

# Expresión diferencial de genes en tilapia *Oreochromis niloticus* (L., 1758) bajo estrés alimentario

M. Villarroel<sup>1</sup>, I. Tupac-Yupanqui<sup>2</sup>, N. Nicodemus<sup>1</sup>, M. Rico<sup>1</sup>, J. Cañón<sup>2</sup>,  
D. Menoyo<sup>1</sup>, M. Alvariño<sup>1</sup> y S. Dunner<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal. ETSI Agrónomos. Ciudad Universitaria, s/n. Universidad Politécnica de Madrid. E-28040 Madrid, España. Correo electrónico: morris.villarroel@upm.es

<sup>2</sup> Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. E-28040 Madrid, España.

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

## RESUMEN

El estrés alimentario o subalimentación de los peces afecta directamente al metabolismo energético, a la eficacia de utilización del alimento y, por tanto, a su productividad. Este efecto se puede cuantificar de forma objetiva mediante comparaciones de expresión génica con respecto a aquellos peces que han sido alimentados a saciedad. Además, algunos de los genes expresados por los peces subalimentados pueden usarse como genes candidatos para identificar estrés alimentario en general. Para identificar estos genes se dividió un grupo de 60 tilapias *Oreochromis niloticus* (L., 1758) en dos tratamientos (alimentado ad libitum o con alimentación subóptima, durante 22 días) con dos réplicas. Se utilizó la técnica de *differential display* en muestras de cerebro con 36 combinaciones resultado de tres cebadores polyT de anclaje y 12 cebadores aleatorios. Se expresaron una media de 25 bandas por pareja de cebadores y un total de 31 bandas expresadas diferencialmente, se extrajeron, secuenciaron y anotaron con la ayuda de la información disponible en bases de datos públicas. Algunas secuencias coinciden con genes cuya función es de unión a diferentes proteínas y de regulación de la transcripción, y juegan un papel importante en la sinapsis. Es destacable el gen ALOX5, que interviene en la producción de leucotrienos, importantes mediadores de procesos inflamatorios. La identificación de los genes que corresponden a estas bandas aportará conocimiento sobre los mecanismos que intervienen en situaciones de estrés, tanto producidas por una alimentación subóptima como por otras causas.

**Palabras clave:** Tilapia, expresión génica, alimentación, estrés.

## ABSTRACT

### *Differential gene expression in tilapia *Oreochromis niloticus* (L., 1758) under feeding stress*

Feeding stress or suboptimal feeding in fish can have a direct impact on their energy metabolism and feed use efficiency, and thus on productivity. That impact can be quantified objectively by comparing the expression of genes between fish fed ad libitum and fish fed suboptimally. Moreover, some of the genes expressed in animals fed suboptimally can also be used as candidate genes to identify feeding stress in general. To identify some of those genes, a group of 60 tilapia *Oreochromis niloticus* (L., 1758) was divided into two batches (fed ad libitum or suboptimally for 22 days) with two replicates. For this purpose, we carried out differential display analysis in brain tissue samples using 36 combinations of 3 polyT anchoring primers and 12 random primers. An average of 25 bands was produced per primer pair, with 31 bands expressed differentially which were excised from the gels, sequenced, and annotated with information available on public databases. Some sequences matched genes with different binding activities, regulation of transcription, and those playing a role in synapses. One of the most interesting findings was the ALOX5

*gene, which plays a role in the production of leukotrienes, important mediators in inflammatory processes. The identification of genes corresponding to those bands will provide more information about mechanisms that play a role in stressful situations produced by suboptimal feeding, as well as other causes.*

**Keywords:** *Tilapia, gene expression, feeding, stress.*

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura moderna debe ser sostenible y tener como objetivo el consenso de legisladores, productores y consumidores sobre aspectos éticos de producción (MAPA, 2001). En países desarrollados, el crecimiento de la acuicultura actual está condicionado por las necesidades de harinas y aceites de pescado (pues está basada en peces carnívoros) y por el uso responsable del agua (Naylor *et al.*, 2000; Gewin, 2004). A nivel comercial, muchos productores tratan de diversificarse, dirigiendo sus esfuerzos hacia especies omnívoras (Powell, 2003) como la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Bolívar, Mair y Fitzsimons, 2004). Por otra parte, los consumidores europeos demandan una mejor trazabilidad de los productos, además de medidas para controlar y mejorar el bienestar animal (Comisión Europea, 2004). En este sentido, existe un gran interés en encontrar indicadores plasmáticos de estrés y en identificar genes candidatos que ayuden a evaluar las condiciones de producción (Gornati *et al.*, 2004).

