



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI
TOF/TOF A LA ENDOCRINOLOGÍA, INMUNOLOGÍA Y
PATOLOGÍA DEL PAICHE *Arapaima gigas*.**

MARIO DAVID CUEVA TÁVARA

TUMBES, PERÚ

(2016)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI
TOF/TOF A LA ENDOCRINOLOGÍA, INMUNOLOGÍA Y
PATOLOGÍA DEL PAICHE *Arapaima gigas*.**

MARIO DAVID CUEVA TÁVARA

TUMBES, PERÚ

(2016)

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo **Mario David Cueva Távara** declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

Mario David Cueva Távara

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS

RESPONSABLES

Blgo. Mario David Cueva Távara

EJECUTOR

Blgo. Emmerik Motte Darricau, PhD.

ASESOR

Blga. Virna Cedeño Escobar, PhD

COASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dra. Enedia Vieyra Peña.....

PRESIDENTE

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón.....

SECRETARIO

Dr. Eric Mialhe Matonnier.....

VOCAL

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	ix
ABSTRACT.	x
1. INTRODUCCIÓN.	11
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.	12
2.1. Antecedentes.	12
2.2. Bases teórico-científicas.	15
2.3. Definición de términos básicos.	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	22
3.1. Localidad y periodo de ejecución.	22
3.2. Población, muestra y muestreo.	22
3.3. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.	23
3.4. Procesamiento y análisis de datos.	26
4. RESULTADOS.	27
4.1. Identificación de neurohormonas asociadas a la reproducción	27
4.2. Identificación de proteínas asociadas a patógenos	37
4.3. Identificación de proteínas asociadas a la inmunidad y estrés	39
5. DISCUSIÓN.	51
6. CONCLUSIONES.	59
7. RECOMENDACIONES.	60
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	61

RESUMEN

El pez amazónico gigante “paiche” *Arapaima gigas* es una especie prometedora para la piscicultura tropical debido a sus características anatómicas, sin embargo, su completa domesticación es problemática debido a la falta de información biológica.

Los progresos recientes en el campo de la biotecnología molecular, llamados “ómicas”, están revolucionando la ictiología básica y aplicada; en particular la proteómica por espectrometría doble masa MALDI TOF/TOF, que permite la detección y caracterización masiva de péptidos de efectores fisiológicos así como de patógenos.

En el presente trabajo, esta tecnología ha sido aplicada al paiche para abrir líneas primordiales de investigación en endocrinología, patología infecciosa e inmunología. Es así, que mediante esta técnica se han identificado péptidos de hormonas primordiales para la reproducción, tal como kisspeptin 1, kisspeptin 2 y gonadoliberin, a partir de extractos proteicos de cerebro; un péptido de proteína de membrana del parásito *Spironucleus salmonicida* (Hexamitidae) ha sido detectado e identificado en extractos proteicos de mucus de la piel y péptidos de proteínas inmunitarias y de respuesta a estrés hipóxico han sido detectados e identificados en extractos proteicos de sueros y mucus de escamas.

Este conjunto de metodologías y resultados va permitir profundizar investigaciones sobre la reproducción y la prevención de enfermedades de paiche y será pronto valorizado en investigaciones con otras especies de peces.

Palabras clave: pez, paiche *Arapaima*, espectrometría de masas, MALDI TOF/TOF, endocrinología, patología, inmunidad, diagnóstico,

ABSTRACT

The giant amazon fish "paiche" (*Arapaima gigas*) is a promising species for tropical fish farming because of their anatomical features but its complete domestication is problematic due to the lack of biological information.

Recent progress in the field of molecular biotechnology, called "omics", are revolutionizing the basic and applied ichthyology; particularly proteomics by dual-mass spectrometry MALDI TOF / TOF, which allows detection and massive characterization of peptides of physiological effectors and pathogens.

In this work, this technology has been applied to paiche to open priority research lines in endocrinology, infectious disease and immunology. Thus, by this technique they have been identified peptides of primordial hormones for reproduction, such as kisspeptin 1, kisspeptin 2 and gonadoliberein, have been detected and identified from brain protein extracts; a peptide of membrane protein of the parasite *Spironucleus salmonicida* (Hexamitidae) has been detected and identified in protein extracts of scale mucus and peptides of immune and hypoxia response proteins have been detected and identified in extracts of serum protein and scale mucus.

This set of methodologies and results will allow further research on reproduction and disease prevention of paiche and will be soon applied for research with other species of fish.

KEYWORDS: fish, paiche, *Arapaima*, Mass spectrometry, MALDI TOF/TOF, endocrinology, pathology, immunology, diagnostic.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento mundial de la población exige constantemente recursos naturales para su subsistencia, tal como productos agrícolas, pesqueros y acuícolas. En los últimos años, la pesca ha mostrado una tendencia a la estabilización de su producción por captura, mientras que la acuicultura ha mantenido su crecimiento (FAO 2014) con un incremento en los últimos 20 años de 78% para peces, 308% para crustáceos y 60% para moluscos (Peng 2013). Las producciones acuícolas con una tasa de crecimiento anual de 6.9% contribuyen al 43% del alimento animal para el consumo humano (Rodrigues et al 2012).

Este incremento en la producción acuícola ha resultado de conocimientos científicos y tecnologías que han sido orientados a la solución de problemas de reproducción, de producción de semilla, de nutrición, de diagnóstico de patógenos, de prevención de enfermedades, de vacunación, de mejoramiento genético, entre otros. Los progresos recientes en biotecnología molecular, con el conjunto de tecnologías llamadas “ómicas” (genómica, metagenómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) han beneficiado ampliamente a las investigaciones básicas y aplicadas en el campo de la producción animal agropecuaria y acuícola (Rodrigues et al 2012).

Si bien, la genómica y transcriptómica son útiles en el entendimiento de la información genética, las vías de transducción de señales y la expresión de genes, las investigaciones a nivel proteómico y metabolómico son primordiales ya que se trata de la caracterización de moléculas estructurales y efectoras de las múltiples funciones celulares (Hartmann et al 2014; Rodrigues et al 2012).

La proteómica y metabolómica se han beneficiado de las fantásticas innovaciones en tecnologías de espectrometría doble masa conocida como MALDI TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). Esta tecnología provee la detección masiva de proteínas, péptidos y metabolitos desde varios tipos de muestras desde organismos completos o en cortes histológicos, células eucariotas o procariotas, hasta moléculas más o menos purificadas, analizando y caracterizando las moléculas de manera global o individual, de forma rápida y versátil (Di Girolamo et al 2013).

Sin embargo, una problemática resalta en el interés de la transferencia tecnológica en el sector acuícola a especies donde los estudios moleculares se han visto estancado o limitado debido a la falta de información biológica y bases de datos, siendo el paiche es un claro ejemplo de esta problemática. De forma particular, vacíos completos de información en proteínas asociadas a la reproducción, inmunología y patología del paiche existen a la fecha.

El presente trabajo, confirmó la hipótesis de que la aplicación de la espectrometría doble masa MALDI TOF/TOF, implementada para abrir tres importantes líneas de investigación referentes a la endocrinología de la reproducción, la inmunología y la patología en el diagnóstico del paiche, contribuyen al conocimiento básico y aplicado con miras al cultivo sostenible de esta especie. Por tanto, el objetivo de estudio fue la aplicación de la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF TOF en la identificación de proteínas asociadas a la endocrinología, inmunología y patología del paiche *Arapaima gigas*.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA

2.1. Antecedentes

Existen pocas dudas de que la biología moderna es la más diversificada de las ciencias naturales y el incremento en el conocimiento de este campo se debe, en gran medida, a la interacción de sus áreas, entre las que destaca la biología molecular (Smith 2004), la cual se centra en los mecanismos por los cuales los procesos celulares son llevados a cabo por varias macromoléculas biológicas en la célula, tal como ácidos nucleicos, proteínas, metabolitos, lípidos y carbohidratos, (Krebs et al 2014).

En las últimas décadas, los avances en el estudio de estas macromoléculas, en el campo de la biotecnología y biología molecular, se deben gracias al desarrollo de nuevas tecnologías que han expandido nuestra capacidad de conocer y analizar la estructura y función de las mismas. La genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, llamadas en conjunto “ómicas”, son campos de estudio donde la aplicación de nuevas herramientas de alto rendimiento permite la medición sistemática de todos los componentes y biomoléculas celulares hasta ahora inexplorados.

La genómica, enfocada en la evolución, funcionamiento y contenido de los genomas, aporta a través del secuenciamiento de genomas completos de organismos de interés. La transcriptómica por su lado, enfoca su estudio en la expresión de los genes, llevando toda la información genómica al plano funcional (Kim et al 2016), complementándose posteriormente con la metabolómica, la cual analiza los cambios en los metabolitos celulares como resultado de la actividad celular (Putri et al 2013). Adicional a estas tres ómicas, una cuarta, la proteómica,

complementa en gran medida el enfoque multidisciplinario de los avances tecnológicos en biotecnología molecular.

La proteómica es un campo emergente de las ómicas que se centra en analizar el conjunto de proteínas que son producidas, moduladas y/o modificadas en células y/u organismos (Görg et al 2004). Hasta ahora, un amplio rango de métodos proteómicos han sido aplicados a la investigación, haciendo uso de tecnologías de identificación multidimensional de proteínas, western-blot, electroforesis bidimensional con espectrometría de masas, espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS) y de espectrometría de masas per sé, han sido publicados en diferentes sectores productivos (agrícolas, acuícolas, ambientales etc) (Prieto et al 2012; Peng et al 2004; Lin et al 2009) y aplicadas en muchos campos de las ciencias biológicas (Ahmad et al 2012). De forma particular, los resultados alcanzados con dichas herramientas tecnológicas han promovido enormemente el desarrollo de la proteómica en la acuicultura y en particular en la piscicultura a nivel mundial (Peng 2013; Prieto et al 2012).

En la endocrinología de peces, la aplicación de la técnica de espectrometría de masas se ha perfilado en los últimos años como una herramienta sensible y rápida en el estudio de moléculas específicas, tal como hormonas asociadas a la reproducción (Liu^b et al 2013; Ubuka et al 2009; Yi et al 2015), neuropéptidos (Ma et al 2009; Takahashi et al 2008) y proteínas involucradas en la diferenciación sexual y maduración (Om et al 2013; Gouveia et al 2013; Groh et al 2011; Rodrigues et al 2012).

En la patología de peces, la aplicación de la espectrometría de masas ha mejorado la sensibilidad de detección de patógenos (Fekih-Zaghib et al 2013), evaluando enfermedades virales y bacterianas (Peng 2013); la identificación de patógenos a través de proteínas del mucus (Mai et al 2015); la clasificación de patógenos bacterianos de peces (Kurokawa et al 2012; Xu et al 2004; Wu et al 2006; Dong et al 2011; Luo et al 2009) así como de microorganismos no patógenos (Krader y Emerson 2004). Este enfoque proteómico está disponible para la identificación de moléculas involucradas en el complejo proceso biológico de infección y permite una búsqueda de las proteínas asociadas a los diversos parásitos (Mai et al 2015). Sin embargo, la aplicación de esta herramienta en el diagnóstico de patógenos es más desarrollada en el ámbito de la medicina humana, donde se aplica actualmente en rutina (Tran et al 2015; Sloots et al 2015; Patel 2015).

En la inmunología de peces, la aplicación de la espectrometría de masas es de importancia en la identificación de péptidos antimicrobianos en el mucus y suero (Jurado et al 2015; Liang et al 2011; Su 2011; Bergsson et al 2005; Conceição et al 2012; Fekih-Zaghib et al 2013), en la detección de proteínas inmunitarias de peces (Medina et al 2015; Huang et al 2015; Liu^a et al 2012), en la identificación de estresores a partir de perfiles de espectros de masas (Sanahuja y Ibarz 2015; Provan et al 2006; Rodrigues et al 2012) y en el estudio de la composición del mucus epidérmico de peces infectados (Provan et al 2013), entre otros.

2.2. Bases teórico-científicas.

La funcionalidad del proteoma, a nivel celular, tisular y global del organismo implica una naturaleza altamente dinámica en relación a los tipos de proteínas

expresadas, su abundancia, modificaciones, localizaciones subcelulares, etc., siendo esta funcionalidad dependiente del estado fisiológico de la célula, tejido u organismo (Aebersold y Goodlett 2000). Esta dinámica y diversidad compleja de moléculas, principalmente aplicado a péptidos y proteínas en general, requiere de técnicas sofisticadas de estudio que permitan un análisis con alta sensibilidad y precisión, además de un rápido tiempo de análisis (Reizer y Caprioli 2005). Frente a ello, la espectrometría de masas surge como herramienta analítica que hace posible la identificación de proteínas y péptidos, así como su peso molecular, modificaciones estructurales y secuencia de aminoácidos (Di Girolamo et al 2013).

La espectrometría de masas es una técnica instrumental que estudia la materia mediante la formación de iones en fase gaseosa, permitiendo la determinación de la relación masa/ carga (m/z) de un compuesto dado, el que ha sido sometido a los efectos de un campo magnético que permite el movimiento de dichos iones. De este modo, esta técnica, brinda información de la masa molecular de un compuesto (o biomoléculas), haciendo posible su identificación y cuantificación a partir de cantidades realmente pequeñas (algunos pmoles) de analito.

El espectrómetro de masas contempla un **sistema de entrada** donde es colocada la muestra o analito, la cual es seguidamente inyectada o vaporizada en la **cámara de ionización** a muy baja presión, donde a través de alguna forma de energía, como un láser de electrones de alta energía, perturba la estabilidad electrónica formando fragmentos ionizados que son impulsados posteriormente a un **analizador másico**, gracias a un campo magnético diferencial, a través de una trayectoria lineal que separa y clasifica dichos iones en función a su relación masa/carga (m/z). Estos iones alcanzan un **detector de iones** que distingue y

cuantifica el tipo y cantidad de iones presentes en la muestra. Como los iones son inestables y muy reactivos, se deben manipular en alto vacío, el cual es condición de funcionamiento del equipo.

Dependiendo de la **forma de ionización**, podemos clasificarla en:

1. Ionización en fase gaseosa:
 - Ionización electrónica (EI)
 - Ionización química (CI)
2. Ionización por bombardeo de partículas:
 - Bombardeo con átomos rápidos (FAB).
 - Espectrometría de masas de iones secundarios (SIM).
3. Ionización a presión atmosférica:
 - Ionización por electroevaporación. (ESI).
 - Ionización química a presión atmosférica (APCI).
4. Ionización por desorción láser:
 - Desorción/ ionización láser asistida por matriz. (MALDI)

De acuerdo al **tipo de analizador másico** presente, podemos clasificar el equipo en:

1. Analizadores cuadrupolares.
2. Analizadores de trampa de iones.
3. Analizador de sectores.
4. Analizador de tiempo de vuelo (TOF)

De acuerdo a ello, en la Universidad Nacional de Tumbes, se cuenta con un espectrómetro de masas con sistema de ionización MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) y un doble analizador de tiempo de vuelo (TOF/TOF), el cual, además de realizar una identificación inicial de iones, permite en un segundo análisis (o segundo tiempo de vuelo o TOF/TOF) fragmentar los iones a fin de identificar los componentes de cada fragmento. De forma particular, en el estudio proteómico, permite conocer la secuencia y composición de aminoácidos en cada fragmento ionizado, el cual posteriormente permite la identificación de la proteína de origen.

Esta técnica fue desarrollada en 1980 por Karas y Hillenkamp y Tanaka y colaboradores, la cual está basada en el uso de una matriz fotosensible que inicialmente absorbe energía láser y posteriormente permite la generación de iones. Cuando un pulso láser incide en la muestra (cocristales de matriz y analito), esta energía es absorbida inicialmente por la matriz que se vaporiza, llevando consigo a las moléculas de analito. En fase gaseosa se intercambian iones entre la matriz y el analito, mediante mecanismos de transferencia protónica, generando moléculas de analito cargadas, llamadas aductos o iones cuasi moleculares. Además, el éxito de esta técnica radica, en que la matriz es capaz de absorber gran cantidad de energía a la longitud de onda del láser y posteriormente sufre una relajación, cediendo la energía emitida a las moléculas de la muestra de una forma controlada, de manera que permite la desorción de las moléculas quedando como iones intactos en fase gaseosa (AB Sciex 2009).

La aplicación de la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF en el estudio proteómico de las neurohormonas asociadas a la reproducción en peces es uno

de los enfoques con interés en la acuicultura de especies como el paiche, a razón que la reproducción es un proceso que implica tanto regulación endocrina como ambiental y el éxito de este proceso reproductivo implica que la gametogénesis ocurra normalmente y que las interacciones hormonales a lo largo del eje cerebro-hipófisis-gónada (CPG) se encuentren todas aseguradas (Vizziano 2010).

La estimulación endocrina de la cascada reproductiva mediante la secreción de melatonina en el hipotálamo, es sólo el inicio de una compleja interacción que incorpora otros péptidos y proteínas, tal como el péptido de activación de la adenilato ciclasa, la hormona de crecimiento, la hormona liberadora de corticotropina y la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH (Falcon et al 2007).

En el eje CPG, la GnRH, un decapeptido hipotalámico, es el principal mediador de la reproducción regulando la síntesis y liberación de gonadotropinas, teniendo un rol clave en la regulación del comportamiento sexual por modulación de la actividad neural en el sistema nervioso central (Ando et al 2013). Adicional a la GnRH, una segunda hormona, recientemente reconocida como un potente regulador de la reproducción de vertebrados, ha sido identificada con el nombre de Kisspeptin, la cual ejerce su función sobre las neuronas GnRH, a las cuales induce para la producción y liberación de la hormona con el mismo nombre a nivel de la pituitaria.

En vertebrados no mamíferos, como en los teleósteos en general, se han identificado dos parálogos de Kisspeptin con funciones conservadas en la reproducción, ejerciendo un efecto regulador en la maduración sexual y sobre el

dimorfismo de individuos juveniles, siendo el responsable inicial del proceso reproductivo. Además, estudios en el pez cebra *Danio rerio*, han mostrado una estrecha relación entre kiss2 y GnRH3 en el área pre-óptica del cerebro, atribuyéndoles el rol de reguladores predominantes de la síntesis de gonadotropinas en peces. (Ogawa y Parhar 2013).

La aplicación de la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF en el estudio de potenciales biomarcadores, a través de la caracterización e identificación de péptidos precursores específicos de diversas proteínas, ha sido ampliamente enfocada en el bienestar de los peces para la acuicultura, nutrición, salud, calidad y seguridad alimentaria (Rodrigues et al 2012). Este enfoque permite la identificación de proteínas asociadas a diversas condiciones fisiológicas y metabólicas del organismo, tal como las relacionadas al estrés, siendo una herramienta potencial en el diagnóstico de dicha condición (Provan et al 2006).

Otros enfoques, tal como la proteómica comparativa, ha contribuido al conocimiento de las respuestas inmunitarias a agentes no infecciosos, involucrando una producción potenciada de proteínas de la fase aguda en hospederos (Peng 2013).

