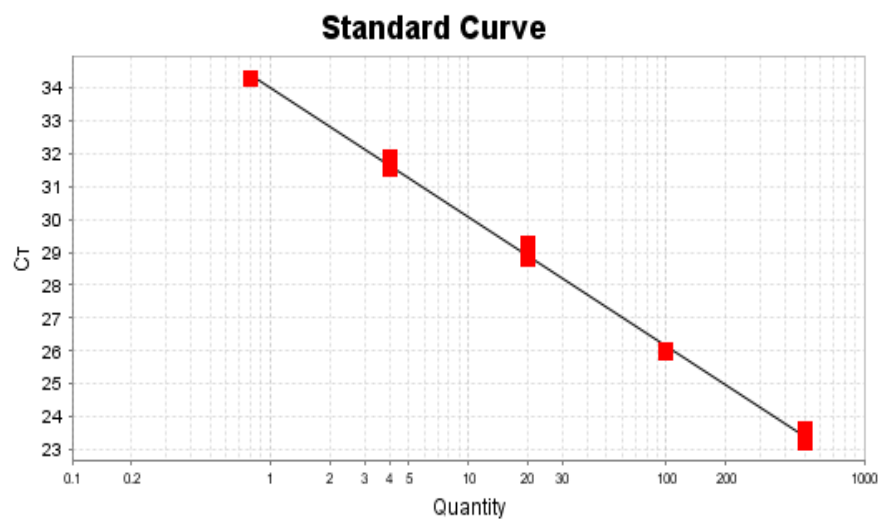
A



B



C

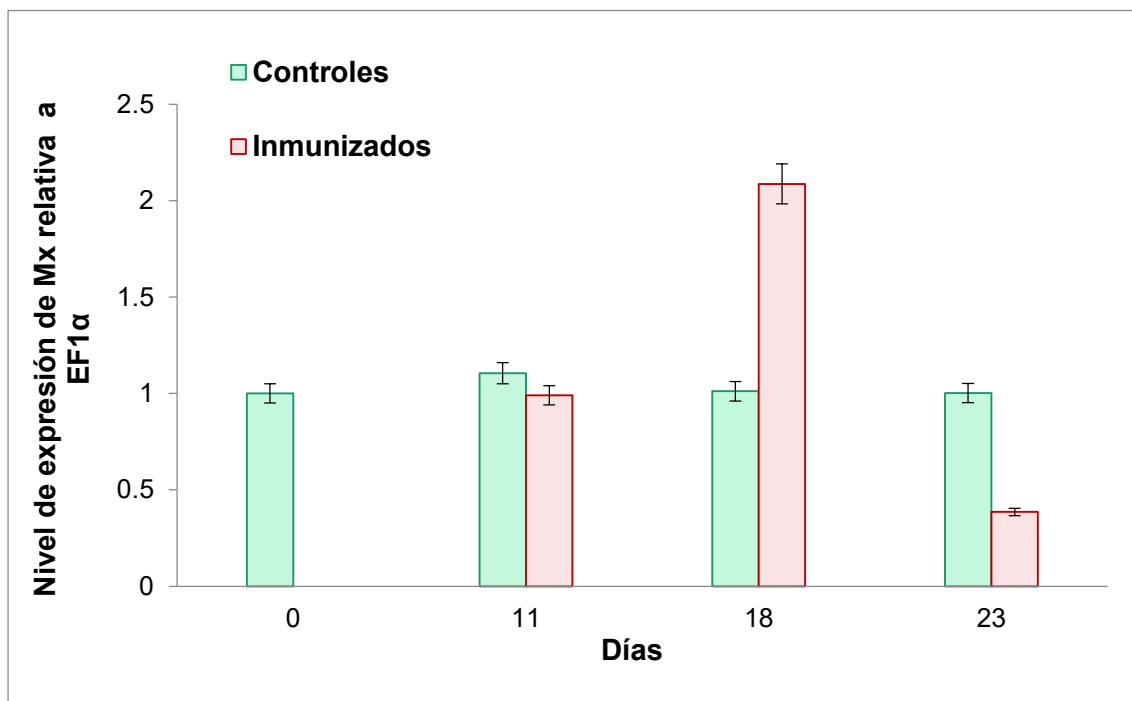


Target: EFA Slope: -3.932 Y-Inter: 34.002  $R^2$ : 0.998 Eff%: 79.62

**Figura 4.** Curva estándar del gen EF1 $\alpha$ . A: escala logarítmica. B: Curva de melting del gen EF1 $\alpha$ . C: Curva estándar. Diluciones 1 (color negro), 1/5 (color marrón), 1/25 (color lila), 1/125 (color azul), 1/625 (color rojo).

### 5.2.3. Evaluación del gen Mx en el tejido de riñón de tilapia

Luego de las tres inmunizaciones de las tilapias con la bacterina de *E. faecalis* (días 1, 8 y 15), el análisis mediante qPCR del gen Mx en riñón en los días 0, 11, 18, 23 y 30, resultó en una expresión del gen Mx constitutiva (basal) en el día 0, mientras que en día 11 no se encontró diferencia entre el grupo inmunizado y el control. Sin embargo, en el día 18 se observó un aumento de expresión del gen Mx del grupo inmunizado en comparación al control, y en día 23, se observó que los niveles de expresión de Mx fueron menores en el grupo inmunizado en comparación al grupo control (Figura 5).



**Figura 5.** Expresión del gen Mx en riñón de tilapias inmunizadas con la bacterina de *E. faecalis*. En el día 18 se observó que en el grupo inmunizado, los niveles de expresión del gen Mx fueron 2 veces mayor que en el grupo control.

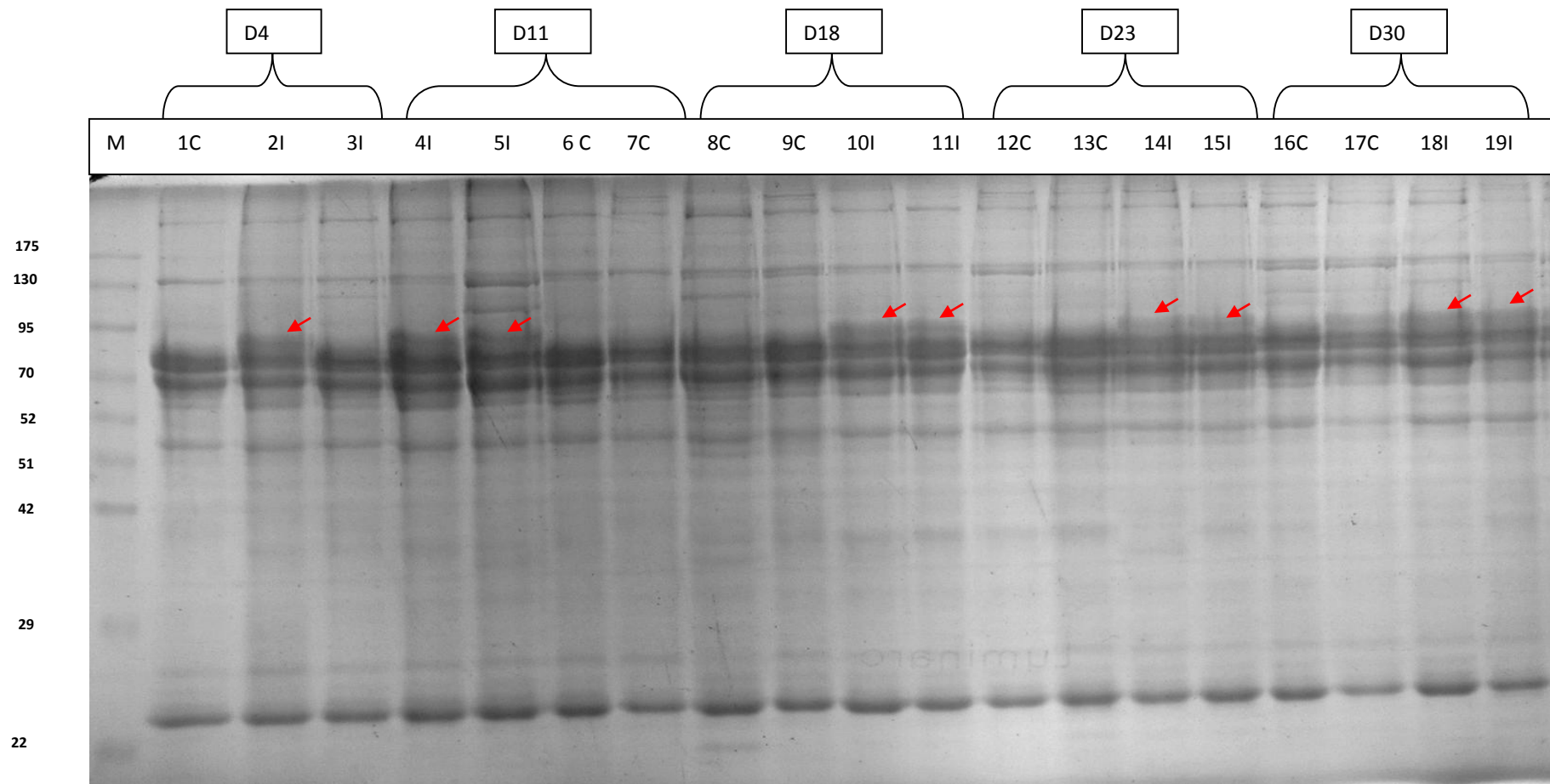


### **5.3. Cambios en el perfil de las proteínas séricas de tilapias inmunizadas con la bacterina de *Enterococcus faecalis***

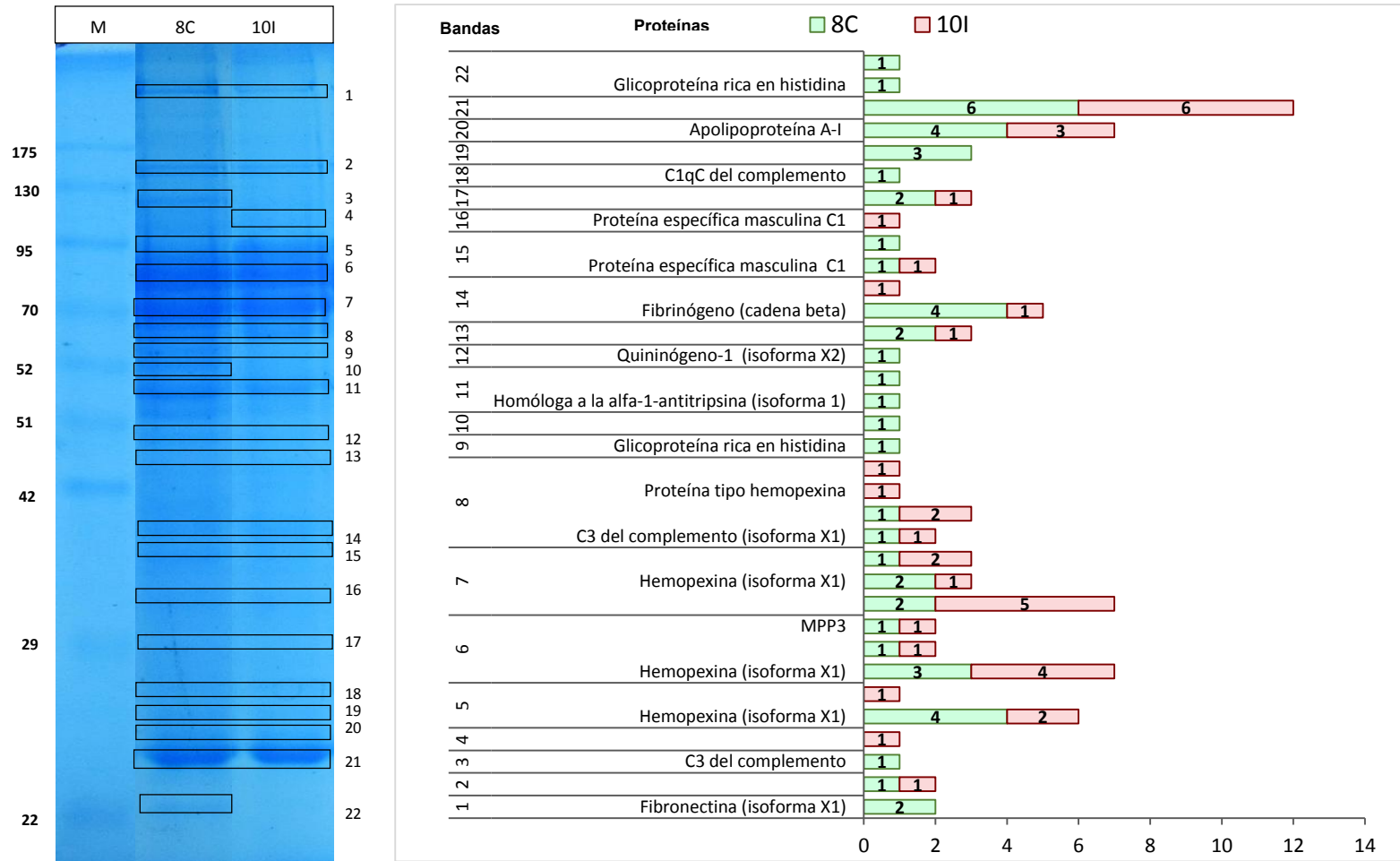
Luego de las tres inmunizaciones (días 1, 8 y 15), a través de la técnica electroforesis en gel de SDS-PAGE, se encontró una banda alrededor de 95 kDa específicamente en los peces inoculados con la bacterina de *E. faecalis* en los días 4, 11, 18, 23 y 30. La banda fue identificada como hemopexina mediante espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF (Figura 6).

### **5.4. Componentes séricos de tilapia identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF**

Otros componentes séricos identificados por proteómica fueron la isoforma X1 de la fibronectina, la ceruloplasmina, el componente C3 del complemento, la alfa-2-macroglobulina, la isoforma X1 de la hemopexina, el precursor de la molécula de adhesión celular relacionada / regulada negativamente por oncogenes (CDON), la isoforma X1 de la proteína de membrana palmitoilada 3 (miembro 3 de la subfamilia p55 de MAGUK) (MPP3), la serotransferrina, la isoforma X3 de la biotinidasa, 2 isoformas de la glicoproteína rica en histidina, la proteína 1 de unión a NEDD4, la isoforma 1 homóloga a la alfa-1-antitripsina (ATT), las cadenas alfa, beta y gamma del fibrinógeno, la isoforma X2 del quininógeno-1 (Kng1), factor de elongación Tu (EF-Tu) de *Serratia spp* y Gammaproteobacterias, las proteínas específicas masculina parálogas MSPB y MSPC, la lipocalina, la subunidad C del subcomponente C1q del complemento (C1qC) y la apolipoproteína A-I (Figura 7, Tabla S3).