Históricamente, la producción animal intentaba aumentar la ingesta para aumentar el crecimiento, pero no parece ser ésta la manera más eficiente para la producción piscícola. Aumentar la cantidad de alimento suministrado puede aumentar la cantidad de pienso no consumido y los índices de conversión, mientras empeora la calidad del agua, la salud de los peces y el rendimiento del sistema (Jobling, 1998). Más específicamente, es importante optimizar el tipo y frecuencia de alimentación para mejorar la utilización del alimento. Por otro lado, el bajo nivel de conocimiento en peces de los genes implicados tanto en la respuesta al estrés como en las rutas metabólicas activadas en función del tipo de ración administrada, justifica establecer una estrategia de estudio de expresión que abarque un número elevado de genes.

En los últimos años se ha demostrado en salmonidos una relación directa entre el estrés y la

expresión diferencial de genes que codifican las proteínas implicadas en la homeostasis (por ej. Pan *et al.*, 2000). No obstante, hay pocos estudios con peces omnívoros y poca información sobre genes candidatos para describir el grado de estrés que padecen bajo condiciones normales en granja. Es importante buscar indicadores que ayuden a evaluar las condiciones de producción desde el punto de vista del animal (Gornati *et al.*, 2004).

McFarlane *et al.* (2004) han demostrado en trucha que la subalimentación tiene efectos directos sobre el bienestar animal, medido como actividad muscular. Algunas especies de tilapia aguantan niveles subóptimos de alimentación (Macaranus *et al.*, 1997), pero no se ha estudiado explícitamente el efecto de la subalimentación y el estrés. En los peces, en general, la escasa disponibilidad de marcadores y el poco conocimiento de los genes ha impedido llevar a cabo estudios de expresión diferencial. Recientemente, Krasnov *et al.* (2005) encontraron en truchas varios genes activados o inactivados en secuencias temporales, siendo éste uno de los escasos ejemplos. Finalmente, aunque existen otros estudios sobre la expresión de genes en tilapia –por ejemplo la expresión de receptores celulares en diferentes salinidades (Feng *et al.*, 2002)–, no se han encontrado estudios sobre genes indicadores de estrés en tilapia.

El objetivo de este trabajo es identificar los genes que se expresan de forma diferencial en respuesta al estrés generado por una subalimentación y relacionarlos con variables productivas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron 60 tilapias *O. niloticus*, con un peso medio de 111 g adquiridas de una población de reproductores de tilapia procedentes de Valenciana de Acuicultura (Puzol, Valencia).

Todos los peces eran machos, ya que provienen de Genetically Male Tilapia (GMT®), comercializados por Fishgen S.A. (<http://www.fishgene.com>) y se criaron en cuatro tanques de 120 litros (n = 15 peces por tanque o 1 indiv/8 l, dos tanques por tratamiento) dentro de un circuito en régimen de recirculación intensiva. La temperatura del agua se mantuvo constante durante los días poses-tabulación (25 °C) en abril (durante 15 días) y luego se incrementó a 28 °C (durante 8 días). Se usó pienso específico para tilapia fabricado por el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, con una composición de 93,6 % de materia seca, 7,6 % cenizas, 33,2 % proteína bruta, 16,6 % extracto etéreo, 16,4 % fibra neutro detergente y 5 201 kcal/kg de energía. Los peces de dos de los tanques tuvieron acceso al pienso ad libitum (comedero con péndulo) y en los dos restantes fueron alimentados una única vez al día a las 7:00 h (aproximadamente 1,8 % peso vivo/día) mediante un comedero automático modelo programable EHEIM 3581 (Feed-Air Digital Automatic Feeder).

Las tilapias se pesaron al inicio y al final del periodo experimental, que fue de 23 días, y se controló el consumo de pienso

$$100 \frac{\text{consumo (g)}}{\text{peso medio (g)} \cdot \text{tiempo (días)}}$$

el crecimiento relativo CR

$$\text{CR} = 100 \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}}$$

la tasa de crecimiento específico TCE

$$\text{TCE} = \ln \left( 100 \frac{\text{peso final (g)}/\text{peso inicial (g)}}{\text{tiempo (días)}} \right)$$

la eficacia proteínica EP

$$\text{EP} = \frac{\text{ganancia de peso (g)}}{\text{consumo de proteína (g)}}$$

y la eficacia alimenticia EA

$$\text{EA} = \frac{\text{ganancia de peso (g)}}{\text{consumo (g)}}$$

Al final del experimento, de cada tanque se sacrificaron los dos peces más grandes y los dos más pequeños, con golpe seco, para el análisis de expresión diferencial de genes y con el fin de obtener la máxima variabilidad dentro de cada tanque (n = 16 muestras en total).

