

RECOMENDACIÓN

MANEJO DE LOS PRIMEROS ESTADIOS LARVIARIOS DEL LENGUADO EN FUNCIÓN DE LA SALINIDAD

Mmanuel Manchado, Carlos Infante, Ana Rodríguez-Rúa, Emilio Salas-Lelion, Paula Armentis, Xavier Cousin, Marie-Laure Bégout, Marian Ponce, José Pedro Cañavate, Catalina Fernández-Díaz

Importancia de los factores ambientales en el desarrollo larvario

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) es un teleosteo de gran importancia comercial y acuícola, debido entre otros factores al rápido desarrollo de las larvas, y a la alta tasa de crecimiento de los juveniles. Este hecho ha motivado la extensión de su cultivo a lo largo de toda la región suratlántica europea.

Durante el desarrollo larvario, el lenguado experimenta un proceso metamórfico por el cual se transforma de una larva bilateral a una morfología asimétrica típica del adulto. Este proceso implica importantes cambios fisiológicos y morfológicos con gran repercusión en acuicultura dada la ocurrencia de malformaciones, malpigmentaciones o reducción de las tasas de crecimiento. Factores ambientales tales como la temperatura, alimentación, densidad o iluminación pueden modular la metamorfosis. De igual forma, la **SALINIDAD** juega un papel clave aunque se posee un conocimiento limitado sobre su influencia en los primeros estadios de desarrollo.



Desarrollo

Desarrollo embrionario	24 horas
Primera alimentación	Día 3
Inicio de metamorfosis	Día 12
Metamorfosis	Día 12-18. 4 estadios
Postlarvas	Día 19



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE



Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional



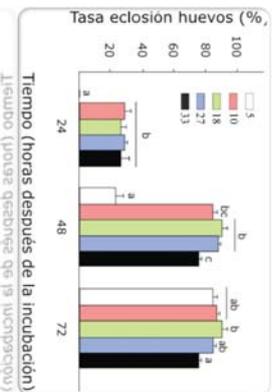
¿A qué salinidad se pueden incubar los embriones hasta su eclosión?

Ensayos de incubación a distintas salinidades indican que las tasas de eclosión son óptimas en el intervalo de salinidad comprendido entre 10 y 33 ‰.

En cambio, por debajo de 10 ‰ si se observan importantes anomalías en el desarrollo embrionario, produciendo un retraso en los tiempos de eclosión y afectando a la viabilidad del propio embrión.



Se representa la tasa de eclosión (media \pm SD) de los huevos incubados a 5, 10, 18, 27 y 33 ‰. Las letras diferentes indican diferencias entre grupos ($P < 0,05$).
Fuente: Salas-Lelion et al., 2012.



La incubación de huevos en el rango de salinidad 10-33 ‰ produce tasas de eclosión óptimas

El lenguado habita en ambientes con altas fluctuaciones de salinidad como estuarios o esteros

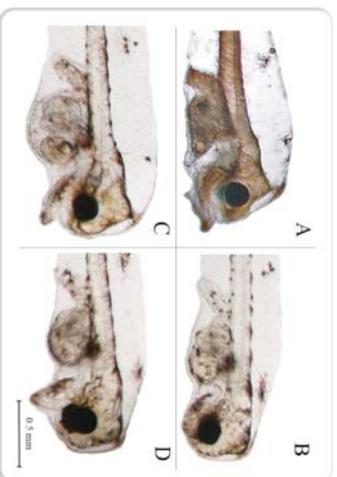
El lenguado senegalés es una especie característica de zonas costeras de la región suratlántica y mediterránea. Antes de la implementación de sistemas intensivos de producción, su cultivo se ha desarrollado de forma tradicional en esteros y marismas, considerándose actualmente una especie interesante para la diversificación de la acuicultura del espacio sudoeste europeo. Pese a la posibilidad de vivir en ambientes con un amplio rango de salinidad apenas se conoce los posibles efectos que esta condición ejerce sobre sus primeros estadios de vida.



Esteros tradicionales para la cría y producción extensiva del lenguado

¿Cuál es la salinidad adecuada tras la eclosión?

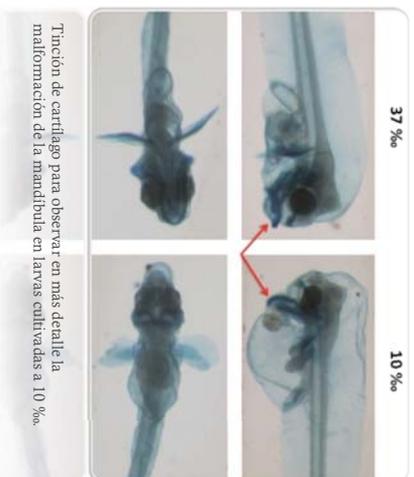
Si la incubación de los huevos se ha realizado a baja salinidad (10 ‰), las larvas eclosionadas deberían transferirse lo antes posible a un medio más salino (al menos 18 ‰). Mantenerlas en el incubador a una salinidad de 10 ‰ llevaría asociado la aparición de malformaciones bucales que impedirían su posterior alimentación. Entre estas deformidades destacan mandíbulas sin desarrollar, desarrollo anormal de la mandíbula inferior, ausencia de la mandíbula superior y mandíbulas permanentemente abiertas.



A. Larva normal cultivada a 8, 27 y 33 ‰. B) Mandíbula no desarrollada; C) Mandíbula superior ausente (D) Deformidad de mandíbula "gaping" en larvas cultivadas a 10 ‰ Fuente: Salas-Leiton et al., 2012

¿Se puede realizar entonces un cultivo larvario con un medio salino de 10 ‰?

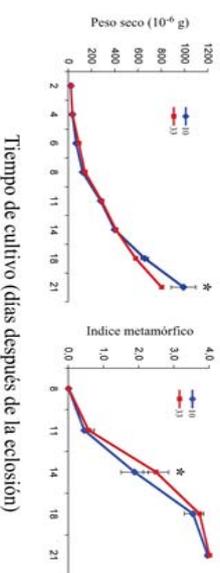
Si. El único requisito es que las larvas eclosionadas desarrollen la boca correctamente, para lo cual es necesario fijar en el incubador una salinidad por encima de 10 ‰ (al menos 18 ‰ o superior). Una vez absorbido el saco vitelino y formada la boca (2-3 días después de la eclosión) las larvas ya pueden transferirse a los tanques correspondientes y ser cultivadas a una salinidad de 10 ‰ sin riesgo alguno. Actuando de esta manera, la actividad alimenticia, el crecimiento, el desarrollo metamórfico y la supervivencia serán similares a los que se obtendrán en un cultivo a alta salinidad (33 ‰).



Las larvas tras la eclosión se deberían transferir a salinidades superiores a 18 ‰ una vez absorbido el saco vitelino y formada la boca (2-3 días después de la eclosión) es posible cultivar las larvas a 10 ‰

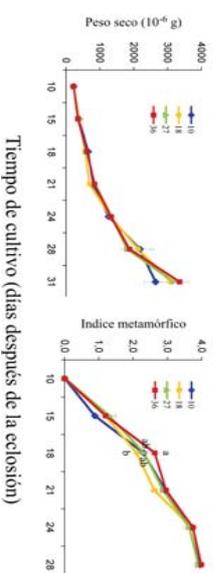
Las larvas de lenguado senegalés criadas en un amplio rango de salinidades no muestran diferencias (o bien son pequeñas) de crecimiento y de evolución de la metamorfosis, indicando que es posible su cultivo en aguas poco salinas.