**Figura 6.** SDS-PAGE de las proteínas séricas de 19 tilapias machos controles (C) e inmunizados (I) con la bacterina de *E. faecalis* colectadas en los días (D) 4, 11, 18, 2 y 30. M: Marcador de peso molecular. La banda diferencial es señalada por la fecha roja.



**Figura 7.** Identificación de proteínas séricas de la tilapia (individuos 8C y 10I) por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF en el día 18. Individuo 8C: Control. Individuo 10I: Inmunizado. Izquierda: SDS-PAGE de las proteínas séricas y selección de 22 bandas. Derecha: Proteínas séricas caracterizadas en base a los péptidos identificados a lo largo de las bandas. Los números en la barra indican la cantidad de péptidos distintos identificados.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Respuesta inmune adaptativa humoral de las tilapias contra *Enterococcus faecalis*

La vacunación se ha convertido en un tratamiento profiláctico de rutina para prevenir diversas enfermedades de los peces en la acuicultura intensiva (Adams, 2019). En el presente estudio se evaluó la eficacia de la bacterina de *E. faecalis* para inducir la respuesta inmunitaria adaptativa humoral en la tilapia. La bacterina, generada por la inactivación de *E. faecalis* con formalina, fue capaz de inducir la producción de anticuerpos aglutinantes en tilapias inmunizadas contra *E. faecalis* durante 22 días, mientras que en el grupo control no se reportó reacción de aglutinación. Las bacterinas de células enteras muertas por formalina son actualmente las vacunas más populares empleadas en peces de piscifactoría, y se ha demostrado que inducen una buena protección contra los patógenos bacterianos en peces (Li *et al.*, 2016, Ramírez-Paredes *et al.*, 2019b). Se alcanzaron niveles altos de anticuerpos, con picos máximos en los días 23 y 30 (8 y 15 días después de la tercera dosis, respectivamente), donde se reportaron títulos de 9.32. Respuestas inmunitarias similares se han determinado en el desarrollo de vacunas polivalentes contra infecciones estreptocócicas en tilapia, mediante el uso de cepas inactivadas con formalina, incluida *E. faecalis*, donde se calcularon títulos de anticuerpos aglutinantes de  $9.38 \pm 0.49$  tres semanas post vacunación (Abu-Elala *et al.*, 2019). Además, títulos de anticuerpos entre 9 y 11 han sido considerados relevantes (Abu-Elala *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, se debe realizar estudios adicionales como evaluar dosis de vacunación y adyuvantes, para lograr una respuesta adaptativa humoral prolongada y una mayor protección contra patógenos de peces (Abu-Elala *et al.*, 2019, Matsuura *et al.*, 2017), ya que la respuesta inmune inducida por la vacunación depende del estado fisiológico del pez, la especie

bacteriana a partir de la cual se preparan las vacunas, los métodos de preparación de la vacuna, la dosis vacunal y la vía de administración de la vacuna (Gudding *et al.*, 2013).

## **6.2. Evaluación de la expresión del gen Mx**

En este estudio, el pico máximo de expresión del gen Mx en el riñón de tilapias inyectadas con la bacterina de *E. faecalis* fue reportado en el día 18. El efecto protector temprano de la proteína Mx ha sido establecido *in vivo* en varias especies de peces en respuesta a patógenos virales (Trobridge *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2019) y bacterianos (Roy *et al.*, 2016). En el pez ciprínido *Cirrhinus mrigala*, luego de la infección con *Aeromonas hydrophila*, la expresión del gen Mx en el riñón alcanzó los niveles más altos en el día 5 y posteriormente se redujo (Roy *et al.*, 2016); y en lubina europea *Dicentrarchus labrax* ante la infección por *Streptococcus iniae*, se ha reportado que la proteína Mx aumentó con el tiempo, alcanzando niveles de expresión detectables a las 48 h después de la infección (El Aamri *et al.*, 2015).

Por otra parte, nuestros resultados demuestran el efecto protector inducido por la bacterina de *E. faecalis* en tilapia, mediante la expresión del gen Mx en el riñón en el día 18 (3 días después de la tercera dosis); sin embargo, la inducción de la expresión del gen Mx no fue observada en el día 11 (3 días después de la segunda dosis), por lo que reportamos que son necesarias tres dosis de  $10^8$  UFC de *E. faecalis* inactivada para la protección. Además, la bacterina fue administrada solamente con suero fisiológico (0.85% de NaCl), por lo que se propone el uso de adyuvantes para potenciar su efecto. Ya ha sido reportado que las bacterias inactivadas (bacterinas) inducen la expresión del gen Mx en peces (Acosta *et al.*, 2004, Grasso *et al.*, 2015). Se reportó que una bacterina de *Vibrio anguillarum* disponible en el mercado, destinada a la vacunación por inmersión, es un potente inductor de la expresión del gen Mx en el salmón del Atlántico *Salmo salar L.*, sin embargo, la respuesta fue dependiente de la dosis y temperatura (Acosta *et al.*, 2004). Del mismo modo, se ha demostrado una fuerte inducción del gen

Mx en los días 2 y 3, desapareciendo en el día 6, en el salmón del Atlántico *Salmo salar* L., luego de la administración intraperitoneal de la bacterina de *Vibrio anguillarum* (Salinas *et al.*, 2004). Por otro lado, la vacuna inactivada con luz UV administrada por inmersión contra el patógeno marino *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* estimuló la expresión del gen Mx en el pez dorado *Sparus aurata* (Grasso *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la transcripción del gen Mx en infecciones virales está relacionada a las glicoproteínas virales (Acosta *et al.*, 2005). En el caso de bacterias Gram negativas, los componentes bacterianos responsables de la inducción del gen Mx, son el LPS, el ADN cromosomal y la proteína de membrana externa (Acosta *et al.*, 2004, Bravo *et al.*, 2011, Bravo *et al.*, 2013, Roy *et al.*, 2016); mientras que en las bacterias Gram positivas como *E. faecalis*, son los peptidoglicanos, la hidrolasa de peptidoglicano, los ácidos teicoicos, la cápsula, el antígeno polisacárido enterocócico y las proteínas superficiales bacterianas, los responsables de la expresión de genes relacionados al sistema inmunitario (Teng *et al.*, 2002, Geiss-Liebisch *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2016, Salamaga *et al.*, 2017, Wolf y Underhill, 2018, Smith *et al.*, 2019). Lo que conlleva a pensar que *E. faecalis* inactivado con formalina mantiene algunos componentes superficiales bacterianos intactos y son capaces de inducir las respuestas inmunitarias en tilapia.

### **6.3. Cambios en el perfil de las proteínas del suero e identificación de biomarcadores por herramientas proteómicas**

La hemopexina (Hx) en los teleósteos generalmente se conoce como proteína de 65 kDa asociada a la aclimatación a temperatura cálida (Wap65) o proteína similar a la hemopexina de mamíferos, con dos isoformas (Wap65-1 y Wap65-2) y ha sido estudiada a nivel genético por varios grupos (Chang *et al.*, 2017). La Hx es una glicoproteína sérica producida principalmente por el hígado con alta afinidad por el hemo. Su función principal es participar en el metabolismo del hierro que elimina el hemo que se libera en el plasma y lo transporta al hígado. De igual modo, la hemopexina

participa en la inflamación como una proteína de fase aguda y su producción está regulada por las citocinas proinflamatorias (Wicher y Fries, 2010, Díaz-Rosales *et al.*, 2014, Chang *et al.*, 2017, Kwon y Ghil, 2017, Criscitiello *et al.*, 2019).

El hemo liberado de los eritrocitos dañados, es una fuente de hierro para las bacterias invasoras, y es altamente tóxico debido a su capacidad para catalizar la formación de radicales libres. La Hx se une al hemo libre con una afinidad muy alta y, por lo tanto, protege las células contra la toxicidad del hemo y ayuda a conservarlo, además, secuestra el hemo de los patógenos, ya que el hemo libre de la circulación contribuye a la proliferación de bacterias (Dooley *et al.*, 2010).

Se ha reportado la hemopexina como un nuevo biomarcador inmune, que se sobreexpresa durante la infección viral (Braceland *et al.*, 2013) e infecciones bacterianas en el salmón del Atlántico *Salmo salar* (Tsoi *et al.*, 2004) y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Bayne *et al.*, 2001). Además, se sobreexpresa significativamente en el hígado del pez rape *Chanos chanos* sometido a estrés hipotérmico e inyección con LPS (Chang *et al.*, 2017) y en rayas amarillas *Urobatis jamaicensis* después de la inyección intraperitoneal con una bacterina de *Vibrio* comercial (Marancik *et al.*, 2013). Del mismo modo, se ha reportado que la expresión del gen Wap65 (hemopexina) es inducido por estrés fisiológico, como el aumento de la temperatura del agua, la respuesta inmune y la exposición a metales pesados (Kwon y Ghil, 2017). En el pez gordo Kumgang *Rhynchocypris kumgangensis*, ambas isoformas (Wap65-1 y Wap65-2) han sido reportadas como proteínas multifuncionales que podrían servir como biomarcadores útiles para evaluar el estrés fisiológico y las respuestas inmunes asociadas (Kwon y Ghil, 2017).

Por lo tanto, la hemopexina reportada en este estudio, resulta ser un biomarcador sérico en las tilapias inducidas con la bacterina de *E. faecalis*, que responde a estímulos

inflamatorios y cambian su concentración en el suero o plasma (Marancik *et al.*, 2013); constituyendo un biomarcador para caracterizar la respuesta inmune innata.

#### **6.4. Componentes séricos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF**

Las proteínas séricas de las bandas comunes (presentes tanto en las tilapias inmunizadas y controles) identificadas en este estudio, se relacionan con la:

**i) Activación del sistema del complemento (C3 y C1qC del complemento).** Los componentes C3 y C1q del complemento están involucrados en la activación del sistema del complemento. Mientras que el componente 3 del complemento (C3), impulsa las funciones efectoras del complemento tanto en la vía clásica, la vía de la lectina de unión a manosa y la vía alternativa; para eliminar los patógenos invasores, regular el sistema inmunitario adaptativo y modificar las propias células, como las células apoptóticas y los restos celulares, para proteger contra la autoinmunidad (Meng *et al.*, 2019). El componente C1q es la subunidad de reconocimiento del complejo C1 que se une a las dianas específicas para la formación de C1 que activa la vía clásica del complemento de manera dependiente o independiente de inmunoglobulinas (Kojouharova, 2014). Aunque el C3 fue identificado en individuos inmunizados y controles, el C1qC solamente fue identificado en el grupo control, esto puede deberse a una baja concentración de C1qC en el individuo inmunizado con la bacterina de *E. faecalis* o a una temprana degradación de proteínas por una inadecuada conservación. Estudios adicionales serán necesarios.

**ii) Eliminación de radicales libres (ceruloplasmina, alfa-2-macroglobulina, serotransferrina).** La adquisición de iones metálicos por los microorganismos es fundamental para su supervivencia en el hospedador infectado por el hecho de que estos iones participan en procesos biológicos como componentes de metaloproteínas de bacterias y sirven como cofactores o elementos estructurales de las enzimas. Por lo



tanto, la ceruloplasmina, serotransferrina, alfa-2-macroglobulina juegan un rol importante en la eliminación de radicales libres y en el sistema inmunológico innato siendo proteínas de fase aguda que responden a la reacción inflamatoria por infección bacteriana (Charlie-Silva *et al.*, 2019). La ceruloplasmina es la principal proteína transportadora de cobre en la sangre y se ha reportado como una proteína de fase aguda durante la reacción inflamatoria por infección bacteriana (Charlie-Silva *et al.*, 2019). En el presente trabajo, se determinó la ceruloplasmina en el grupo inmunizado y control. La alfa-2-macroglobulina ( $\alpha$ -2-M) se une a los iones de hierro, zinc y cobre en sangre, denominada transcupreína, porque transporta el cobre en el suero por quelación de iones de cobre en la sangre humana (Charlie-Silva *et al.*, 2019). Además, ha sido reportada como un importante factor humoral inespecífico en el sistema de defensa de los animales (Chuang *et al.*, 2013). En nuestro estudio se identificó la  $\alpha$ -2-M solamente en tilapias inmunizadas con la bacteria *E. faecalis*, en una banda del SDS-PAGE ligeramente superior a 95 kDa, similar a un reporte donde se identificó la  $\alpha$ -2-M en el plasma de mero *Epinephelus spp.*, con una masa molecular de 97 y 80 kDa en SDS-PAGE reducida (Chuang *et al.*, 2013). La transferrina es una glicoproteína de unión a hierro que desempeña un papel central en el transporte de hierro entre los sitios de absorción, almacenamiento y utilización en todos los organismos vertebrados (Braceland *et al.*, 2013). En los peces, la transferrina tiene un papel importante en el sistema inmunológico innato (Cnaani *et al.*, 2002). En el presente estudio, se determinó la transferrina en el grupo inmunizado y control, por lo que no fue considerado un biomarcador, sin embargo, son necesarios estudios adicionales mediante proteómica cuantitativa.