2.3. Definición de términos básicos.

Proteómica: Es el estudio del proteoma y se enfoca exhaustivamente al estudio de los procesos biológicos a través del análisis sistemático de las proteínas expresadas en una célula o tejido (Aebersold y Goodlett 2000). Estas proteínas son consideradas los “caballos de batalla” de la célula, involucradas en todas las

reacciones bioquímicas celulares, como transmisores, receptores y mensajeros dentro y entre las células (Haga et al 2014). Provee no solo información a nivel mecánico, sino que captura además los cambios en la actividad de las proteínas tal como las modificaciones post traduccionales (Rodrigues et al 2012).

Espectrometría de masas: Es la herramienta más importante en la actualidad para el estudio de la proteómica (Aebersold y Goodlett 2000). Esta técnica genera espectros de masa a partir de células o tejidos, donde cada señal corresponde a un único péptido o proteína, el cual puede ser posteriormente identificado en base a la información de la secuencia generada directamente de la señal (m/z) de interés (Reizer y Caprioli 2005).

MALDI-MS: Espectrometría de masas por ionización/desorción por láser asistido por matriz (Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) - Mass Spectrometry (MS)). Está referido a una fuente poderosa y versátil para la producción de iones intactos en fase gaseosa de un amplio rango de componentes térmicamente lábiles y no volátiles (como las proteínas), haciendo uso de una matriz (solvente que contiene pequeñas moléculas orgánicas), factor crucial para el éxito del método de desorción y la ionización, en el cual se basa esta técnica. Durante la desorción, a través de la incidencia de un láser, la energía acumulada por la matriz permite su sublimación haciendo contacto con el analito en una pluma de expansión. Durante la ionización, el estado excitado permite la transferencia de iones a las moléculas, las cuales son aceleradas en el vacío, separándola entre sí de acuerdo a la masa, hasta llegar al detector (Hoffmann y Stroobant 2007).

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Localidad y periodo de ejecución.

El presente estudio fue desarrollado en diferentes etapas: el mantenimiento de los individuos de paiche *A. gigas* se realizó en el centro acuícola experimental CEBAP, ubicado en Villa Puerto Pizarro, Tumbes. El procesamiento inicial de las muestras se realizó en el laboratorio de Biología molecular y biotecnología de Inca´Biotec SAC, ubicado en la ciudad de Tumbes. El procesamiento final y análisis proteómico se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicado en Villa Puerto Pizarro-Tumbes. El estudio tuvo una duración de dos años (Marzo 2014 a Febrero 2016).

3.2. Población, muestra y muestreo.

La muestra de paiches empleados en el desarrollo del presente proyecto fueron donados por la Universidad Nacional de Tumbes (UNT) en el 2015, consistiendo de 12 juveniles de 7 kg peso promedio aproximado de 1,5 años de edad. Adicionalmente, se realizaron dos evaluaciones de individuos provenientes del cultivo de paiche de la UNT, donde se tomaron diversas muestras de interés.

Para el estudio de la identificación de neurohormonas asociadas a la reproducción, se trabajó con individuos destinados a la producción (2015), los cuales fueron sacrificados mediante shock térmico (en frío) y a los cuales se les extrajo el cerebro. Adicionalmente, se sacrificaron tres individuos de los 12 destinados a la investigación.

Para el diagnóstico de patógenos presentes en el mucus de paiche, se realizó dos colectas de muestras (mucus) en pools de individuos provenientes de la actividad productiva de la UNT durante los muestreos de biometría y sacrificio organizados por la misma. El estudio de moléculas inmunitarias se realizó con los individuos destinados a la investigación, en los cuales se tomó de forma independiente, muestras de sangre y mucus.

3.3. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.

La metodología de estudio fue dividida en tres tipos de acuerdo a las diferentes orientaciones del muestreo:

El estudio de la neurohormonas asociadas a la reproducción se realizó a partir de cerebros frescos colectados de forma inmediata al sacrificio de los individuos y su almacenamiento en nitrógeno líquido hasta el procesamiento de las muestras. Previo a la extracción de proteínas, los cerebros fueron segmentados en sus respectivos lóbulos (olfatorio, óptico), la región del telencéfalo, mesencéfalo, hipotálamo y pituitaria para un mejor manejo. Dichas muestras fueron maceradas adicionando buffer de lisis (5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 40 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM MgCl₂, 65 mM DTT, 1 mM PMSF) y sobre hielo. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a ultrasonido dos veces por 15 minutos y homogenizadas con el “vórtex”. Las muestras fueron centrifugadas a 16000 g por 10 minutos y el sobrenadante fue recuperado en tubos nuevos, donde se realizó la precipitación con acetona helada en un volumen de 4:1 acetona/muestra. Al igual que en el mucus, las proteínas precipitadas fueron lavadas dos veces en

metanol helado y 2 veces en acetona helada. Los pellet secos fueron almacenados en -20°C hasta su uso y se tomaron alícuotas (50 ul) de las mismas para su digestión con tripsina (13ng/ul) en bicarbonato de amonio con 10% de acetonitrilo según el protocolo descrito por Schevchenko et al (2007). Los pellet finales fueron resuspendidos en 10 ul de ACN 80% con 0.1% TFA y posteriormente depositados en la placa MALDI junto a un volumen igual de matriz (CHCA).

La identificación de patógenos presentes en el mucus de paiche se llevó a cabo a través de la colecta del mucus de la piel, la cual se realizó con ayuda de láminas portaobjeto estériles, haciendo un ligero raspado en las regiones dorsolateral de los individuos y se depositaron en forma combinada de hasta 7 muestras aprox. en tubos estériles de 15 ml. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1000 rpm/30 seg para retirar partículas contaminantes del mucus, el cual fue separado y sometido a la extracción de proteínas. El mucus limpio de partículas contaminantes (como arena o fibras) fue diluido en un volumen igual con buffer de lisis (5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 40 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM MgCl₂, 65 mM DTT, 1 mM PMSF). Posteriormente, la precipitación de proteínas se realizó con acetona helada en relación 3:1 acetona/muestra. Las proteínas precipitadas fueron lavadas dos veces en metanol helado y 2 veces en acetona helada. Los pellet secos fueron almacenados en -20°C hasta su uso. Se tomaron alícuotas (50 ul) de las mismas para su digestión con tripsina (13ng/ul) en bicarbonato de amonio con 10% de acetonitrilo según el protocolo descrito por Schevchenko et al (2007). Los pellet finales fueron resuspendidos en 10 ul de ACN 50% con 0.1% TFA y posteriormente depositados en la placa MALDI junto a un volumen igual de matriz (CHCA).

Para el estudio de proteínas en sangre, individuos previamente anestesiados con isoeugenol (anestesia leve) en solución al 1% stock, fueron empleados para la toma de muestras de sangre con sistema al vacío en tubos con activadores de la coagulación (tapa roja) a partir de la vena caudal de los paiches. Las muestras fueron centrifugadas a 5000rpm/10 min y el suero resultante fue colectado de forma aséptica. La precipitación se realizó directamente sobre el suero con acetona helada en un volumen 4:1 acetona/muestra. Se incubó a -20°C por 1,5 horas y posteriormente se centrifugó a 16000g/10 min donde se recuperó el pellet, el cual fue lavado 2 veces con acetona helada. Los pellet secos fueron almacenados en -20°C hasta su uso. Se tomaron alícuotas (50 ul) de las mismas para su digestión con tripsina (13ng/ul) en bicarbonato de amonio con 10% de acetonitrilo según el protocolo descrito por Schevchenko et al (2007). Los pellet finales fueron resuspendidos en 10 ul de ACN 50% con 0.1% TFA y posteriormente depositados en la placa MALDI junto a un volumen igual de matriz (CHCA).

Para el procesamiento de todas las muestras, se empleó un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF 5800 (AB SCIEX) con un láser de Nd:YAD de 349 nm de longitud de onda. Las condiciones de corrida (Job Run) fueron configuradas manualmente de acuerdo a calibraciones previas con espectros más resolutivos y posteriormente de forma automática para todas las muestras (Spot Set).

3.4. Procesamiento y análisis de datos.

El análisis de los resultados se realizó con el software ProteinPilot™ (AB Sciex) considerando las condiciones de alquilación con iodoacetamida y la digestión con Tripsina. Se trabajó con bases de datos asociados a teleóstos descargados del repositorio universal Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) y NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

Los péptidos obtenidos del procesamiento por doble fragmentación (MS/MS) fueron posteriormente analizados en función a sus características de longitud, porcentaje de confianza, valor de Error (E value, en el ProteinBLAST) y su identificación directa por el software ProteinPilot.

En la identificación de las neurohormonas GnRH y Kisspeptin, se realizó adicionalmente un alineamiento con la secuencia de mayor similitud, debido al interés en la caracterización del péptido funcional (decapéptido en GnRH y dodecapéptido en Kisspeptin).

4. RESULTADOS.

La aplicación de la espectrometría de doble masa, MALDI TOF/TOF en el estudio proteómico del paiche se organizó en tres líneas principales: Reproducción (Tabla 1), Patología (Tabla 2) e Inmunología (Tabla 3). Se identificaron diversas proteínas con valores de confianza mayores al 90% a partir de las secuencias generadas por el software ProteinPilot posterior al análisis doble masa (TOF/TOF) de las muestras provenientes de diferentes extractos protéicos.

4.1 Identificación de neurohormonas asociadas a la reproducción:

A partir de extractos de proteínas de cerebro de juveniles de paiche, se identificaron dos isoformas de la hormona kisspeptin (Kiss) (Fig. 1 y 2), así como una de las tres isoformas de la hormona liberadora de gonadotropinas (llamada también gonadoliberina o GnRH) (Fig. 3) y otros neuropéptidos (Tabla 1; Fig. 4 a Fig. 9). La identificación del péptido de Kisspeptin 1 y de la Proteína de respuesta al crecimiento temprano se realizó a través de la base de datos del ProtinBlast mientras que los péptidos restantes a partir del software ProteinPilot.

El análisis de los péptidos identificados de las hormonas kisspeptin y gonadoliberina no perteneció a las regiones funcionales de las mismas, sin embargo permitieron asociar comparativamente y de forma significativa las relaciones con otras especies.

Los neuropéptidos de paiche identificados en el presente estudio fueron:

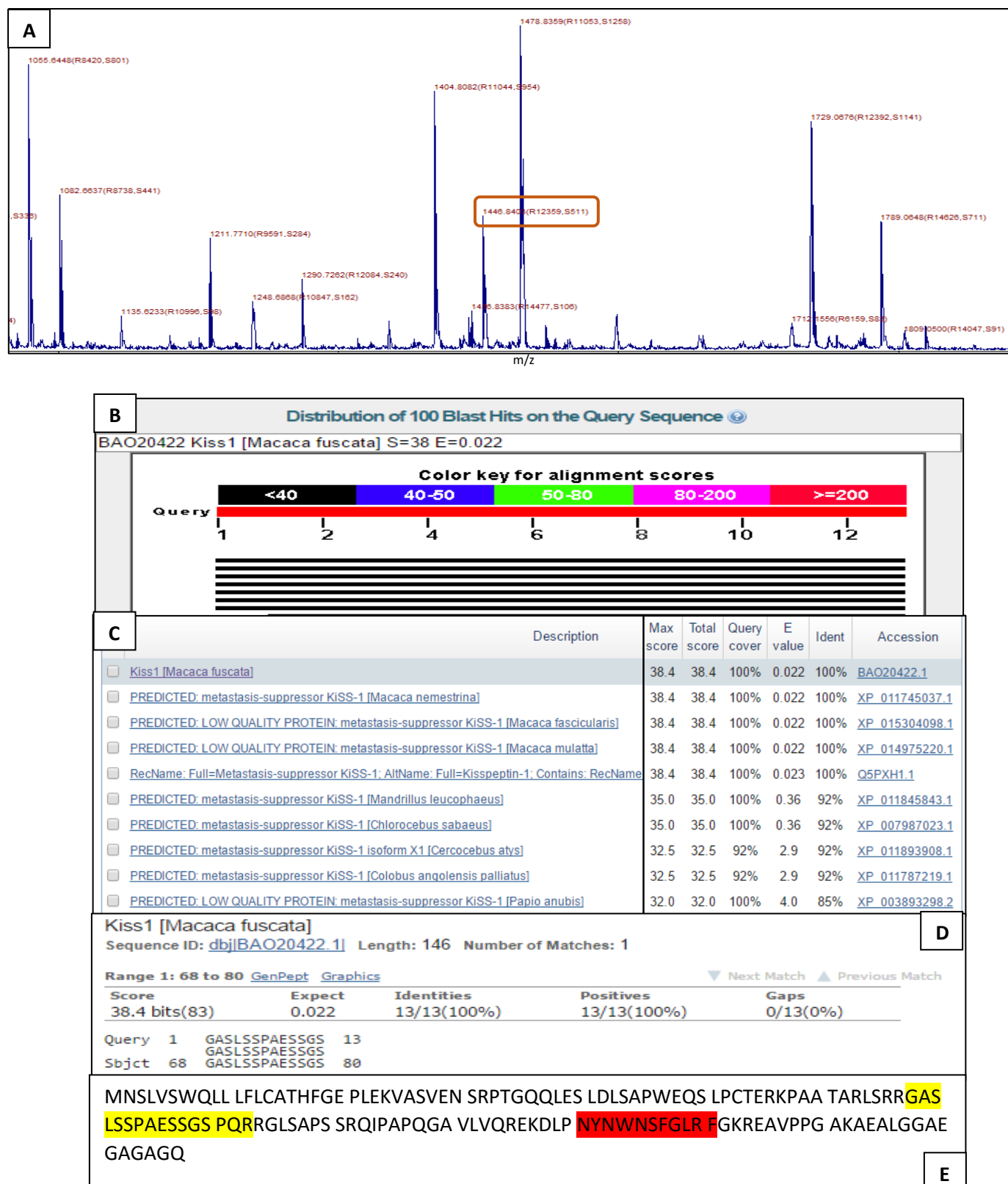


Fig.1: Identificación de Kisspeptin1 de paiche. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1446.84 correspondiente a Kisspeptin 1. B, C: Análisis de identidad por ProteinBlast (NCBI) de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1446.84. D: Análisis de homología con la secuencia de Kiss1 de *Macaca fuscata*. E: Alineamiento y ubicación del péptido identificado (amarillo) en relación al sitio activo (rojo) de Kisspeptin 1 de *Macaca fuscata*.

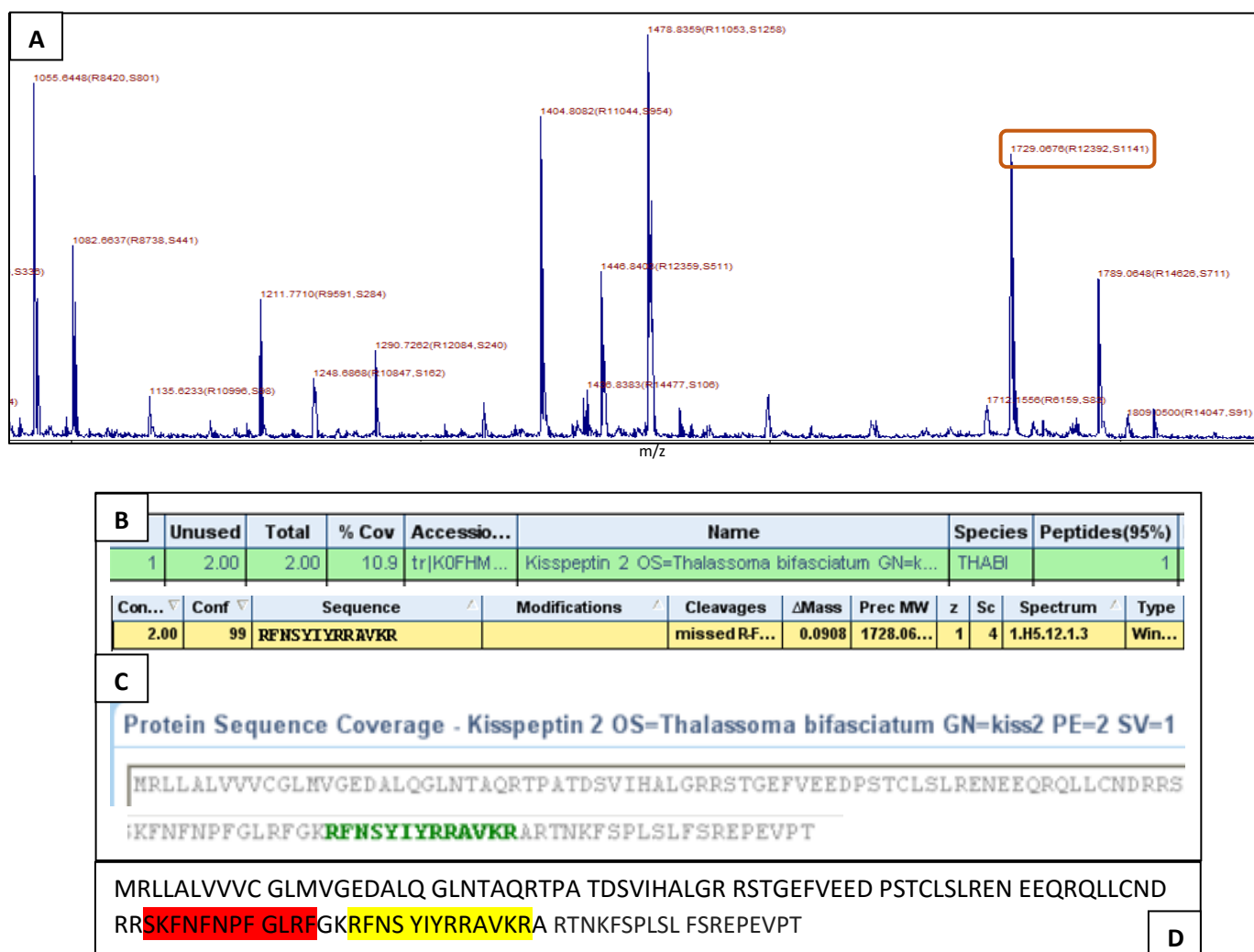


Fig.2: Identificación de Kisspeptin 2 de paiche. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1729.06 correspondiente a Kisspeptin 2. B, C: Análisis de identidad por ProteinPilot y ubicación (en verde) de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1729.06 mostrando homología con la secuencia Kiss2 de *Thalassoma bifasciatum*. D: Alineamiento y ubicación del péptido identificado (amarillo) en relación al sitio activo (rojo) de Kisspeptin 2 de *Thalassoma bifasciatum*.