Experiencia 1: Crecimiento e índice metamórfico a 10 y 33 ‰ (Salas-Leiton et al., 2012) de larvas de lenguado



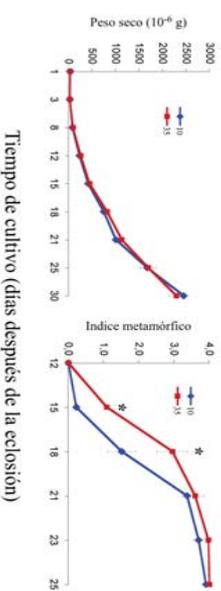
Tiempo de cultivo (días después de la eclosión)

Experiencia 2: Crecimiento e índice metamórfico a 10, 18, 27 y 36 ‰ (Armesio et al., 2011) de larvas de lenguado



Tiempo de cultivo (días después de la eclosión)

Experiencia 3: Crecimiento e índice metamórfico a 10 y 35 ‰ (Armesio et al., 2012) de larvas de lenguado



Tiempo de cultivo (días después de la eclosión)



Aspectos tecnológicos

Es necesario saber que cuanto menor es la salinidad del medio mayor es el peso relativo de las larvas. Por ello, es necesario una adecuada hidrodinámica de los tanques que corrija este efecto.

Aspectos como la inclinación del fondo, la aireación y la localización del flujo de agua adquieren una gran importancia. La hidrodinámica del tanque debe facilitar por un lado la homogeneización del medio, evitando la aparición de zonas muertas donde se puedan depositar las larvas, y por otro la distribución eficiente del alimento.

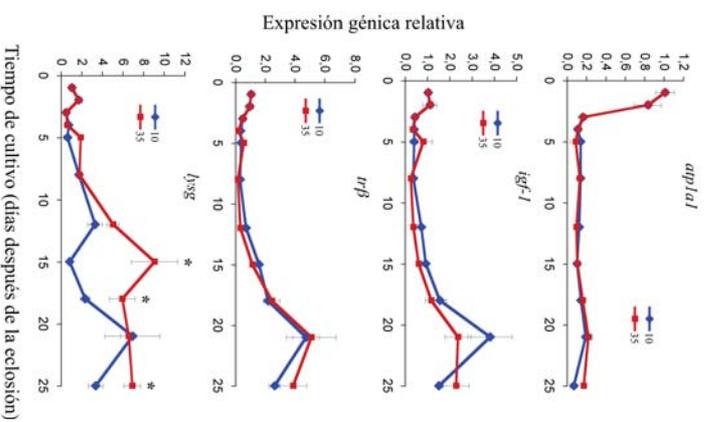
Respecto a la aireación, se debe evitar que sea excesiva para que las larvas no se golpeen y se deformen. Una aireación desbalancada provocará un incremento e inapreciable aumento de las malformaciones esqueléticas.

Los datos de tolerancia a amplios rangos de salinidad hacen idónea esta especie para su cultivo en zonas costeras y de agua salobre.

La **biotecnología** ofrece nuevas herramientas para la evaluación de los efectos y para comprender los mecanismos fisiológicos en los que se basan las observaciones realizadas. La generación de la **SoleaDB** (ver página web de AQUAGENET) nos ha proporcionado nuevos genes para su estudio en las condiciones larvares evaluadas. Esta información ha permitido desarrollar un **Osmochip** basado en la tecnología qPCR de alto rendimiento con una alta sensibilidad, especificidad y amplio rango dinámico.

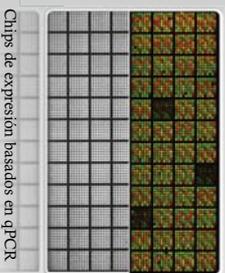
Además, la información de SoleaDB ha permitido la cuantificación de la expresión génica en larvas cultivadas a distintas salinidades. De esta forma, se ha cuantificado los niveles de ARN mensajero de la bomba sodio potasio (*atp1a1*) implicada en la respuesta osmoreguladora, el factor de crecimiento similar a la insulina I (*igf-1*), el receptor beta de hormonas tiroideas (*trfβ*) que regulan el crecimiento y la metamorfosis, y la lisozima g (*lysg*) que participa en la respuesta defensiva frente a bacterias.

No se observaron cambios de expresión en los factores de crecimiento y diferenciación *igf-1* y *trfβ* ni en la bomba *atp1a1*. Los patrones de expresión son los esperados según datos previos (Manchado et al., 2009; Funes et al., 2006). En cambio, hubo menor expresión de *lysg* a salinidad de 10 psu, lo que sugiere un retraso en la maduración del sistema inmune innato. Estudios con immunochip y RNA-seq permitirán confirmar si otros genes relacionados con el sistema inmune también se ven afectados y la relevancia del hallazgo.



Las técnicas genómicas permiten evaluar las respuestas fisiológicas a la salinidad del medio

La evaluación de las respuestas celulares mediante técnicas moleculares permite complementar e integrar los resultados biométricos y morfológicos obtenidos. La integración de estos resultados se convierte en una herramienta de decisión para los cambios y mejoras de los protocolos de cultivo larvario con el fin de alcanzar condiciones óptimas de crecimiento, salud y bienestar.



Referencias

- Low salinity induces dysfunctional moults without affecting the overall development in yolk sac larvae of Senegalese sole (Solea senegalensis) Kamp, 1838*. Rodríguez-Rúa A, Asensio E, Arneso P, Infante C, Fernandez-Díaz C, Cahavate JP, Salas-Letion E. *Aquaculture Europe* 2011. 18-21 Octubre Rhodes (Grecia).
- High Tolerance of Senegalese sole (S. senegalensis) Kamp, 1838) larvae to a low salinity culture medium*. Arneso E, Rodríguez-Rúa A, Arneso P, Infante C, Cahavate JP, Salas-Letion E, Aquaculture Europe 2011. 18-21 Octubre Rhodes (Grecia).
- Effect of salinity on egg hatching, yolk sac absorption and larval rearing of Senegalese sole (Solea senegalensis) Kamp, 1838*. 2012. Salas Letion E, Rodríguez-Rúa A, Asensio E, Infante C, Manchado M, Fernández-Díaz C, Cahavate JP. *Reviews in Aquaculture*, 4 (2): 49–58.
- Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of thyroid hormone receptors in Senegalese sole, 2009*. Manchado M., Infante C., Reboldinos L., Cahavate J.P. *General and Comparative Endocrinology* 160(2): 139-147.
- Insulin-like growth factors I and II in the sole Solea senegalensis: cDNA cloning and quantitation of gene expression in tissues and during larval development*. 2006. Funes V, Asensio E, Ponce M, Infante C, Cahavate JP, Manchado M. *General and Comparative Endocrinology* 149: 166-172.
- Metamorfosis del languido senegalés (Solea senegalensis) Kamp, 1838) a baja salinidad: parámetros productivos y análisis transcriptómico*. 2011. Arneso P, Asensio E, Salas-Letion E, Zerolo R, Manchado M, Infante C. XIII Congreso Nacional de Acuicultura. 21- 24 Noviembre Castelldefels (Barcelona).
- Salinity effects on Senegalese sole Solea senegalensis Kamp larval development: productive parameters and gene expression analysis*. 2012. Arneso P, Asensio E, Salas-Letion E, Crespo A, Torres S, Zerolo R, Manchado M, Infante C. AQUA 2012. 1-5 Septiembre Praga (República Checa).