**iii) Modulación de la respuesta inmune (proteína 1 de unión a NEDD4, apolipoproteína A-I).** La proteína 1 de unión a NEDD4 (N4BP1) de la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella*, se ha identificado como un sustrato de la ligasa NEDD4 E3, y desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria frente a la invasión viral

(Cai *et al.*, 2014). En este estudio se identificó a la N4BP1 solamente en tilapias inmunizadas con la bacterina *E. faecalis*, sugiriendo que podría ser inducida por esta bacterina. La apolipoproteína A-I (ApoA-I) es el componente principal de la lipoproteína de alta densidad (HDL) también llamada “colesterol bueno”, su función principal es la unión y transporte de lípidos (Concha *et al.*, 2004; Karan *et al.*, 2020). Además, se conocen otras funciones defensivas antivirales, antimicrobianas y antiinflamatorias (Villarroel *et al.*, 2007, Whyte *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la apolipoproteína A-I de *Cyprinus carpio L.*, *Labeo rohita* y *Epinephelus coioides* muestran actividad antibacteriana frente a bacterias (Gram negativas y Gram positivas), y propiedades antivirales (Concha *et al.*, 2004, Wei, *et al.*, 2015 Karan *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado su expresión en epidermis, branquias y mucosa intestinal de *Oncorhynchus mykiss*, como principal barrera de la defensa primaria en los peces (Villarroel *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar que su sobreexpresión en tejidos, no se ha evidenciado diferencias significativas en los niveles plasmáticos de esta proteína en grupos de peces sanos y enfermos (Villarroel *et al.*, 2007, Wei, *et al.*, 2015, Charlie-Silva *et al.*, 2019). En el presente estudio, se determinó la apolipoproteína A-I en el grupo inmunizado y control, por lo que no fue considerado un biomarcador, sin embargo, son necesarios estudios adicionales mediante proteómica cuantitativa.

**iv) Formación de coágulos (glicoproteína rica en histidina, alfa-1-antitripsina, fibrinógeno, quininógeno-1).** En mamíferos, la glicoproteína rica en histidina (HRG) posee una estructura de múltiples dominios, para unirse a numerosos ligandos y participar en varios procesos biológicos que incluyen inmunidad, vascularización y coagulación (Blank *et al.*, 2008). Además, el nivel bajo de la HRG plasmática ha sido reportado como biomarcador de la sepsis (Nishibori *et al.*, 2018). La alfa-1-antitripsina (ATT) suprime las vías de coagulación al reducir los niveles plasmáticos del complejo trombina-antitrombina (Wang *et al.*, 2017). En *Plecoglossus altivelis* “ayu” esta proteína ha sido identificada como una proteína de fase aguda “positiva” (sus niveles sanguíneos

aumentan en respuesta a la inflamación) frente a la infección bacteriana (Lü *et al.*, 2012). En el presente estudio, esta proteína fue solamente reportada en el grupo control. Esto puede indicar una baja concentración en las tilapias inmunizadas con la bacterina *E. faecalis*. El fibrinógeno es una glicoproteína derivada de hepatocitos que se compone de dos trímeros, con cada trímero compuesto de tres cadenas polipeptídicas diferentes, la cadena alfa, beta y gamma (Fish y Neerman-Arbez, 2012). Después de una lesión vascular, el fibrinógeno es escindido por la trombina para formar fibrina, que es el componente más abundante de los coágulos sanguíneos (Mosesson, 2005). Se ha demostrado que el pez cebra posee ortólogos de las cadenas de fibrinógeno altamente conservados, que funcionan de manera similar a los mamíferos mediante la formación de un coágulo de fibrina (Vo *et al.*, 2013). Asimismo, se ha reportado en peces y mamíferos que el fibrinógeno es una proteína de fase aguda "positiva", es decir, sus niveles sanguíneos aumentan en respuesta a la inflamación sistémica, lesión tisular y otros eventos como el cambio de temperatura en los peces (Davalos y Akassoglou, 2012, Dietrich *et al.*, 2018). En este estudio se identificaron las cadenas alfa, beta y gamma en el grupo inmunizado con la bacterina de *E. faecalis* y las cadenas beta y gamma en el grupo control, esto puede deberse a un error en la técnica, ya que se necesitan las tres cadenas para formar el complejo fibrinógeno biológicamente activo (Fish y Neerman-Arbez, 2012). El quinínógeno-1 (Kng1) es un componente del sistema de coagulación sanguínea en peces (Dietrich *et al.*, 2018), además, en *Morone americana* "perca blanca" se ha reportado, que el Kng1 responde a estradiol y, por lo tanto, pueden ser indicadores útiles de la inducción de estrógenos (Schilling *et al.*, 2015). En este estudio se identificó el quinínógeno-1 solamente en el grupo control, por lo que puede sugerirse una baja concentración en tilapias inmunizadas con la bacterina de *E. faecalis*. Estudios adicionales serán necesarios para elucidar la función del quinínógenos en tilapias inmunizadas con la bacterina de *E. faecalis*.

**v) Adhesión celular (la fibronectina, CDON, MPP3).** La fibronectina es una proteína de la matriz extracelular altamente conservada y bien caracterizada que juega un papel crucial en muchos procesos celulares, como la adhesión celular, migración, morfología, crecimiento y diferenciación celular (Liu *et al.*, 2003). La molécula de adhesión celular relacionada / regulada negativamente por oncogenes (CDON) de mamíferos es una glicoproteína transmembrana conservada que pertenece a un subgrupo de la superfamilia de inmunoglobulinas de moléculas de adhesión celular. Se expresa en líneas celulares de mioblastos en proliferación y diferenciación, y participa en la mediación de los efectos de las interacciones célula-célula entre precursores musculares que son críticos en la miogénesis (Yoo *et al.*, 2015). En el presente trabajo se determinó el CDON en el grupo inmunizado con la bacterina de *E. faecalis*. La proteína de membrana, palmitoilada 3 (MPP3) (miembro 3 de la subfamilia p55 de MAGUK) es un miembro de una familia de las proteínas asociadas a la membrana denominadas MAGUK (homólogos de la guanilato quinasa asociada a la membrana). Los MAGUK interactúan con el citoesqueleto y regulan la proliferación celular, las vías de señalización y las uniones intercelulares. En humanos, se ha reportado que la MPP3 participa en la polaridad de los fotorreceptores (Kantardzhieva *et al.*, 2006). Asimismo, se ha demostrado que se requiere MPP3 para el mantenimiento del complejo proteico apical y las uniones adherentes, y para la estratificación y la migración adecuada de las neuronas durante el desarrollo de la corteza (Dudok *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha reportado que MPP3 promueve la migración e invasión de células de carcinoma hepatocelular (HCC) y por lo tanto la metástasis (Ma *et al.*, 2014).

**vi) Metabolismo (biotinidasa).** La biotinidasa es una enzima que descompone las amidas de biotina, liberando biotina y la amina. La biotinidasa puede tener un papel regulador importante en la función de la cromatina / ADN mediante la biotilación de las histonas (Wolf, 2005, Sarker *et al.*, 2012). En *Ctenopharyngodon idella*, los resultados indicaron que la deficiencia de biotina afectaba la función inmunológica del riñón

anterior, el bazo y la piel de los peces (He *et al.*, 2020). En el presente trabajo se determinó en el grupo inmunizado y control, por lo que no fue considerado un biomarcador, sin embargo, son necesarios estudios adicionales mediante proteómica cuantitativa.

**vii) Determinación del sexo (MSPB, MSPC, la lipocalina).** La proteína específica masculina (MSP) de la tilapia es un tipo de lipocalina y la estructura de su dominio sugiere que son portadores de esteroides sexuales y, por lo tanto, influye en la vía de la determinación del sexo. Asimismo, se ha detectado la MSP por proteómica en bandas electroforéticas exclusivamente en machos de tilapia sexualmente activos (Shirak *et al.*, 2012). En los machos dominantes de *Sarotherodon galilaeus*, se ha observado que los niveles de la proteína masculina específica (MSP) puede ser hasta cuatro veces superior que la concentración en los hombres sexualmente activos promedio. Se ha sugerido que el nivel de MSP alcanza un máximo en el momento del desove y también es detectable en las hembras en este punto, pero en menor concentración y en algunos caso indetectable (Shirak *et al.*, 2012). Además, existe una correlación positiva entre los niveles de MSP en el suero y el comportamiento dominante y agresivo mostrado por los machos socialmente dominantes, sugiriéndose que la MSP participa en la comunicación intra e intergénero (Machnes *et al.*, 2008). Adicionalmente, se han reportado tres tipos de parálogos MSPA, MSPB y MSPC en diferentes especies de tilapia (Shirak *et al.*, 2008). En el presente estudio se reportaron las proteínas parálogas MSPB, MSPC con bandas superiores a 29 kDa. La MSPC fue identificada en el grupo inmunizado y control, mientras que la MSPB se determinó solamente en el grupo control, sin embargo, la masa molecular calculada de la MSP secretada es de 22 kDa lo que sugiere que está altamente glicosilada (Shirak *et al.*, 2008). La lipocalina está involucradas en la unión de pequeñas moléculas como los esteroides sexuales (Shirak *et al.*, 2008). La lipocalina generalmente llevan a cabo funciones de transporte, incluido el transporte de feromonas, pero también pueden catalizar la síntesis de prostaglandinas (Shirak *et al.*,

2012). En varios peces se ha observado la participación de las lipocalinas en la determinación del sexo, la jerarquía reproductiva y el dominio territorial (Shirak *et al.*, 2012). Las tilapias trabajadas en este estudio son machos fenotípicos, por lo que la identificación de MSPB y MSPC concuerdan con los reportes previos sobre la participación de estas proteínas en la determinación del sexo (Shirak *et al.*, 2012).

**viii) Proteínas bacterianas (EF-Tu de *Serratia spp.* y Gammaproteobacterias).** El factor de elongación térmica inestable Tu (EF-Tu) es una proteína G que cataliza la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma dentro de las células vivas. El EF-Tu es una de las proteínas más abundantes y altamente conservadas en procariotas (Harvey *et al.*, 2019). En este estudio se identificaron péptidos de la proteína EF-Tu en el grupo inmunizado y control, los cuales mediante un análisis de homología en la base de datos NCBI, se encontró que comparte homología con las Gammaproteobacterias, que son una clase de bacterias Gram negativas, con importancia médica, ecológica y están presentes en una amplia variedad de nichos ambientales (Williams *et al.*, 2010).

Además, un péptido identificado en la tilapia del grupo control tuvo homología con varias especies de *Serratia*, que es un género de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas y baciliformes comunes que habitan en el agua y colonizan el tracto intestinal. De este modo, se ha reportado, que una *Serratia sp.*, aislada de peces mediterráneos capturados en la naturaleza, presentó efecto letal cuando se microinyectaron en *Drosophila*, mientras que en el pez cebrá no causó ninguna enfermedad (Jammal *et al.*, 2017).

Se debe mencionar que las proteínas del precursor de la molécula de adhesión celular relacionada/regulada negativamente por oncogenes (CDON), la proteína de membrana, palmitoilada 3 (MPP3) y la proteína 1 de unión a NEDD4, fueron identificadas por homología de péptidos por primera vez en tilapia, en base a la homología con proteínas de *Scleropages formosus*, *Poecilia mexicana* y *Mastacembelus armatus*;

respectivamente (Tabla S1). Además, la mayor parte de proteínas fue identificada en base a la homología de proteínas predichas de la base de datos del NCBI con evidencia a nivel de transcritos, pero sin evidencia proteica, por lo que este **trabajo aporta información sobre las características y funciones de las proteínas reportadas.** Además, se demostró la importancia de la espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF para identificar proteínas inmunitarias específicas como biomarcadoras de los peces inmunizados con *E. faecalis*. Asimismo, se identificaron proteínas presentes en el suero de importancia biológica y que aún no han sido caracterizadas.

Finalmente, se ha utilizado la electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) para el estudio del perfil proteómico plasmático en varias especies de peces. Se ha reportado el uso de la electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) acoplada a MALDI-TOF-TOF o ESI-LC-MS para la identificación y evaluación del perfil proteómico de las tilapias inoculadas con *Aeromonas hydrophila* (Charlie-Silva *et al.*, 2019), de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Nynca *et al.*, 2014, Morro *et al.*, 2020) y en tiburón nodriza *Ginglymostoma cirratum* (Criscitiello *et al.*, 2019). Sin embargo, la electroforesis en una dimensión (SDS-PAGE) es limitada para el estudio de la expresión génica. Por lo que será interesante aplicar la electroforesis bidimensional asociada al uso de marcadores fluorescentes para la separación e identificación espectrométrica subsecuente permitiendo un estudio diferencial y comparativo entre peces inmunizados y controles.

## 6. CONCLUSIONES

La bacterina de *E. faecalis* produce una respuesta humoral duradera y con altos títulos de anticuerpos en tilapias inmunizadas.

La bacterina de *E. faecalis* induce la expresión del gen Mx en el riñón de tilapias inmunizadas con tres dosis.

La bacterina de *E. faecalis* induce la expresión de la proteína hempexina y otros biomarcadores séricos relacionados a la respuesta inmunitaria en tilapias inmunizadas.



## **7. RECOMENDACIONES**

Se sugiere probar dosis adicionales y adyuvantes para lograr una respuesta adaptativa humoral prolongada y una mayor protección contra patógenos de tilapia.

Se sugiere emplear la electroforesis diferencial bidimensional fluorescente (2D-DIGE) en gel o el uso de etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ 4-plex) acoplada a espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF para un estudio diferencial y comparativo entre las tilapias inmunizadas y controles.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou El-Geit EN, Saad TT, Abdo MH, Mona SZ. Microbial infections among some fishes and crustacean species during blooming phenomenon in Qaroun Lake-Egypt. *Life Sci. J.* 2013; 10(2):1217-24.
2. Abu-Elala NM, Samir A, Wasfy M, Elsayed M. Efficacy of Injectable and Immersion Polyvalent Vaccine against Streptococcal Infections in Broodstock and Offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & shellfish immunology.* 2019 May 1; 88:293-300.
3. Acosta F, Lockhart K, Gahlawat SK, Real F, Ellis AE. Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish & Shellfish Immunology.* 2004 Sep 1; 17(3):255-63.
4. Acosta F, Petrie A, Lockhart K, Lorenzen N, Ellis AE. Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr in response to VHS–DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology.* 2005 Jan 1; 18(1):81-9.
5. Adams A. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & shellfish immunology.* 2019 Jul 1; 90:210-4.
6. Alvarenga ÉR, França LR. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biology of reproduction.* 2009 Mar 1; 80 (3):537-44.
7. El-Refaey AM. Studies on major bacterial diseases affecting fish; Tilapia *Oreochromis niloticus*, Catfish, *Clarias gariepinus* and mullets in Port Said, Egypt with special references to its pathological alterations. *Researcher.* 2013;5(2):5-14.