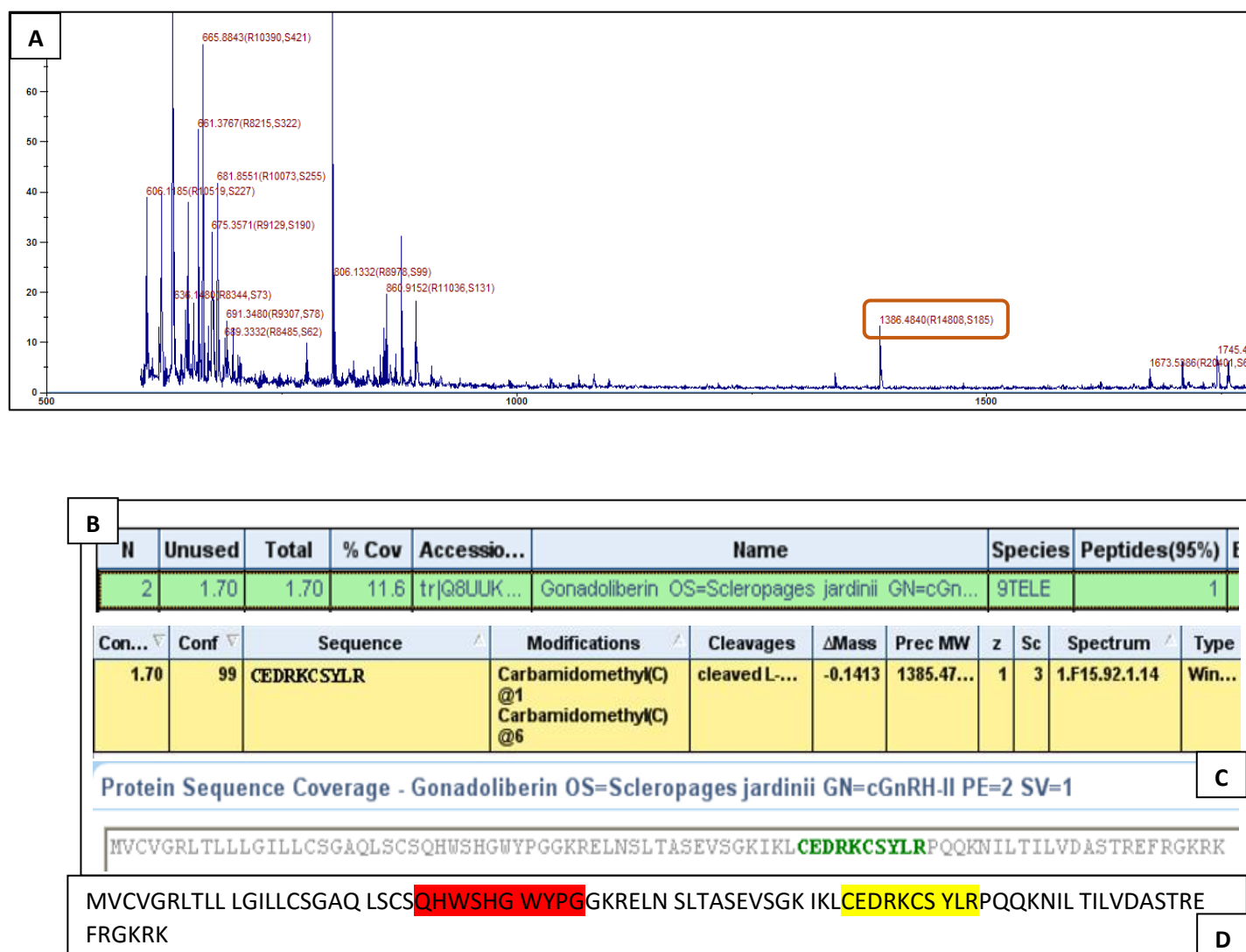


Fig.3: Identificación de gonadoliberina de paiche. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1386.48 correspondiente a Gonadoliberina (GnRH). B, C: Análisis de identidad por ProteinPilot y ubicación (en verde) de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1386.48 mostrando homología con la secuencia Gonadoliberina de *Scleropages jardinii*. D: Alineamiento y ubicación del péptido identificado (amarillo) en relación al sitio activo (rojo) de Gonadoliberina de *Scleropages jardinii*.

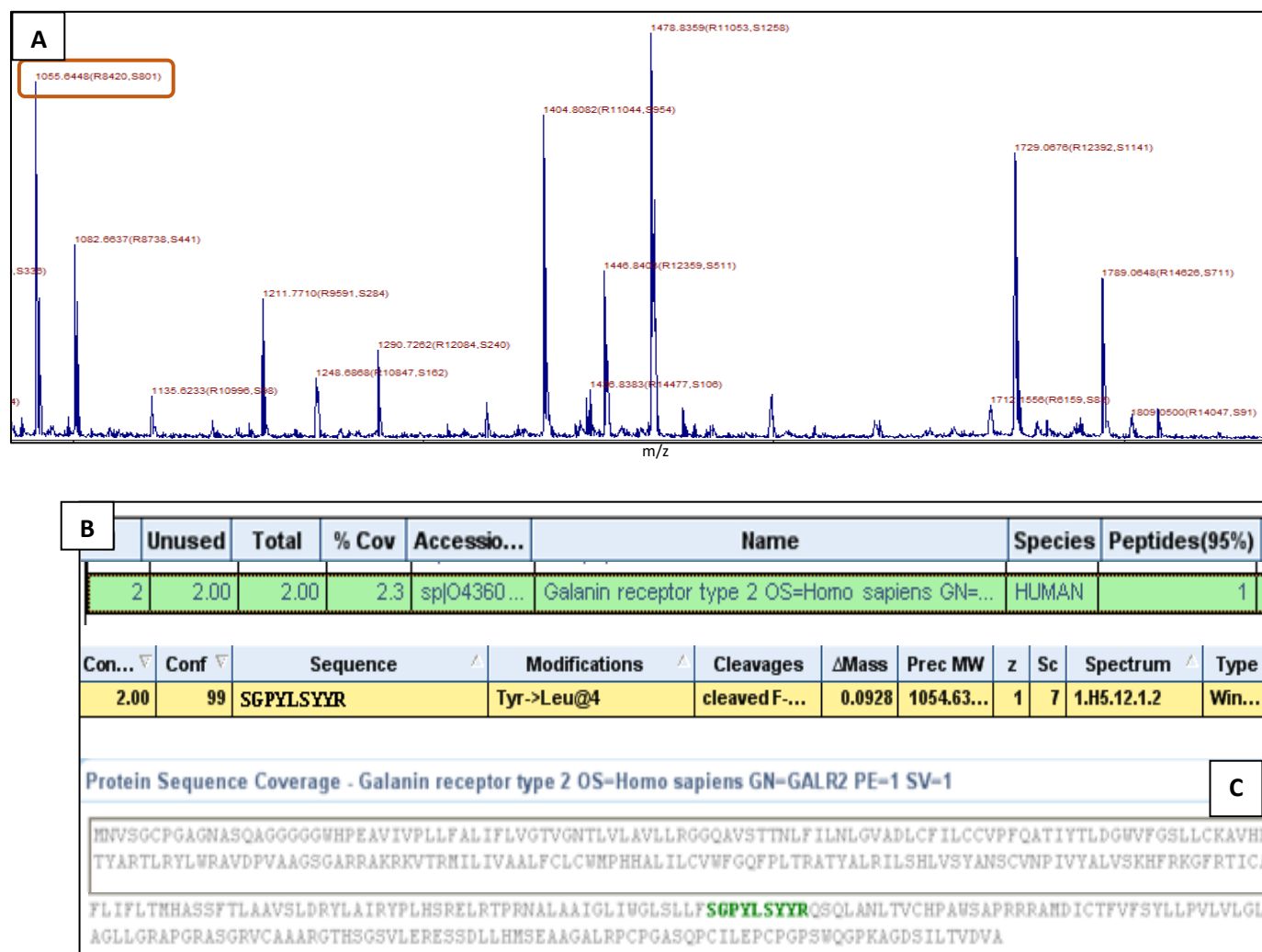
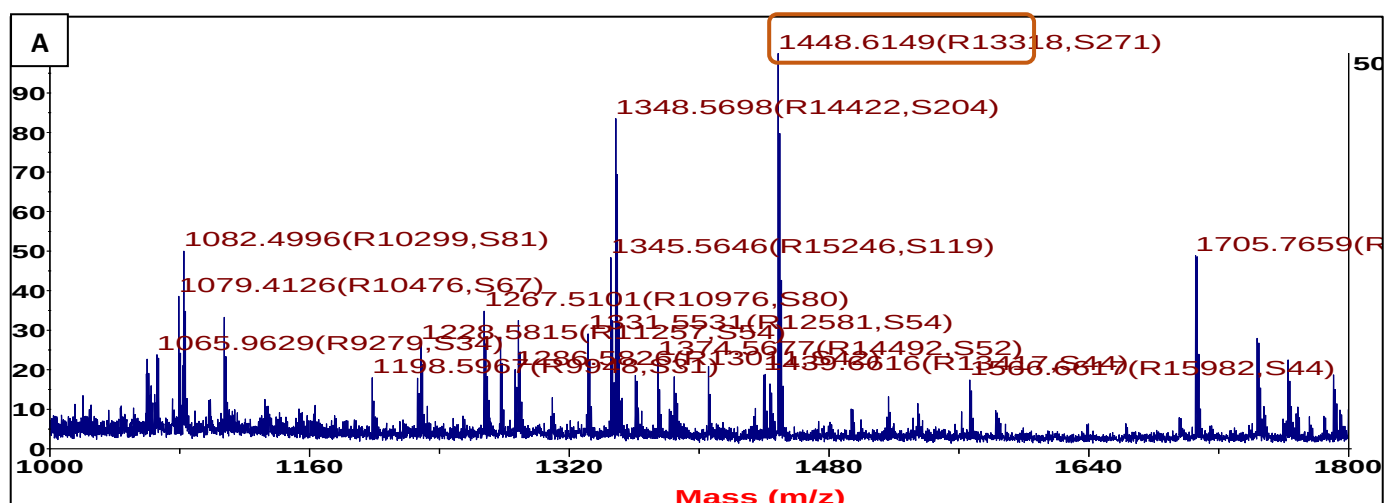


Fig.4: Identificación de Receptor de galanina tipo 2. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1055.64 correspondiente al Receptor de galanina tipo 2. B, C: Análisis de identidad por ProteinPilot y ubicación (en verde) de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1055.64 mostrando homología con la secuencia del Receptor de galanina tipo 2 de *Homo sapiens*.



B	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)	Biological Pr
1	2.00	2.00	2.4	tr Q674Y...	Recombination-activating protein 2 (Fragment) OS=Arapaima gigas GN=RAG2 PE=4 SV=1			

Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
2.00	99	RLKRGQLKLR	Leu->Gly@9	missed RL...	-0.0097	1210.76...	1	5	1.H5.12.1.15	Win...

Protein Sequence Coverage - Recombination-activating protein 2 (Fragment) OS=Arapaima gigas GN=RAG2 PE=4 SV=1

C

RLKRGQLKLR A I S F S N D S C Y L P P L R S P A V T H L D A U D A E P E C Y L I H G G R T P N N E I S G S L Y L L S Q E S R G C N R K V H L R C R E K E L V G D V P E P R Y G H T I S V V H N R G K R A G G L S L T S A I V V P S G L A H E Y I I L G G Y Q S E T Q K C L E C S S V A L D D A G I H I K P R E P P A W T G E I S H S R T W F G G S L G K G C A L I G V P S E G R S A L P E T H N F Y Q V S F K Q D G N G H A Q C N D L P E S L L V E

K R A C V L F G G R S Y R P P G E R T T E T W N S H V D C L P H V F L I D L E F G C C S A H I V P E L T D G Q S F H L A L A R E D R V Y I L G G H T H S S D S R P L R L F C L R V E L L Q G S P V I S C N T L D G N G E H D D G H Q G C S Q E S T D F E D S A P L E D S E E L Y F S R E P H E N E D S S D G E G D T Y N E E D E E S Q T G Y V V R C C L G C Q V D P N T W E P Y Y S T E L H R P A N I F C S R G E G G H V

Fig.5: Identificación de la proteína activadora de la recombinación. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1448.61 correspondiente la proteína activadora de la recombinación. B, C: Análisis de identidad por ProteinPilot y ubicación (en verde) de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1448.61 mostrando homología con la secuencia de la proteína activadora de la recombinación de paiche *Arapaima gigas*.

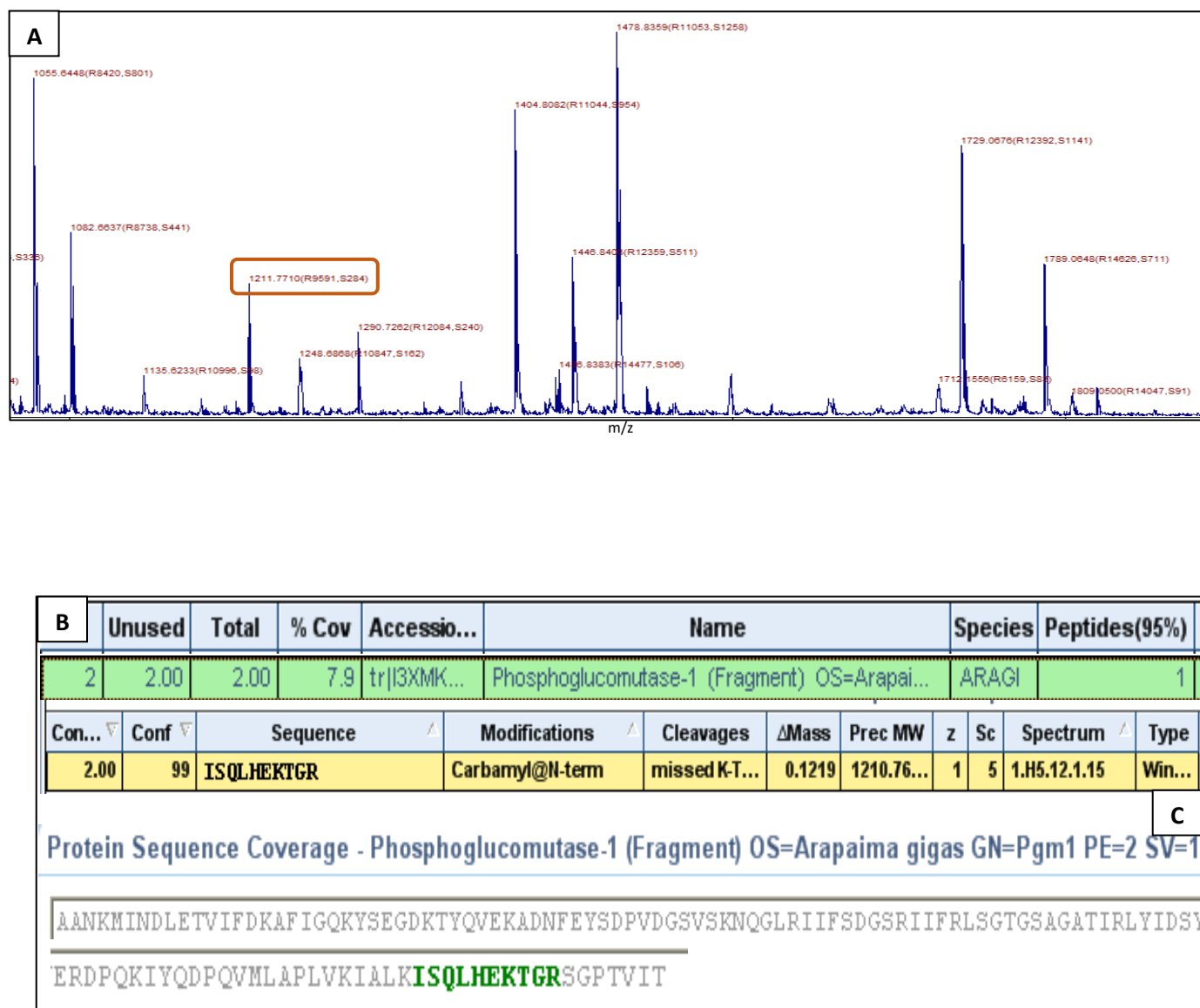
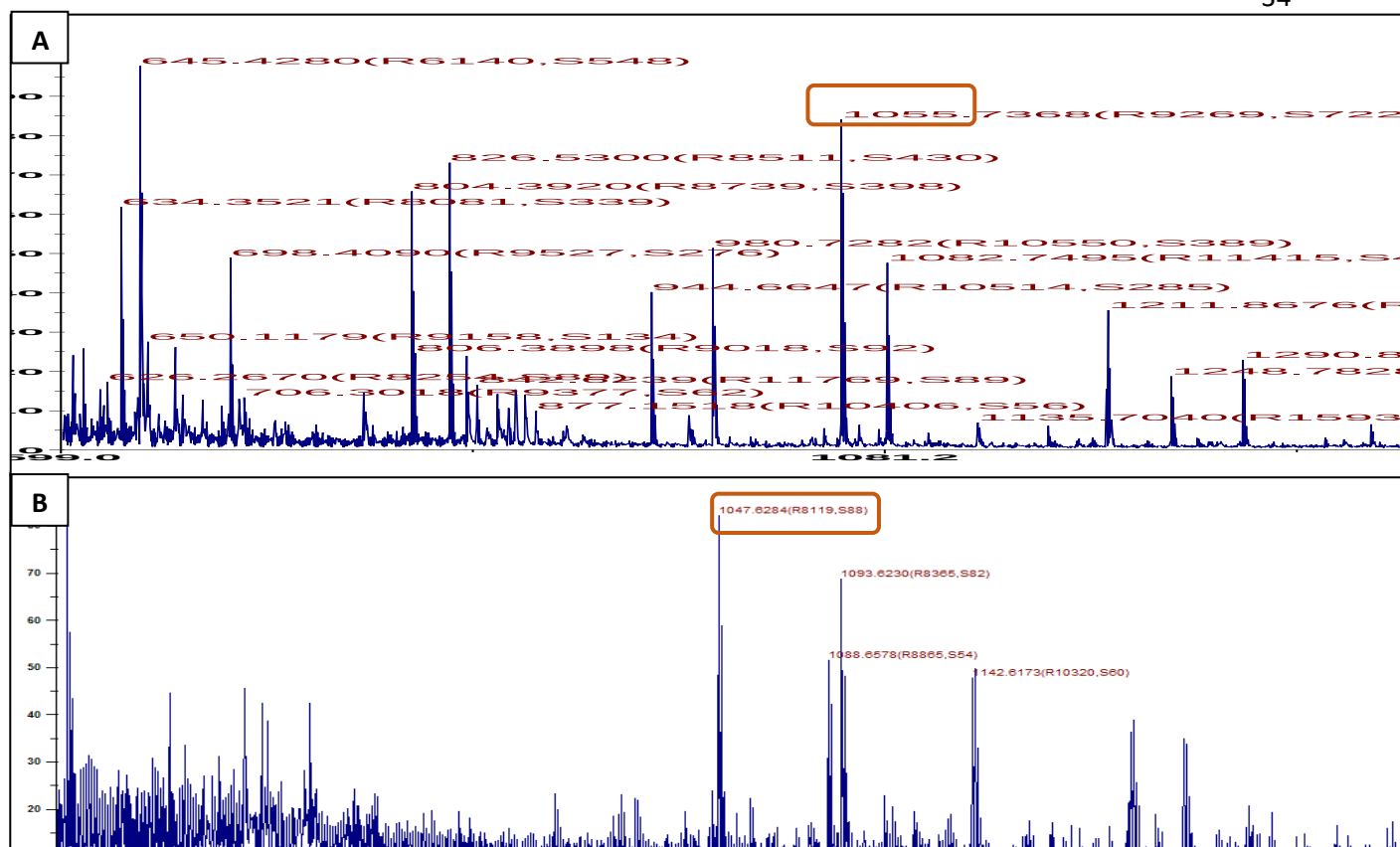


Fig.6: Identificación de la proteína Fosfoglucomutasa 1. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1211.77 correspondiente la proteína Fosfoglucomutasa 1. B, C: Análisis de identidad por ProteinPilot y ubicación (en verde) de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1211.77 mostrando homología con la secuencia de la proteína Fosfoglucomutasa 1 de paiche *Arapaima gigas*.