### Análisis estadístico

Los datos se analizaron como un diseño completamente al azar, con el tipo de alimentación como principal fuente de variación (ad libitum o subóptimo). Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las variables productivas, se realizó un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (Statistical Systemes Institute Inc., Cary, North Carolina, EE UU).

### Extracción de ARNm

Para el análisis genético, se extrajo ARN total de muestras de cerebro de los 16 individuos mantenidas en RNA later® (Qiagen, S.A.) a -80 °C. Para ello, se utilizó el RNeasy® mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se diluyó en 50 µl de agua libre de RNAsas, con un tratamiento posterior con DNAsa para garantizar una pureza máxima del ARN total extraído.

La integridad del ARN total extraído se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8 % en buffer TBE1X (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH:8), bajo un campo eléctrico de 80 V durante 1 h. El ARN total se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm ( $A_{260}$ ) con la ayuda de un espectrofotómetro.

Las muestras de ARN total correspondientes a los dos animales de mayor tamaño de un mismo tanque fueron mezcladas, y se procedió de la misma manera con los dos individuos más pequeños de cada tanque, generándose un total de 8 muestras de ARN, cuatro de ellas procedentes de los tanques donde los peces recibieron alimento ad libitum y cuatro los que fueron sometidos a una alimentación una única vez al día.

### Differential Display (DD)

Estas ocho muestras se retrotranscribieron utilizando la enzima iSCRIPT® cDNA síntesis kit (Biorad) y cebadores de anclaje con una cola de poliTs (tabla I), utilizando 25 ng de ARN total para una reacción final de 15 µl y manteniendo la mezcla a 25 °C durante 5 minutos, 42 °C durante 40 minutos y un paso final de 5 minutos a 85 °C.

En un segundo paso se amplificó el ADNc producido mediante combinaciones de cebador poliT y de cebadores arbitrarios (tabla II) en un volumen final de 10 µl conteniendo 1 µM de cada cebador, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 0,5 U de enzima AmpliTaq Gold (Applied Biosystem) en un programa que consistió en 2 ciclos de 94 °C (60 segundos), 40 °C (60 segundos), 72 °C (5 minutos), seguidos de 30 ciclos de 94 °C (30 segundos), 58 °C (30 segundos) y 72 °C (2 minutos), precedidos por una desnaturalización de 8 minutos a 94 °C y cerrando con una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Los amplicones se separaron por electroforesis vertical en geles de acrilamida desnaturalizantes (19:1) al 6 % durante 4 h a 60 W para separar las bandas generadas. Las muestras de PCR se mezclaron con 5 µl de tampón de carga (EDTA 5,5 mM; pH:8, xilen-cyanol 0,05 %, azul de bromofenol 0,005 %) y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos previamente a su carga en el gel. Para observar los fragmentos amplificados diferencialmente se llevó a cabo un proceso de tinción con nitrato de plata basado en el protocolo de Bassam, Caetano-Anolles y Gresshoff (1991) con algunas modificaciones ya descritas anteriormente (Barroso, Dunner y Canón, 1998).

### Reamplificación y secuenciación de las bandas diferenciales

Esas bandas se recortan del gel de acrilamida con un bisturí y se introducen en un tubo con 50 µl de agua, calentando el tubo a 95 °C durante 15 min y, a continuación, se mantienen a -70 °C durante 45 min. Esta congelación se repite durante 15 min y se utilizan 10 µl del sobrenadante para su reamplificación en un volumen

total de 30 µl, utilizando 1 µM de los mismos cebadores que en la amplificación del ADNc, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 0,5 U de Taq Gold (Applied Biosystems).

Los productos PCR se purificaron y secuenciaron en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) con el cebador arbitrario correspondiente a la combinación en la que ha aparecido la banda, analizando el resultado con el programa Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems).

### Análisis de las secuencias

El objetivo es identificar a qué gen corresponden las secuencias anónimas que se han obtenido. Para ello, se compara esta secuencia con bases de datos de genes disponibles en Internet, como NCBI (National Centre of Biotechnology Information) TIGR (The Institute of Genomic Research) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, y UCSC Genome Bioinformatics (University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics) <http://genome.ucsc.edu/>

### RESULTADOS

El efecto de la alimentación subóptima sobre las variables productivas se muestra en la tabla III. El consumo de pienso, el crecimiento relativo, la tasa de crecimiento específico, la eficacia proteínica y la eficiencia alimenticia fueron el 80 % ( $p < 0,01$ ), 98 % ( $P = 0,01$ ), 97 % ( $p < 0,01$ ), 87 % ( $p = 0,05$ ) y 87 % ( $p = 0,05$ ) inferiores, respectivamente, en las tilapias que fueron subalimentadas con respecto a las que fueron alimentadas ad libitum.