AQUAGENET es un proyecto financiado por el programa INTERREG IVB SUDOE (SOE2/1381PI/E287) para la creación de una red de biotecnología en acuicultura



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE

ifremer



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional

Array para la evaluación de la respuesta de genes del sistema inmune en lenguado

Manchado M, Ponce M, Crespo A, Aparicio M, Armesto P, Berbel C

Introducción Descripción de la herramienta	Panel de genes Descripción del panel	Descripción funcional
Pag. 1-4	Pag. 5-6	Pag. 7-8

Andalucía
se mueve con Europa

Biotecnología para estudiar el sistema inmune innato

La inmunidad es un mecanismo fisiológico que confiere protección frente a infecciones, actuando contra los patógenos y sus productos tóxicos.

La respuesta inmune, de forma genérica, incluye variados y complejos mecanismos de defensa, aunque por la naturaleza de su respuesta, se suele subdividir en *“sistema inmune innato”* (no específico) y *“sistema inmune adquirido”* (específico). Tales sistemas no son excluyentes sino que la respuesta inata precede a la adaptativa, además de activar y determinar la naturaleza de la misma y de cooperar en el mantenimiento de la homeostasis

1. **Sistema inmune innato (SII)**. Constituye la primera barrera defensiva frente a patógenos. Está formado por tres componentes: **humoral** (como la lisozima, transferrina, sistema del complemento, citoquinas, anticuerpos naturales, inhibidores de proteasas y péptidos antimicrobianos), **físico** (superficies mucosas de la piel, branquias y epidermis) y **celular** (monocitos/macrófagos, los granulocitos (neutrófilos), las células



La evaluación de la respuesta inmune es esencial para garantizar la salud y bienestar de los animales

Durante el proceso de producción, los lenguados están sometidos a distintos agentes patógenos y situaciones de estrés que pueden comprometer el estado inmunológico y defensivo de los peces

El sistema inmune innato es la primera barrera defensiva del organismo frente a patógenos y responde de forma inespecífica ante los estímulos

citotóxicas no específicas y las células dendríticas y epiteliales).

El SII no desencadena respuestas específicas, lo cual significa que estos sistemas reconocen y responden a los patógenos de una forma genérica. Además, esta inmunidad no es duradera a diferencia de la respuesta mediada por anticuerpos.

La respuesta del SII en peces media y regula la reparación de heridas, inflamación y patógenesis de muchas enfermedades

El reconocimiento de agentes extraños por el sistema inmune innato es mediado por proteínas/receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) característicos de cada uno de ellos. Estos receptores actúan como forma soluble (proteínas de unión a LPS, pentaxinas, complemento, colectinas) o asociados a la membrana de las células inmunes (epiteliales, fagocíticas, dendríticas, granulocíticas) y las moléculas que reconocen incluyen polisacáridos, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicano, DNA bacteriano, ácido lipoteicoico, peptidoglicano, glucano β 1,3 de hongos, y ADN bacteriano y RNA viral de doble

cadena y otras moléculas no encontradas normalmente en la superficie de organismos pluricelulares.

2. **Sistema inmune adquirido o adaptativo (SIA)** es más evolucionado, específico y con memoria, está formado por una parte humoral (anticuerpos) y otra celular (linfocitos T y B y sus clones). Entre sus características fundamentales está: (i) la capacidad para reconocer de forma específica un antígeno (Ag); (ii) la memoria o posibilidad de recordar exposiciones previas a un Ag; (iii) la maduración de la respuesta inmune o capacidad de responder de forma más eficaz después de una nueva exposición al mismo Ag.

Durante la evolución, el SII ha representado la principal defensa frente a microbios hasta la aparición del SIA en los vertebrados mandibulados hace 450 millones de años. Los peces comprenden la primera clase de vertebrados evolutivamente que poseen elementos de ambos sistemas.

El SSI es funcional a edad temprana, antes o justo después de la eclosión, siendo fundamental durante el desarrollo larvario, a diferencia del SIA que tarda de semanas a meses en desarrollarse

Principales componentes del sistema inmune innato

HUMORAL	FÍSICO-QUÍMICOS	CELULAR
Lisozima	superficies mucosas de la piel, branquias y epidermis)	Monocitos/macrófagos, Granulocitos (neutrófilos), Células citotóxicas no específicas
Transferrina	Mucus	Células dendríticas
Sistema del complemento	pH ácido	Células epiteliales
Citoquinas	Microbiota	
Anticuerpos naturales		
Inhibidores de proteasas		
Péptidos antimicrobianos		

¿Porqué es importante monitorizar la respuesta del sistema immune innato?

El adecuado funcionamiento de la respuesta defensiva frente a un agente patógeno es esencial para garantizar la producción piscícola. Los factores humorales del sistema inmato representan la primera barrera defensiva del pez ante un agente microbiano. La cuantificación de la expresión de los genes que codifican para estos factores nos va a permitir determinar el estado de inmunocompetencia de la población en cultivo y su estado de salud. Dada la cantidad de factores implicados en esta respuesta immune, y con el objetivo de poder comprender la naturaleza y efecto de los estímulos se requiere de una herramienta de alto desarrollo que monitorice las principales rutas defensivas.

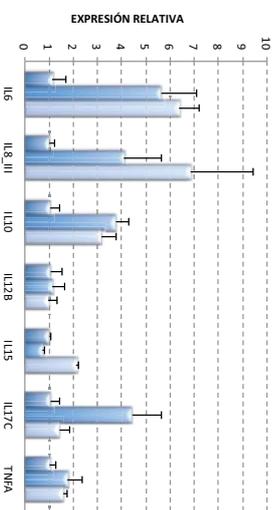
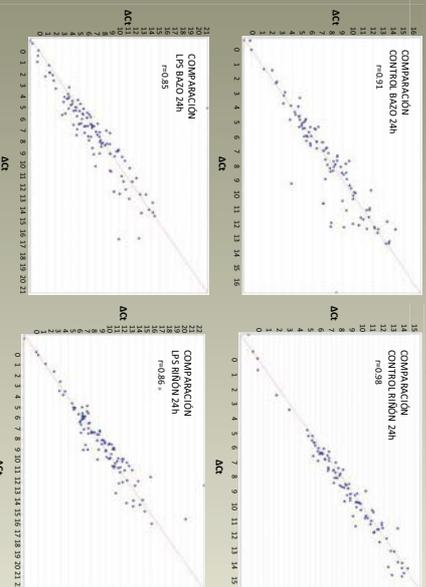
¿Se puede aplicar a cualquier tipo de muestra?

En principio, la herramienta está preparada para tejidos de naturaleza immune, es decir, riñón, bazo, timo, e intestino. También se ha aplicado con éxito en muestras de larvas, especialmente en los estadios metamórficos y posteriores.