C

Peptides Detected

N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)
3	1.03	1.03	3.1	RRRRRtr ...	REVERSED NADH-ubiquinone oxidoreductase ...	ARAGI	1

Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
1.03	99	AVALLVPIIF		cleaved F...	-0.0416	1054.63...	1	5	1.H5.12.1.2	Win...

Protein Sequence Coverage - REVERSED NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (Fragment) OS=Arapaima gigas PE=3 SV=1

TQPPIGANALPLASHULLALTIPFNKWLHNLQDYFRPYSARIWLFWVSLISAKIHLNLASTEPLLPNLTGFLITSLTNMLINAYEALFFLAFFGGAYEV
VLSLSIALIFLIGLNMTIPYPIMPAVLNLALTALAPNLLFLFSSSTHPRIPEKTFKIGDAFFQLGFPVGPINPGKRLQNYGLIKRELLTLFAVALLVPIIFL
EVNFGSVLESEGETLDFPARNTEALTSIYHMAALPWAPILLWIKETQINFTQLAFGGTFHITSLILALSVEYSITQAVARLAGILAYNSNSAUGSLIAY
LLPNIIILIKHM

E

Peptides Detected

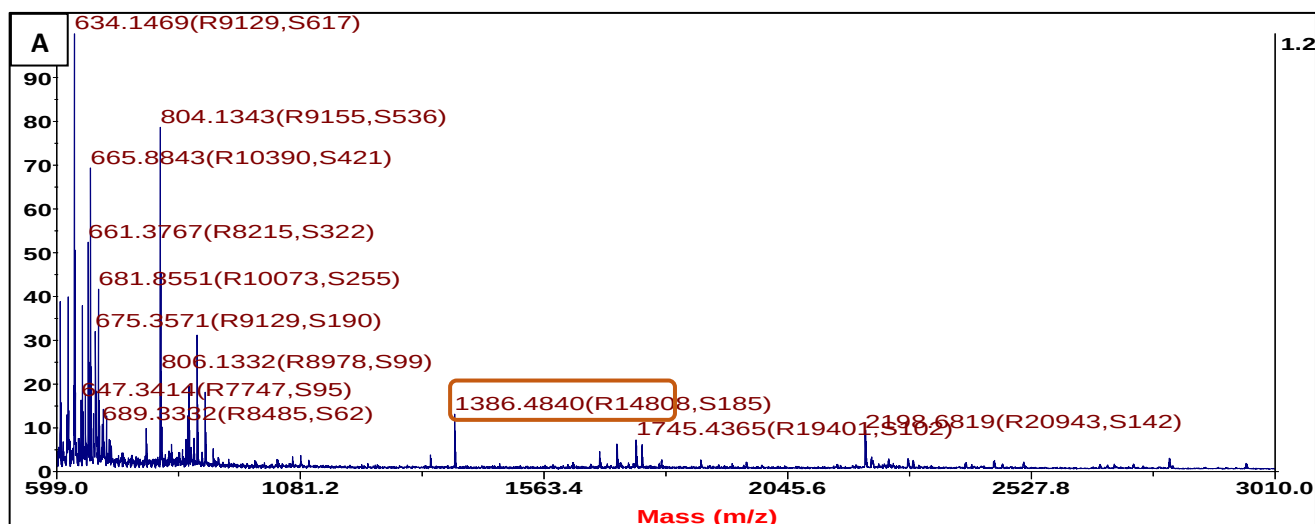
N	Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)
1	2.00	2.00	2.5	trJST6X ...	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 OS=...	9TELE	1

Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
2.00	99	SILFLWIR		cleaved L...	-0.0065	1046.62...	1	3	1.P22.76.1.5	Win...

Protein Sequence Coverage - NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 OS=Osteoglossum ferreirai GN=ND1 PE=3 SV=1

MHEWIIIVSNPLLCIVPVLLAVAFLLTLERKILGYHQLRKGPNVVGPGYLLQPIADGVKLFKEPVRPYASSPILFLITPHLALTALTNWHPPIYPV
TEGESLVSQFNVEYAGGPFALFFLAEYANILLMNTLSLIFLGLALHSPPLPEITTLNLMTKASLLSILFLWIRASYPRFRYDQLNHLHWKFLPITLAL
VIDINLGVLFILAISLAVYSILSGVWASNSKYALIGALRAVAQTISYEVSGLILLSAIILAGGFTLHTFNVAQESIWLLAPIWPLAMNVIYSTLAETNRAPFDL
LILWHTALPIATAGIPPQI

Fig.7: Identificación de la proteína NADH Ubiquinona oxidoreductasa. A,B: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observan los espectros m/z 1047.62 y 1055.62 correspondientes la proteína NADH Ubiquinona oxidoreductasa. C-F: Análisis de identidad por ProteinPilot y ubicación (en verde) de las secuencias obtenidas por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1047.62 y 1055.62 mostrando homología con la secuencia de la proteína NADH Ubiquinona oxidoreductasa de paiche *Arapaima gigas* y de *Osteoglossum ferreirai*.



B

Unused	Total	% Cov	Accessio...	Name	Species	Peptides(95%)
3	0.53	0.53	7.8	trjQ9PV2...	RAG1 protein (Fragment) OS=Osteoglossum sp...	9TELE

Con...	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
0.53	99	QEMDTHMGHLR	Oxidation(M)@3 Oxidation(M)@7	cleaved L-...	-0.1049	1385.47...	1	3	1.F15.92.1.14	Win...

C

Protein Sequence Coverage - RAG1 protein (Fragment) OS=Osteoglossum sp. GN=RAG1 PE=4 SV=1

KFSEWKFKLFRVKSMEKAPLPGLPAPAPPPAPQSELDVPPGSPPTASVMRLCLGGKSKESVESAVARVDRKLQEMDTHMGHLRC

CLCRLCGVALRKVKGGAEHNVQGPLDDSSSSALRRMGCKAKTWPEVVLKVFQVDV

Fig.8: Identificación de la proteína RAG1. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1386.48 correspondiente a la proteína RAG 1. B, C: Análisis de identidad por ProteinPilot y ubicación (en verde) de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1386.48 mostrando homología con la secuencia de la proteína RAG 1 de *Osteoglossum sp.*

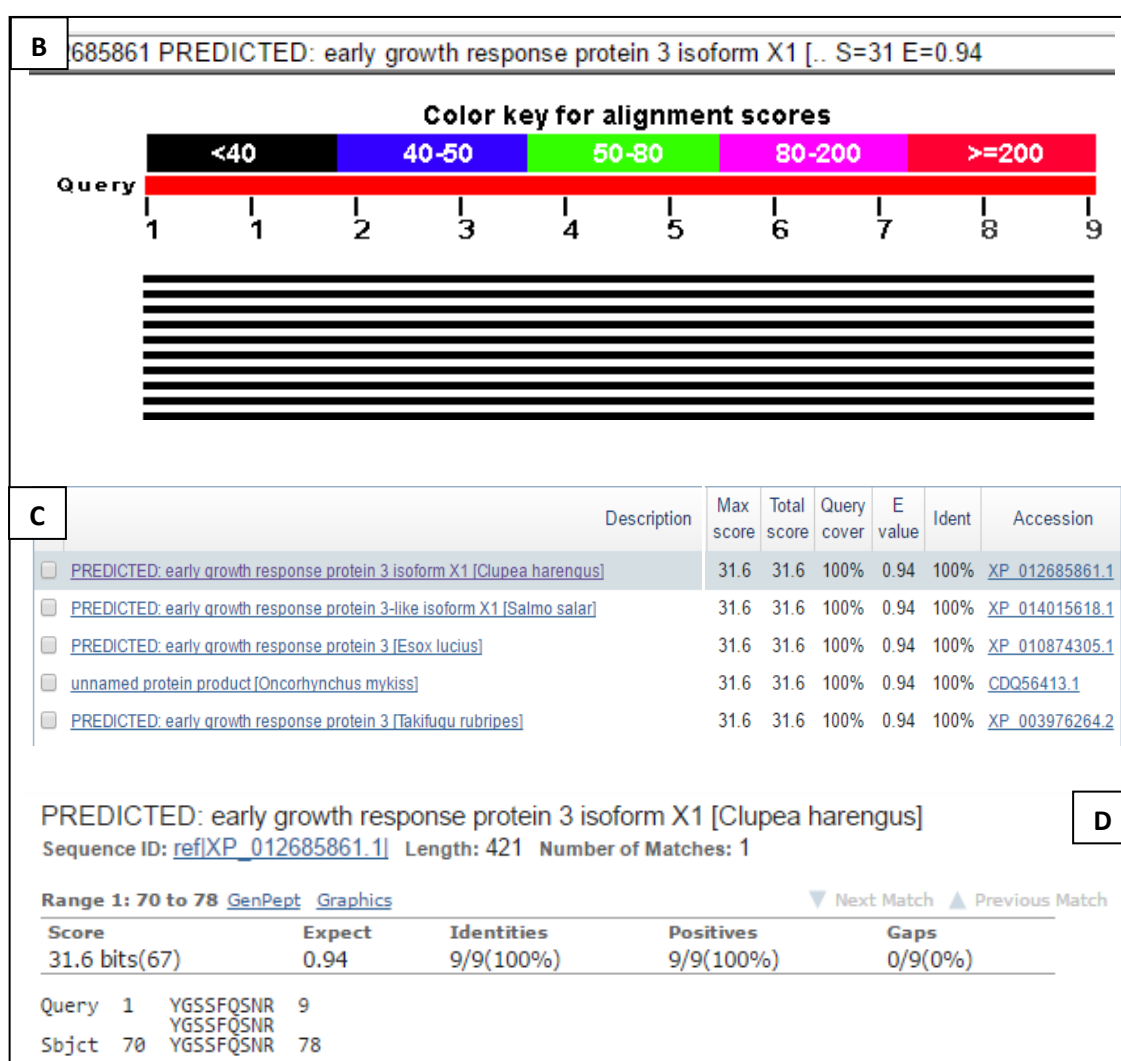
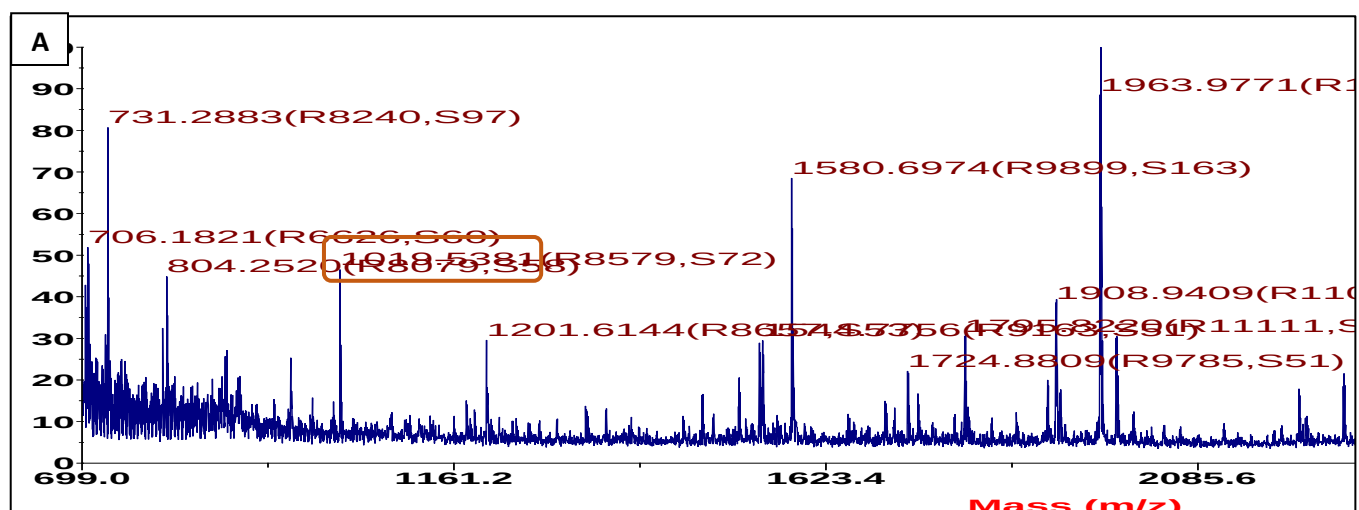


Fig.9: Identificación de la proteína de respuesta al crecimiento temprano. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de cerebro de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1019.53 correspondiente a la proteína de respuesta al crecimiento temprano. B-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1019.53 mostrando homología con la secuencia de la proteína de respuesta al crecimiento temprano de peces.

Tabla 1: péptidos asociados a la identificación de neuropéptidos asociados a la reproducción de paiche

PROTEINA	SECUENCIA	ESPECIE	MW (P)*	MUESTRA	FUNCIÓN
Kisspeptin 1	GASLSSPAESSGSPQR	<i>Macaca fuscata</i>	1445.674	Cerebro	endocrino
Kisspeptin 2	RFNSYIYRRAVKR	<i>Thalassoma bifasciatum</i>	1728.06	Cerebro	endocrino
Gonadoliberin (GnRH)	CEDRKCSYLR	<i>Sclerophages jardinii</i>	1385.47	Cerebro	endocrino
Receptor de galanin 2	SGPYLSYYR	<i>Homo sapiens</i>	1054.63	Cerebro	endocrino
Proteína 2 activadora de la recombinación	RLKRGQLKLR TNPFSSESMENLR	<i>Arapaima gigas</i>	1210.76 1447.651	Cerebro	endocrino
Fosfoglucomutasa 1	ISQLHEKTGR	<i>Arapaima gigas</i>	1210.76	Cerebro	endocrino
Ubiquinona oxidoreductasa NADH, cadena 1	AVALLVPIIF SILFLWIR	<i>Arapaima gigas</i>	1054.63 1046.62	Cerebro	endocrino
RAG 1 protein	QEMDTHMGHLR	<i>Osteoglossum sp.</i>	1385.47	Cerebro	endocrino
P. de respuesta al crecimiento temprano	YGSSFQSNR	Peces (varios)	1018.543	Cerebro	endocrino

(*) Peso molecular asociado al ion precursor (P).

4.2 Identificación de proteínas asociadas a patógenos:

En el diagnóstico de patógenos (Tabla 2), la aplicación de la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF permitió la identificación de una proteína de membrana del flagelado *Spironucleus salmonicida* (Familia Hexamitidae) (Fig. 10), a través del ProteinBlast y el cual fue confirmado posteriormente por observación microscópica directa. No se tomaron en cuenta péptidos asociados a otros patógenos con valores de error altos o valores de confianza menores al 90%.

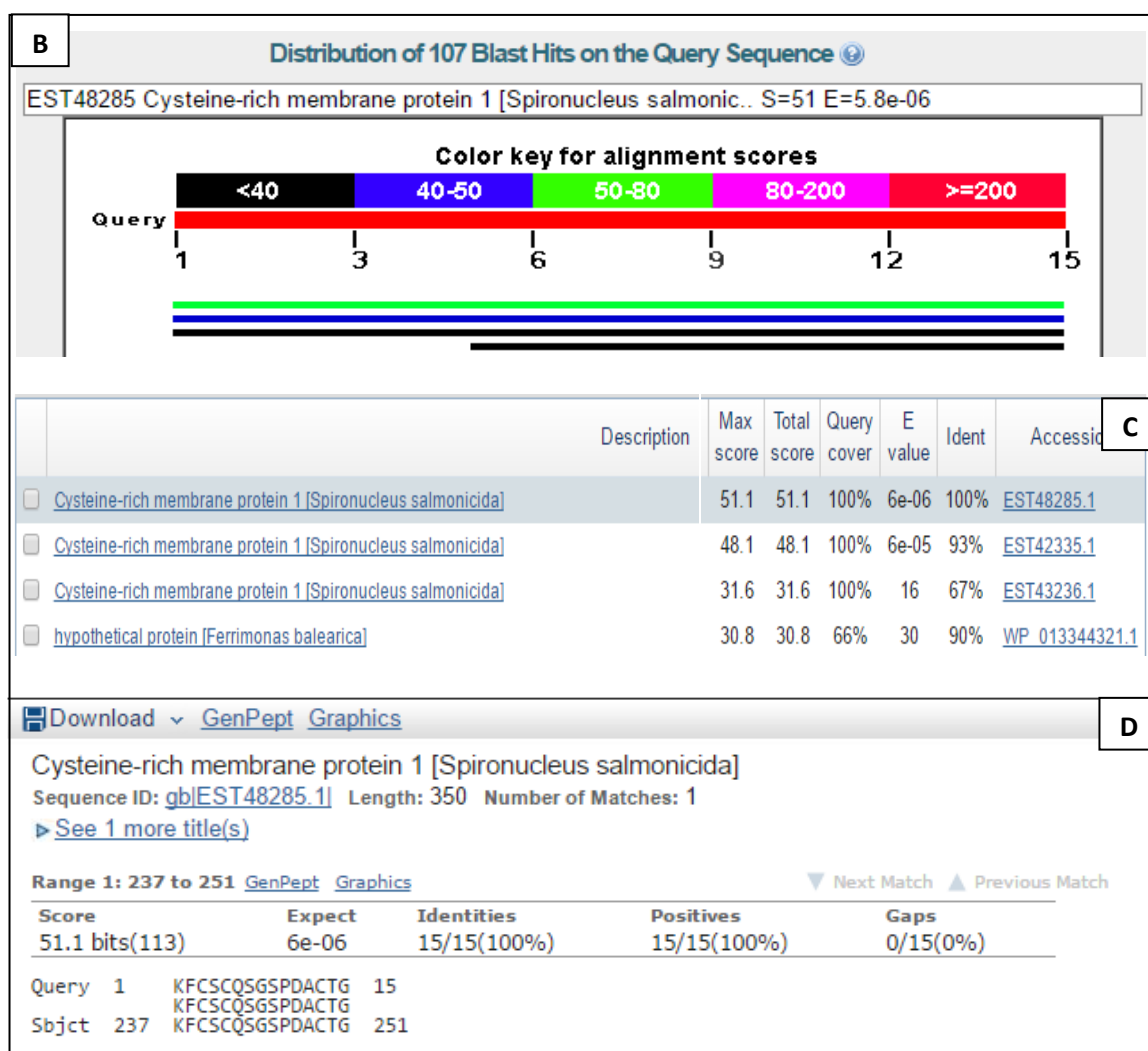
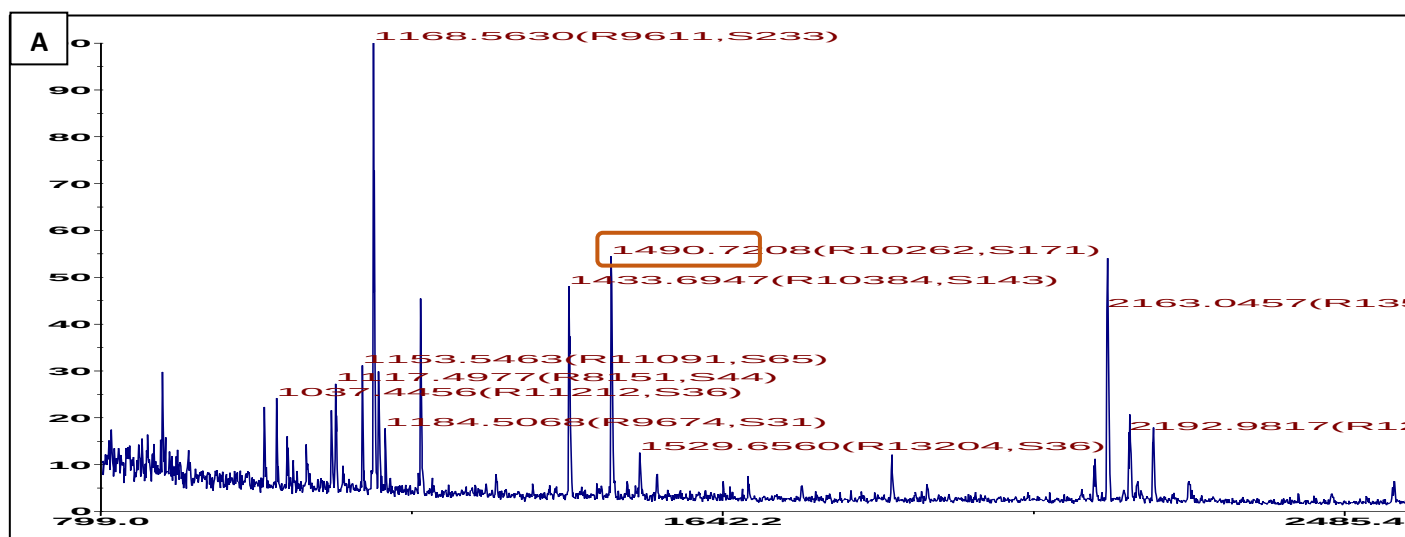


Fig.10: Identificación de la proteína de membrana 1 rica en cisteína. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de mucus de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1490.72 correspondiente a la proteína de membrana 1 rica en cisteína. B-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1490.72 mostrando homología con la secuencia de la proteína de membrana 1 rica en cisteína del patógeno de peces *Spironucleus salmonicida*.