Respecto al análisis genético, se analizaron 36 combinaciones de tres cebadores de anclaje con cola poliT y 12 cebadores arbitrarios (tablas I y II). El número medio de bandas generado por pareja de cebadores fue de 25. Un total de 31 bandas (figura 1) se expresan diferencialmente en los *pooles* correspondientes a muestras de individuos que han sido alimentados ad libitum y subalimentados, lo que parece ser un efecto del tratamiento en la expresión de determinados genes.

Tabla I. Lista de los cebadores con cola poliT utilizados para la RT-PCR.

Nombre	Secuencia
T7(dT <sub>12</sub> )A	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTA-3'
T7(dT <sub>12</sub> )C	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTC-3'
T7(dT <sub>12</sub> )G	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTG-3'

Se recortaron y reamplificaron las bandas diferenciales entre las cuatro muestras correspondientes a individuos alimentados ad libitum y las cuatro muestras procedentes de individuos alimentados una única vez al día, entendiendo la manifestación diferencial de la expresión como una de presencia-ausencia o como una intensidad variable de la banda entre los diferentes tratamientos, siendo coincidentes en todas las muestras de cada grupo (figura 1).

Las bandas resultantes aparecen en la tabla IV, en la que se indica el gen del que forman parte (cuando se conoce), su función, el acceso de GenBank con indicación de la especie en la que está descrito ese gen y el grupo experimental en el que aparece la banda diferencial.

En algunos casos las secuencias corresponden a un gen con función conocida, como es el caso de la banda 9-300. Esta banda se alinea con un fragmento del gen ALOX5 que codifica la araquidonato-5-lipoxigenasa, que interviene en la síntesis de leucotrienos a partir de ácido araquidónico, mediadores importantes en procesos inflamatorios. Es sabido que las condiciones de estrés pueden favorecer la aparición de procesos inflamatorios (Studynkova *et al.*, 2004), y este gen es, por tanto, un buen candidato para expli-

car este proceso en los individuos subalimentados.

Las bandas 7-400 y 3-250 son dos fragmentos correspondientes a un mismo gen desconocido en *Danio rerio* (Hamilton, 1822) y probablemente corresponden a dos dominios diferentes, ya que distan más de 50 kb en el clon de referencia AL929182.

Para algunas bandas, por ejemplo la 3-250, aparecen dos llamadas: un gen desconocido, clasificado como proteína nueva, y CLIC6, que corresponde al gen Chloride channel form A. Otro ejemplo es el de la banda 8-174, cuya secuencia también parece pertenecer a un gen sin clasificar (FLJ44057), pero en la que una parte corresponde al gen sarcoma antígeno NY-SAR-41, con el número de acceso AL139421, y que pertenece a un grupo de antígenos ya descritos que se expresan en diferentes formas de cáncer (sarcoma, melanoma, de esófago, de pulmón y de mama).

En el caso de la banda 8-170, su secuencia corresponde al gen SEC5-like 1 (sec511-BX927255) descrito en *Saccharomyces cerevisiae* (TerBush *et al.*, 1996) y cuya proteína es un componente del complejo de exocitosis, un complejo esencial para llevar vesículas de exocitosis a lugares diana específicos de la mem-

Tabla II. Lista de los cebadores arbitrarios utilizados para la amplificación del ADNc.

Nombre	Secuencia
M13-ARP1	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACG ACT CCA AG-3'
M13-ARP2	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAT GG-3'
M13-ARP3	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGA CCA TTG CA-3'
M13-ARP4	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAG AC-3'
M13-ARP5	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAT GGT CGT CT-3'
M13-ARP6	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA CAA CGA GG-3'
M13-ARP7	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GAT TGG TC-3'
M13-ARP8	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GTA AAG GG-3'
M13-ARP9	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA AGC CTA GC-3'
M13-ARP10	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACA GTG TGT GA-3'
M13-ARP11	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAC GCT AGT GT-3'
M13-ARP12	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGG TAC TAA GG-3'