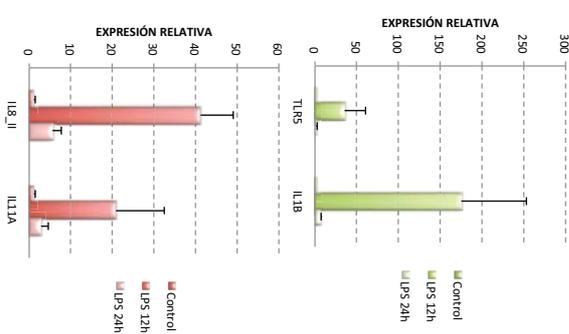
La herramienta se puede aplicar a otros tejidos pero tendrá un alto porcentaje de fallo de ensayos dependiendo de la expresión de los genes en dichos tejidos y las condiciones de cría. Por tanto, se desaconseja su uso en estos otros tejidos en beneficio de otras técnicas o hasta que se compruebe se la tasa de éxito de cada ensayo para cada muestra y condición específica.

¿Son reproducibles los datos?

La reproducibilidad del ensayo y la obtención de muestras es muy importante para la fiabilidad de los resultados. Los ensayos diseñados en este inmunochip y testados en muestras de riñón y bazo en lenguados control e inducidos con lipopolisacárido (LPS) han mostrado correlaciones superiores al 86% entre muestras independientes para el conjunto de genes analizados al comparar los incrementos de Ct respecto a los HK-G. En los controles, con datos de expresión más estables, el índice de correlación llegó a alcanzar el 98%. Para los replicados técnicos, las tasas de correlación son superiores al 97%. Esto indica la reproducibilidad y confianza de los ensayos en la herramienta diseñada.



Para comprobar la utilidad de la herramienta para cuantificar la expresión de los genes ante un estímulo microbiano, se analizaron muestras de riñón céfalo de animales expuestos a LPS a las 12 y 24 horas tras la inoculación y se comparó con los controles inoculados con PBS. La interleuquina 1B (IL1B) y receptor TLR5 alcanzaron activaciones de hasta 175,2 y 6356 veces, respectivamente a las 12h. La interleuquina 8 tipo II (IL8 II) e interleuquina 11A (IL11A) de 41,1 y 20,9 veces, respectivamente también a las 12h. En el resto de interleuquinas la inducción fue menor aunque significativas (excepto IL12B). Por tanto, los resultados indican que la herramienta es capaz de detectar la respuesta específica al estímulo observando diferencias temporales y de intensidad de los genes relacionadas con su función.



	LPS		Poly (I:C)	
	12h	24h	12h	24h
<i>IRF1</i>	2,0	2,2	17,1	4,3
<i>IRF2</i>	1,4	1,1	5,7	3,3
<i>IRF3</i>	3,5	3,7	57,7	43,9
<i>IRF4A</i>	2,0	0,8	2,4	2,8
<i>IRF5</i>	0,6	0,5	0,2	0,4
<i>IRF7</i>	0,8	2,4	68,9	13,4
<i>IRF8</i>	1,2	1,2	3,5	1,9
<i>IRF9</i>	2,1	2,0	6,6	3,8
<i>IRF10</i>	3,4	4,0	44,3	21,1
<i>IFN_C</i>	1,4	1,5	668,6	177,8
<i>MX</i>	2,9	1,0	83,0	45,8



Para validar la especificidad de la herramienta se realizó una comparación entre los datos de expresión obtenidos en muestras de animales tratados con LPS (estímulo bacteriano) y poli I:C (que simula la infección vírica). Como se muestra en la tabla adjunta, se puede observar que los genes IFN tipo C y MX sólo activaron su expresión de forma significativa (hasta 668,6 y 84 veces, respectivamente) en las muestras tratadas con el estímulo vírico, indicando la especificidad de respuesta al estímulo. De igual forma, los genes IRF3, IRF7, IRF9 e IRF10 también activaron su expresión de forma más intensa en aquellos animales tratados con poli I:C, confirmando los datos

PANEL DE GENES

Nombre	Símbolo	Código	Función
Ruta del complemento			
Complemento C1q proteína 4	C1qL4	AHSOLP	Ruta complemento via clásica
Complemento C2	C2	AIIIMRX	Ruta complemento via clásica
Complemento C4-1	C4-1	AILLJ4D	Ruta complemento via clásica
Complemento C4-2	C4-2	AIMSHAL	Ruta complemento via clásica
Complemento C3	C3	AIKAKX5	Ruta complemento via alternativa
Complemento C5	C5	AINIFGT	Ruta complemento via alternativa
Complemento Factor H	CPH	AIQJBS9	Ruta complemento via alternativa
Complemento C9	C9	AIPADMI	Complejo de ataque a membrana
Reconocimiento de Patrones moleculares asociados a patógenos			
Proteína de Reconocimiento de peptidoglicano L1	PGRPL1	A120TJH	Reconocimiento de peptidoglicano
Receptor tipo toll 1	TLR1	AIRR9ZH	Reconocimiento de PAMPs de Bacterias Gram +
Receptor tipo toll 5S	TLR5S	AIS075P	Reconocimiento de flagelinas bacterianas
Receptor tipo toll 8B	TLR8B	AIT96BX	Reconocimiento de ARN monocatenario
Receptor tipo toll 9	TLR9	AVI4H5	Reconocimiento de motivos CpG no metilados de ADN bacteriano
Respuesta defensiva frente a bacterias			
Lisozima tipo g1	GLYS1	AIWR2OD	Lisozima. Destrucción de membrana bacteriana
Lisozima tipo g2	GLYS2	ADX00UL	Lisozima. Destrucción de membrana bacteriana
Lisozima tipo g3	GLYS3	AIY9Y0T	Lisozima. Destrucción de membrana bacteriana
Lisozima tipo c1	CLYS1	A101W61	Lisozima. Destrucción de membrana bacteriana
Lisozima tipo c2	CLYS2	A11RV69	Lisozima. Destrucción de membrana bacteriana
Respuesta defensiva frente a virus			
Factor regulador de interferón 1	IRF1	ADX00UK	Constitutivo e inducible por IFN γ
Factor regulador de interferón 2	IRF2	AIY9Y0S	Constitutivo. Atenua respuestas de IFN tipo I
Factor regulador de interferón 3	IRF3	A101W60	Promueve inmunidad innata antibacteriana y antiviral
Factor regulador de interferón 7	IRF7	A11RV68	Constitutivo e inducible por IFN tipo I. Promueve inmunidad innata antibacteriana y antiviral
Factor regulador de interferón 8	IRF8	A120TIG	Constitutivo e inducible por IFN γ
Factor regulador de interferón 9	IRF9	A139RPO	Constitutivo. Meda respuestas de IFN tipo I
Factor regulador de interferón 10	IRF10	A15HPVW	Constitutivo e inducible. Regula estadios tardíos de la respuesta inmune
Proteína inducible por interferón Mx	Mx	A189KEL	Suprime la replicación vírica
Interferón tipo C	IFNC	AV70L8D	Suprime la replicación vírica
Síntesis de prostaglandinas			
Ciclooxigenasa 1A	COX1A	A139RPP	Inflamación. Constitutiva
Ciclooxigenasa 2	COX2	A15IPVX	Inflamación. Inducible

CONTINUA...