Tabla 2: péptido asociados a la identificación de patógenos

PROTEINA	SECUENCIA	ESPECIE	MW (P)*	MUESTRA	FUNCIÓN
proteína 1 de membrana rica en cis	KFCSCQSGSPD ACTG	<i>Spironucleus salmonicida</i>	1489.5636	Mucus	diagnóstico

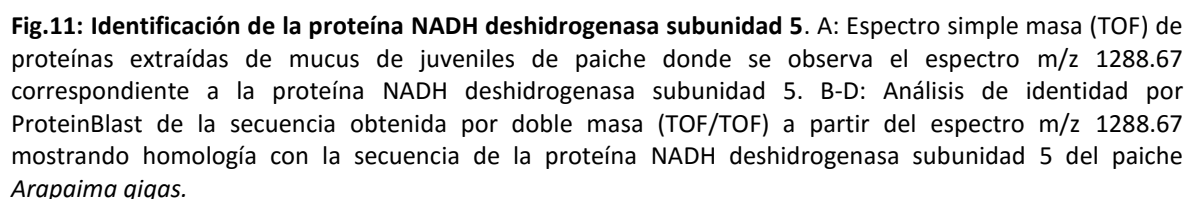
(*) Peso molecular asociado al ion precursor (P).

4.3 Identificación de proteínas asociadas a la inmunidad y estrés:

Finalmente, la aplicación de la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF permitió la identificación de proteínas asociadas a la inmunidad y metabolismo de peces a partir de extractos de proteínas del mucus de la piel y suero (Tabla 3). No se muestran los péptidos asociados a la hemoglobina debido a su recurrencia y abundancia en las muestras de suero y plasma.

Las proteínas NADH (Fig. 11) y Citocromo c oxidasa (Fig. 14) pertenecieron a paiche, mientras que Hemopexin (Fig. 16) y HSP (Fig. 18) mostraron homología con los géneros *Poecilia* y *Carassius* respectivamente. Estas proteínas se asociaron estrechamente al estrés hipóxico generado como consecuencia del manejo de los individuos previo a la toma de muestra. SOX11 (Fig. 12), un dominio Ig (Fig. 15), folistatin Ig2 (Fig.17), una molécula de adhesión funcional (JAM) (Fig. 18) y un miembro 10 de inmunoglobulina (Fig. 19) se asociaron a la condición inmune de los individuos. Para el análisis de las secuencias de péptidos se tomaron en cuenta alineamientos con bases de datos de proteínas de peces contenidas en ProteinBlast, UniprotKB y ProteinPilot.

Las proteínas de paiche asociadas a la inmunidad y al estrés identificadas en el presente estudio fueron:



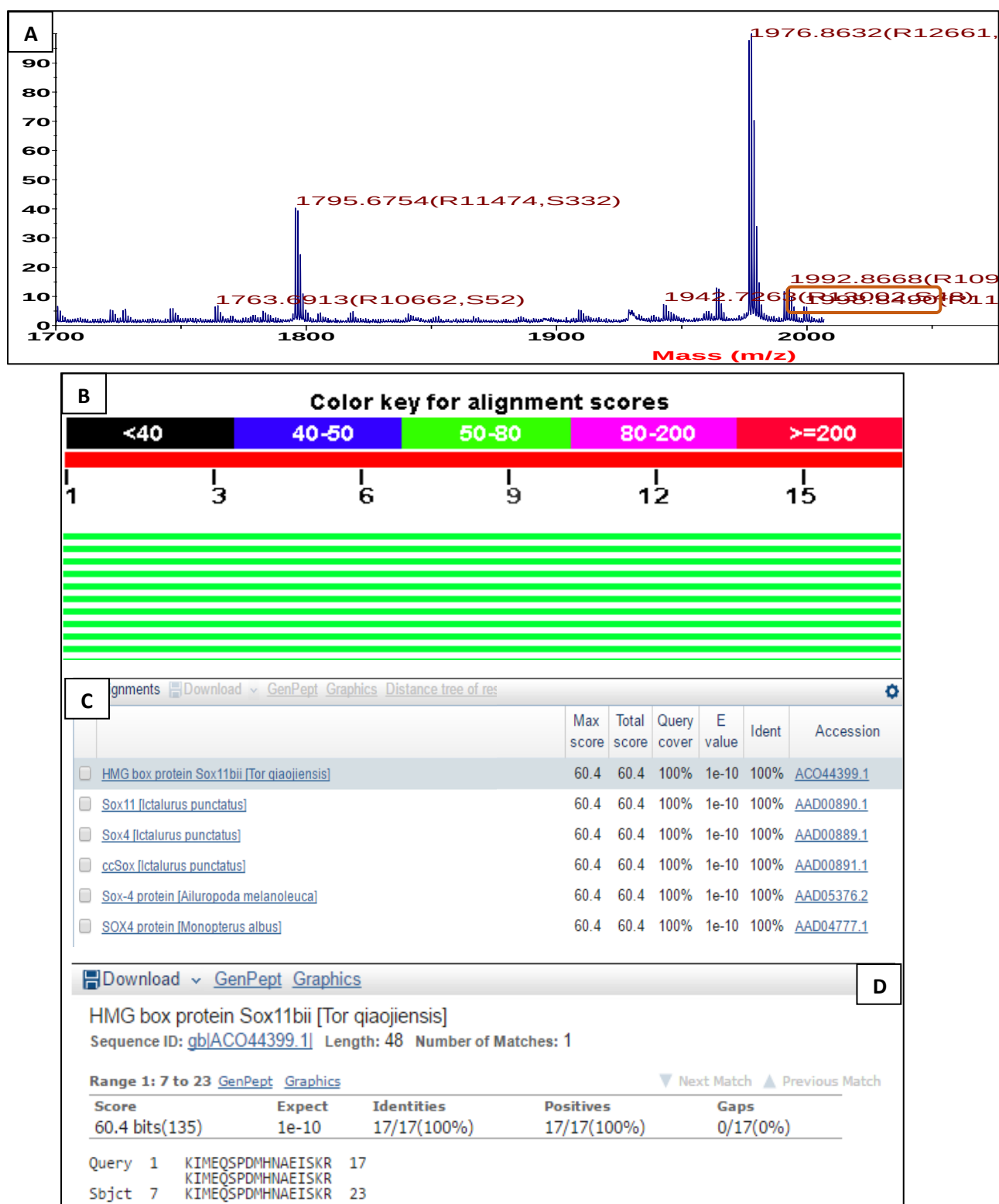
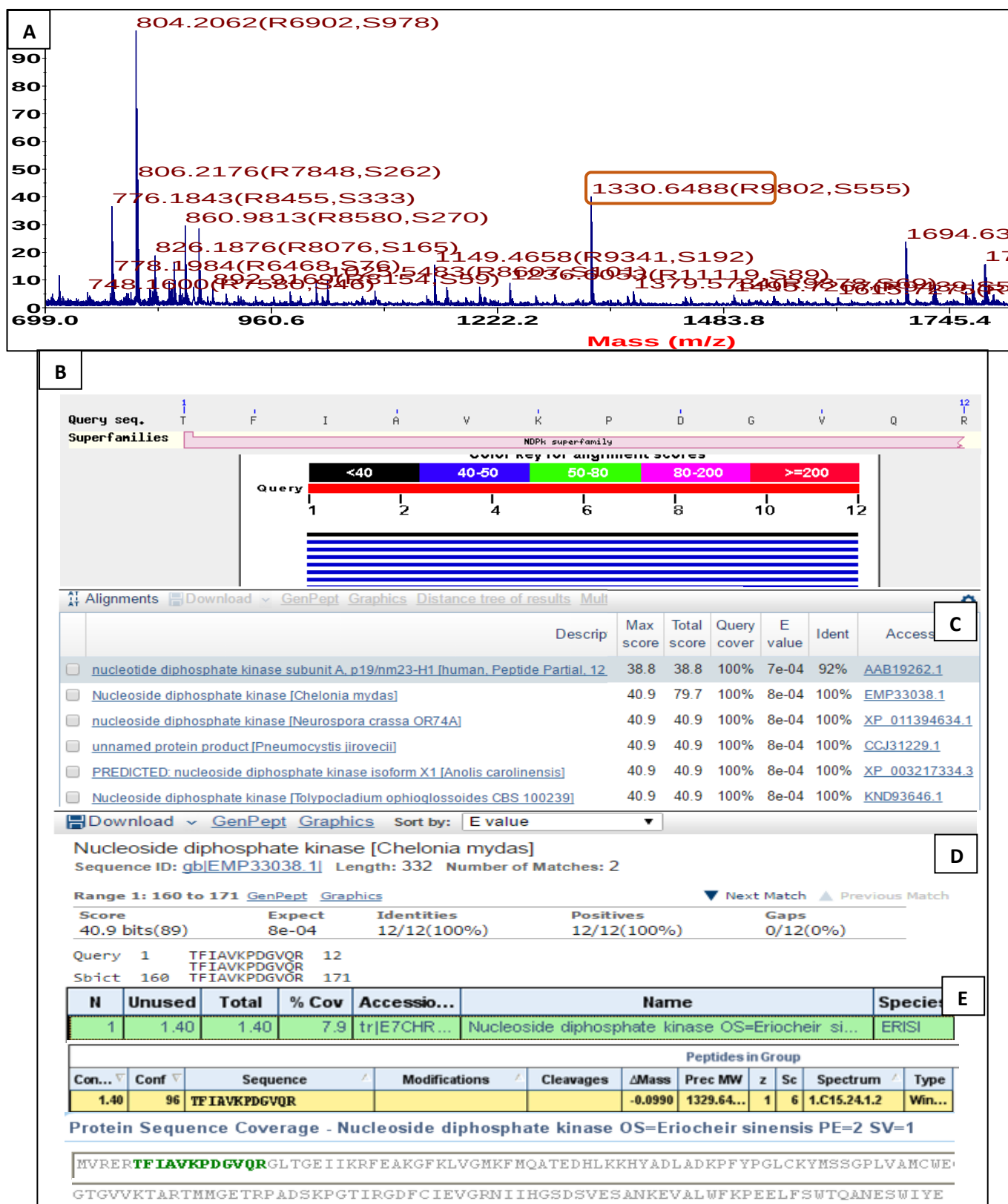


Fig.12: Identificación de la proteína Sox11 de la caja HMG. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas de mucus de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1989.9612 correspondiente a la proteína Sox11 de la caja HMG. B-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1989.9612 mostrando homología con la secuencia de la proteína Sox11 de la caja HMG de *Tor qiaojiensis*.



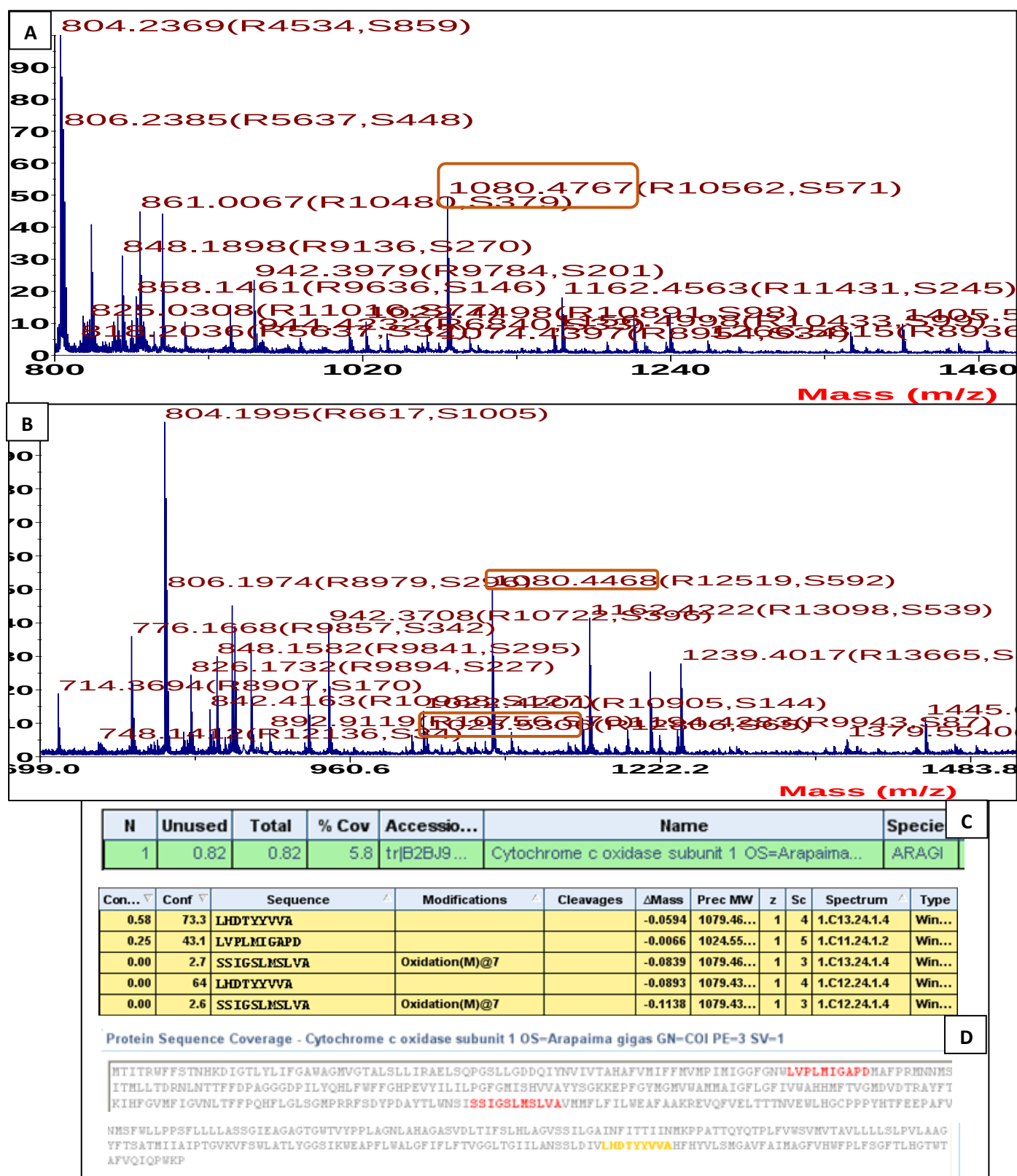


Fig.14: Identificación de la proteína Citocromo oxidasa C subunidad 1. A, B: Espectros simple masa (TOF) de proteínas extraídas de mucus de juveniles de paiche donde se observan los espectros m/z 1080.47; 1080.44 y 1025.53 correspondientes a la proteína Citocromo oxidasa subunidad 1. C-D: Análisis de identidad por ProteinPilot de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir de los espectros m/z 1080.47; 1080.44 y 1025.53, mostrando homología con la secuencia de la proteína Citocromo oxidasa subunidad 1 de paiche *Arapaima gigas*.

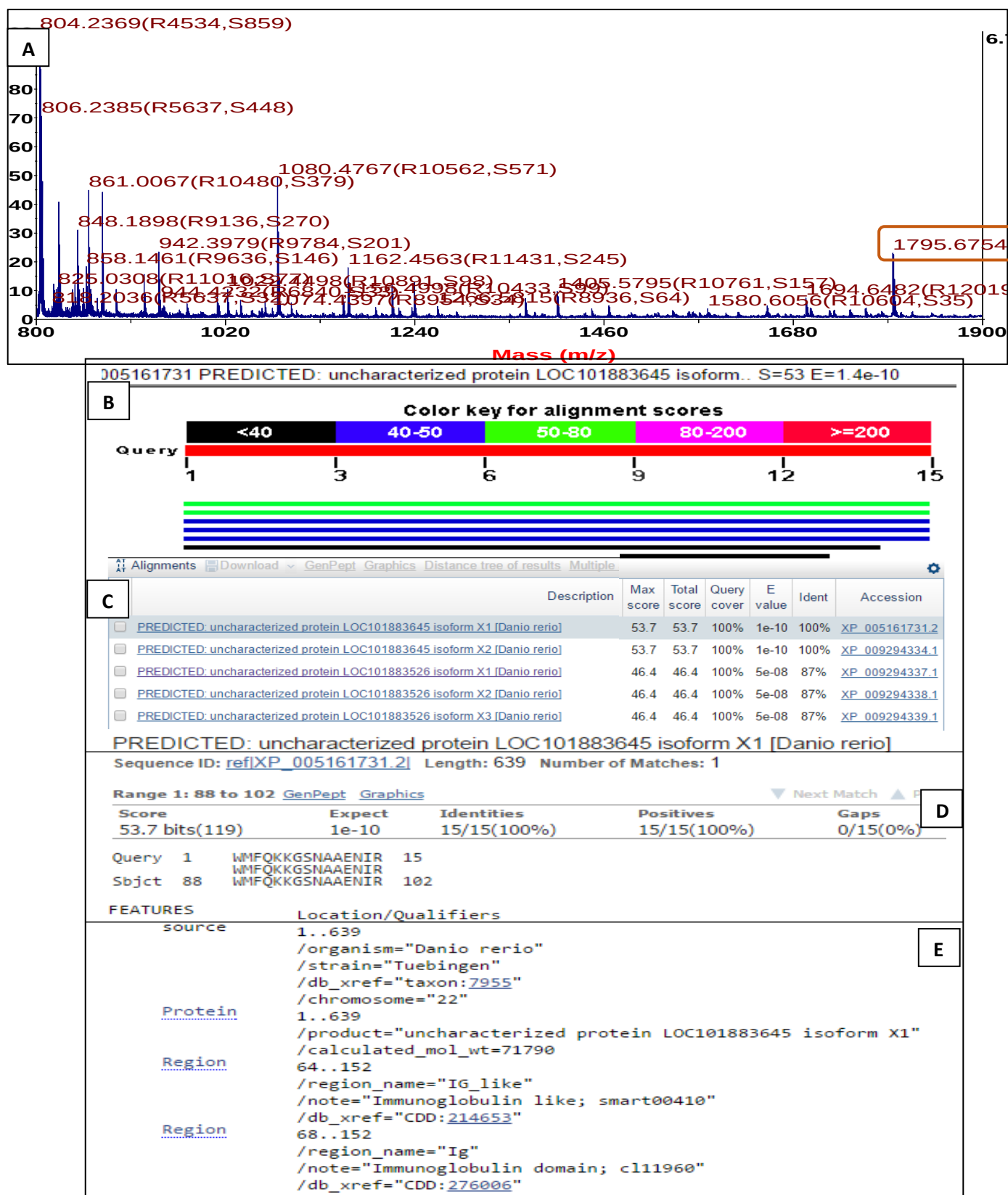


Fig.15: Identificación de una proteína no caracterizada con dominio Inmunoglobulina. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas del suero de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1795.67 correspondiente a una proteína no caracterizada con dominio Inmunoglobulina. C-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1795.67, mostrando homología con la secuencia de una proteína no caracterizada con dominio Inmunoglobulina de paiche *Danio rerio*. E: características del dominio Ig en la proteína no caracterizada de *Danio rerio*.