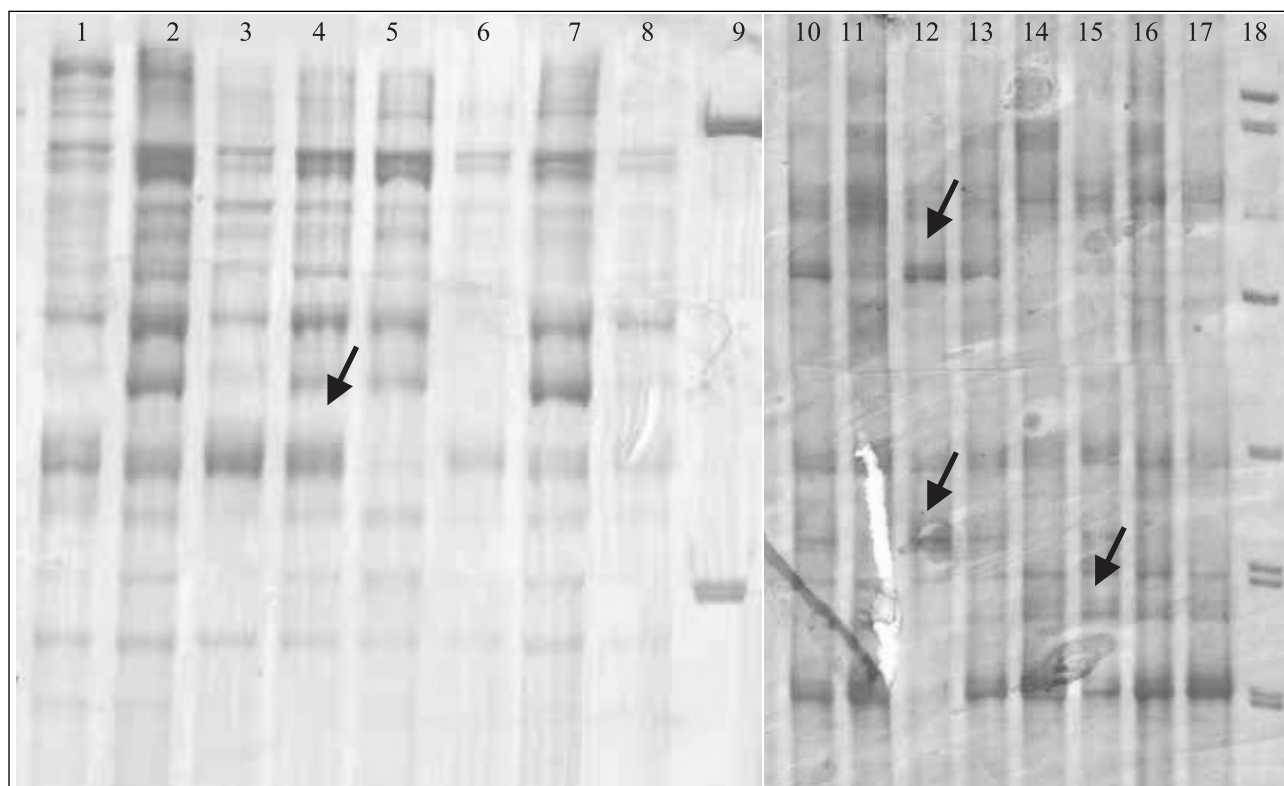


Figura 1. Un ejemplo de *differential display* en muestras de cerebro de *Oreochromis niloticus* alimentados ad líbitum (calles 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13) o subalimentados (calles 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 17). Las calles 9 y 18 son marcadores de peso molecular. Las flechas indican las bandas diferenciales.

brana plasmática. Estas proteínas están bien caracterizadas en levadura y se conocen por ser altamente conservadas en otros eucariotas más complejos. Al menos ocho componentes del complejo de exocitosis que incluye esta proteína interactúan con v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (RALA), una pequeña GTPasa Ras-related cuya función es la de controlar la remodelación de la actina citoesquelética y el transporte de vesículas. Se han descrito mutaciones en *Droso-*

*phila* que sugieren la implicación de esta proteína en el tráfico de la membrana neuronal. Para la banda 2-186 no ha sido posible la adjudicación a ningún gen o región concreta de ADN.

## DISCUSIÓN

Los índices de crecimiento de los peces alimentados ad líbitum fueron similares a los datos

Tabla III. Efecto de los tratamientos sobre las variables productivas de tilapia (datos de dos réplicas). (EEM): error estándar medio (n = 2 tanques). (p): probabilidad.

Variables productivas	Tratamientos		EEM	p
	Ad líbitum	Subalimentados		
Peso inicial (g)	105,4	116,9	0,92	0,01
Peso final (g)	123,5	117,3	2,36	0,20
Consumo (%/días)	0,54	0,11	0,02	0,005
Crecimiento relativo (%)	17,2	0,38	1,22	0,01
Tasa de crecimiento específico (%/días)	0,72	0,02	0,05	0,009
Eficacia proteínica (g/g)	4,02	0,51	0,57	0,05
Eficacia alimenticia (g/g)	1,34	0,17	0,19	0,05
Supervivencia (%)	100	100	-	-

Tabla IV. Resultados de anotación de las secuencias recortadas y reamplificadas para su identificación.