5

Nombre	Símbolo	Código	Función
Antígeno de diferenciación			
Antígeno de diferenciación CD4	CD4	AIKAKX6	Superficie de los linfocitos T colaboradores
Antígeno de diferenciación CD8 cadena alfa	CD8A	AHSOLOQ	Superficie de los linfocitos T citotóxicos
Antígeno de diferenciación cadena beta	CD8B	AIIIMRY	Superficie de los linfocitos T citotóxicos
Citoquinas y sus receptores			
Quimiocina C-C19	CCL19	AIGJOFI	Quimiotaxis de linfocitos
Quimiocina C-C20	CCL20	AIFAR9A	Quimiotaxis de linfocitos
Quimiocina C-C25	CCL25	AIBXQOM	Quimiotaxis de linfocitos
Quimiocina C-C CK3	CCK3	A1AAZKE	Quimiotaxis de linfocitos
Quimiocina C-X-C13	CXCL13	AID1T22	Quimiotaxis de linfocitos
Quimiocina C-X-C10	CXCL10	AICSVWU	Quimiotaxis de linfocitos
Interleuquina 1B	IL1B	A16RNI4	Citoquina proinflamatoria
Interleuquina 6	IL6	A170L8C	Citoquina proinflamatoria
Interleuquina 8 tipo II	IL8_II	A189KEK	Citoquina proinflamatoria y quimiotaxis
Interleuquina 8 tipo III	IL8_III	A1AAZKD	Citoquina proinflamatoria y quimiotaxis
Interleuquina 10	IL10	AIBXQOL	Citoquina antiinflamatoria
Interleuquina 11A	IL11A	AICSVWT	Citoquina antiinflamatoria
Interleuquina 12 beta	IL12b	AID1T21	Citoquina proinflamatoria
Interleuquina 15	IL15	AIFAR89	Citoquina proinflamatoria
Interleuquina 17C	IL17C	AIGJOFH	Citoquina proinflamatoria
Factor Necrosis Tumoral alfa	TNFA	A16RNI5	Citoquina proinflamatoria
Receptor de interleuquina 1 tipo 1	IL1RL1	A1RR9ZG	Receptor de interleuquina específico
Receptor de interleuquina 8 tipo 2	IL8R1	AIS075O	Receptor de interleuquina específico
Receptor de interleuquina 10 subunidad beta	ctrb4	AT96BW	Receptor de interleuquina específico
Receptor de interleuquina 15 subunidad alfa	IL15RA	AVI4H4	Receptor de interleuquina específico
Receptor de interleuquina 17 subunidad alfa	IL17Ra	A1WR2OC	Receptor de interleuquina específico
Síntesis de prostaglandinas			
Ciclooxigenasa 1A	COX1A	A139RPP	Inflamación. Constitutiva
Ciclooxigenasa 2	COX2	A15IPVX	Inflamación. Inducible



6

FUNCIONES INMUNOLÓGICAS

Ruta complemento

El sistema del complemento es un conjunto de proteínas que actúan en cascada con el objetivo de defender al organismo frente a los microorganismos. Esta ruta se puede activar a través de 3 vías: la clásica (CCP), la alternativa (ACP), y la de las lectinas (LCP). La vía clásica interactúa con el sistema inmune adaptativo mediante la unión a inmunocomplejos. La vía alternativa conecta con el sistema de inmunidad innata, interaccionando directamente con la superficie del microorganismo. La ruta de las lectinas es una especie de variante de la ruta clásica, pero que se inicia sin necesidad de anticuerpos. Las 3 vías llevan a la vía lítica que conduce a la opsonización y muerte del patógeno. En el inmunochip se han incluido las fracciones C1q, C2, C4-1, C4-2 de la ruta clásica, C3, C5 y factor H de la vía alternativa y C9 del complejo de ataque a la membrana

Citoquinas

Las citoquinas son una familia de proteínas secretadas por distintos tipos celulares (macrófagos, neutrófilos, células NK, células endoteliales y células epiteliales) involucradas en reacciones inflamatorias inmunológicas. Las citoquinas poseen pesos moleculares comprendidos entre 10 y 50 kDa, a menudo glicosiladas. Se producen localmente actuando de forma paracrina o autocrina. Además, son extremadamente potentes, ya que cantidades picomolares son capaces de desencadenar una respuesta inflamatoria, las diversas citoquinas pueden exhibir una o varias de las siguientes características: i) pleiotropía, múltiples efectos al actuar sobre diferentes células; ii) redundancia, varias citoquinas pueden ejercer el mismo efecto; iii) sinergismo, dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente; iv)

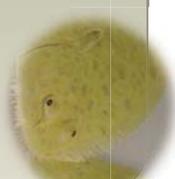
antagonismo, inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos. Las citoquinas se clasifican atendiendo a su funcionalidad o tipo celular distinguiéndose las interleuquinas, las quimioquinas, los interferones, los factores estimuladores de colonias, los factores de crecimiento y los factores de necrosis tumoral.

Las *quimioquinas* representan un tipo de citoquinas que actúan como moléculas con propiedades quimioatrácticas y señalizadoras entre leucocitos. Dependiendo del número de cisteínas y la secuencia del dominio N-terminal, las quimioquinas se dividen en 4 subfamilias, α , β , γ y δ , también denominadas como CXC (con dos cisteínas separadas por un aminoácido), CC (con dos cisteínas adyacentes), XC y CX3C (con tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas), respectivamente. En pez cebra se han identificado más de 100 quimioquinas del tipo CXC (81), CC (25) y XC (1) y ninguna del tipo CX3C. Por el contrario, sólo se han identificado 18 quimioquinas en los genomas de *T. rubripes* y *Tetraodon nigroviridis*. En el chip se han incorporado 4 quimioquinas tipo CC y 2 tipo CXC.

Las *interleucinas* median la comunicación entre células inmunes e inflamatorias regulando su crecimiento, diferenciación y activación celular. En mamíferos se conocen 35 tipos aunque en peces la clasificación es más completa dado los procesos de duplicación de genomas que han ocurrido durante su evolución. Para ejercer su acción, las interleucinas se unen a receptores específicos. En el chip se han considerado tanto interleucinas pro- y antiinflamatorias tales como IL1B, IL6, IL8 tipo II y III, IL10, IL11A, IL12b, IL15, IL17C y los receptores IL1RL1, IL8R1, CRP4, IL15RA, IL17RA

Selección de genes y diseño de sondas

Para seleccionar los genes se hizo una búsqueda en la SoleaDB (www.solea.ucm.es). En este link se puede descargar el fichero tipo fasta correspondiente con las secuencias utilizadas y depuradas. El formato seleccionado para el chip ha sido de 48x64, que permite utilizar 48 muestras diferentes con 64 ensayos qPCR. El diseño de las sondas se realizó con el software específico para la plataforma y se puede consultar [aquí](http://link). El diseño final del chip incluye 53 genes implicados en la respuesta del Sistema Inmune Innato, 3 housekeeping y 8 controles negativos y se puede consultar en la tabla adjunta.



Factores reguladores de interferón

La familia de los IRF comprende un conjunto de factores de transcripción que regulan la expresión de interferones y genes estimulados por interferón. En mamíferos, se han identificado hasta 9 tipos de IRF, ocho de los cuales controlan la diferenciación y/o actividades funcionales de las células dendríticas. El estudio de la familia de IRFs ha ganado interés en los últimos años gracias al descubrimiento de nuevas funciones que los convierten en un enlace entre la respuesta inmune a patógenos y la supresión de tumores. En el chip se han estudiado los IRF1, IRF2, IRF3, IRF7, IRF8, IRP9, IRF10

Proteína Mx

La proteína Mx es una de las proteínas inducidas por IFN más estudiada ya que ha relacionado con una acción antiviral directa incluyendo especies tan importantes para la acuicultura como la rodballo, dorada o lenguado. Esta proteína pertenece a la familia de GTPases y su mecanismo de acción se ha asociado a su capacidad de interferir la replicación viral mediante el secuestro de proteína N de la nucleocápsida sintetizada de novo mediante la formación de grandes complejos perinucleares.