8. Algammal AM, Mohamed MF, Tawfiek BA, Hozzein WN, El Kazzaz WM, Mabrok M. Molecular Typing, Antibiogram and PCR-RFLP Based Detection of *Aeromonas hydrophila* Complex Isolated from *Oreochromis niloticus*. *Pathogens*. 2020 Mar;9(3):238.
9. Amal MN, Zamri-Saad M. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika J Trop Agric Sci*. 2011;34(2):195-206.
10. Amal MN, Koh CB, Nurliyana M, Suhaiba M, Nor-Amalina Z, Santha S, Diyana-Nadhirah KP, Yusof MT, Ina-Salwany MY, Zamri-Saad M. A case of natural co-infection of Tilapia Lake Virus and *Aeromonas veronii* in a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. *Aquaculture*. 2018 Feb 2;485:12-6.
11. Ambrosius H. Comparative investigation of immune globulins of various vertebrate classes. *Nature*. 1966 Jan 29;209(5022):524-.
12. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2012 Apr;10(4):266-78.
13. Argayosa AM, Lee YC. Identification of L-fucose-binding proteins from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) serum. *Fish & shellfish immunology*. 2009 Sep 1;27(3):478-85.
14. Atef HA, Howayda M, El S, Mogda K, Mansour S, Snosy AM, Abo-Zaid KF. Effect of microbiological contamination and pollution of water on the health status of fish. *European Journal of Academic Essays*. 2016;3(5):178-92.
15. Austin B, Austin DA. Vibrionaceae representatives. In *Bacterial fish pathogens* 2012 (pp. 357-411). Springer, Dordrecht.
16. Bacharach E, Mishra N, Briese T, Zody MC, Tsofack JE, Zamostiano R, Berkowitz A, Ng J, Nitido A, Corvelo A, Toussaint NC. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia. *MBio*. 2016 May 4;7(2).

17. Banerjee S, Mahanty A, Mohanty S, Mazumder DG, Cash P, Mohanty BP. Identification of potential biomarkers of hepatotoxicity by plasma proteome analysis of arsenic-exposed carp *Labeo rohita*. Journal of hazardous materials. 2017 Aug 15;336:71-80.
18. Bautista AM, Carlos MH, San Antonio AI. Hatchery production of *Oreochromis niloticus* L. at different sex ratios and stocking densities. Aquaculture. 1988 Oct 1;73(1-4):85-95.
19. Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki K, Nakao M, Yano T. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. Developmental & Comparative Immunology. 2001 Apr 1;25(3):205-17.
20. Behera BK, Pradhan PK, Swaminathan TR, Sood N, Paria P, Das A, Verma DK, Kumar R, Yadav MK, Dev AK, Parida PK. Emergence of tilapia lake virus associated with mortalities of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. Aquaculture. 2018 Feb 1;484:168-74.
21. Begum A, Mondal S, Ferdous Z, Zafar MA, Ali MM. Impact of water quality parameters on monosex tilapia (*Oreochromis niloticus*) production under pond condition. International Journal of Animal and Fish Science. 2014;2(1):14-21.
22. Bendixen E, Danielsen M, Hollung K, Gianazza E, Miller I. Farm animal proteomics—a review. Journal of proteomics. 2011 Mar 1;74(3):282-93.
23. Bhanumathi K, Sharmili R, Revathi K. Infectivity and pathology due to *Vibrio anguillarum* in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Journal of Experimental Zoology, India. 2010;13(1):237-42.
24. Blank M, Shoenfeld Y. Histidine-rich glycoprotein modulation of immune/autoimmune, vascular, and coagulation systems. Clinical reviews in allergy & immunology. 2008 Jun 1;34(3):307-12.

25. Braceland M, Bickerdike R, Tinsley J, Cockerill D, Mcloughlin MF, Graham DA, Burchmore RJ, Weir W, Wallace C, Eckersall PD. The serum proteome of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during pancreas disease (PD) following infection with salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3). *Journal of proteomics*. 2013 Dec 6;94:423-36.
26. Bravo J, Acosta F, Padilla D, Grasso V, Real F. Mx expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) in response to poly I: C, bacterial LPS and chromosomal DNA: preliminary study. *Fish and Shellfish Immunology*. 2011;1(31):170-2.
27. Bravo J, Real F, Padilla D, Oliveira JG, Grasso V, Román L, Acosta F. Effect of lipopolysaccharides from *Vibrio alginolyticus* on the Mx gene expression and virus recovery from gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) experimentally infected with Nodavirus. *Fish & shellfish immunology*. 2013 Jan 1;34(1):383-6.
28. Bringans S, Eriksen S, Kendrick T, Gopalakrishnakone P, Livk A, Lock R, Lipscombe R. Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion). *Proteomics*. 2008 Mar;8(5):1081-96.
29. Ceci M, Delpech G, Sparo M, Mezzina V, Bruni SS, Baldaccini B. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2015 Nov 30;9(11):1195-203.
30. Cai J, Yang L, Wang B, Huang Y, Tang J, Lu Y, Wu Z, Jian J. Identification of a novel N4BP1-like gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in response to GCRV infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2014 Jan 1;36(1):223-8.
31. Chang CH, Lin JY, Lo WY, Lee TH. Hypothermal stress induced differential expression profiles of the immune response gene, warm-temperature-acclimation associated 65-kDa protein (Wap65), in the liver of fresh water and seawater milkfish, *Chanos chanos*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2017 Nov 1;70:174-84.
32. Charlie-Silva I, Klein A, Gomes JM, Prado EJ, Moraes AC, Eto SF, Fernandes DC, Fagliari JJ, Junior JD, Lima C, Lopes-Ferreira M. Acute-phase proteins during

- inflammatory reaction by bacterial infection: fish-model. *Scientific reports*. 2019 Mar 18;9(1):1-3.
33. Cho ST, Tsai YM, Chen CY, Kuo CH. Draft Genome Sequence of *Vibrio vulnificus* 86573B, a Bacterium Isolated from Diseased Tilapia in Taiwan. *Microbiology Resource Announcements*. 2018 Jul 12;7(1).
  34. Chuang WH, Lee KK, Liu PC. Characterization of alpha-2-macroglobulin from groupers. *Fish & shellfish immunology*. 2013 Aug 1;35(2):389-98.
  35. Clem LW, De Boutaud F, Sigel MM. Phylogeny of Immunoglobulin Structure and Function: II. Immunoglobulins of the Nurse Shark. *The Journal of Immunology*. 1967 Dec 1;99(6):1226-35.
  36. Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function IV. Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira*. *Journal of Biological Chemistry*. 1971 Jan 10;246(1):9-15.
  37. Cnaani A, Ron M, Lee BY, Hulata G, Kocher TD, Seroussi E. Mapping the transferrin gene in tilapia. *Animal genetics*. 2002 Feb;33(1):78-80.
  38. Collet B, Urquhart K, Monte M, Collins C, Perez SG, Secombes CJ, Hall M. Individual monitoring of immune response in Atlantic salmon *Salmo salar* following experimental infection with Infectious Salmon Anaemia Virus (ISAV). *PloS one*. 2015 Sep 23;10(9):e0137767.
  39. Concha MI, Smith VJ, Castro K, Bastías A, Romero A, Amthauer RJ. Apolipoproteins A-I and A-II are potentially important effectors of innate immunity in the teleost fish *Cyprinus carpio*. *European Journal of Biochemistry*. 2004 Jul;271(14):2984-90.
  40. Criscitiello MF, Kraev I, Lange S. Deiminated proteins in extracellular vesicles and plasma of nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*)-novel insights into shark immunity. *Fish & Shellfish Immunology*. 2019 Sep 1;92:249-55.

41. Das BK, Roy P, Rout AK, Sahoo DR, Panda SP, Pattanaik S, Dehury B, Behera BK, Mishra SS. Molecular cloning, GTP recognition mechanism and tissue-specific expression profiling of myxovirus resistance (Mx) protein in *Labeo rohita* (Hamilton) after Poly I: C induction. *Scientific reports*. 2019 Mar 8;9(1):1-9.
42. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med J*. 2009 Jun 1;41(2):117-22.
43. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. In *Seminars in immunopathology 2012 Jan 1* (Vol. 34, No. 1, pp. 43-62). Springer-Verlag.
44. Del-Pozo J, Mishra N, Kabusu R, Cheetham S, Eldar A, Bacharach E, Lipkin WI, Ferguson HW. Syncytial hepatitis of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is associated with orthomyxovirus-like virions in hepatocytes. *Veterinary pathology*. 2017 Jan;54(1):164-70.
45. Díaz-Rosales P, Pereiro P, Figueras A, Novoa B, Dios S. The warm temperature acclimation protein (Wap65) has an important role in the inflammatory response of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2014 Nov 1;41(1):80-92.
46. Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2010 Aug;48(2):147-61.
47. Dietrich MA, Hliwa P, Adamek M, Steinhagen D, Karol H, Ciereszko A. Acclimation to cold and warm temperatures is associated with differential expression of male carp blood proteins involved in acute phase and stress responses, and lipid metabolism. *Fish & shellfish immunology*. 2018 May 1;76:305-15.

48. Dolka B, Czopowicz M, Chrobak-Chmiel D, Ledwoń A, Szeleszczuk P. Prevalence, antibiotic susceptibility and virulence factors of *Enterococcus* species in racing pigeons (*Columba livia f. domestica*). BMC veterinary research. 2020 Dec;16(1):1-4.
49. Dong HT, Techatanakitarnan C, Jindakittikul P, Thaiprayoon A, Taengphu S, Charoensapsri W, Khunrae P, Rattanarojpong T, Senapin S. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of Fish Diseases. 2017c Oct;40(10):1395-403.
50. Dong HT, Ataguba GA, Khunrae P, Rattanarojpong T, Senapin S. Evidence of TiLV infection in tilapia hatcheries from 2012 to 2017 reveals probable global spread of the disease. Aquaculture. 2017b Oct 1;479:579-83.
51. Dong HT, Siriroob S, Meemetta W, Santimanawong W, Gangnonngiw W, Pirarat N, Khunrae P, Rattanarojpong T, Vanichviriyakit R, Senapin S. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. Aquaculture. 2017a Jul 1;476:111-8.
52. Dooley H, Buckingham EB, Criscitiello MF, Flajnik MF. Emergence of the acute-phase protein hemopexin in jawed vertebrates. Molecular immunology. 2010 Nov 1;48(1-3):147-52.
53. Dudok JJ, Sanz AS, Lundvig DM, Wijnholds J. MPP3 is required for maintenance of the apical junctional complex, neuronal migration, and stratification in the developing cortex. Journal of Neuroscience. 2013 May 8;33(19):8518-27.
54. Eckersall PD, Whitfield PD, editors. Methods in animal proteomics. Wiley-Blackwell; 2011.
55. El Aamri F, Real F, Acosta F, Bravo J, Román L, Déniz S, Padilla D. Differential innate immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) against *Streptococcus iniae*. Fish & Shellfish Immunology. 2015 Oct 1;46(2):436-41.



56. Embregts CW, Forlenza M. Oral vaccination of fish: lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*. 2016 Nov 1;64:118-37.
57. Erkinharju T, Lundberg MR, Isdal E, Hordvik I, Dalmo RA, Seternes T. Studies on the antibody response and side effects after intramuscular and intraperitoneal injection of Atlantic lumpfish (*Cyclopterus lumpus L.*) with different oil-based vaccines. *Journal of fish diseases*. 2017 Dec;40(12):1805-13.
58. Erkinharju T, Strandskog G, Vågnes Ø, Hordvik I, Dalmo RA, Seternes T. Intramuscular vaccination of Atlantic lumpfish (*Cyclopterus lumpus L.*) induces inflammatory reactions and local immunoglobulin M production at the vaccine administration site. *Journal of fish diseases*. 2019 Dec;42(12):1731-43.
59. Eyngor M, Zamostiano R, Tsofack JE, Berkowitz A, Bercovier H, Tinman S, Lev M, Hurvitz A, Galeotti M, Bacharach E, Eldar A. Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *Journal of clinical microbiology*. 2014 Dec 1;52(12):4137-46.
60. FAO 2006-2020. Aquaculture topics and activities. Acuicultura. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 20 August 2019. [Citado 3 February 2020].
61. Fathi M, Dickson C, Dickson M, Leschen W, Baily J, Muir F, Ulrich K, Weidmann M. Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality'syndrome. *Aquaculture*. 2017 Apr 20;473:430-2.
62. Ferguson HW, Kabuusu R, Beltran S, Reyes E, Lince JA, Del Pozo J. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus (L.)*: a case report. *J Fish Dis*. 2014 Jun 1;37(6):583-9.
63. FIS. 2017. Tilapia Lake Virus Affects Seven Farms in Taoyuan. <http://www.fis.com/Fis/Worldnews/worldnews.asp?monthyear=6-2017&day=19&id =92318&l=e&country=&special=&ndb=1&df=1>. Acceso 08/08/2018.

64. Fischer U, Koppang EO, Nakanishi T. Teleost T and NK cell immunity. *Fish & shellfish immunology*. 2013 Aug 1; 35(2):197-206.
65. Fish RJ, Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene regulation. *Thrombosis and haemostasis*. 2012; 108(09):419-26.
66. Forné I, Agulleiro MJ, Asensio E, Abián J, Cerdà J. 2-D DIGE analysis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) testis proteome in wild-caught and hormone-treated F1 fish. *Proteomics*. 2009 Apr; 9(8):2171-81.
67. Fujimura K, Okada N. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Development, growth & differentiation*. 2007 May; 49(4):301-24.
68. Geiss-Liebisch S, Rooijackers SH, Beczala A, Sanchez-Carballo P, Kruszynska K, Repp C, Sakinc T, Vinogradov E, Holst O, Huebner J, Theilacker C. Secondary cell wall polymers of *Enterococcus faecalis* are critical for resistance to complement activation via mannose-binding lectin. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Nov 2;287(45):37769-77.
69. Ghanem A, Haggag M. Assessment of the feasibility of using filter made of rice straw for treating aquaculture effluents in Egypt. *Resources and Environment*. 2015;5(5):135-45.
70. Golan M, Levavi-Sivan B. Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor activation. *General and comparative endocrinology*. 2014 Oct 1;207:50-5.
71. Grasso V, Padilla D, Bravo J, Román L, Rosario I, Acosta B, Vega B, El Aamri F, Escuela O, Ramos-Vivas J, Acosta F. Immunization of sea bream (*Sparus aurata*) juveniles against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by short bath: Effect on some pro-inflammatory molecules and the Mx gene expression. *Fish & shellfish immunology*. 2015 Oct 1;46(2):292-6.