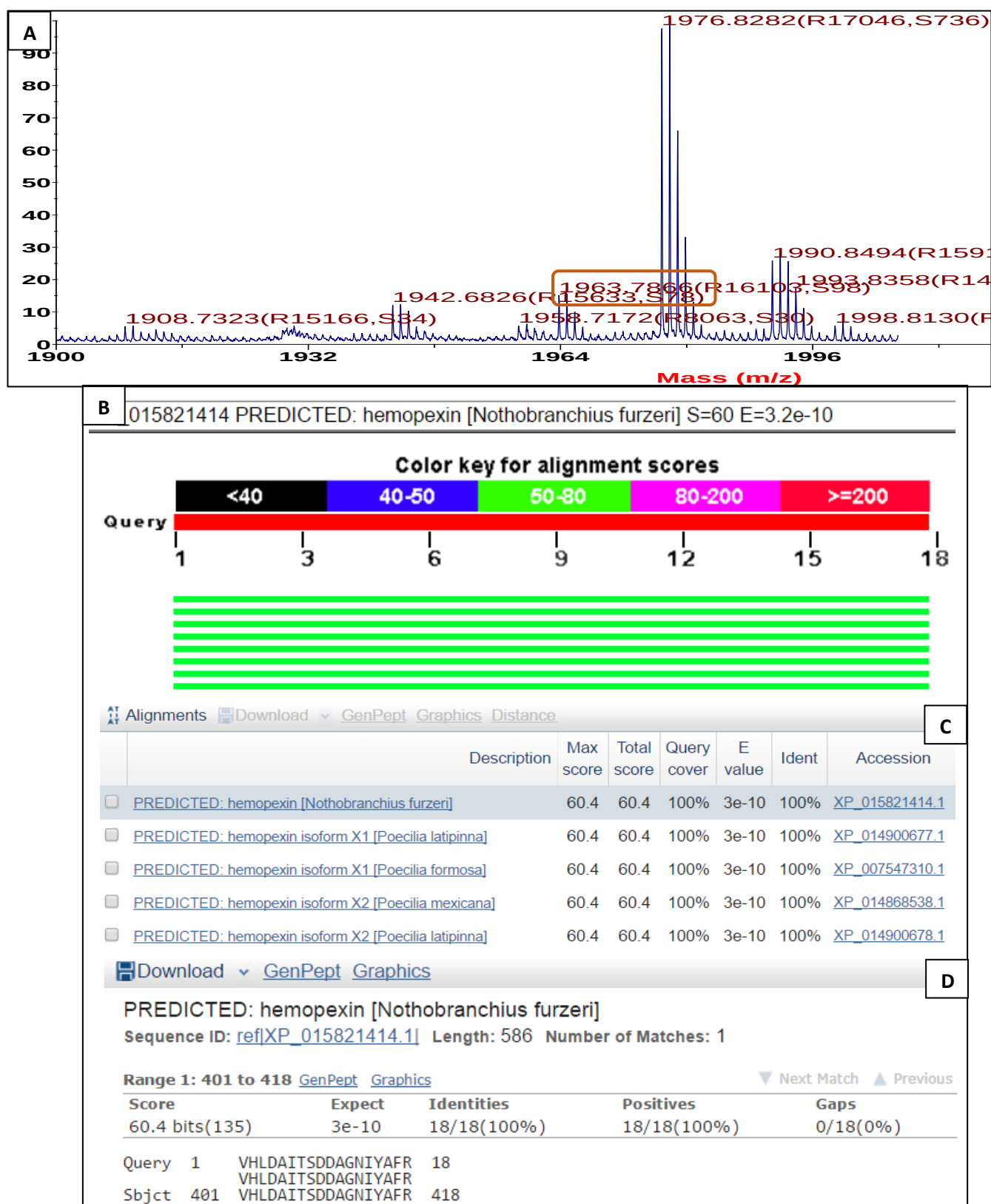


Fig.16: Identificación de la proteína hemopexin. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas del suero de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1963.78 correspondiente a la proteína hemopexin. C-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1963.78, mostrando homología con la secuencia de hemopexin de paiche *Nothobranchius furzeri*.

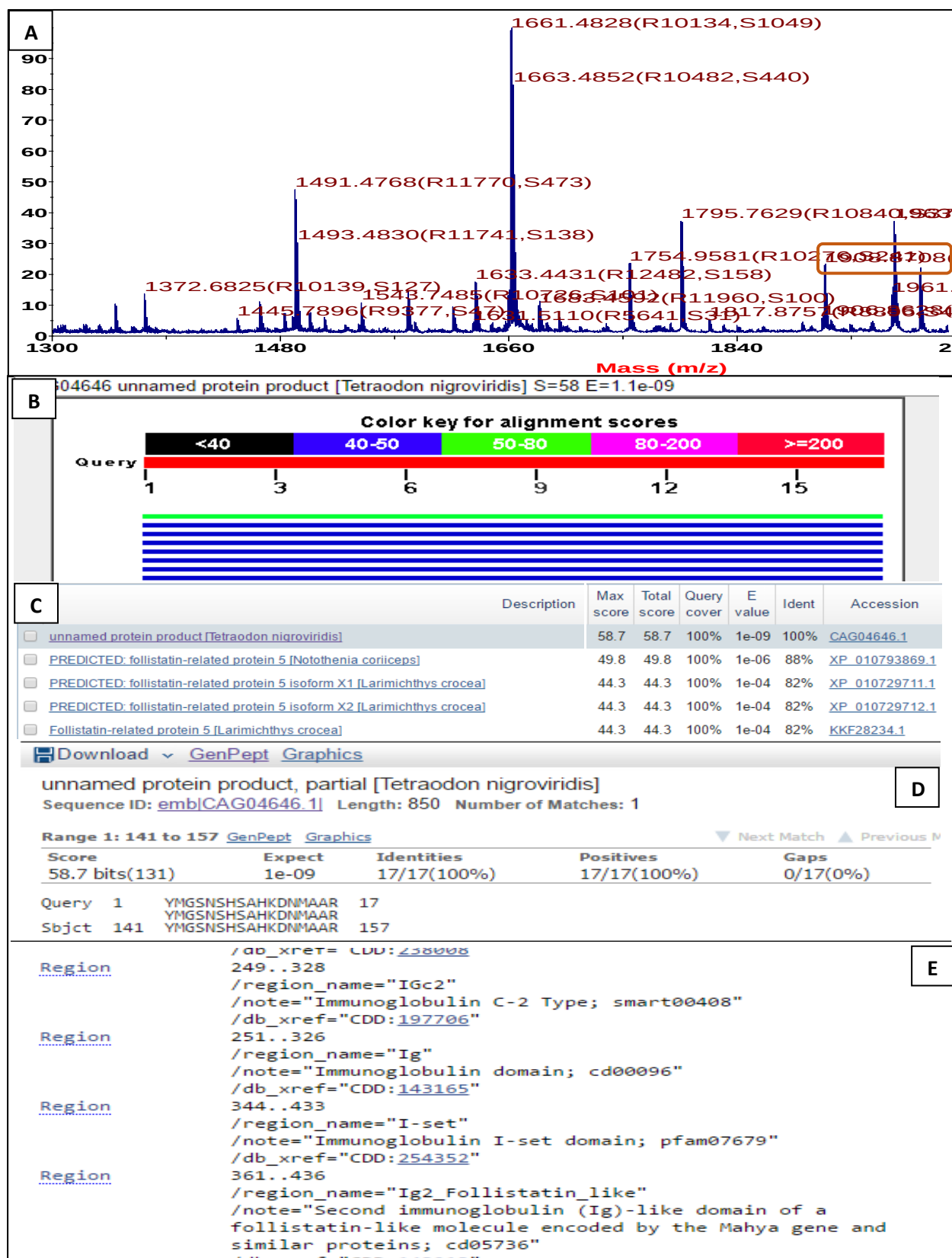


Fig.17: Identificación de una proteína no caracterizada con dominio Follistatin-Ig2. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas del suero de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1908.87 correspondiente a una proteína no caracterizada con dominio follistatin-Ig2. C-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1908.87, mostrando homología con la secuencia de una proteína no caracterizada con dominio Follistatin-Ig2 de *Tetraodon nigroviridis*. E: características del dominio Ig en la proteína no caracterizada de *T. nigroviridis*.

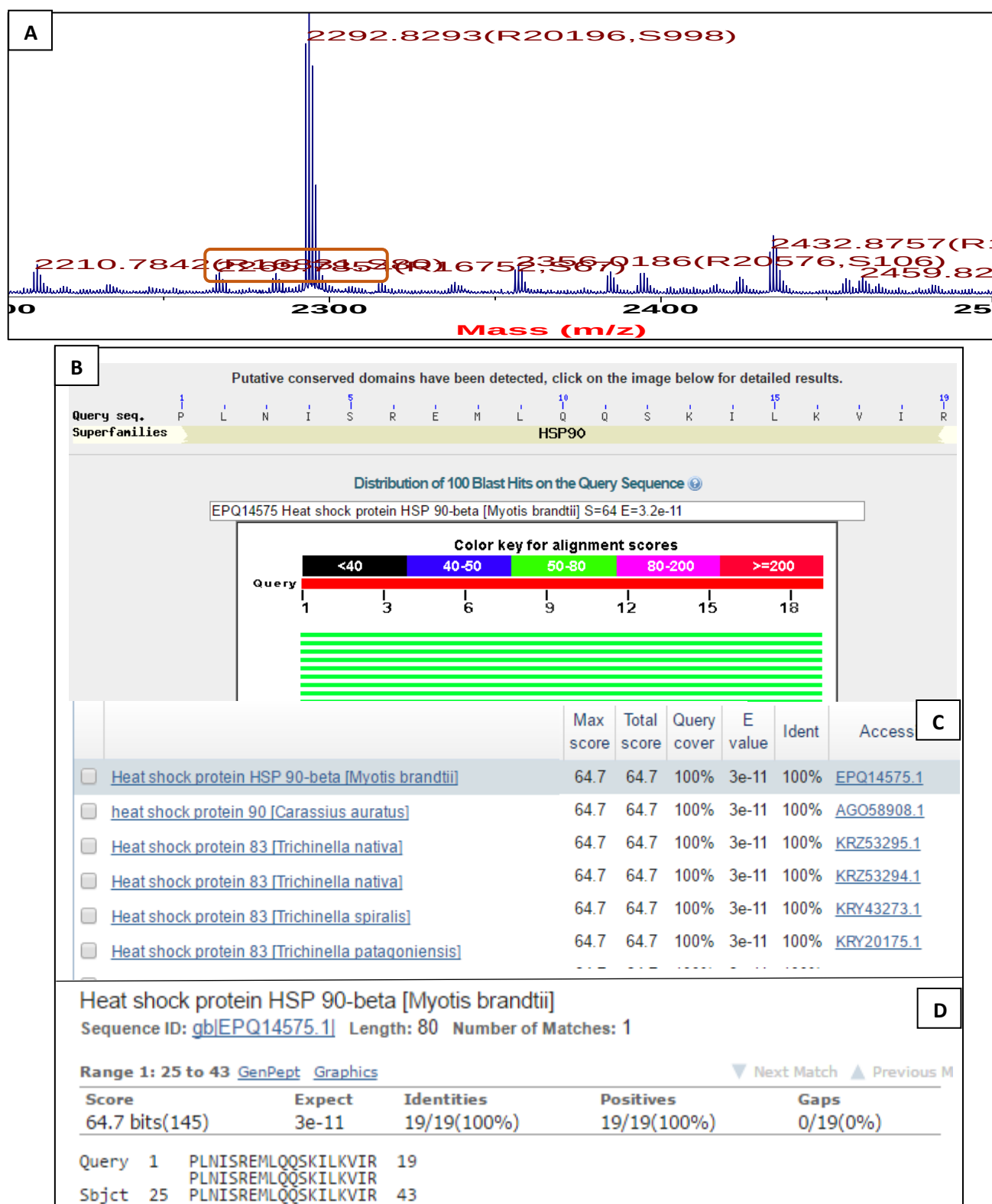


Fig.18: Identificación de la proteína de la superfamilia HSP 90. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas del suero de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 2265.78 correspondiente a la proteína HSP90. C-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 2265.78, mostrando homología con la secuencia de HSP90 de *Myotis brandtii*.

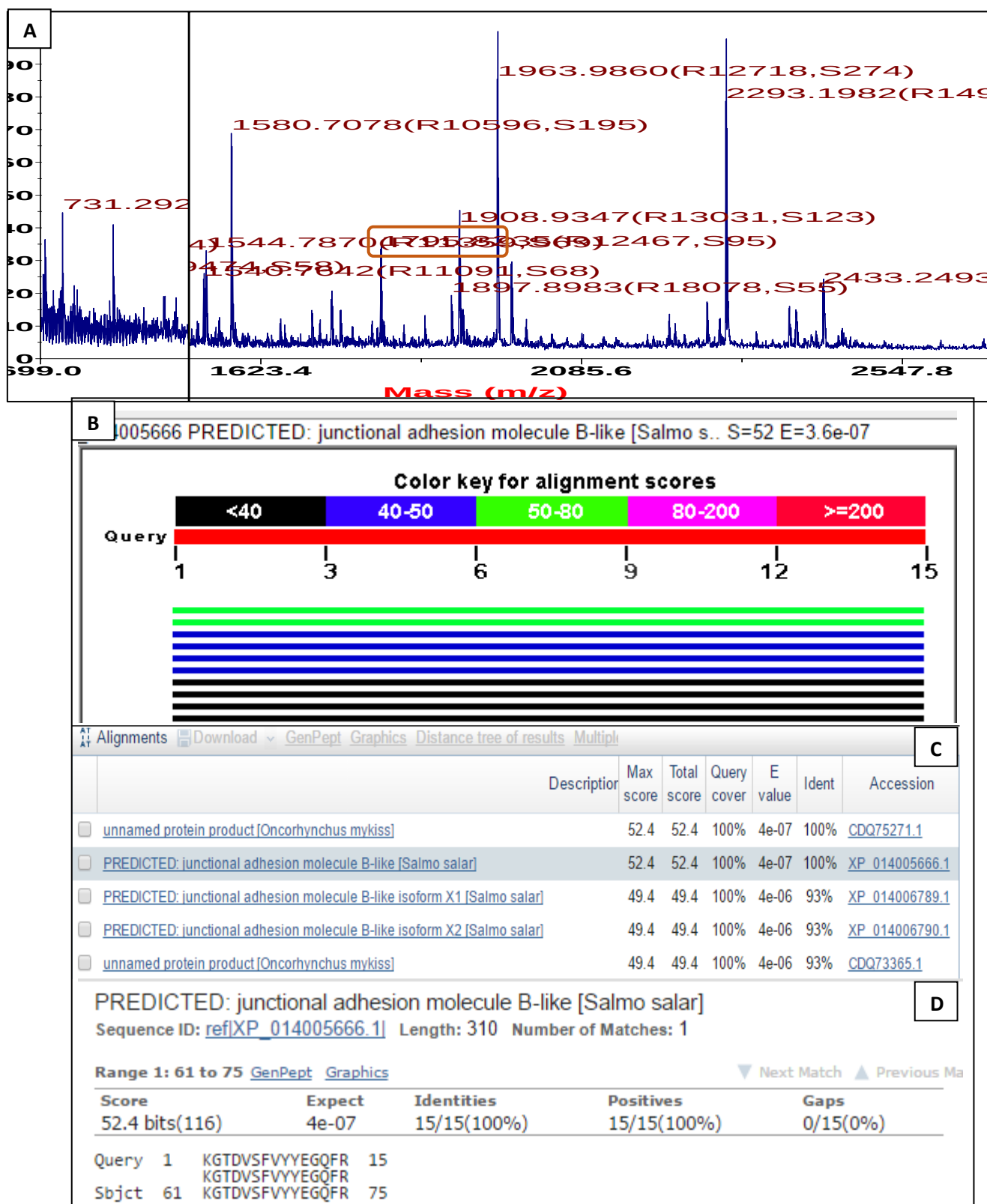


Fig.19: Identificación de la proteína JAM. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas del suero de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1795.82 correspondiente a la proteína JAM-like B. C-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1795.82, mostrando homología con la secuencia JAM-like B de *Salmo salar*.