Antígenos de diferenciación

Los antígenos de diferenciación leucocitaria son proteínas de superficie de algún tipo de leucocito. Estos se denominan CD (cluster of differentiation) seguido de un número ordinal ya que al madurar las células modifican los antígenos leucocitarios de superficie. Existen más de 160 tipos de CD. En concreto, en el chip se han incorporado los CD4, un marcador linfocitos T colaboradores y CD8 de los linfocitos T citotóxicos

Isozimas

Las isozimas son enzimas claves de la respuesta inmune innata contra la infección bacteriana. Estas catalizan la hidrólisis de las uniones β -(1,4)glicosídicas de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. En bacterias Gram positivas, la isozima actúa directamente causando la lisis de la capa más externa de peptidoglicanos. En bacterias Gram negativas, la isozima actúa en sinergia con péptidos antimicrobianos catiónicos que permeabilizan la membrana

exterior y exponen la capa de peptidoglicanos interna.

Dado el papel clave de las isozimas para la lucha frente a las infecciones bacterianas, éstas se pueden encontrar en todos los rinós. En total se han identificado hasta seis tipos aunque en vertebrados hay dos: tipo c o de pollo y tipo g o de ganso. Aunque estos tipos difieren claramente en sus pesos moleculares, la composición de aminoácidos y sus propiedades enzimáticas, su estructura tridimensional sugiere que todas estas isozimas podrían tener un origen evolutivo común. En lenguado se han identificado 2 tipos de isozima g y 3 tipos de isozima c y que han sido incorporadas en el chip.

Receptores tipo Toll

Son un tipo de proteína que se encuentra en las células del sistema inmune y que cumplen la función de reconocimiento de patógenos. Estos receptores se expresan en diferentes tipos celulares, principalmente células del sistema inmune tales como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y linfocitos, además de células endoteliales y epiteliales. Según su localización los TLR se clasifican en aquellos localizados en la superficie de membrana (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 y TLR13) y los ubicados en endosomas (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9). En este chip se han incluido TLR1, TLR5, TLR8B y TLR9

Síntesis de prostaglandinas

Las prostaglandinas son moléculas producidas a partir de la oxidación del ácido araquidónico en una reacción catalizada por las enzimas ciclooxigenasas. Las prostaglandinas son moléculas de señalización de vida media corta, que actúan como mensajeros autocrinos y paracrinos y relacionada con los procesos inflamatorios. Las enzimas ciclooxigenasas 1 y 2, son proteínas que tienen un origen común y son muy parecidas en su estructura. En mamíferos, la COX-1 se expresa de forma constitutiva prácticamente en todas las células y presenta gran actividad mientras que la COX2 no aparece de forma constitutiva, pero puede ser inducida por citoquinas, factores de crecimiento y endotoxinas. En el chip se han incluido

ifremer



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE



Unión Europea
Fondo Europeo
de Desarrollo Regional

Array para la evaluación de la respuesta de genes implicados en osmoregulación y respuesta defensiva a estrés en lenguado

Manchado M, Ponce M, Crespo A, Aparicio M, Armesto P, Berbel C

Introducción
Descripción de la
herramienta
Pag 1-3

Panel de genes
Descripción del panel
Pag 4-5

Descripción funcional
Pag 6-7



Biotechnología para estudiar la capacidad osmoreguladora y estrés

La osmoregulación se refiere a la capacidad que tienen los peces para regular la presión osmótica y concentración de sales en el medio interno



La osmoregulación y la respuesta al estrés son dos factores importantes para la producción

Las especies estuarinas como el lenguado están expuestas en su medio natural a cambios bruscos de salinidad, junto con otros de temperatura, oxígeno disuelto y turbidez, que requieren respuestas fisiológicas específicas para su supervivencia. El lenguado es una especie muy abundante en términos de alevinaje en casi todos los caños de la Bahía de Cádiz. En este hábitat, la salinidad media varía entre 21,0 ppt (Enero) y 47,4 ppt (Agosto). Esto indica que esta especie es muy tolerante a los cambios de salinidad, por lo cual se considera como una especie eurhalina.

El lenguado es capaz de mantener la presión osmótica interna constante con independencia del medio que le rodea. De hecho, el punto isoosmótico del plasma de los juveniles se ha estimado en 10,8 ppt. Para ello, ha tenido que desarrollar mecanismos osmorreguladores que mantienen constante la homeostasis interna.

Durante el proceso de producción, los lenguados están sometidos a distintos agentes estresantes y diferentes salinidades, por lo cual se hace necesario conocer y evaluar el estado fisiológico de los animales



Unión Europea
Fondo Europeo
de Desarrollo Regional



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE

El estrés se puede definir como cualquier situación intrínseca o extrínseca que modifica el estado fisiológico normal de un organismo con pérdida de bienestar

El bienestar de los animales se refiere a un estado positivo tanto físico, fisiológico como mental. En términos generales, el bienestar animal se engloba en las “cinco libertades”: libres de sed y hambre, libres de incomodidad, libres de dolor, lesiones y enfermedad, libertad de expresar un comportamiento normal y libres de miedo y angustia.

El estrés provoca una alteración del equilibrio u homeostasis del animal, con pérdida de bienestar. Por ello, los peces poseen sistemas defensivos muy conservados evolutivamente que incluyen multitud de neuro péptidos, hormonas y otras sustancias que actúan como mediadoras de la respuesta a distintos estímulos. Al igual que los mamíferos, los peces pueden desencadenar respuestas adaptativas (Síndrome General de Adaptación) destinadas a mantener la homeostasis del organismo. Estas se pueden dividir en tres etapas:

-*Etapas de alerta* que implica la liberación de catecolaminas y movilización de energía, principalmente glucosa

-*Etapas de resistencia* con la liberación de

cortisol y compensación de los gastos de energía ocasionados por el estado de estrés

-*Etapas de agotamiento* cuando se pierde la capacidad de respuesta afectando las condiciones vitales.

Por tanto, la adaptación al estrés va a tener un fuerte impacto sobre el crecimiento, reproducción y sistema inmune, con una mayor predisposición a sufrir una enfermedad, trastornos reproductivos y retrasos en el crecimiento. Esto es especialmente importante en peces, expuestos a un alto número de agentes estresantes y a la existencia de una respuesta centralizada en el riñón anterior.

Los mecanismos disponibles para la osmorregulación y la respuesta defensiva a estrés son diversos, dada la distinta naturaleza de los agentes estresantes y la fluctuación del medio que lo rodea. Estos mecanismos han sido clave en los procesos de especialización y diversificación de las especies acuáticas. Su conocimiento es clave para la optimización de los sistemas acuícolas.