72. Gudding R, Van Muiswinkel WB. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish & shellfish immunology*. 2013 Dec 1;35(6):1683-8.
73. Haller O, Gao S, Von der Malsburg A, Daumke O, Kochs G. Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Sep 10;285(37):28419-24.
74. Harvey KL, Jarocki VM, Charles IG, Djordjevic SP. The diverse functional roles of elongation factor Tu (EF-Tu) in microbial pathogenesis. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2351.
75. Harvey D. Aquaculture trade—recent years and top countries. United States Department of Agriculture, Washington, DC. 2016.
76. Hastefnl T, Guo'ding R, Eve-risen B. Bacterial vaccines for fish—an update. *Dev Biol. Basel*. 2005;121:55-T4r.
77. He P, Jiang WD, Liu XA, Feng L, Wu P, Liu Y, Jiang J, Tan BP, Yang QH, Kuang SY, Tang L. Dietary biotin deficiency decreased growth performance and impaired the immune function of the head kidney, spleen and skin in on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2020 Feb 1;97:216-34.
78. Hong S, Jin JW, Park JH, Kim JK, Do Jeong H. Analysis of proinflammatory gene expression by RBIV infection in rock bream, *Oplegnathus faciatius*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2016 Mar 1;50:317-26.
79. Huang B, Wang ZX, Liang Y, Zhai SW, Huang WS, Nie P. Identification of four type I IFNs from Japanese eel with differential expression properties and Mx promoter inducibility. *Developmental & Comparative Immunology*. 2019 Feb 1;91:62-71.
80. Iregui CA, Guarín M, Tibatá VM, Ferguson HW. Novel brain lesions caused by *Edwardsiella tarda* in a red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2012 Mar;24(2):446-9.

81. Jammal A, Bariche M, Kambris Z. Characterization of the cultivable gut microflora in wild-caught Mediterranean fish species. *Current Nutrition & Food Science*. 2017 May 1;13(2):147-54.
82. Kantardzhieva A, Alexeeva S, Versteeg I, Wijnholds J. MPP3 is recruited to the MPP5 protein scaffold at the retinal outer limiting membrane. *The FEBS journal*. 2006 Mar;273(6):1152-65.
83. Karan S, Mohapatra A, Sahoo PK, Garg LC, Dixit A. Structural-functional characterization of recombinant Apolipoprotein AI from *Labeo rohita* demonstrates heat-resistant antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020 Jan 1;104(1):145-59.
84. Khafagy A, Eid H, Abou El-Atta M, Abd El-Fattah L. Isolation of *Enterococcus faecalis* from tilapia in Lake Tamsah in Ismailia governorate. *SCVMJ, IVX (2)*. 2009:45-54.
85. Kojouharova M. Classical Complement Pathway Component C1q: Purification of Human C1q, Isolation of C1q Collagen-Like and Globular Head Fragments and Production of Recombinant C1q—Derivatives. Functional Characterization. In *The Complement System 2014* (pp. 25-42). Humana Press, Totowa, NJ.
86. Kwon G, Ghil S. Identification of warm temperature acclimation-associated 65-kDa protein-2 in Kumgang fat minnow *Rhynchocypris kumgangensis*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*. 2017 Dec;327(10):611-9.
87. Kusuda R, Salati F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual review of fish diseases*. 1993 Jan 1;3:69-85.
88. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 1970 Aug;227(5259):680-5.

89. Li J, Ma S, Woo N. Vaccination of silver sea bream (*sparus sarba*) against *Vibrio alginolyticus*: Protective evaluation of different vaccinating modalities. International journal of molecular sciences. 2016 Jan;17(1):40.
90. Li L, Chen SN, Laghari ZA, Huo HJ, Hou J, Huang L, Li N, Nie P. Myxovirus resistance (Mx) gene and its differential expression regulated by three type I and two type II IFNs in mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. Developmental & Comparative Immunology. 2020 Apr 1;105:103604.
91. Lin OE, Ohira T, Hirono I, Saito-Taki T, Aoki T. Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. Developmental & Comparative Immunology. 2005 Jan 1;29(5):443-55.
92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. methods. 2001 Dec 1;25(4):402-8.
93. Liu X, Chen N, Gao X, Zhang Y, Li X, Zhang Y, Bing X, Huang H, Zhang X. The infection of red seabream iridovirus in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and the host immune related gene expression profiles. Fish & shellfish immunology. 2018 Mar 1;74:474-84.
94. Liu H, Zhang S, Shen Z, Ren G, Liu L, Ma Y, Zhang Y, Wang W. Development of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in fish based on truncated cell wall surface anchor proteins. Veterinary Record. 2016 Oct 8;179(14):359-.
95. Liu X, Zhao Q, Collodi P. A truncated form of fibronectin is expressed in fish and mammals. Matrix biology. 2003 Sep 1;22(5):393-6.
96. Lo WS, Chen H, Chen CY, Kuo CH. Complete genome sequence of *Vibrio vulnificus* 93U204, a bacterium isolated from diseased tilapia in Taiwan. Genome announcements. 2014 Oct 30;2(5).

97. Lü JN, Chen J, Lu XJ, Shi YH. Identification of  $\alpha$ 1-antitrypsin as a positive acute phase protein in ayu (*Plecoglossus altivelis*) associated with *Listonella anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2012 Jan 1;32(1):237-41.
98. Ma H, Cai H, Zhang Y, Wu J, Liu X, Zuo J, Jiang W, Ji G, Zhang Y, Liu C, Zhu W. Membrane palmitoylated protein 3 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via up-regulating matrix metalloproteinase 1. *Cancer letters*. 2014 Mar 1;344(1):74-81.
99. Machnes Z, Avtalion R, Shirak A, Trombka D, Wides R, Fellous M, Don J. Male-specific protein (MSP): a new gene linked to sexual behavior and aggressiveness of tilapia males. *Hormones and behavior*. 2008 Aug 1;54(3):442-9.
100. Makori AJ, Abuom PO, Kapiyo R, Anyona DN, Dida GO. Effects of water physico-chemical parameters on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth in earthen ponds in Teso North Sub-County, Busia County. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 2017 Dec 1; 20(1):30.
101. Mahmud ZH, Wright AC, Mandal SC, Dai J, Jones MK, Hasan M, Rashid MH, Islam MS, Johnson JA, Gulig PA, Morris JG. Genetic characterization of *Vibrio vulnificus* strains from tilapia aquaculture in Bangladesh. *Applied and environmental microbiology*. 2010 Jul 15;76(14):4890-5.
102. Marancik DP, Fast MD, Camus AC. Proteomic characterization of the acute-phase response of yellow stingrays *Urobatis jamaicensis* after injection with a *Vibrio anguillarum-ordalii* bacterin. *Fish & shellfish immunology*. 2013 May 1;34(5):1383-9.
103. Martins ML, Mouriño JL, Amaral GV, Vieira FN, Dotta G, Jatobá AM, Pedrotti FS, Jerônimo GT, Buglione-Neto CC. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus sp.* *Brazilian Journal of Biology*. 2008 Aug;68(3):657-61.

104. Martínez D, Oyarzún R, Pontigo JP, Romero A, Yáñez AJ, Vargas-Chacoff L. Nutritional immunity triggers the modulation of iron metabolism genes in the sub-Antarctic Notothenioid *Eleginops maclovinus* in response to *Piscirickettsia salmonis*. *Frontiers in Immunology*. 2017 Sep 19;8:1153.
105. Mashoof S, Criscitiello MF. Fish Immunoglobulins. *Biology* 5, 45.
106. Matsuura Y, Takasaki M, Miyazawa R, Nakanishi T. Stimulatory effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* on cell-mediated immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2017 Sep 1;74:1-9.
107. Meng X, Shen Y, Wang S, Xu X, Dang Y, Zhang M, Li L, Zhang J, Wang R, Li J. Complement component 3 (C3): an important role in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) experimentally exposed to *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*. 2019 May 1;88:189-97
108. Miniero Davies Y, Xavier de Oliveira MG, Paulo Vieira Cunha M, Soares Franco L, Pulecio Santos SL, Zanolli Moreno L, Túlio de Moura Gomes V, Zanolli Sato MI, Schiavo Nardi M, Micke Moreno A, Becker Saldenberg A. *Edwardsiella tarda* outbreak affecting fishes and aquatic birds in Brazil. *Veterinary Quarterly*. 2018 Jan 1;38(1):99-105.
109. Mitchell PS, Patzina C, Emerman M, Haller O, Malik HS, Kochs G. Evolution-guided identification of antiviral specificity determinants in the broadly acting interferon-induced innate immunity factor MxA. *Cell host & microbe*. 2012 Oct 18;12(4):598-604.
110. Morro B, Doherty MK, Balseiro P, Handeland SO, MacKenzie S, Sveier H, Albalat A. Plasma proteome profiling of freshwater and seawater life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Plos one*. 2020 Jan 3;15(1):e0227003.
111. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2005 Aug;3(8):1894-904.

112. Mugimba KK, Chengula AA, Wamala S, Mwege ED, Kasanga CJ, Byarugaba DK, Mdegela RH, Tal S, Bornstein B, Dishon A, Mutoloki S. Detection of tilapia lake virus (Ti LV) infection by PCR in farmed and wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Victoria. *Journal of fish diseases*. 2018 Aug;41(8):1181-9.
113. Munang'andu HM, Paul J, Evensen Ø. An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *Streptococcus agalactiae* vaccines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccines*. 2016 Dec;4(4):48.
114. Munang'andu HM, Evensen Ø. Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish & shellfish immunology*. 2019 Feb 1;85:132-40.
115. Mustapha MK, Atolagbe SD. Tolerance level of different life stages of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) to low pH and acidified waters. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 2018 Dec 1;79(1):46.
116. Nandal S, Pickering T. Tilapia Fish Farming in Pacific Island Countries. Tilapia Grow-Out in Ponds. Secretariat of the Pacific Community, Noumea, New Caledonia. 49p. 2004.
117. Nayak SK, Shibasaki Y, Nakanishi T. Immune responses to live and inactivated *Nocardia seriolae* and protective effect of recombinant interferon gamma (rIFN  $\gamma$ ) against nocardiosis in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish & shellfish immunology*. 2014 Aug 1;39(2):354-64.
118. Nicholson P, Fathi MA, Fischer A, Mohan C, Schieck E, Mishra N, Heinemann A, Frey J, Wieland B, Jores J. Detection of Tilapia Lake Virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015.
119. Nieto JM, Devesa S, Quiroga I, Toranzo AE. Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Diseases*. 1995 Jan;18(1):21-30.



120. Nishibori M, Wake H, Morimatsu H. Histidine-rich glycoprotein as an excellent biomarker for sepsis and beyond. 2018: 209.
121. Nynca J, Arnold GJ, Fröhlich T, Otte K, Flenkenthaler F, Ciereszko A. Proteomic identification of rainbow trout seminal plasma proteins. *Proteomics*. 2014 Jan;14(1):133-40.
122. Noguera P, Collet B, Klinger M, Örün H, Del Pozo J. Use of Salmon Cardiac Primary Cultures (SCPCs) of different genotypes for comparative kinetics of mx expression, viral load and ultrastructure pathology, after infection with Salmon Pancreas Disease Virus (SPDV). *Fish & Shellfish Immunology*. 2018 Jan 1;72:181-6.
123. OIE. Disease notification report 25278, 23/11/2017. [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=25278](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=25278).
124. Oh WT, Jun JW, Kim HJ, Giri SS, Yun S, Kim SG, Kim SW, Kang JW, Han SJ, Kwon J, Park SC. Characterization and Pathological Analysis of a Virulent *Edwardsiella anguillarum* Strain Isolated from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Korea. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020 Jan 28;7:14.
125. Osman KM, Al-Maary KS, Mubarak AS, Dawoud TM, Moussa IM, Ibrahim MD, Hessain AM, Orabi A, Fawzy NM. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicaemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC veterinary research*. 2017 Dec 1;13(1):357.
126. Park YH, Hwang SY, Hong MK, Kwon KH. Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Revue Scientifique et Technique-OIE*. 2012 Apr 1;31(1):189.
127. Parra D, Takizawa F, Sunyer JO. Evolution of B cell immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013 Jan 1;1(1):65-97

128. Penago G, Barato P, Iregui C. Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biológica Colombiana*. 2009;14(1):3-24.
129. Petersen A, Dalsgaard A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas spp.* and *Enterococcus spp.* in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture*. 2003 Apr 2;219(1-4):71-82.
130. Pirarat N, Maita M, Endo M, Katagiri T. Lymphoid apoptosis in Edwardsiella tarda septicemia in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2007 Jun 1;22(6):608-16.
131. Plumb JA, Hanson LA. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. John Wiley & Sons; 2010 Nov 11.
132. Plumb JA. Infectious diseases of tilapia. *Tilapia aquaculture in the Americas*. 1997;1:212-28.
133. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001 May 1;29(9):e45.
134. PRODUCE (MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN). Anuario Estadístico Pesquero Acuicola 2018. Lima, Perú. 153 p.
135. Rahman M, Rahman MM, Deb SC, Alam MS, Alam MJ, Islam MT. Molecular identification of multiple antibiotic resistant fish pathogenic *Enterococcus faecalis* and their control by medicinal herbs. *Scientific reports*. 2017 Jun 16;7(1):1-1.
136. Ramírez-Paredes G, Paley RK, Hunt W, Feist SW, Stone DM, Field T, Hayden D, Ziddah PA, Duodu S, Wallis T, Verner-Jeffreys D. First detection of Infectious Spleen and kidney Necrosis Virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. *bioRxiv*. 2019a Jan 1:680538.
137. Ramírez-Paredes JG, Mendoza-Roldan MA, Lopez-Jimena B, Shahin K, Metselaar M, Thompson KD, Penman DJ, Richards RH, Adams A. Whole cell inactivated autogenous vaccine effectively protects red Nile tilapia (*Oreochromis*