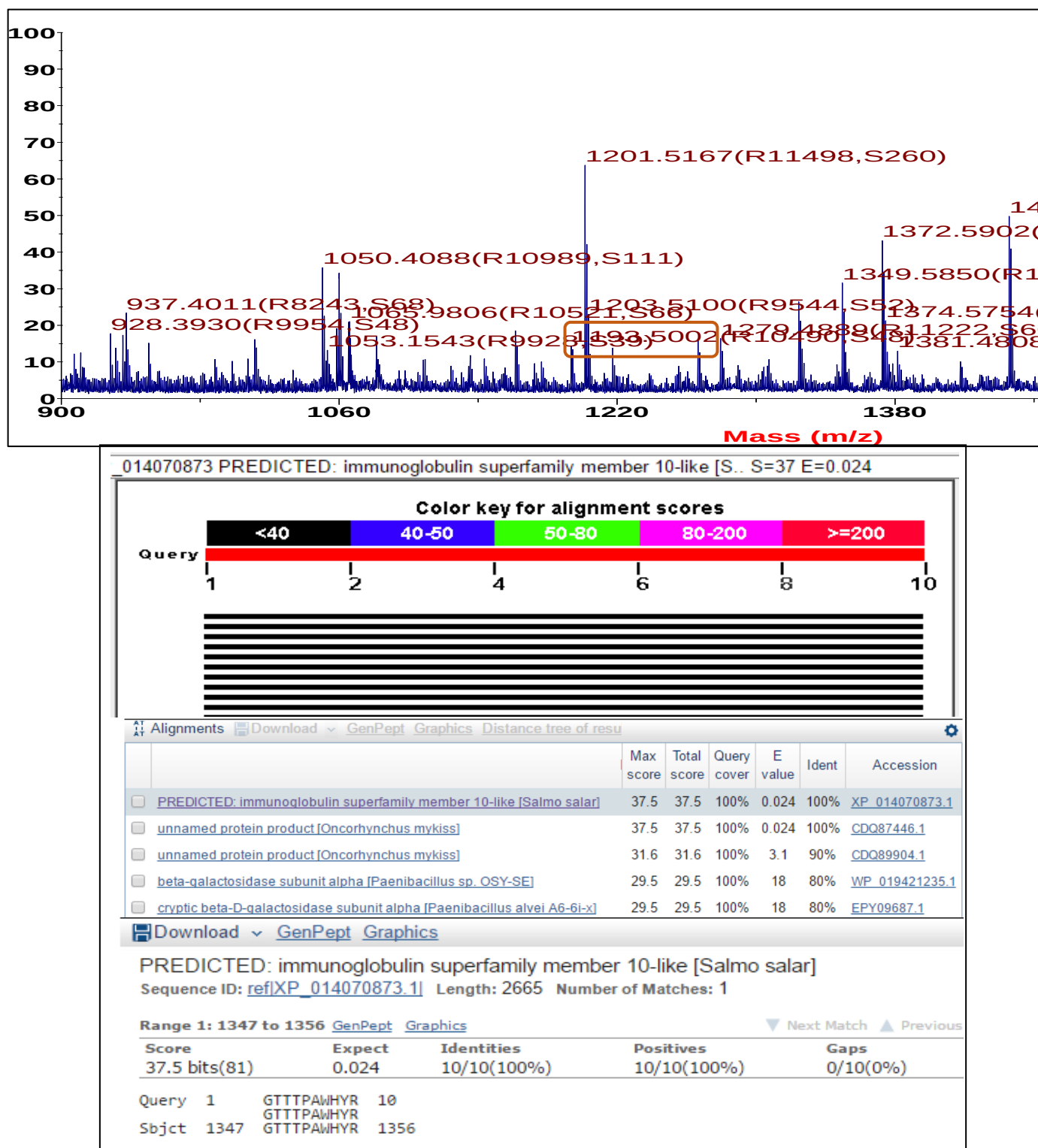


Fig.20: Identificación del miembro 10 de la superfamilia inmunoglobulina. A: Espectro simple masa (TOF) de proteínas extraídas del suero de juveniles de paiche donde se observa el espectro m/z 1193.50 correspondiente al miembro 10 de la superfamilia inmunoglobulina. C-D: Análisis de identidad por ProteinBlast de la secuencia obtenida por doble masa (TOF/TOF) a partir del espectro m/z 1193.50, mostrando homología con la secuencia miembro 10 de la superfamilia inmunoglobulina de *Salmo salar*.

Tabla 3: péptidos asociados a la identificación de proteínas inmunitarias

PROTEINA	SECUENCIA	ESPECIE	MW (P)*	MUESTRA	FUNCIÓN
NADH deshidrogenasa	LLMIFTILIFP	<i>Arapaima gigas</i>	1287.8207	Mucus	inmunidad
Proteína de la caja HMG Sox 11	KIMEQSPDMHNAEIS KR	<i>Ictalurus punctatus</i>	1989.9612	Mucus	inmunidad
SF: Nucleósido difosfato quinasa	TFIAVKPDGVQR	<i>Danio rerio</i>	1329.7405	Mucus	inmunidad
Citocromo oxidasa C subunid 1	LHDTYYVVA LVPLMIGAPD SSIGSLMSLVA	<i>Arapaima gigas</i>	1079.4625 1024.5581 1079.4659	Mucus	inmunidad
No caracterizada-Dominio Ig	WMFQKKGSNAAENI R	<i>Danio rerio</i>	1794.8835	Suero	inmunidad
Hemopexin	VHLDAITSDDAGNIY AFR	<i>Poecilia formosa</i>	1962.91	Suero	inmunidad
No caracterizada-Dominio similar a folistatin-Ig2	YMGSNSHSAHKDN MAAR	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	1907.8003	Suero	inmunidad
HSP 90	PLNISREMLQQSKIL KVIR	<i>Carassius auratus</i>	2265.3354	Suero	inmunidad
JAM Moléculas de adhesión funcional	KGTDVSFVYYEGQF R	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1794.8577	Suero	inmunidad
Inmunoglobulinas miembro 10	GTTTPAWHYR	<i>Salmo salar</i>	1192.5625	Suero	inmunidad

(*) Peso molecular asociado al ion precursor (P).

5. DISCUSIÓN.

Los avances tecnológicos en la era de las “ómicas” han sido evidentemente más numerosos en el área de medicina humana (Dudley 2014), sin embargo no han estado lejos de su aplicación en el sector acuícola, siendo China el pionero en los estudios mediados por la genómica, transcriptómica y en la última década, la proteómica (Peng 2013). En relación a las “ómicas” en los peces, algunos estudios se han centrado en el diagnóstico de patologías, la inmunidad y el aseguramiento de la calidad, sin embargo la incorporación en rutina de dichas metodologías es aun limitada.

Una de las limitantes en el desarrollo de las aplicaciones de las tecnologías “ómicas” en los diversos sectores acuícolas se debe a la escasez de bases de datos relacionados a la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica requeridas para el potenciamiento de dichas tecnologías. Este vacío de información se observa particularmente en el paiche *Arapaima gigas*, única especie de la familia Arapaimidae para la cual no existen bases de datos específicas ni tampoco para peces de grupos parentales cercanos. Este aislamiento, en términos de información molecular, es debido a su condición evolutiva relictiva y topográficamente nativa.

A la fecha, sólo 18 proteínas diferentes de paiche *Arapaima gigas* son contenidas en las bases de datos de proteínas de peces (ProteinBlast, UniprotKB, SwissProt) y 69 secuencias de proteínas de paiche depositadas en comparación a las 59,069 secuencias del pez modelo cebra *Danio rerio* y las 409,946 secuencias de la base de datos de proteínas en peces a partir base de datos de UniprotKB.

El estudio proteómico a través de la espectrometría de masas, en particular el sistema simple masa MALDI TOF, ha cobrado interés en los últimos años gracias

a la mejora en la precisión, sensibilidad, velocidad, confiabilidad y simpleza (Haga y Wu 2014; Aebersold y Goodlett 2000). Estas características han revolucionado la proteómica como tal, dejando atrás técnicas que demandan procesamiento complicado de muestras y de gran consumo de tiempo, reduciendo además contaminantes y pérdida de características propias de la misma.

Además, el desarrollo del sistema de espectrometría doble masa MALDI TOF/TOF reduce en gran medida los problemas de identificación de proteínas y péptidos por su alta precisión en la medición de las masas y la secuenciación masiva de péptidos, en particular generados por digestión enzimática (Di Girolamo et al 2013; Peng 2013). Sin embargo, la identificación de proteínas o péptidos en escasa proporción puede ser complicada, siendo enmascarados por la presencia de otras proteínas más abundantes en las muestras. Tales abundancias marcadamente distintas son notables en tejidos endocrinos donde las hormonas están presentes en muy bajas concentraciones (Di Girolamo et al 2013).

La aplicación de la espectrometría de masas en la endocrinología del paiche se basa en la identificación de las neurohormonas reproductivas, específicamente Kisspeptin y GnRH que son los dos iniciadores del ciclo endocrino de la reproducción (Okubo y Nagahama 2008; Vizziano 2010).

A nivel de todos los vertebrados, se han caracterizado 25 isoformas de GnRH (Kim^a et al 2011) y 8 isoformas de Kisspeptin (Biran et al 2008). Las isoformas de GnRH se distinguen a nivel de la secuencia del decapeptido de tipo elicitor involucrado en la interacción con el receptor GPCR presente en la membrana de las células hipotalámicas mientras que las isoformas de Kisspeptin se distinguen a nivel de dos secuencias peptídicas, respectivamente de 12 y 15 amino ácidos, de

tipo elicitor involucrados en la interacción con los receptores GPR54 presentes en la membrana de las “neuronas GnRH” a las cuales induce a nivel del cerebro.

Los estudios en teleósteos han revelado la presencia, por una parte de tres parálogos de GnRH (GnRH1, GnRH2, GnRH3), siendo solo uno o dos reguladores de la función de la pituitaria (Selvaraj et al 2013) y por otra parte dos parálogos de kisspeptin (Kiss1, Kiss2) con sus funciones conservadas en la reproducción, la maduración sexual y el dimorfismo en individuos juveniles (Kuohung y Kaiser 2006; Messenger et al 2005; Tena-Sempere 2012).

Nuestros resultados muestran la identificación de la isoforma GnRH2 y las isoformas Kiss1 y Kiss2 en base a la detección y secuenciación de péptidos externos a las regiones funcionales elicitoras. Se identificaron secuencias adicionales (no mostradas por su bajo nivel de confianza, <6%) asociadas a la isoforma 1 (Kiss1) de mamífero (c.f. roedores) y anfibio (c.f. *Xenopus*), abarcando este último los 4 primeros aminoácidos del dodecapéptido funcional.

Se debe mencionar que Montaner y colaboradores (2001) mostraron por primera vez la potencia de la aplicación de la espectrometría de masas MALDI en la identificación de la GnRH del pez pejerrey (pjGnRH).

Otros estudios por espectrometría de masas MALDI han demostrado su aplicación en la identificación de Kisspeptin como marcador tumoral del cáncer de mama (Hadi y Jamal 2015), en la cuantificación del decapeptido Kisspeptin y su farmacocinética en ratas (Liu^b et al 2013) así como en la identificación de la hormona inhibidora de gonadotropinas (Tobari et al 2010) en el que se realizó la identificación de dicha hormona a partir de un péptido de 10 aminoácidos.

La identificación de la hormona GnRH del paiche permite profundizar en el estudio neurobiológico de esta especie, en particular para detectar y caracterizar las otras isoformas de la misma hormona. Considerando el carácter primitivo del paiche, será interesante determinar el número de las isoformas de GnRH en comparación con las especies de peces más recientes evolutivamente, que pueden tener hasta tres isoformas de GnRH, como en la dorada, cíclidos, medaka, pejerrey, lubina y otros (Kim^a et al 2011; Karigo y Oka 2013).

La aplicación de la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF en el diagnóstico de patologías ha sido desarrollado a través de la identificación de biomarcadores específicos (Provan et al 2006; Di Girolamo et al 2014), principalmente en relación a la respuesta inmunitaria del hospedero (Brunt et al 2008; Wu et al 2004) o a la interacción patógeno hospedero (Liu^c et al 2013), mas no a la identificación directa del agente patógeno.

De hecho, otras técnicas de detección de patógenos han sido preferencialmente utilizadas; en particular la PCR y sus variantes en razón de su extrema sensibilidad y especificidad ligadas al proceso de amplificación del ADN de interés. Las técnicas de diagnóstico basadas en el uso de anticuerpos, inmunodiagnósticos, han sido ampliamente utilizadas pero carecen de gran sensibilidad ya que no hay amplificación de los antígenos detectados (Elliott et al 2015; Joyner et al 2014; Kulkarni et al 2011).

Sin embargo, los resultados mostraron, de forma positiva, que la espectrometría de masas MALDI TOF/TOF para la detección directa de microorganismos en el mucus de la piel de paiche mediante la identificación y caracterización de péptidos constitutivos de proteínas específicas de patógenos (estructurales, metabólicas, de transporte) es factible.

El protozoo flagelado, *Spironucleus salmonicida* (Hexamitidae) conocido por afectar severamente varias especies de peces en cultivo, ha sido diagnosticado por MALDI TOF/TOF con la identificación de un péptido de una proteína de membrana a partir de una muestra de mucus de la piel de paiche con un protocolo muy sencillo de extracción de las proteínas. La confirmación fue realizada posteriormente haciendo uso de la microscopía electrónica. Es importante resaltar el carácter no invasivo de la toma de muestra y la posibilidad de detección de numerosas otras proteínas, ya sea de patógenos o del propio pez, incluyendo la microbiota del mucus. Es interesante, además, considerar el análisis de costos comparativo para el diagnóstico de patógenos por MALDI con otras técnicas, siendo el ahorro estimado a más del 50% (Tran et al 2015).

La aplicación de la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF en el campo de la inmunología de los peces es extremadamente innovadora, con la identificación de varias proteínas inmunitarias así como de proteínas de respuesta a estrés a partir de muestras de mucus de la piel o de suero. Tales estudios de respuesta frente a estresores biológicos, químicos o ambientales han sido clásicamente basados en herramientas transcriptómicas (Sanchez et al 2011; Dupuy et al 2014).

Estudios de proteómica comparativa, basada en electroforesis 2D y complementados en algunos casos con análisis de spots por espectrometría de masa, han mostrados alteraciones en los niveles de expresión de proteínas asociadas a la producción energética, metabolismo, antioxidantes, chaperonas, proteínas del citoesqueleto entre otras (Jian et al 2009; Chen^b et al 2009; Dupuy et al 2014).

Las proteínas identificadas en esta investigación están asociadas tanto a la respuesta inmune como al manejo del estrés, tal como citocromo oxidasa C, NADH deshidrogenasa y nucleósido difosfato quinasa involucradas en la respiración celular y metabolismo oxidativo de la mitocondria. Estas proteínas de paiche corresponden a procesos bien caracterizados a nivel molecular en otras especies animales (Sappal et al 2015; Al-Shboul y Mustafa 2015; Lai et al 2013; Dupuy et al 2014).

La hemopexina y la hemoglobina identificadas en el paiche, son asociadas al transporte de oxígeno por los glóbulos rojos.

La proteína de choque térmico 90 (HSP 90), moléculas de adhesión funcional (JAM), la proteína Sox 11 asociada a la caja HMG y ciertas inmunoglobulinas, que han sido identificadas, cumplen funciones importantes en la modulación de las respuestas inmunitarias (Zhang et al 2014; Cordero et al 2015; van de Wetering et al 1993).

La identificación de estas proteínas en conjunto muestra un panorama de estrés asociado a la hipoxia como consecuencia de la captura y manipulación de los individuos, el que se evidencia en la sobreexpresión de proteínas asociadas a la oxidación celular en la mitocondria y transportadoras de oxígeno en sangre. Proteínas como las HSP 90, por su función en la reestructuración de proteínas a las condiciones de estrés y como respuesta inmune también se ha visto previamente potenciada, facilitando su detección.

Estos estudios de análisis de proteómica por espectrometría doble masa MALDI TOF/TOF han mostrado la influencia del estado fisiológico del animal en función de condiciones ambientales sobre la detección de proteínas, lo que es

particularmente interesante del punto de vista de la proteómica funcional como es mencionado por Peng (2013).

El análisis de datos es el talón de Aquiles de la proteómica mediante la espectrometría MALDI TOF/TOF (Haga y Wu 2014) ya que busca identificar una secuencia de péptidos utilizando algoritmos de comparación con secuencias disponibles en diversas bases de datos.

Además, los algoritmos pueden ser utilizados para los análisis explotando los datos de espectros de masas obtenidos de experimentos previos y almacenados, así como datos de “proteínas hipotéticas” identificadas a partir de secuencias genómicas (Haga y Wu 2014),

Por otra parte, la confiabilidad de la secuencia establecida por el MALDI TOF/TOF puede ser insuficiente para la identificación certera de algunos péptidos, como fue el caso de un péptido relacionado a la kisspeptin 1 mencionado anteriormente. Es por ello, que el análisis de las proteínas realizadas en el presente estudio, son la selección de péptidos identificados con niveles de confianza máximos (mayores al 90%), resultado de las mejores comparaciones entre las masas teóricas y experimentales.

La tecnología de espectrometría de masa MALDI TOF/TOF, además de las mejoras a nivel de la bioinformática previamente explicadas, va a beneficiar de importantes mejoras a nivel de la preparación de las proteínas y péptidos. De hecho, un problema recurrente concierne la dificultad de detección de péptidos en escasas concentraciones dentro una muestra, así como la detección global de los varios péptidos correspondientes a una misma proteína fragmentada por digestión enzimática. Estos problema se sensibilidad de detección podrían ser solucionados

mediante el tratamiento de las muestras con una biblioteca combinatoria de hexapéptidos fijados sobre perlas de carácter comercial. Se ha mostrado con este kit de BIORAD (Protein Miner) que aumenta el número de proteínas de baja abundancia detectadas por (MALDI) (Aebersold y Goodlett 2000; Di Girolamo et al 2013).

Sin embargo, la identificación de una proteína o sus péptidos generados por digestión enzimática, partir de una mezcla muy compleja de proteínas no deja de ser la principal potencia de la aplicación de la espectrometría de masas (Aebersold y Goodlett 2000). Esta potencia es evidente y valorizada en la aplicación de “mass imaging” donde las proteínas, los péptidos así como los metabolitos pueden ser directamente caracterizados, visualizados y semi-cuantificados a partir de un corte histológico, organismos completos o hasta de colonias microbianas.

6. CONCLUSIONES.

- La aplicación de la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF TOF en la endocrinología, patología e inmunología del paiche, permitió alcanzar el objetivo de identificar las principales neurohormonas involucradas en la reproducción, la identificación de patógenos presentes en el mucus y la identificación de proteínas asociadas a la inmunidad y estrés.
- Los conocimientos y las metodologías resultado de esta investigación abren la vía para futuros trabajos de caracterización de otras proteínas de interés en la endocrinología, patología, inmunología y otros campos de la fisiología y biología del paiche así como de otras especies de peces de interés acuícola.
- Innovaciones tecnológicas podrán ser desarrolladas en particular en el campo de la técnica "mass imaging", eventualmente en asociación con el uso de anticuerpos para la detección específica de complejos moleculares.