Principales factores de estrés en peces criados en cautividad

Ambiente y alimentación	Manejo	Fisiológicos
Cambios bruscos de temperatura	Captura	Reproducción
Cambios de salinidad	Anestesia	Metamorfosis
Anoxia	Clasificación	
Productos nitrogenados	Carga	
Niveles extremos de pH	Vacunación	
Turbidez	Cambios de tanque	
Tamaño de la ración	Tipo de tanque	
Contenido proteico y lipídico	Transporte	



¿Cuál es la importancia de esta herramienta?

El amplio espectro de rutas metabólicas que analiza, su precisión, sensibilidad y rapidez, la convierte en una herramienta que puede ser aplicada a la industria acuícola y en el campo de la investigación para dar respuestas rápidas y fiables ante cuestiones relacionadas con el bienestar animal y su capacidad de adaptación ante agentes estresantes diversos. La mejora y optimización basada en la innovación biotecnológica es clave para la competitividad de las empresas del sector.

¿En qué tecnología se basa?

En el diseño de la herramienta se ha considerado la tecnología de alto rendimiento basada en PCR en tiempo real (Openarray), la técnica de mayor precisión para la cuantificación de los transcritos celulares. Además, es rápida, fiable y de gran sensibilidad.

¿Que incluye el chip?

El chip contiene sondas específicas de genes. Los genes se han seleccionado por su función relacionada con los mecanismos especializados en la excreción activa de sales (regulación iónica),

El formato elegido ha sido de 48x64 para analizar un amplio espectro de rutas metabólicas a un precio competitivo

El formato seleccionado permite evaluar 48 muestras diferentes con 64 ensayos qPCR. Los genes se seleccionaron de un amplio panel de candidatos según su función y representación en la SoleaDB. En este [link](#) se puede descargar el fichero tipo fasha correspondiente con las secuencias utilizadas y procesadas. El diseño final de las sondas se realizó con el software específico para la plataforma y se puede consultar [aquí](#). El diseño final del chip incluye 53 genes implicados en la regulación osmótica y estrés, 3 housekeeping y 8 controles negativos tal como se muestra en la table del panel de genes



incorporación de agua del medio (regulación osmótica), bombas de iones y canales de membrana, regulación hormonal como los eje hipotalámico-hipofisario-interrrenal, eje de la prolactina y hormonas neurohipofisarias como la arginina vasopresina, sistema renina-angiotensina, péptidos natrurécticos o sistema neurosecretor caudal de la urotensina. Otros sistemas reguladores de la capacidad osmorreguladora, tal como el eje somatotrópico y eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo, se han incluido en el chip de endocrino

PANEL DE GENES

Nombre	Símbolo	Código	Función
Angiotensinógeno	AGT	A139RPJ	Sistema Renina-Angiotensina
Renina	REN	A151PVR	Sistema Renina-Angiotensina
Enzima convertidora de angiotensina 1	ACE1	A16RN1Z	Sistema Renina-Angiotensina
Enzima convertidora de angiotensina 2	ACE2	A170L77	Sistema Renina-Angiotensina
Prolactina1	PRL1	A189KEF	Eje de la prolactina
Prolactina2	PRL2	A1AAZ18	Eje de la prolactina
Receptor de la prolactina	PLR	A1B3XQG	Eje de la prolactina
Receptor del péptido liberador de prolactina	PRPR	A1CSWVO	Eje de la prolactina
Receptor de mineralocorticoides	MR	A1D1T2W	Eje HPI
Hormona liberadora de corticotropina	CRH	A1KAKX1	Eje Hipotalámico-hipofisario-interrrenal (HPI)
Proteína ligadora de CRF 1	CRFBP1	A1LJ139	Eje HPI
Proteína ligadora de CRF 2	CRFBP2	A1MSHAH	Eje HPI
Receptor de la hormona liberadora de corticotropina	CRFR	A1N1FGP	Eje HPI
Proopiomelanocortina alfa1	POMCa1	A1PADMX	Eje HPI
Proopiomelanocortina alfa2	POMCa2	A1QJBS5	Eje HPI
Proopiomelanocortina beta	POMCb	A1RR92D	Eje HPI
Receptor de glucocorticoides I	GR1	A1T96BT	Eje HPI
Receptor de glucocorticoides II	GR2	A1WRZ19	Eje HPI
Receptor de Melanocortina I	MC1R	A1S075L	Pigmentación
Factor de transcripción de choque osmótico 1	O5TF1	A1FAR84	Factor de transcripción específico de estrés osmótico
Aquaporina 3A	AQP3A	A1HSOLK	Canales de agua
Aquaporina 12	AQP12	A111MR5	Canales de agua
Aquaporina 1AA	AQP1AA	A1KAKX0	Canales de agua
Cotransportadores Na-K-Cl 1 alfa	NKCC1a	A1LJ138	Transportadores iónicos
Cotransportadores de Na-K-Cl 1 beta	NKCC1b	A1MSHAG	Transportadores iónicos
Cotransportadores de Na-K-Cl 2	NKCC2	A1N1FGO	Transportadores iónicos
Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística	CFTR	A1PADMW	Transportador iones cloruro
Arginina Vasotocina	AVT	A1QJBS4	Homona reguladora de función renal
Péptido natriurético tipo C1	CNP1	A1RR92C	Homeostasis de fluidos
Péptido natriurético tipo C4	CNP4	A1S075K	Homeostasis de fluidos

CONTINUA...

4

Nombre	Símbolo	Código	Función
Urotensina II	UTS2	AT968B5	Función renal y cardiovascular
Colágeno tipo 1A1	COL1A1	A1V4H0	Estructural
Colágeno tipo 1A3	COL1A3	A1WR2N8	Estructural
Colágeno tipo 1A2	COL1A2	A1X00UG	Estructural
ATPasa Na+/K+ subunidad alfa1a	ATP1A	A1HSOLL	Bomba de protones
ATPasa Na+/K+ subunidad beta1a	ATP1B	A111MRT	Bomba de protones
Proteína de choque térmico HSP70 4L	Hsc70-4L	A1G1QFC	Chaperonas de estrés
Proteína de choque térmico HSP70 cognate1	Hsc70-1	A101W6W	Chaperonas de estrés
Proteína de choque térmico HSP70 cognate2	Hsc70-2	A11RYC4	Chaperonas de estrés
Proteína de choque térmico HSP70i	HSP70i	A1Y9Y00	Chaperonas de estrés
Glutatión peroxidasa 3	GPX3	A1Z0TJC	Detoxificación de peróxidos
Glutatión peroxidasa 1	GPX1	A139RPK	Detoxificación de peróxidos
Glutatión S transferasa	GST	A151PVS	Detoxificación celular
Superóxido dismutasa dependiente de manganeso	SOD2	A16RN10	Detoxificación de radical superperóxido
Superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc	SOD1	A170L78	Detoxificación de radical superperóxido
Catalasa	CAT	A189KEG	Detoxificación de peróxidos
Piruvato kinasa	PKLR	A1AAZ19	Glucólisis
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa 1	GAPDH1	A1B3XOH	Glucólisis
Cadena Media de la ferritina	FTM	A1CSWVP	Metabolismo del hierro
Transferrina	TFR	A1D1TX	Metabolismo del hierro
Hepcidina	HAMP1	A1V4H1	Metabolismo del hierro
Quinasas específicas de proteínas ricas en Serina-Treonina 1	SRPK1	A1FAR85	Regulador de procesamiento alternativo
Transportador de vitamina C dependiente de sodio	SLC23a1	A1G1QFD	Respuesta antioxidativa
Ubiquitina	UB52	A1X00UH	Housekeeping gene
Factor de elongación 1 alfa	EEEF1A	A1Y9Y0P	Housekeeping gene
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa 2	GAPDH2	A101W6X	Housekeeping gene



5

FUNCIONES ENDOCRINAS

Eje Hipotalámico-hipofisiario interrenal (HPI)

El cortisol es el principal producto del eje HPI jugando un papel clave en la respuesta defensiva frente al estrés y osmorregulación. De hecho, el cortisol actúa tanto como glucocorticoide y como mineralocorticoide en peces teleosteos. La ruta de síntesis de cortisol es compleja y está regulada a nivel hipotalámico por la hormona liberadora de corticotropina (CRF) que, al unirse a su receptor específico (CRFR), promueve la síntesis a nivel hipofisiario de la proopiomelanocortina (precursor de la hormona adrenocorticotropa (ACTH)). La hormona ACTH actúa a nivel interrenal para activar la secreción de cortisol, que ejercerá su acción mediante la unión a sus receptores específicos de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR). La acción de CRF además está modulada negativamente por las proteínas ligadoras de CRF al impedir su unión al receptor.

El cortisol se considera una hormona de adaptación a ambientes hipersalinos. Esta hormona promueve la proliferación de las células de cloruro y de los mecanismos de bombeo de solutos. No obstante, en algunas especies también participa en la adaptación a medios hipotónicos. Además, el cortisol participa en la respuesta defensiva al estrés aumentando la movilización de energía

principalmente glucosa en hígado aunque también lipólisis y proteólisis. En este chip se han incluido el factor CRF tipo 1 y CRF tipo 2, CRFR, POMC, α y POMC beta, GR1, GR2 y MR.

Canales y transportadores

Los mecanismos de transporte de solutos y canales de agua son importantes para la regulación de la homeostasis celular y adaptación a las condiciones fluctuantes de salinidad. Los mecanismos de transporte de solutos se localizan principalmente en las células encargadas de la excreción y absorción de iones conocidos como las células de cloruro ricas en mitocondrias (MRC). Entre ellas hay que destacar las bombas ATPasa N°/K° (NKA) que crean un gradiente electroquímico al intercambiar $3 Na^{\circ}$ por $2 K^{\circ}$. Otros bombas importantes para la excreción de NaCl son los cotransportadores $Na^{\circ}/K^{\circ}/2Cl^{\circ}$ (NKCC) y el canal de cloruro regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Además, están los canales de agua tipo aquaporinas que van a regular la entrada y salida de agua a través de la membrana celular. En el chip se han incluido AQP3A, AQP12, AQP14A, NKCC1a, NKCC1b, NKCC2 y CFTR.

CONTINUA...

Los peces eurhalinos en medios hipersalinos excretan sales por branquia y riñón

Los peces que habitan en agua salada están expuestos a una pérdida osmótica de agua al vivir en un medio hipertónico. Por ello, los teleosteos ingieren de forma continua agua salada por la boca y la reabsorben en sus riñones.

Además, la cantidad de orina excretada es pequeña y expulsan el exceso de sales por medio de unas células especializadas de sus branquias. Esta regulación se conoce como hiposmótica ya que los fluidos corporales están más diluidos que el medio marino en el que habitan.



6

Eje hormonal de la prolactina

La prolactina es una hormona adenohipofisiaria pleiotrópica implicada en la regulación del crecimiento, reproducción, inmunomodulación y osmorregulación. La síntesis de prolactina está regulada a nivel hipotalámico por la hormona liberadora de prolactina (PRL) tras unirse a su receptor específico (PRLR). En peces existen dos tipos de prolactina (1 y 2) que ejercen su acción mediante la unión a sus receptores específicos (PRLR). La prolactina se considera como una hormona clave para la adaptación a ambientes hiposmóticos en peces eurhalinos. La prolactina tiene una actividad hipernátrémica e hipervolemia al reducir la actividad de los transportadores específicos de branquias, y diurética al reducir la permeabilidad renal. En este chip se han incluido la PRL1, PRL2, PRLR y PRLR.

Factor de transcripción de choque osmótico 1

El Factor de transcripción de choque osmótico (*osf1*) se considera como un gen de respuesta temprana a cambios hiperosmóticos en peces. Este gen se expresa en las células de cloruro de la branquia jugando un papel clave en como sensor específico de cambios osmóticos y en la transducción de la señal celular a genes diana para mantener la homeostasis.

Sistema Renina-Angiotensina

El sistema renina-angiotensina está formado por un conjunto de péptidos y enzimas que conducen a la síntesis de la angiotensina II. La renina es el primer componente del sistema. Esta actúa sobre el angiotensinógeno, sintetizado en el hígado, y se transforma en angiotensina I. Sobre este actúa la enzima convertidora de angiotensina y lo convierte en Angiotensina II. La angiotensina II tiene efectos vasculares reduciendo la filtración glomerular y regula positivamente la secreción de ACTH y

cortisol favoreciendo la regulación a ambientes hiperosmóticos. En el chip se ha incluido 4 componentes: la prorenina, angiotensinógeno y las enzimas convertidoras de angiotensina I y II.

Arginina Vasopresina

La arginina vasopresina es una hormona secretada a nivel de la neurohipófisis. Tiene una acción vasopresora que conlleva antidiuresis. Su acción se asocia a la adaptación a ambientes hipersalinos a través del receptor V2, lo cual lleva a la inserción de canales de agua (aquaporinas) para aumentar la permeabilidad al agua y antidiuresis.

Urotensinas

La Urotensina I y Urotensina II son dos neuropéptidos secretados en la urófisis. La urotensina I tiene homología con CRF regulando la secreción de ACTH y cortisol. En cambio la urotensina II tiene homología con la somatostatina regulando la secreción de prolactina. Las dos urotensinas son vasoactivas estando la urotensina I relacionada con ambientes hiperosmóticos y la urotensina II con hiposmóticos por su captación activa de Na° en intestino y vejiga urinaria y de Cl° en piel opercular. Sólo la urotensina II se ha incluido en el chip.

Péptidos natruréticos

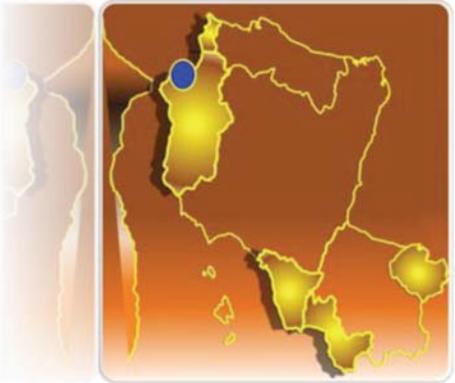
Son péptidos de pequeño tamaño con acción cardiovascular y osmorreguladora. Existen tres tipos: Atrial, Ventricular NP y tipo C. Se han relacionado con adaptación con ambientes hipersalinos. Estos péptidos se detectan en varios tejidos, principalmente en cerebro y corazón. En peces, los NP se relacionan con la excreción del exceso de sales a través de la branquia y glándula rectal y limitando la incorporación de sales acopiada a la bebida. En el chip se han incluido péptido natrurético tipo C1 y péptido natrurético tipo CA.



7



Ifremer



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE



Unión Europea
Fondo Europeo
de Desarrollo Regional