- niloticus*) against francisellosis via intraperitoneal injection. Journal of fish diseases. 2019b Aug;42(8):1191-200.
138. Rizkiantino R, Wibawan WT, Pasaribu FH, Soejoedono RD, Arnafia W, Ulyama V, Wibowo DB. Isolation and characterization of the *Enterococcus faecalis* strain isolated from red tilapia (*Oreochromis hybrid*) in Indonesia: A preliminary report. Survey in Fisheries Sciences. 2020 Jul 10;7(1):27-42.
139. Robertsen B. The interferon system of teleost fish. Fish & shellfish immunology. 2006 Feb 1;20(2):172-91.
140. Rodrigues PM, Silva TS, Dias J, Jessen F. Proteomics in aquaculture: applications and trends. Journal of proteomics. 2012 Jul 19;75(14):4325-45.
141. Rombout JH, Yang G, Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. Fish & Shellfish Immunology. 2014 Oct 1;40(2):634-43.
142. Roy P, Panda SP, Pal A, Mishra SS, Jayasankar P, Das BK. Expression of Mx gene in *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) to OmpC protein of *Aeromonas hydrophila* and bacterial infection. Applied biochemistry and biotechnology. 2016 Feb 1;178(4):640-53.
143. Saad TT, Abd El-Latif G, Helmy AT, Atallah ST. Bacteriological and Molecular Studies on the *Enterococcus* Species Isolated From Diseased Fish and Its Effect on Fish Farm Profits. J. Life Sci. Res.. 2014;2014(2).
144. Salah AS, El Nahas AF, Mahmoud S. Modulatory effect of different doses of  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. Fish & shellfish immunology. 2017 Nov 1;70:204-13.
145. Salamaga B, Prajsnar TK, Jareño-Martinez A, Willemse J, Bewley MA, Chau F, Belkacem TB, Meijer AH, Dockrell DH, Renshaw SA, Mesnage S. Bacterial size matters: Multiple mechanisms controlling septum cleavage and

- diplococcus formation are critical for the virulence of the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis*. PLoS pathogens. 2017 Jul 24;13(7):e1006526.
146. Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011 Dec 1;35(12):1346-65.
147. SANIPES (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera). COMUNICADO N° 018 - 2018 - SANIPES, Ministerio de Producción, Perú. [http://192.169.196.91/documentos/\\_COMUNICADO-N-018-2018-SANIPES.pdf](http://192.169.196.91/documentos/_COMUNICADO-N-018-2018-SANIPES.pdf)
148. Sarker PK, Yossa R, Karanth S, Ekker M, Vandenberg GW. Influences of dietary biotin and avidin on growth, survival, deficiency syndrome and hepatic gene expression of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish physiology and biochemistry*. 2012 Aug 1;38(4):1183-93.
149. Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*. 2006 Dec;1(6):2856-60.
150. Shirak A, Reicher S, Uliel S, Mehlman T, Shainskaya A, Ron M, Seroussi E. Gender and sexual behavior modulate the composition of serum lipocalins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene*. 2012 Aug 1;504(1):22-30.
151. Shirak A, Golik M, Lee BY, Howe AE, Kocher TD, Hulata G, Ron M, Seroussi E. Copy number variation of lipocalin family genes for male-specific proteins in tilapia and its association with gender. *Heredity*. 2008 Nov;101(5):405-15.
152. Smith RE, Salamaga B, Szkuta P, Hajdamowicz N, Praisnar TK, Bulmer GS, Fontaine T, Kołodziejczyk J, Herry JM, Hounslow AM, Williamson MP. Decoration of the enterococcal polysaccharide antigen EPA is essential for virulence, cell surface charge and interaction with effectors of the innate immune system. PLoS pathogens. 2019 May 2;15(5):e1007730.

153. Surachetpong W, Janetanakit T, Nonthabenjawan N, Tattiyapong P, Sirikanchana K, Amonsin A. Outbreaks of tilapia lake virus infection, Thailand, 2015–2016. *Emerging infectious diseases*. 2017 Jun;23(6):1031.
154. Steinel NC, Bolnick DI. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*. 2017 Jul 17;8:827.
155. Salinas I, Lockhart K, Bowden TJ, Collet B, Secombes CJ, Ellis AE. An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. *Fish & Shellfish Immunology*. 2004 Aug 1;17(2):159-70.
156. Salinas I, Zhang YA, Sunyer JO. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011 Dec 1;35(12):1346-65.
157. Samuel CE. Antiviral actions of interferon interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*. 1991 Jul 1;183(1):1-1.
158. Saxena A, Belwal K, Chauhan A, Pande A. Interferon induced Mx protein from Indian snow trout *Schizothorax richardsonii* (Gray) lacks critical functional features unlike its mammalian homologues. *Computational biology and chemistry*. 2018 Apr 1;73:31-40
159. Saavedra Olivos, Katherine Yuliana. “Caracterización molecular de la microbiota bacteriana en la hemolinfa de langostinos (*Litopenaeus vannamei*), sanos y enfermos en base a técnicas de aislamiento, co-cultivo y metagenómica”. Asesor: Quimi Mujica, Juan. Tesis de magister en ciencias con mención en: Biotecnología Molecular. Escuela de Posgrado, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, 2016.

160. Schilling J, Nepomuceno AI, Planchart A, Yoder JA, Kelly RM, Muddiman DC, Daniels HV, Hiramatsu N, Reading BJ. Machine learning reveals sex-specific 17 $\beta$ -estradiol-responsive expression patterns in white perch (*Morone americana*) plasma proteins. *Proteomics*. 2015 Aug;15(15):2678-90.
161. Sigel MM, Clem LW. Immunologic anamnesis in elasmobranchs. University Florida Press: Gainesville, FL, USA; 1966.
162. Singh AK. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *General and Comparative Endocrinology*. 2013 Jan 15; 181:146-55.
163. Soliman NF. Aquaculture in Egypt under Changing Climate. Alexandria Research Center for Adaptation to Climate Change (ARCA). 2017 Jan.
164. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. 1998: 227-264.
165. Sun Y, Liu CS, Sun L. Construction and analysis of the immune effect of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccine encoding a D15-like surface antigen. *Fish & shellfish immunology*. 2011 Jan 1; 30(1):273-9.
166. Teng F, Jacques-Palaz KD, Weinstock GM, Murray BE. Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Infection and immunity*. 2002 Apr 1;70(4):2010-5.
167. Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. 2005 May 18;246(1-4):37-61.
168. Trewavas E. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum (Natural History); 1983.
169. Trobridge GD, LaPatra SE, Kim CH, Leong JC. Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected

- for susceptibility or resistance to IHNV. *Diseases of aquatic organisms*. 2000 Feb 24;40(1):1-7.
170. Tsoi SC, Ewart KV, Penny S, Melville K, Liebscher RS, Brown LL, Douglas SE. Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. *Marine Biotechnology*. 2004 Jun 1;6(3):199-214.
171. Tsofack JE, Zamostiano R, Watted S, Berkowitz A, Rosenbluth E, Mishra N, Briese T, Lipkin WI, Kabuusu RM, Ferguson H, del Pozo J. Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017 Mar 1;55(3):759-67.
172. Van Muiswinkel WB. A history of fish immunology and vaccination I. The early days. *Fish & Shellfish Immunology*. 2008 Oct 1;25(4):397-408.
173. Velázquez J, Acosta J, Herrera N, Morales A, González O, Herrera F, Estrada MP, Carpio Y. Novel IFN $\gamma$  homologue identified in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) links with immune response in gills under different stimuli. *Fish & shellfish immunology*. 2017 Dec 1;71:275-85.
174. Velázquez J, Acosta J, Lugo JM, Reyes E, Herrera F, González O, Morales A, Carpio Y, Estrada MP. Discovery of immunoglobulin T in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A potential molecular marker to understand mucosal immunity in this species. *Developmental & Comparative Immunology*. 2018 Nov 1;88:124-36.
175. Velmurugan BK, Chan CR, Weng CF. Innate-immune responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposure to acute cold stress. *Journal of Cellular Physiology*. 2019 Sep;234(9):16125-35.
176. Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013 Dec 1;77(4):551-66.

177. Verrier ER, Langevin C, Benmansour A, Boudinot P. Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011 Dec 1;35(12):1204-14.
178. Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM. Evidence for melanomacrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish & Shellfish Immunology*. 2006 Oct 1;21(4):467-71.
179. Villarroel F, Bastías A, Casado A, Amthauer R, Concha MI. Apolipoprotein AI, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish. *Fish & shellfish immunology*. 2007 Jul 1;23(1):197-209.
180. Vinitnantharat S, Gravningen K, Greger E. Fish vaccines. *Advances in veterinary medicine*. 1999 Jan 1;41:539-50.
181. Vo AH, Swaroop A, Liu Y, Norris ZG, Shavit JA. Loss of fibrinogen in zebrafish results in symptoms consistent with human hypofibrinogenemia. *PloS one*. 2013 Sep 30;8(9):e74682.
182. Von der Malsburg A, Abutbul-Ionita I, Haller O, Kochs G, Danino D. Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Oct 28;286(43):37858-65.
183. Wang T, Liu F, Tian G, Secombes CJ, Wang T. Lineage/species-specific expansion of the Mx gene family in teleosts: differential expression and modulation of nine Mx genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & shellfish immunology*. 2019 Jul 1;90:413-30.
184. Wang J, Sun Z, Gou W, Adams DB, Cui W, Morgan KA, Strange C, Wang H.  $\alpha$ -1 antitrypsin enhances islet engraftment by suppression of instant blood-mediated inflammatory reaction. *Diabetes*. 2017 Apr 1; 66(4):970-80.



185. Wei J, Gao P, Zhang P, Guo M, Xu M, Wei S, Yan Y, Qin Q. Isolation and function analysis of apolipoprotein AI gene response to virus infection in grouper. *Fish & Shellfish Immunology*. 2015 Apr 1;43(2):396-404.
186. Wicher KB, Fries E. Evolutionary aspects of hemoglobin scavengers. *Antioxidants & redox signaling*. 2010 Jan 15;12(2):249-59.
187. Williams KP, Gillespie JJ, Sobral BW, Nordberg EK, Snyder EE, Shallom JM, Dickerman AW. Phylogeny of gammaproteobacteria. *Journal of bacteriology*. 2010 May 1;192(9):2305-14.
188. Whyte SK. The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish & shellfish immunology*. 2007 Dec 1;23(6):1127-51.
189. Wolf AJ, Underhill DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2018 Apr;18(4):243.
190. Wolf B. Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005 Jul 1;16(7):441-5.
191. Yin X, Mu L, Bian X, Wu L, Li B, Liu J, Guo Z, Ye J. Expression and functional characterization of transferrin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection. *Fish & shellfish immunology*. 2018 Mar 1;74:530-9.
192. Yoo M, Kim BG, Lee SJ, Jeong HJ, Park JW, Seo DW, Kim YK, Lee HY, Han JW, Kang JS, Bae GU. Syntaxin 4 regulates the surface localization of a promyogenic receptor Cdo thereby promoting myogenic differentiation. *Skeletal muscle*. 2015 Dec;5(1):1-5.
193. Zahran E, Mahgoub HA, Abdelhamid F, Sadeyen JR, Risha E. Experimental pathogenesis and host immune responses of *Enterococcus faecalis* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 2019 Oct 15;512:734319.

194. Zhi T, Huang C, Sun R, Zheng Y, Chen J, Xu X, Brown CL, Yang T. Mucosal immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* during *Gyrodactylus cichlidarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2020 Nov 1;106:21-7.
195. Zhang L, Ma J, Fan Y, Zhou Y, Xu J, Liu W, Gu Z, Zeng L. Immune response and protection in gibel carp, *Carassius gibelio*, after vaccination with  $\beta$ -propiolactone inactivated cyprinid herpesvirus 2. *Fish & shellfish immunology*. 2016 Feb 1;49:344-50.
196. Zhang D, Gao Y, Li Q, Ke X, Liu Z, Lu M, Shi C. An effective live attenuated vaccine against *Streptococcus agalactiae* infection in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2020 Mar 1;98:853-9.
197. Zhou R, Zeng S, Hou D, Liu J, Weng S, He J, Huang Z. Occurrence of human pathogenic bacteria carrying antibiotic resistance genes revealed by metagenomic approach: a case study from an aquatic environment. *Journal of Environmental Sciences*. 2019 Jun 1;80:248-56.
198. Zhu LY, Nie L, Zhu G, Xiang LX, Shao JZ. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology*. 2013 Jan 1;39(1-2):39-62.
199. Zorrilla I, Chabrilón M, Arijó S, Díaz-Rosales P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Morinigo MA. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture*. 2003 Mar 27;218(1-4):11-20.

## 9. ANEXOS

**Tabla S1. Composición de los reactivos**

<b>Reactivos</b>	<b>Componentes</b>
Solución salina fisiológica (SSF)	Cloruro de sodio (NaCl) 0.85%
Preservante de ácidos nucleicos	Ácido etilendiaminotetraacético tri-potasio (EDTA K3) 0.39 M, Fluoruro sódico ( NaF) 0.33 M y Timol (2-isopropil-5-metilfenol) 0.0001 M
Buffer fosfato salino (PBS)	Cloruro de sodio (NaCl) 137 mM, Cloruro de potasio (KCl) 2.7 mM, Fosfato disódico hepta hidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O) 4.3 mM, Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 1.4 mM, pH 7.3.
Buffer con alto contenido de urea	Úrea 8 M, Dithiothreitol (DTT) 20 mM, 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamonio] -1-propanosulfonato (CHAPS) 4%.
Buffer de carga	Tris 125 mM pH 6.8, Dodecilsulfato sódico SDS 4%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0.02%, DTT 200 mM
Buffer Tripsina	Tripsina 13 ng/μL, Acetonitrilo 10%, Bicarbonato de amonio 10 mM, agua grado HPLC.
Buffer de extracción	Ácido fórmico 5%, Acetonitrilo 100% (1:2v/v).