Banda	Gen	Función	N.º acceso GenBank	Especie	Grupo experimental
7-400	Desconocido	Nueva proteína	AL929182	<i>D. rerio</i>	Ad líbitum
3-250	Desconocido	Nueva proteína	AL929182	<i>D. rerio</i>	Ad líbitum
	CLIC6	Canal de cloruro	AF448438	<i>H. sapiens</i>	
7-155	FLJ13220	Proteína hipotética FLJ13220	BC036768.1	<i>H. sapiens</i>	Ad líbitum
	Contiguo		AC096586	<i>H. sapiens</i>	
8-174	NY-SAR-41 (antígeno del sarcoma NY-SAR-41)	Dominio <i>coiled-coil</i> conteniendo 18	AL139421	<i>H. sapiens</i>	Ad líbitum
	FLJ44057	Proteína hipotética FLJ44057	AK126045	<i>H. sapiens</i>	
2-186	RCOR3	Regulación de la transcripción	AL590101	<i>H. sapiens</i>	Subalimentados
8-170	Sec5l1	Gen sec5like1 descrito en <i>S. cerevisiae</i>	BX927255, CK698666	<i>D. rerio</i>	Ad líbitum
	CCHL1A2	Subunidad $\alpha$ -1 del canal de calcio tipo N	M94172	<i>H. sapiens</i>	Ad líbitum
9-300	ALOX5	Interviene en la síntesis de leucotrienos a partir de ácido araquidónico	AL731567	<i>H. sapiens</i>	Ad líbitum
	GRIP1	Es un coactivador de la transcripción (en sinapsis)	BX470116	<i>H. sapiens</i>	Ad líbitum
8-310	Nuevo gen	Desconocido	AC153637	<i>M. musculus</i>	Ad líbitum
9-250	ARN ribosómico 16S	Transcripción de genes mitocondriales	AY597335	<i>O. mossambicus</i>	Ad líbitum
2-123	Desconocido	Nueva proteína	Z70272	<i>H. sapiens</i> y <i>M. musculus</i>	Subalimentados
	Y2H9A.4		NM_073934	<i>C. elegans</i>	Subalimentados
	Similar al calpain 3	Proteólisis intracelular	M_796928	<i>S. purpuratus</i>	Subalimentados

obtenidos por Shnel *et al.* (2002) en un sistema de recirculación intensiva *zero discharge* en Israel y comparables a los obtenidos por Rakocy *et al.* (1992) para alevines de *O. niloticus* (EA 1,86-2,04) y Suresh y Lin (1992) para alevines de tilapia roja. Provenzano y Winfield (1987) obtuvieron una EA más baja (1,25) cuando los peces recibieron una ración con un contenido mayor de proteína (36 % proteína bruta).

La utilización de la técnica de DD (Liang y Pardee, 1992) está resultando positiva para identificar genes que se expresan en relación con niveles de estrés producido por la alimentación. En algunos casos, las secuencias de las bandas diferenciadas se refieren a clones de genotecas de cerebro y, por tanto, son genes que se expresan en relación a la actividad neuronal. Este hecho parece indicar que la subalimentación genera una respuesta específica en la expresión

de determinados genes. Hemos reamplificado y secuenciado diez de las bandas que corresponden a transcritos que generan diferentes proteínas, y la técnica utilizada ha mostrado ser una buena opción para identificar genes que se expresan bajo determinadas condiciones de estrés, en una especie cuyo genoma es todavía poco conocido, con la ayuda de la información generada en otras especies.

En la mayor parte de los casos, los genes a los que pertenecen las bandas diferenciales secuenciadas son desconocidos en la tilapia, es decir, pertenecen a clones de *Danio rerio* o de *Homo sapiens* de gran longitud y que contienen varios genes completos o parciales y, en caso de secuencias codificantes desconocidas, éstas se describen como genes por anotación automática. Estas secuencias requieren un trabajo adicional para determinar su función mediante análisis de simi-



litud de dominios y comparación con otras especies cuyo proyecto genoma está más desarrollado, como, por ejemplo, la especie humana. A pesar de los esfuerzos realizados en el desarrollo de genotecas en diferentes tejidos –esta información está incluida en el *Cyprinid genome consortium* (<http://hgsc.unh.edu/cichlid>)–, como gónada (Nagahama, 18186 ESTs), cerebro y gónadas (Baroiller/D’Cotta), cerebro y branquias (Genomar, 2500 ESTs) y cerebro, corazón y músculo (Martins), el genoma de la especie *O. niloticus* es, en gran parte, desconocido. Las secuencias EST nombradas en esta página *web* no están a disposición de la comunidad científica en la mayor parte de los casos, lo que no permite encontrar fácilmente un *Expressed Sequence Tag* (EST) que corresponda a la secuencia generada por DD, y, con frecuencia, las búsquedas en bases de datos de secuencias públicas dan resultados positivos en especies como *Danio rerio* o la especie humana. En un único caso (banda 9-250) la búsqueda de información nos ha remitido al genoma mitocondrial completo de la especie *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852), al tratarse de un fragmento del 16s ribosómico mitocondrial.