7. RECOMENDACIONES.

- Complementar con tecnologías de tipo electroforético en gel 2D para mejorar la resolución de separación de las proteínas
- Implementar tecnologías de tipo HPLC para disponer de preparaciones de proteínas no desnaturalizadas y funcionales
- Potenciar tecnologías de tratamiento de las muestras con una biblioteca combinatoria de hexapéptidos fijados sobre perlas para la detección de proteínas en muy baja abundancia
- Difundir la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF/TOF a nivel nacional a fin de expandir sus potencialidades de aplicación a los campos poco explorados de la proteómica.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aebersold R, Goodlett D. 2000. *Mass Spectrometry in proteomics*. American Chemical Society. 10.1021/cr990076h
- Ahmad F, Babalola O y Tak H. 2012. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Anal Bioanal Chem* (2012) 404:1247–1255. DOI 10.1007/s00216-012-6091-7.
- Al-Shboul O, Mustafa A. 2015. Effect of oxidative stress on Rho kinase II and smooth muscle contraction in rat stomach. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015 Jun;93(6):405-11. doi: 10.1139/cjpp-2014-0505.
- Ando H, Shahjahan Md, Hattori A. 2013. Molecular neuroendocrine basis of lunar-related spawning in grass puffer. *General and Comparative Endocrinology* 181 (2013) 211–214. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.07.027>
- Applied Biosystem/MDS Analytical Technologies Instruments. 2009. User Guide AB Sciex TOF TOF™ 5800 System. Document Number: D1000079418A. Canada.
- Bergsson G, Agerberth B, Jörnvall H, Gudmundsson G. 2005. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *FEBS Journal* 272 (2005) 4960–4969. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04906.x.
- Biran J, Dor S, Sivan B. 2008. Molecular Identification and Functional Characterization of the Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in Lower Vertebrates. *Biology of reproduction* 79, 776–786 (2008). DOI 10.1095/biolreprod.107.066266
- Brunt, J.; Hansen, R.; Jamieson, D.J.; Austin, B. 2008. Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008, 121, 199–205.
- Conceição K, Monteiro-dos-Santos J, Seibert C, Silva Jr P, Marques E, Richardson M, Di Girolamo F, Lante I, Muraca M, L. Putignani. 2013. The

- Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Current Organic Chemistry*, 2013, 17, 2891-2905.
- Cordero H, Brinchmann M, Cuesta A, Mesequer J, Esteban M. 2015. Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Proteomics*, 2015 Dec; 15(23-24);4007-20. Doi: 10.1002/pmic.201500120.
- Chen, J., Wu, H.Q., Shi, Y.H., Li, C.H., Li, M.Y., 2009b. The effects of environmental salinity on trunk kidney proteome of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 4, 263–267.
- Di Girolamo F, Lante I, Muraca M, Putignani L. 2013. The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Current Organic Chemistry*, 2013, 17, 2891-2905.
- Di Girolamo F, D’Amato A, Lante I, Signore F, Muraca M, Putignani L. 2014. Farm Animal Serum Proteomics and Impact on Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 15396-15411; doi:10.3390/ijms150915396.
- Dong, C.F., Xiong, X.P., Shuang, F., Weng, S.P., Zhang, J., Zhang, Y., Luo, Y.W., He, J.G., 2011. Global landscape of structural proteins of infectious spleen and kidney necrosis virus. *Journal of Virology* 85, 2869–2877.
- Dudley E. 2014. MALDI profiling and applications in medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2014;806:33-58. doi: 10.1007/978-3-319-06068-2_2.
- Dupuy C, Galland C, Pichereau V, Sanchez W, Riso R, Labonne M, Amara R, Charrier G, Fournier M, Laroche J. 2014. Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar. Pollut. Bull.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.033>
- Elliott DG, McKibben CL, Conway CM, Purcell MK, Chase DM, Applegate LJ. 2015. Testing of candidate non-lethal sampling methods for detection of *Renibacterium salmoninarum* in juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis Aquat Organ.* 2015 May 11;114(1):21-43. doi: 10.3354/dao02846.

- Falcon J, Besseau L, Sauzet S, Boeuf G. 2007. Melatonin effects on the hypothalamo–pituitary axis in fish. *Endocrinology and Metabolism* Vol.18 No.2. doi:10.1016/j.tem.2007.01.002
- FAO, 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Departamento de pesca y acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s00.htm>.
- Fekih-Zaghib S, Fildier A, Barrek S, Bouhaouala-Zahar B. 2013. A complementary LC-ESI-MS and MALDI-TOF approach for screening antibacterial proteomic signature of farmed European Sea bass mucus, *Fish and Shellfish Immunology* (2013), doi: 10.1016/j.fsi.2013.04.017.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665e3685.
- Gouveia M, Brindley P, Santos L, Correia da Costa J, Gomes P, Vale N. 2013. Mass spectrometry techniques in the survey of steroid metabolites as potential disease biomarkers: a review. *Metabolism*. 2013 Sep;62(9):1206-17. doi: 10.1016/j.metabol.2013.04.003.
- Groh K, Nesatyy V, Segner H, Eggen R, Suter M. 2011. Global proteomics analysis of testis and ovary in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiol Biochem* (2011) 37:619–647. DOI 10.1007/s10695-010-9464-x.
- Haga S, Wu H. 2014. Overview of software options for processing, analysis and interpretation of mass spectrometric proteomic data. *J. Mass Spectrom.* 2014, 49, 959–969. DOI 10.1002/jms.3414.
- Hadi N, Q. Jamal. 2015. "OMIC" tumor markers for breast cancer: A review. *Pak J Med Sci*. doi: 10.12669/pjms.315.7627.
- Hartmann EM, Durighello E, Pible O, Nogales B, Beltrametti F, Bosch R, Christie-Oleza JA, Armengaud J. 2014 Proteomics meets blue biotechnology: a wealth of novelties and opportunities. *Mar Genomics*. 17:35-42
- Hoffmann E, Stroobant V. 2007. Mass spectrometry : principles and applications. – 3rd ed. *John Wiley and Sons Ltd*.

- Huang Z, Chen S, Liu J, Xiao J, Yan J, Feng H. 2015. IFN α of black carp is an antiviral cytokine modified with N-linked glycosylation. *Fish Shellfish Immunol.* 2015 Oct;46(2):477-85. doi: 10.1016/j.fsi.2015.07.020.
- Jiang, H., Li, F.H., Xie, Y.S., Huang, B.X., Zhang, J.K., Zhang, J.Q., Zhang, C.S., Li, S.H., Xiang, J.H., 2009. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics* 9, 3353–3367.
- Joyner J, Wanless D, Sinigalliano CD, Lipp EK. 2014. Use of quantitative real-time PCR for direct detection of *Serratia marcescens* in marine and other aquatic environments. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Mar;80(5):1679-83. doi: 10.1128/AEM.02755-13. Epub 2013 Dec 27.
- Jurado J, Fuentes C, Guardiola F, Cuesta A, Esteban M, Prieto M. 2015. Proteomic profile of the skin mucus of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of proteomics* 120(2015)21–34. doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.019
- Karigo T, Oka Y. 2013. Neurobiological study of fish brains gives insights into the nature of gonadotropin-releasing hormone 1-3 neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Nov 19;4:177. doi: 10.3389/fendo.2013.00177.
- Kim^a D, Cho E, Jin M, Park S, Hwang J, Kah O, Sower S, Vaudry H, Seong J. 2011. Revisiting the evolution of gonadotropin-releasing hormones and their receptors in vertebrates: Secrets hidden in genomes. *General and Comparative Endocrinology* 170 (2011) 68–78. doi:10.1016/j.ygcen.2010.10.018
- Kim^b NN, Shin HS, Habibi HR, Lee J, Choi CY. 2011. Expression profiles of three types of GnRH during sex-change in the protandrous cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*: Effects of exogenous GnRHs. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2012 Feb;161(2):124-33. doi: 10.1016/j.cbpb.2011.10.003.
- Kim Bo, Kim J, Choi I, Raisuddin S, Au D, Leung K, Wu R, Rhee J. 2016. Omics of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its relevance to marine

- environmental research. Review. *Marine Environmental Research* 113 (2016) 141e152.
- Krader P, Emerson D. 2004. Identification of archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Extremophiles* (2004) 8:259–268. DOI 10.1007/s00792-004-0382-7.
- Krebs J, Golldstein E, Kilpatrick S. 2014. Lewin's Genes XI. 11th ed. *Jones and Bartlett Learning*, LLC, an Ascend Learning Company. USA.
- Kulkarni A, Caipang CM, Korsnes K, Brinchmann MF, Kiron V. 2011. Molecular diagnosis of francisellosis, a systemic granulomatous inflammatory disease in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Vet Res Commun*. 2011 Feb;35(2):67-77. doi: 10.1007/s11259-010-9451-9.
- Kuohung W, Kaiser UB. 2006. GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006 Dec;7(4):257-63.
- Kurokawa S, Kabayama J, Fukuyasu T, Hwang S, Park C, Park S, Del Castillo C, Hikima J, Jung T, KondoH, Hirono I, Takeyama H, Aoki T. 2012. Bacterial Classification of Fish-Pathogenic Mycobacterium Species by Multigene Phylogenetic Analyses and MALDI Biotyper Identification System. *Mar Biotechnol*. DOI 10.1007/s10126-012-9492-x.
- Lai KP, Law AY, Lau MC, Takei Y, Tse WK, Wong CK. 2013. Osmotic stress transcription factor 1b (Ostf1b) promotes migration properties with the modulation of epithelial mesenchymal transition (EMT) phenotype in human embryonic kidney cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Aug;45(8):1921-6. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.023.
- Liang Y, Guan R, Huang W, Xu T. 2011. Isolation and identification of a novel inducible antibacterial peptide from the skin mucus of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Protein J*. 2011 Aug;30(6):413-21. doi: 10.1007/s10930-011-9346-9.

- Lin, Y., Chen, Y., Yang, X.X., Xu, D., Liang, S.P., 2009. Proteome analysis of a single zebrafish embryo using three different digestion strategies coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 394,177–185.
- Liu^a R, Yang E, Liu C, Xue W. 2012. Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) allergens characterized by ELISA, SDS-PAGE, 2D gels, Western blotting and MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Sci Nutr*. 2012 May;63(3):259-66. doi: 10.3109/09637486.2011.619966.
- Liu^b Z, Ren C, Jones W, Chen P, Jones W, Chen P, Seminara S, Chan Y, Smith N, Covey J, Wang J, Chan K. 2013. LC–MS/MS quantification of a neuropeptide fragment kisspeptin-10 (NSC 741805) and characterization of its decomposition product and pharmacokinetics in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 May 1; 926: 1–8. doi:10.1016/j.jchromb. 2013.02.027.
- Liu^c, X.; She, X.T.; Zhu, Q.F.; Li, H.; Peng, X.X. 2013. Heterogeneous interactome between *Litopenaeus vannamei* plasma proteins and *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins. *Fish Shellfish Immunol*. 2013, 34, 192–198.
- Luo, Y.W., Weng, S.P., Wang, Q., Shi, X.J., Dong, C.F., Lu, Q.X., Yu, X.Q., He, J.G., 2009. Tiger frog virus can infect zebrafish cells for studying up- or down-regulated genes by proteomics approach. *Virus Research* 144, 171–179.
- Ma M, Bors EK, Dickinson ES, Kwiatkowski MA, Sousa GL, Henry RP, Smith CM, Towle DW, Christie AE, Li L. 2009. Characterization of the *Carcinus maenas* neuropeptidome by mass spectrometry and functional genomics. *Gen Comp Endocrinol*. 2009 May;161(3):320-34. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.01.015.
- Mai Y, Li Y, Li R, Li W, Huang X, Mob Z, Li A. 2015. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in the marine fish parasitic ciliate *Cryptocaryon irritans*. *Veterinary Parasitology* 211 (2015) 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.004>

- Medina A, Mancera JM, Martínez-Manzanares E, Moriñigo MA, Arijó S. 2015. Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Fish Shellfish Immunol.* 2015 Nov;47(1):377-80. doi: 10.1016/j.fsi.2015.09.031
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 1;102(5):1761-6.
- Montaner A, Park M, Fischer W, Craig A, Chang J, Somoza G, Rivier J, Sherwood N. 2001. Primary Structure of a Novel Gonadotropin-Releasing Hormone in the Brain of a Teleost, Pejerrey. 2001. *Endocrinology* vol 142, No.4. USA
- Ogawa S, Parhar I. 2013. Anatomy of the kisspeptin systems in teleosts. *General and Comparative Endocrinology* 181 (2013) 169–174. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.023>
- Okubo K, Nagahama Y. 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica* 2008; 193: 3–15.
- Om AD, , Jasmani S, Ismail N, Yeong SY, Abol-Munafi AB. 2013. Application MALDI TOF on protein identification of vitellogenin in giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). *Fish Physiol Biochem.* 2013 Oct;39(5):1277-86. doi: 10.1007/s10695-013-9782-x.
- Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015 Jan;61(1):100-11. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770.
- Pen X. 2103. Proteomics and its applications to aquaculture in China: Infection, immunity, and interaction of aquaculture hosts with pathogens. *Developmental and Comparative Immunology* 39 (2013) 63–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.017>
- Peng, X.X., Wu, Y.J., Chen, J.G., Wang, S.Y., 2004. Proteomic approach to identify acute phase response-related proteins with low molecular weight in loach skin following injury. *Proteomics* 4, 3989–3997.

- Prieto M, Jiménez I, Abril N, Alhama J, Pueyo C, Lopez J. 2012. Omics methodologies: New tools in aquaculture studies. *Aquaculture*. DOI: 10.5772/31065
- Provan F, Bjørnstad A, Pampanin D, Lyng E, Fontanillas R, Ketil A, Koppe W, Bamber S. 2006. Mass spectrometric profiling – A diagnostic tool in fish?. *Marine Environmental Research* 62 (2006) S105–S108. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.002
- Provan F, Jensen LB, Uleberg KE, Larssen E, Rajalahti T, Mullins J, Obach A. 2013. Proteomic analysis of epidermal mucus from sea lice-infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*. 2013 Mar;36(3):311-21. doi: 10.1111/jfd.12064. Epub 2013 Jan 11.
- Putri S, Nakayama Y, Matsuda F, Uchikata T, Kobayashi S, Matsubara A, Fukusaki E. 2013. Current metabolomics: practical applications. *J Biosci Bioeng*. 2013 Jun;115(6):579-89. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.007. Epub 2013 Jan 29.
- Reizer M, Caprioli R. 2005. MALDI Mass Spectrometry for Direct Tissue Analysis: A New Tool for Biomarker Discovery. *Journal of Proteome Research* 2005, 4, 1138-1142. 10.1021/pr050095.
- Rodrigues P, Silva T, Diasa J, F Jessen. 2012. Proteomics in aquaculture: Applications and trends. *Journal of Proteomics* 75(2012)4325–4345. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.03.042
- Sanahuja I, A. Ibarz. 2015. Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish Shellfish Immunol*. 2015 Oct;46(2):426-35. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.056. Epub 2015 Jun 29.
- Sánchez C, Weber G, Gao G, Cleveland B, Yao J, Rexroad C. 2011. Generation of a reference transcriptome for evaluating rainbow trout responses to various stressors. *BMC Genomics* 2011, 12:626. doi:10.1186/1471-2164-12-626
- Sappal R, MacDougald M, Fast M, Stevens D, Kibenge F, Siah A, Kamunde C. 2015. Alterations in mitochondrial electron transport system activity in

- response to warm acclimation, hypoxia-reoxygenation and copper in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol.* 2015 Aug;165:51-63. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.05.014.
- Selvaraj S., Ohga H., Kitano H., Nyuji M., Yamaguchi A; M. Matsuyama. 2013. Peripheral Administration of Kiss1 Pentadecapeptide Induces Gonadal Development in Sexually Immature Adult Scombroid Fish. *ZOOLOGICAL SCIENCE* 30: 446–454 (2013)
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J, Mann M. 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *NATURE PROTOCOLS*. VOL.1 NO.6 | 2006 | doi:10.1038/nprot.2006.468
- Sloots T, Nissen M, Ginn A, Iredell J. 2015. Rapid identification of pathogens using molecular techniques. *Pathology*. 2015 Apr;47(3):191-8. doi: 10.1097/PAT.0000000000000241.
- Smith J. 2004. *Biotechnology*. Fourth edition. Cambridge University Press. Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York.
- Su Y. 2011. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2011 Feb;158(2):149-54. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.11.002.
- Takahashi A1, Kobayashi Y, Moriyama S, Hyodo S. 2008. Evaluation of posttranslational processing of proopiomelanocortin in the banded houndshark pituitary by combined cDNA cloning and mass spectrometry. *Gen Comp Endocrinol*. 2008 May 15;157(1):41-8. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.03.006.
- Tena-Sempere, M., Felip, A., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from nonmammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 175 (2012) 234–243.
- Tobari Y, Iijima N, Tsunekawa K, Osugi T, Okanoya K, Tsutsui K, Ozawa H. 2010. Identification of gonadotropin-inhibitory hormone in the zebra finch

- (*Taeniopygia guttata*): Peptide isolation, cDNA cloning and brain distribution. *Peptides*. doi: 10.1016/j.peptides.2010.01.015.
- Tran A, Alby A, Kerr A, Jones M, Gilligan P. 2015. Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2015 Aug;53(8):2473-9. doi: 10.1128/JCM.00833-15.
- Ubuka T, Morgan K, Pawson A, Osugi T, Chowdhury V, Minakata H, Tsutsui K, Millar R, Bentley G. 2009. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One*. 2009 Dec 22;4(12):e8400. doi: 10.1371/journal.pone.0008400.
- Van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. 1993. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J*. 1993 Oct;12(10):3847-54.
- Vizziano D. 2010. Control endocrino del ciclo ovárico de los peces. Laboratorio de fisiología de la reproducción y ecología de peces. Disponible en: <http://fisionut.fcien.edu.uy/FISIOLOGIA%202010/pdfs2010/19%20mayo.pdf>
- Wu, L.N., Lin, X.M., Wang, F.P., Ye, D.Z., Xiao, X., Wang, S.Y., Peng, X.X., 2006. OmpW and OmpV are required for NaCl regulation in *Photobacterium damsela*. *Journal of Proteome Research* 5, 2250–2257.
- Wu, Y.; Wang, S.; Peng, X. 2004. Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma. *Fish Shellfish Immunol*. 2004, 16, 381–389.
- Xu, C.X., Ren, H.X., Wang, S.Y., Peng, X.X., 2004. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Research in Microbiology* 155, 835–842.
- Yi J, Warunek D, Craft D. 2015. Degradation and Stabilization of Peptide Hormones in Human Blood Specimens. *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7):e0134427. doi: 10.1371/journal.pone.0134427.

Zhang J, Zhang M, Sun L. 2014. Junctional adhesion molecule A of red drum (*Sciaenops ocellatus*): a possible immunomodulator and a target for bacterial immune evasion. *Vet Immunol Immunopathol*. 2014 Sep 15;161(1-2):99-107. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.07.008.

DEDICATORIA

A ***mi familia***, quienes acompañaron
siempre mi desarrollo profesional entre
alegrías y preocupaciones, alientos y sonrisas;
a ***mis tutores***, por ser mi mano derecha
en el desarrollo de este proyecto,
a **Concytec**, la **UNT** e **IncaBiotec**, por
creer y apostar en el desarrollo tecnológico
en Tumbes.

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres** por su infinito amor,
a **Eric, Emmerik y Virna** por su apoyo incondicional,
a **Petter, Pedro y César** por su paciencia y colaboración,
al equipo acuicultura, en especial a “**los paiches**” por su dedicación,
a los profesores **Enedia y Auberto**, por su motivación y apoyo
para concretar esta primera promoción de maestría,
a la **universidad**, que apostó por la espectrometría de masas,
a **Concytec**, en especial a la **Dra. Orjeda**, por su destacada labor,
sin ella todo seguiría siendo un sueño anhelado de los jóvenes en el país.