**Tabla S2. Preparación de gel SDS-PAGE al 12%**

<b>Gel de resolución 12% (15 mL)</b>		<b>Gel de apilamiento 5% (5 mL)</b>	
Agua bidestilada	5.0 ml	Agua bidestilada	3.4 ml
30% Mix acrilamida	6.0 ml	30% Mix acrilamida	0.83 ml
1.5M Tris pH 8.8	3.8 ml	1 M Tris pH 6.8	0.63 ml
10% SDS	0.15 ml	10% SDS	0.05 ml
10% APS	0.15 ml	10% APS	0.05 ml
TEMED	0.006 ml	TEMED	0.005 ml

**Tabla S3. Proteínas séricas caracterizadas**

NºB	Prot.	In d.	PM (Da)	Péptidos	Conf.	Especie	Max Score	Total score	Cov. (%)	E value	Iden. (%)	Acces.	Long. (aa)	PM (kDa)	Función
1	Fibrone ctina (isoform a X1)	8	1537.73 17	EPLVFVPLPDA EGR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	47.7	47.7	100	4.00E-05	100	XP_019 212665. 1	2452	271.3 6	Participa en la adhesión y migración celular.
			1885.92 66	FTDIGPDSALIV WEAPR	93.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	58.7	58.7	100	9.00E-09	100	XP_019 212665. 1			
2	Cerulop lasmina	8	1520.68 16	IEEVSWNYAPT GR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	46.9	97.4	100	6.00E-05	100	XP_003 458996. 1	1073	122.1 1	Es la principal proteína transportadora de cobre en la sangre.
		10	1520.69 67	IEEVSWNYAPT GR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	46.9	97.4	100	6.00E-05	100	XP_003 458996. 1			
3	C3 del comple mento	8	1226.57 47	NTFEYVIGER	96.9	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.14	100	XP_019 203045. 1	1657	185.9 3	Impulsa las funciones efectoras del complemento para eliminar los patógenos invasores.
4	Alfa-2-macroglobulina	10	1269.60 36	EVQHFKVEVR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.3	36.3	100	0.2	100	XP_019 212738. 1	1450	160.6 4	Quela iones de hierro, zinc y cobre en la sangre.
5	Hemop exina (isoform a X1)	8	1975.98 07	VHLDAITSDNA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	60.4	60.4	100	3.00E-09	100	XP_019 208998. 1	549	61.04	Participar en el metabolismo del hierro, eliminando el hemo que se libera en el
			1676.82 47	VIIGNHFYHFD STK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	50.3	50.3	100	5.00E-06	100	XP_019 208998. 1			

6		10	1235.56 47	GDEIYHFDLK	98.7	<i>Oreochromis niloticus</i>	37.1	37.1	100	0.11	100	XP_019 208998. 1			plasma y lo transporta al hígado.	
			1184.62 07	AGNERPIGPFK	96.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	38	38	100	0.062	100	XP_019 208998. 1				
			1975.93 07	VHLDAITSDNA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	60.4	60.4	100	3.00E -09	100	XP_019 208998. 1				
			1676.77 17	VIIGNHFYHFD STK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	50.3	50.3	100	5.00E -06	100	XP_019 208998. 1				
	CDON			2068.87 77	MGGVAVEMYG VMESRGPKR	88.3	<i>Scleropages formosus</i>	65.5	65.5	100	5.00E -11	100	KPP642 97.1	1216	132.4 7	Está implicada en la diferenciación miogénica.
	6	Hemopexina (isoforma X1)	8	1975.94 17	VHLDAITSDNA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	60.4	60.4	100	3.00E -09	100	XP_019 208998. 1	549	61.04	Participar en el metabolismo del hierro, eliminando el hemo que se libera en el plasma y lo transporta al hígado.
1676.80 37				VIIGNHFYHFD STK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	50.3	50.3	100	5.00E -06	100	XP_019 208998. 1				
1184.58 17				AGNERPIGPFK	80.2	<i>Oreochromis niloticus</i>	38	38	100	0.066	100	XP_019 208998. 1				
10			1976.90 47	VHLDAITSDDA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis aureus</i>	60.4	60.4	100	3.00E -09	100	XP_031 588793. 1				
			1676.76 37	VIIGNHFYHFD STK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	50.3	50.3	100	5.00E -06	100	XP_019 208998. 1				
			1975.88 06	VHLDAITSDNA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	60.4	60.4	100	3.00E -09	100	XP_019 208998. 1				

			1184.57 07	AGNERPIGPFK	93.6	<i>Oreochromis niloticus</i>	38	38	100	0.062	100	XP_019 208998. 1			
	Fibrinógeno (cadena gamma)	8	1357.67 97	IELVDWEGNKR	91.7	<i>Oreochromis niloticus</i>	40.5	40.5	100	0.008	100	XP_019 215643. 1	431	48.92	Es el componente gamma del fibrinógeno, que participa en el proceso de coagulación sanguínea y en respuesta a la inflamación.
		10	1357.64 77	IELVDWEGNKR	98.9	<i>Oreochromis niloticus</i>	40.5	40.5	100	0.008	100	XP_019 215643. 1			
	MPP3	8	1235.55 76	EGVEYHFISR	83.1	<i>Poecilia mexicana</i>	36.7	36.7	100	0.15	100	XP_014 867143. 1	649	73.37	Regula la proliferación celular, las vías de señalización y las uniones intercelulares.
		10	1235.53 37	EGVEYHFISR	83.1	<i>Poecilia mexicana</i>	36.7	36.7	100	0.15	100	XP_014 867143. 1			
7	Serotransferrina	8	1667.70 97	ASADEKYYGY AGAFR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	50.7	73.4	100	4.00E -06	100	NP_001 298250. 1	750	81.62	Participa en el transporte de hierro entre sitios de absorción, almacenamiento y utilización.
			1854.76 46	HTTVTENS DNGPDWAR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	58.3	58.3	100	1.00E -08	100	XP_019 203149. 2			
		10	1667.65 97	ASADEKYYGY AGAFR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	50.7	73.4	100	4.00E -06	100	NP_001 298250. 1			
			1854.75 27	HTTVTENS DNGPDWAR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	58.3	58.3	100	1.00E -08	100	XP_019 203149. 2			
			1522.69 76	APIDNYET CSLAR	99	<i>Oreochromis mossambicus</i>	45.6	45.6	100	2.00E -04	100	CAC422 28.1			
			2110.95 36	VQTDHSFN LFSSEAYAPAK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	63	63	100	4.00E -10	100	XP_019 203149. 2			

			1867.90 47	KDPQLADFIWE TLHR	86	<i>Oreochromis niloticus</i>	49	49	100	2.00E -05	93.33	XP_019 203149. 2			
	Hemop exina (isoform a X1)	8	1975.92 07	VHLDAITSDNA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	60.4	60.4	100	3.00E -09	100	XP_019 208998. 1	549	61.04	Participar en el metabolismo del hierro, eliminando el hemo que se libera en el plasma y lo transporta al hígado.
			1975.91 06	VHLDAITSDDA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis aureus</i>	60.4	60.4	100	3.00E -09	100	XP_031 588793. 1			
		10	1976.88 67	VHLDAITSDDA GNIYAFR	99	<i>Oreochromis aureus</i>	60.4	60.4	100	3.00E -09	100	XP_031 588793. 1			
	Biotinid asa (isoform a X3)	8	1281.59 57	WQFNTNVAFR	98.9	<i>Oreochromis niloticus]</i>	38.4	38.4	100	0.036	100	XP_019 206437. 1	523	58.61	Participa en el metabolismo de la biotina.
			10	1281.57 26	WQFNTNVAFR	93.2	<i>Oreochromis niloticus</i>	38.4	38.4	100	0.036	100			
			1320.60 96	NLDIYEEQAAR	90.4	<i>Oreochromis niloticus</i>	39.2	39.2	100	0.023	100	XP_019 206437. 1			
8	C3 del comple mento (isoform a X1)	8	1526.71 26	QYVYLQAQFP DR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	44.3	44.3	100	4.00E -04	100	XP_019 203043. 1	1658	186.0 6	Impulsa las funciones efectoras del complemento para eliminar los patógenos invasores.
		10	1526.69 26	QYVYLQAQFP DR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	44.3	44.3	100	4.00E -04	100	XP_019 203043. 1			
	Glicopr oteína rica en histidin a	8	1718.75 17	AVHHINEYHDH GYK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	51.5	51.5	100	2.00E -06	100	XP_013 128933. 2	444	48.21	Modula varios procesos biológicos que incluyen inmunidad,
		10	1718.73 07	AVHHINEYHDH GYK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	51.5	51.5	100	2.00E -06	100	XP_013 128933. 2			



	(isoforma X1)		2018.88 17	GRHPPHDHEH GHGPPPPGGK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	68.5	223	100	6.00E-12	100	XP_013 128933. 2			vascularización y coagulación.
	Proteína tipo hemopexina	10	1976.89 47	VHLDAITSDDA GNIYAFR	96.7	<i>Oreochromis aureus</i>	60.4	60.4	100	3.00E-09	100	XP_031 588793. 1	549	61.04	Participar en el metabolismo del hierro, eliminando el hemo que se libera en el plasma y lo transporta al hígado.
	Proteína 1 de unión a NEDD4	10	1718.69 67	HGPHLDVFLRK DNR	99	<i>Mastacembelus armatus</i>	49.4	49.4	100	1.00E-05	100	XP_026 167555. 1	989	109.8 1	Desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria a la invasión viral.
9	Glicoproteína rica en histidina	8	2545.05 76	HAHDHSHDHG LNHDHVHAHH AK	93.5	<i>Oreochromis niloticus</i>	76.6	171	100	1.00E-14	100	XP_005 458334. 1	499	55.48	Modula varios procesos biológicos que incluyen inmunidad, vascularización y coagulación.
10	Producto de proteína desconocida	8	1448.64 67	AVQPEPVAGS QIPR	98	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	46.4	46.4	100	1.00E-04	100	CAG05 640.1	Desconocido		Desconocida
11	Homólogo a la alfa-1-antitripsina	8	1696.73 27	HLFHMLGESQ ENQK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	50.3	50.3	100	5.00E-06	100	XP_005 449880. 2	410	46.14	Desempeña un papel en la inmunidad innata de los peces.

	(isoforma 1)														
	Fibrinógeno (cadena beta)		1388.6697	EIVDTVFPNIR	97.9	<i>Oreochromis niloticus</i>	42.2	42.2	100	0.002	100	XP_003455581.2	512	57.85	Es el componente beta del fibrinógeno, que participa en el proceso de coagulación sanguínea y en respuesta a la inflamación.
12	Quinínogeno-1 (isoforma X2)	8	1371.6387	AVHSAVDKFN ER	97.8	<i>Oreochromis niloticus</i>	40.9	40.9	100	0.007	100	XP_005464293.1	368	40.28	Participa en el sistema de coagulación sanguínea.
13	Factor de elongación Tu	8	1918.9087	ELLSAYDFPGD DLPVIR	99	<i>Serratia spp</i>	57.9	57.9	100	2.00E-08	100	WP_126221220.1	396	43.003	Son bacterias comunes de los habitantes acuáticos.
			1630.7556	GYDQIDNAPEERAR	99	<i>Gammaproteo bacteria</i>	49	49	100	2.00E-05	100	MBA3563249.1			Las gammaproteobacterias son gram negativas presentes en una amplia variedad de nichos ambientales.
	Factor de elongación Tu	10	1630.7236	GYDQIDNAPEERAR	99	<i>Gammaproteo bacteria</i>	49	49	100	2.00E-05	100	MBA3563249.1	396	43.003	
14	Fibrinógeno (cadena beta)	8	1238.4977	EDGGGWYWR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	39.7	39.7	100	0.013	100	XP_003455581.2	512	57.85	Es el componente beta del fibrinógeno, que participa en el proceso de
			1388.6766	EIVDTVFPNIR	97.9	<i>Oreochromis niloticus</i>	42.2	42.2	100	0.002	100	XP_003455581.2			

			1543.66 66	HGTDDGVVW MNWK	97.8	<i>Oreochromis niloticus</i>	49.8	49.8	100	6.00E -06	100	XP_003 455581. 2			coagulación sanguínea y en respuesta a la inflamación.
			1745.68 87	GHCATPGEYW LGNDR	92.2	<i>Oreochromis niloticus</i>	54.1	54.1	100	3.00E -07	100	XP_003 455581. 2			
		10	1238.47 17	EDGGGWY NR	98.7	<i>Oreochromis niloticus</i>	39.7	39.7	100	0.013	100	XP_003 455581. 2			
	Fibrinó eno (cadena alfa)	10	2036.91 77	VELEDWEGAV ASAEYTIR	89.2	<i>Oreochromis niloticus</i>	61.3	61.3	100	1.00E -09	100	XP_013 119750. 1	696	76.18	Es el componente alfa del fibrinógeno, que participa en el proceso de coagulación sanguínea y en respuesta a la inflamación.
15	Proteín a específi ca masculi na C1	8	2507.13 26	TVHSFWVEQT PIPDSEDMFSR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	74.9	74.9	100	6.00E -15	100	CAP076 45.1	198	22.19 9	Son portadores de esteroides sexuales y, por lo tanto, influyen en la vía más fundamental de determinación del sexo.
	Proteín a específi ca masculi na B1		1786.75 37	WIFYAATSDSE EQLK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	52.8	52.8	100	5.00E -07	100	CAP076 44.1	198	22.19 9	
	Proteín a específi ca masculi na C1	10	2507.06 08	TVHSFWVEQT PIPDSEDMFSR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	74.9	74.9	100	6.00E -15	100	CAP076 45.1	198	22.19 9	

16	Proteína específica masculina C1	10	2507.0757	TVHSFWVEQT PIPDSEDMFSR	95.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	74.9	74.9	100	6.00E-15	100	CAP076 45.1	198	22.199	
17	Lipocalina	8	1157.5146	YWGYVSDLR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	35	35	100	0.5	100	XP_003 446889.1	183	20.65	Se caracterizan por su capacidad para unirse a pequeñas moléculas hidrofóbicas como ácidos grasos, esteroides, bilinas y retinoides
			1627.6747	YDEYGLTYSFN TR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	47.3	47.3	100	5.00E-05	100	XP_003 446889.1			
		10	1627.6627	YDEYGLTYSFN TR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	47.3	47.3	100	5.00E-05	100	XP_003 446889.1			
18	C1qC del complemento	8	2055.9006	FTDAITNINDDY NINTGR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	62.6	62.6	100	5.00E-10	100	XP_003 448409.1	241	25.62	C1q es la subunidad de reconocimiento de la vía clásica del complemento que conduce a su activación.
19	Apolipoproteína A-I	8	1838.9017	AMLAPYVEEYK EQLR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	53.7	53.7	100	4.00E-07	100	XP_003 449376.1	263	29.56	Tiene un papel específico en el metabolismo de los lípidos y actividades antibacterianas.
			1209.5557	QAYDHAHNVR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.15	100	CCF550 60.1			
			1168.6277	AALTPIVESIR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.19	100	XP_003 449376.1			
20		8	1209.5377	QAYDHAHNVR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.15	100	CCF550 60.1	263	29.54	Tiene un papel específico en el