De forma general, y a falta de confirmar los resultados por PCR cuantitativa (Q-PCR), se observa que en los animales sometidos a estrés por una alimentación restringida, aparecen diferencias (con respecto a los que son alimentados ad libitum) en la actividad mitocondrial y en la expresión de genes que intervienen en los mecanismos de intercambio de  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ , como son el N-type calcium channel alpha-1 subunit o el CLIC6, también llamado N-type calcium channel alpha-1 subunit, que interacciona con receptores de Dopamina (Friedli *et al.*, 2003).

Las bandas estudiadas remiten, en muchos casos, a una secuencia perteneciente a un clon en el que, por anotación automática, aparece un hipotético gen que dará lugar a un producto actualmente desconocido. Este es el caso de cuatro de las diez bandas estudiadas, que requerirán un trabajo adicional para la identificación precisa, bien de una nueva proteína o de una ya descrita en otras especies. Estos resultados sólo incluyen los obtenidos mediante la técnica de DD, que puede considerarse como la primera fase en un proceso de identificación

de genes que se expresan de forma diferencial, por lo que deben ser considerados como resultados preliminares. En un segundo paso será necesario determinar con más precisión la identidad de los genes encontrados y confirmar mediante Q-PCR. En esta fase, en la que no existe aun la valoración relativa de un transcrito, es difícil interpretar los resultados, ya que el hecho de que aparezca una banda diferencial es sólo un indicio de la posible existencia de diferencias entre los dos tipos de muestras, sin que sea posible valorar si esas diferencias son significativas.

En los últimos años se están multiplicando los esfuerzos para identificar genes relacionados con el estrés en diferentes especies de peces y con el objetivo de encontrar marcadores que permitan valorar el grado de estrés inducido por la calidad del agua (Brown *et al.*, 2004; Fiol y Kultz, 2005), la densidad de estabulación (Gornati *et al.*, 2004, 2005), la subalimentación, la presencia de contaminantes químicos (Koskinen *et al.*, 2004) o por inyecciones de cortisol (Sarropoulou *et al.*, 2005), y que indican el grado de bienestar de estos animales, afectando, en última instancia, a su producción. Estos trabajos han iniciado la identificación de genes como CYP1A, UDPGT y EF1 (Williams *et al.*, 2003), así como de diferentes HSP (Pan *et al.*, 2000; Gornati *et al.*, 2004; Place, Zippay y Hoffman, 2004) que sugieren un estrés por baja temperatura. En los resultados que aparecen en este trabajo, reviste un gran interés la banda correspondiente al gen ALOX5, que interviene en la producción de leucotrienos, conocidos mediadores en los procesos inflamatorios. Es necesario investigar de qué manera esta lipoxigenasa interviene en el individuo como consecuencia del estrés producido. La confirmación de la expresión de este gen y la cuantificación de esta expresión está en curso.

La culminación de este trabajo permitirá avanzar en la identificación y el conocimiento de las rutas metabólicas en las que están incluidas las proteínas diferencialmente expresadas y disponer de más elementos para la comprensión de los mecanismos del estrés en *O. niloticus* en particular y, por analogía, en otros vertebrados.



## AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación de Recursos Acuícolas de la Universidad Politécnica de Valencia, especialmente a A. Moñino y M. Jover por el suministro de pienso. A Valenciana de Acuicultura y R. Barrera por el suministro de los alevines de tilapia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barroso, A., S. Dunner y J. Canón. 1998. Detection of bovine Kappacasein variants A, B, C and D by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Technical note. *J. Anim. Sci.* 76: 1535-1538.
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles y P. M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
- Bolivar, R., G. Mair y K. Fitzsimmons. 2004. *Proceedings from the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Creative Unlimited. Manila, Filipinas: 399 pp.
- Brown, M., C. Robinson, I. M. Davies, C. F. Moffat, J. Redshaw y J. A. Craft. 2004 Temporal changes in gene expression in the liver of male plaice (*Pleuronectes platessa*) in response to exposure to ethynyl oestradiol analysed by macroarray and Real-Time PCR. *Mutat. Res.* 552: 35-49.
- Comisión Europea. 2004. *From the Farm to the Fork, Safe Food for Europe's Consumers*. Directorate-General for Press and Communication, Luxemburg. Catalog Number NA-59-04-540-EN-C. <http://europa.eu.int/comm/publications/booklets>
- Feng, S. H., J. H. Leu, C. H. Yang, M. J. Fang, C. J. Huang y P. P. Huang. 2002. Gene expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  subunits in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* adapted to different environmental salinities. *Marine Biotechnology* 4 (4): 379-391.
- Fiol, L. y T. Kultz. 2005. Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 102: 927-32.
- Friedli, M., M. Guipponi, S. Bertrand, D. Bertrand, M. Neerman-Arbez, H. S. Scott, S. E. Antonarakis y A. Raymond. 2003. Identification of a novel member of the CLIC family, CLIC6, mapping to 21q22.12. *Gene* 320: 31-40.
- Gewin, V. 2004. The Future of Global Fisheries. *PLoS Biology* 2: 422-427.
- Gornati, R., R. Gualdioni, G. Cavaliere, G. Terova, M. Saroglia y G. Bernardini. 2005. Molecular biology and fish welfare: a winning combination. *Aquaculture International* 13: 51-55.
- Gornati, R., E. Papis, S. Rimoldi, G. Terova, M. Saroglia y G. Bernardini. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341: 111-118.
- Jobling, M. 1998. Feeding and nutrition in intensive fish farming. En: *Biology of Farmed Fish*. K. D. Black y A. D. Pickering (eds.): 67-113. Sheffield Academic Press. Sheffield, Reino Unido.
- Koskinen, H., P. Pehkonen, E. Vehniainen, A. Krasnov, C. Rexroad, S. Afanasyev, H. Molsa y A. Oikari. 2004. Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 745-753.
- Krasnov, A., H. Koskinen, P. Pehkonen, C. E. Rexroad, S. Afanasyev y H. Molsa. 2005. Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. *BMC Genomics* 6 (3): 11 pp. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/3>
- Liang, G. y A. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger-RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Macaranus, J. M., P. B. Mather, S. N. Lal, T. T. Vereivalu, M. Lagibalavu y M. F. Capra. 1997. Genotype and environment: a comparative evaluation of four tilapia stocks in Fiji. *Aquaculture* 150: 11-24.
- MAPA. 2001. *Libro Blanco de la Acuicultura en España*. Secretaría General de Pesca Marítima. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. VA Impresores. Madrid: 521 pp.
- McFarlane, W. J., K. F. Cubitt, H. Williams, D. Rowsell, D. Moccia, R. Gosine y R. S. McKinley. 2004. Can feeding status and stress level be assessed by analyzing patterns of muscle activity in free swimming rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)? *Aquaculture* 239: 467-484.
- Naylor, R. L., R. J. Goldburg, J. H. Primavera, N. Kautsky, M. C. M. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney y M. Troell. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.
- Pan, F., J. M. Zarate, G. C. Tremblay y T. M. Bradley. 2000. Cloning and characterization of salmon HSP90 cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *J. Exp. Zool.* 287: 199-212.
- Place, S. P., M. L. Zippay y G. E. Hofmann. 2004. Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R429-R436.
- Powell, K. 2003. Eat your veg. *Nature* 426: 378-379.
- Provenzano, A. J., Jr. y J. G. Winfield. 1987. Performance of recirculating fish production system stocked with tilapia. *Aquaculture Engineering* 6: 5-26.
- Rakocy, J., W. Cole, D. Bailey y A. Rangel. 1992. The effect of phytoplankton on water quality and tilapia production in closed recirculating systems with solid removal and fixed-film biofiltration. En: *Proceedings of Aquaculture'92: growing toward the 21st century* (21-25 de mayo, 1992. Orlando, Florida, EE UU): 189-190. World Aquaculture Society. Orlando (Florida), EE UU.
- Sarropoulou, E., G. Kotoulas, D. M. Power y R. Geisler. 2005. Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress related genes by the application of cDNA

- microarray technology. *Physiological Genomics* 33: 182-191.
- Shnel, N., Y. Barak, T. Ezer, Z. Dafni y J. van Rijn. 2002. Design and performance of a zero-discharge tilapia recirculating system. *Aquaculture Engineering* 26: 191-203.
- Studynkova J. T., S. Kuchen, E. Jeisy, J. Schedel, F. Charvat, K. Jarosova, H. Sprott, M. Matucci-Cerinic, R. E. Gay, B. A. Michel, K. Pavelka, J. Vencovsky y S. Gay. 2004. The expression of cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in inflammatory muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 22 (4): 395-402.
- Suresh, A. V. y C. K. Lin. 1992. Effect of stocking density on water quality and production of red tilapia in a recirculated water system. *Aquaculture Engineering* 11: 1-22.
- TerBush, D. R., T. Maurice, D. Roth y P. Novick. 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15 (23): 6483-6494.
- Williams, T. D., K. Gensberg, S. D. Minchin y J. K. Chipman. 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology* 65: 141-57.