	Apolipo proteína A-I		1838.88 37	AMLAPYVEEYK EQLR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	53.7	53.7	100	4.00E-07	100	XP_003449376.1		metabolismo de los lípidos y actividades antibacterianas.		
			1681.70 57	ALDQLDDTPY QEFK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	49.4	49.4	100	1.00E-05	100	XP_003449376.1				
			1201.56 67	SNIATDIEALR	98.9	<i>Oreochromis niloticus</i>	37.1	37.1	100	0.13	100	XP_003449376.1				
		10		1209.52 77	QAYDHAHNVR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.15	100	CCF55060.1			
				1838.87 87	AMLAPYVEEYK EQLR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	53.7	53.7	100	4.00E-07	100	XP_003449376.1			
				1201.57 97	SNIATDIEALR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	37.1	37.1	100	0.13	100	XP_003449376.1			
21	Apolipo proteína A-I	8		1209.54 47	QAYDHAHNVR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.15	100	CCF55060.1	263	29.54	Tiene un papel específico en el metabolismo de los lípidos y actividades antibacterianas.
				1838.88 56	AMLAPYVEEYK EQLR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	53.7	53.7	100	4.00E-07	100	XP_003449376.1			
				1681.74 17	ALDQLDDTPY QEFK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	49.4	49.4	100	1.00E-05	100	XP_003449376.1			
				1309.66 16	LQPWISEYYAK	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	39.2	39.2	100	0.024	100	XP_003449376.1			
				1168.65 97	AALTPIVESIR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.19	100	XP_003449376.1			
				1201.60 96	SNIATDIEALR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	37.1	37.1	100	0.13	100	XP_003449376.1			
		10		1209.53 16	QAYDHAHNVR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.15	100	CCF55060.1			

			1838.87 96	AMLAPYVEEYK EQLR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	53.7	53.7	100	4.00E -07	100	XP_003 449376. 1			
			1168.63 17	AALTPIVESIR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	36.7	36.7	100	0.19	100	XP_003 449376. 1			
			1309.61 36	LQPWISEYYAK	95.7	<i>Oreochromis niloticus</i>	39.2	39.2	100	0.024	100	XP_003 449376. 1			
			1681.72 86	ALDQLDDTPY QEFK	92.8	<i>Oreochromis niloticus</i>	49.4	49.4	100	1.00E -05	100	XP_003 449376. 1			
			1201.59 27	SNIATDIEALR	89.8	<i>Oreochromis niloticus</i>	37.1	37.1	100	0.13	100	XP_003 449376. 1			
22	Glicoproteína rica en histidina	8	2059.97 27	NVDELFNKDPE FKPAAAR	99	<i>Oreochromis niloticus</i>	60.9	60.9	100	2.00E -09	100	XP_005 458334. 1	499	55.48	Modula varios procesos biológicos que incluyen inmunidad, vascularización y coagulación.
	Apolipoproteína A-I		1838.86 87	AMLAPYVEEYK EQLR	83.8	<i>Oreochromis niloticus</i>	53.7	53.7	100	4.00E -07	100	XP_003 449376. 1	263	29.56	Tiene un papel específico en el metabolismo de los lípidos y actividades antibacterianas.

NºB (Número de banda). Prot. (Proteína). Ind. (Individuo). PM (peso molecular). Conf. (% de confianza). Iden. (Identidad). Acces. (Código de acceso del NCBI). Long. (Longitud).



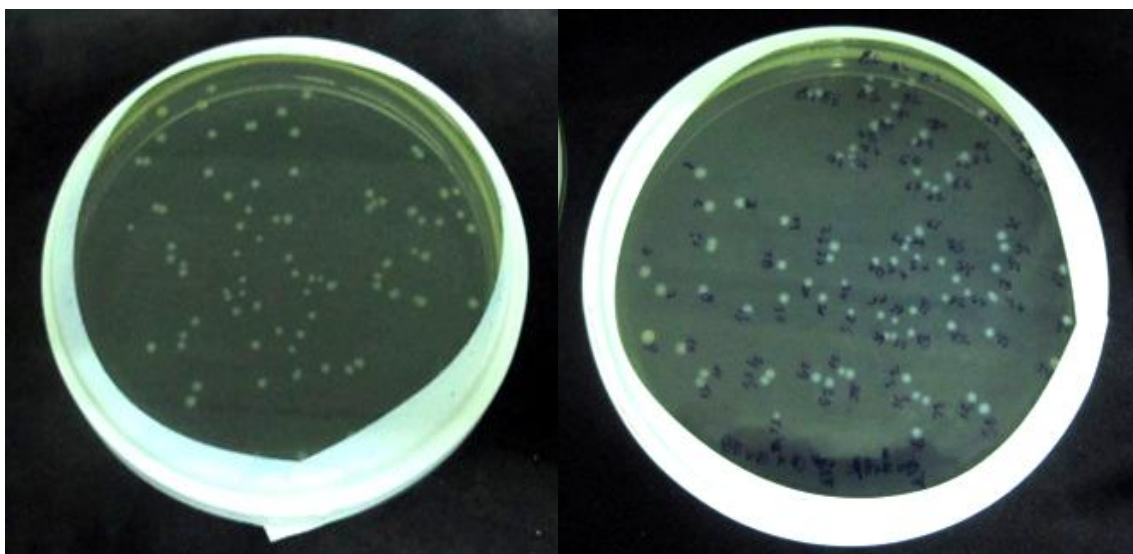
**Figura S1.** Diseño experimental y mantenimiento de tilapias



**Figura S2.** Kits colorimétricos para la medición de los parámetros físico-químicos del agua de cultivo de tilapias.

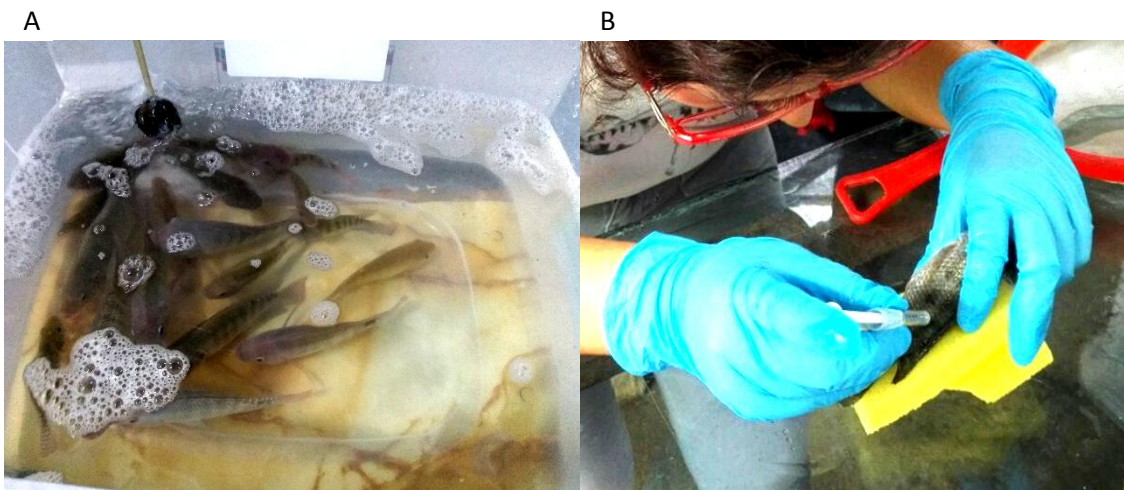


**Figura S3.** Identificación de *Enterococcus faecalis* mediante secuenciación del gen de ARN ribosomal 16S.

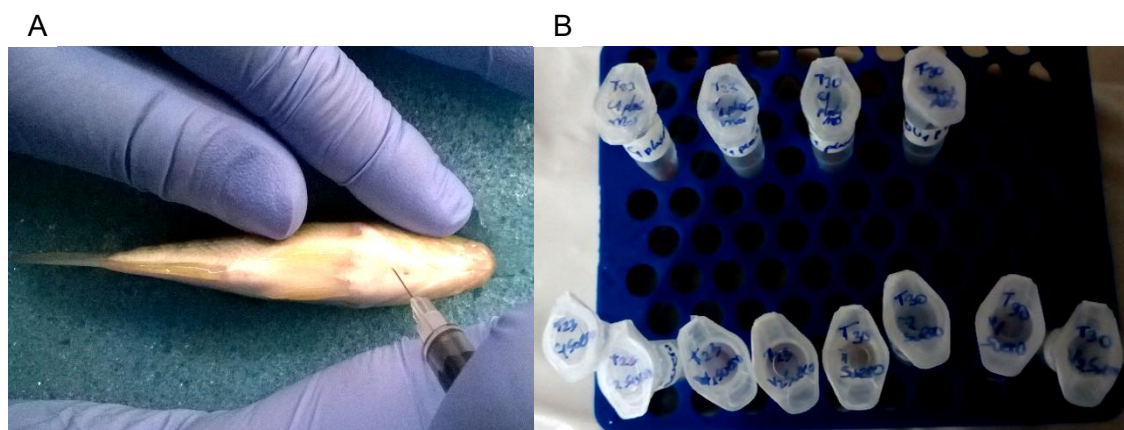


**Figura S4.** Enumeración de *Enterococcus faecalis*

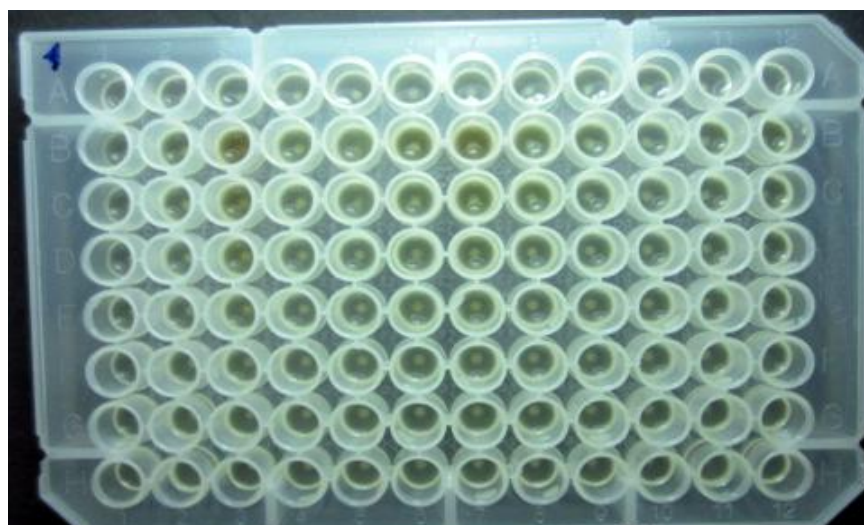




**Figura S5.** Inyección de tilapias con la bacterina de *E. faecalis*. A: Anestesia de peces. B: Inyección.



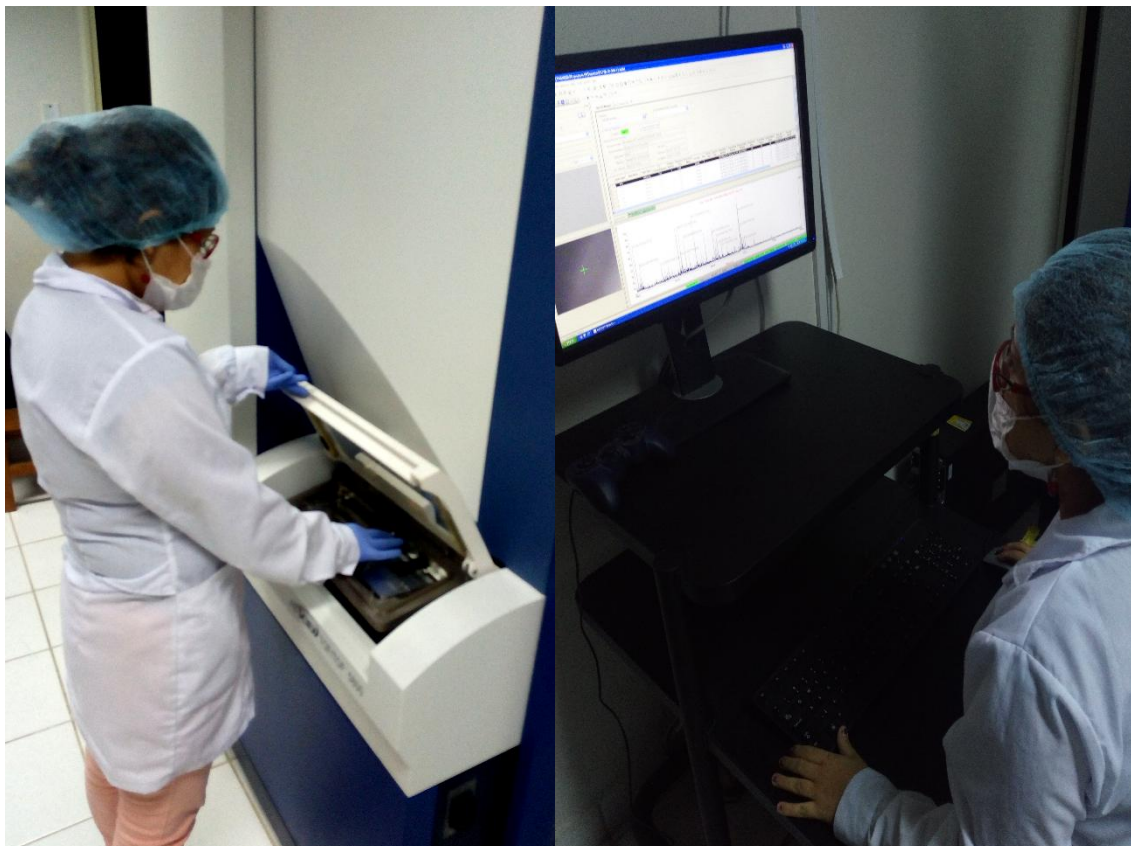
**Figura S6.** Colecta de muestra de tilapia. A: Colecta de sangre por punción cardiaca. B: Colecta de suero por centrifugación de la sangre.



**Figura S7.** Ensayo de aglutinación en placa.



**Figura S8.** Ensayo de qPCR



**Figura S9.** Análisis proteómico por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF