

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA, CULTIU I PATOLOGIA
D'ESPÈCIES MARINES

DUPLICACIÓN, ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS RECEPTORES
DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO DE PECES.
ASPECTOS BÁSICOS Y APLICADOS EN DORADA SPARUS
AURATA.

ALFONSO SAERA VILA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 13 de novembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. Silvia Zanuy Doste
- Dr. Lluís Tort Bardolet
- Dra. M^a del Mar Malagón Poyato
- Dr. Juan Miguel Mancera Romero
- Dr. Rubén D. Artero Allepuz

Va ser dirigida per:
Dr. Jaume Pérez Sánchez

©Copyright: Servei de Publicacions
Alfonso Saera Vila

Dipòsit legal: V-1059-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-7795-6

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

Tesis Doctoral ~ Alfonso Saera Vila ~ 2009

Duplicación, organización genómica y regulación transcripcional de los receptores de la hormona del crecimiento de peces. Aspectos básicos y aplicados en dorada *Sparus aurata*.



Tesis Doctoral
Alfonso Saera Vila
2009

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE GENÈTICA



**DUPLICACIÓN, ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS
RECEPTORES DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO DE PECES. ASPECTOS BÁSICOS Y
APLICADOS EN DORADA (*Sparus aurata*)**

Memoria presentada por Alfonso Saera Vila para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Fdo.: Alfonso Saera Vila

Valencia, septiembre 2009

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO DIRIGIDA POR EL DOCTOR JAUME PÉREZ SÁNCHEZ, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (INSTITUTO DE ACUICULTURA DE TORRE LA SAL), Y CUMPLE CON TODOS LOS REQUISITOS EXIGIDOS POR LA LEGISLACIÓN VIGENTE.

Fdo.: Jaime Pérez Sánchez

.....c"

Para desarrollar la investigación descrita en esta memoria, Alfonso Saera Vila recibió una beca predoctoral de la Excelentísima Diputación Provincial de Castellón.

"



.....d

“La virtud está en el término medio”

Aristóteles (384 a.c. – 322 a.c.)

1. Prólogo.....	1
2. Introducción.....	11
2.1. Familia GH/PRL.....	13
2.1.1. Origen y evolución	13
2.1.2. Estructura proteica y organización genómica.....	18
2.1.3. Función biológica	21
2.1.3.1. Regulación del crecimiento: eje somatotrópico	22
2.2. Receptores de la hormona del crecimiento	25
2.2.1. Superfamilia de receptores de citoquina clase I	25
2.2.2. Receptores de la hormona del crecimiento de	
tetrápodos.....	26
2.2.2.1. Transducción de la señal.....	28
2.2.2.2. Organización genómica y formas alternativas..	31
2.2.3. GHR de peces	35
3. Objetivos y plan de trabajo.....	43
4. Material y Métodos.....	51
4.1. Extracción de ARN.....	53
4.2. Retrotranscripción.....	56
4.3. Secuenciación del ADNc del GHR-II.....	56
4.3.1. Diseño de cebadores	56
4.3.2. Amplificación y secuenciación.....	57
4.3.3. Amplificación de los extremos 5' y 3'	59
4.4. Inicio de la transcripción	61
4.5. Organización genómica	62
4.5.1. Extracción de ADN genómico.....	62
4.5.2. Amplificación por PCR	63
4.5.3. Librerías genómicas.....	64
4.6. Análisis bioinformáticos.....	65
4.7. Análisis de la expresión génica.....	65
4.8. Ensayos bioquímicos	72
4.8.1. GH e IGF-I.....	72
4.8.1.1. Radioyodación	74
4.8.1.2. Radioinmunoensayos de GH e IGF-I	75
4.8.3. Cortisol	78
4.8.4. Glucosa	79
4.9. Animales en experimentación.....	80
4.9.1. Condiciones de cultivo	80
4.9.2. Muestras.....	81

4.9.2.1. Biomasa	81
4.9.2.2. Sangre y tejidos	82
4.10. Modelos experimentales	82
4.10.1. Ayuno	82
4.10.2. Estación	82
4.10.3. Edad	83
4.10.4. Reto frente a patógeno	84
4.10.4.1. Diseño experimental	84
4.10.4.2. Detección del parásito	86
4.10.4.2.1. Técnicas histológicas	86
4.10.4.2.2. Técnicas moleculares	86
4.10.5. Estrés por confinamiento	87
4.11. Análisis estadísticos	89
5. Resultados	91
5.1. Secuenciación del GHR-II	93
5.2. Organización genómica de los GHR de dorada	102
5.2.1. Sitio de inicio de la transcripción	102
5.2.2. Estructura exón-intrón	102
5.2.3. Región flanqueante en 5'	105
5.3. Modelos experimentales	109
5.3.1. Ayuno	109
5.3.2. Estación	110
5.3.3. Edad	114
5.3.4. Reto frente a parásito	118
5.3.4.1. Progresión de la infección	118
5.3.4.2. Análisis de la expresión génica	119
5.3.5. Estrés por confinamiento	121
5.3.5.1. Marcadores plasmáticos de estrés	121
5.3.5.2. Eje GH-IGF	122
5.4. Anexo: Resumen de las correlaciones	126
6. Discusión	127
6.1. Duplicación del GHR en el genoma de peces	129
6.2. Organización genómica de los GHR de peces	135
6.2.1. Sitio de inicio de la transcripción y región flanqueante en 5'	140
6.3. Regulación transcripcional de los GHR de dorada	144
7. Conclusiones	163
8. Bibliografía	167

9. Anexo: artículos publicados203

- **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA y Pérez-Sánchez J (2005). Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* 142, 193-203.
- **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA y Pérez-Sánchez J (2007). Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region. *Journal of Endocrinology* 194, 361-372.
- Sitjà-Bobadilla A, Calduch-Giner JA, **Saera-Vila A**, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P y Pérez-Sánchez J (2008). Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 610-619.
- **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA, Prunet P y Pérez-Sánchez J (2009). Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement. Differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology* 154A, 197-203.

Tabla 4. 1. Cebadores para la determinación por PCR de la organización genómica del GHR-II de dorada	63
Tabla 4. 2. Cebadores utilizados en la PCR en tiempo real.....	67
Tabla 5. 1. Estructura exón-intrón del GHR-I de dorada	104
Tabla 5. 2. Estructura exón-intrón del GHR-II de dorada.....	104
Tabla 5. 3. Sitios potenciales de unión de factores transcripción localizados en la región flanqueante en 5' de los GHR de dorada	108
Tabla 5. 4. Progresión de la infección en los peces expuestos a <i>E. lei</i>	118
Tabla 5. 5. Resumen de correlaciones	126

Figura 1.1. Producción mundial de pesca y acuicultura.....	3
Figura 1.2. Producción acuícola por regiones y grupos de especies.....	5
Figura 1.3. Producción y consumo de pescado.....	5
Figura 1.4. Producción mundial de dorada.....	6
Figura 1.5. Producción española por especies.....	7
Figura 1.6. Zonas productoras de dorada en España.....	7
Figura 1.7. Producción de dorada por Comunidades Autónomas.....	8
Figura 2.1. Árboles filogenéticos de GH.....	14
Figura 2.2. Cladograma y clasificación filogenética de los vertebrados.....	16
Figura 2.3. Árbol filogenético de la familia GH/PRL en peces..	17
Figura 2.4. Hipótesis de un pez teleósteo.....	18
Figura 2.5. Evolución molecular de la familia GH/PRL.....	19
Figura 2.6. Estructura exón-intrón del gen de la GH.....	20
Figura 2.7. Estructura exón-intrón del gen de la GH, la PRL y la SL de dorada.....	21
Figura 2.8. Hipótesis de la somatomedina.....	22
Figura 2.9. Contribución relativa de la GH y la IGF-I al crecimiento.....	23
Figura 2.10. Grupos estructurales de los receptores de citoquina clase I.....	26
Figura 2.11. Estructura del GHR.....	28
Figura 2.12. Rutas de señalización de la GH.....	29
Figura 2.13. Complejo multiproteico formado tras la estimulación con GH.....	30
Figura 2.14. Estructura del gen de los GHR de hombre, ratón y pollo.....	32
Figura 2.15. Formas alternativas del GHR en tetrápodos.....	34
Figura 2.16. Organización exón-intrón del GHR de hombre, dorada y rodaballo.....	36
Figura 2.17. Representación esquemática de los GHR de peces.....	37
Figura 2.18. Alineamiento de los GHR de peces.....	38
Figura 2.19. Análisis de los GHR de vertebrados.....	41
Figura 4.1. Extracción de ARN mediante el equipo ABI PRISM®6100.....	54
Figura 4.2. Aislamiento de ARNm.....	55

Figura 4.3. Cebadores degenerados para la secuenciación del GHR-II.....	57
Figura 4.4. Variación de la temperatura con los ciclos de una PCR. Amplificación de una cadena molde.....	58
Figura 4.5. Esquema de la 5'RACE.....	59
Figura 4.6. Esquema de la 3'RACE.....	60
Figura 4.7. Esquema general del RLM-RACE.....	61
Figura 4.8. Esquema general del kit del GenomeWalker.....	64
Figura 4.9. PCR en tiempo real usando SYBR Green I.....	66
Figura 4.10. Diluciones seriadas en una PCR en tiempo real. Modelo de amplificación. Fluorescencia en función del número de ciclos.....	69
Figura 4.11. Curvas de fusión y sus derivadas.....	71
Figura 4.12. RIA de doble anticuerpo.....	73
Figura 4.13. Curva de desplazamiento de GH recombinante de dorada. RIA de GH.....	76
Figura 4.14. Curva de desplazamiento de IGF-I recombinante de <i>red sea bream</i> . RIA de IGF-I.....	78
Figura 4.15. Elisa de cortisol.....	79
Figura 4.16. Instalaciones de cultivo.....	80
Figura 4.17. Curva de crecimiento de doradas en cultivo.....	83
Figura 4.18. Modelo experimental de reto frente a parásito.....	85
Figura 4.19. Modelo experimental de estrés por confinamiento.....	88
Figura 5.1. Productos de PCR con cebadores degenerados.....	93
Figura 5.2. Secuencia del GHR-II de trucha.....	95
Figura 5.3. Secuencia del GHR-II de dorada.....	97
Figura 5.4. Alineamiento de los GHR-II de peces.....	100
Figura 5.5. Árbol filogenético de los GHR.....	101
Figura 5.6. Determinación de la estructura exón-intrón del GHR-I y II de dorada.....	102
Figura 5.7. Alineamiento del GHR-I y II de dorada.....	104
Figura 5.8. Estructura exón-intrón del GHR-I y II de dorada.....	105
Figura 5.9. Región flanqueante en 5' del GHR-I de dorada.....	107
Figura 5.10. Región flanqueante en 5' del GHR-II de dorada.....	107
Figura 5.11. Expresión relativa del GHR-I y II (ayuno).....	109
Figura 5.12. Peso, GH e IGF-I (estación).....	111
Figura 5.13. Expresión relativa del GHR-I y II (estación).....	112
Figura 5.14. Expresión relativa de la IGF-I y II (estación).....	113
Figura 5.15. Peso, GH e IGF-I (edad).....	115

Figura 5.16. Expresión relativa del GHR-I y II (edad).....	116
Figura 5.17. Expresión relativa de la IGF-I y II (edad).....	117
Figura 5.18. Intestino de doradas parasitadas con <i>E. leei</i>	119
Figura 5.19. Expresión relativa de GHR-I, GHR-II, IGF-I e IGF-II (reto frente a patógeno).....	120
Figura 5.20. Niveles plasmáticos de cortisol y glucosa.....	121
Figura 5.21. Niveles plasmáticos de GH e IGF-I (estrés por confinamiento).....	123
Figura 5.22. Expresión relativa del GHR-I y II (estrés por confinamiento).....	124
Figura 5.23. Expresión relativa de la IGF-I y II (estrés por confinamiento).....	125
Figura 6.1. Árbol filogenético actual de los GHR.....	130
Figura 6.2. Alineamiento del GHR-II de trucha, dorada, <i>tongue sole</i> y fletán.....	132
Figura 6.3. Estructura de la región extracelular del GHR-I y GHR-II de dorada.....	133
Figura 6.4. Rondas de duplicación genómica en los peces.....	134
Figura 6.5. Árbol filogenético de teleósteos, esturión, pez pulmonado y tetrápodos.....	135
Figura 6.6. Organización exón-intrón de los GHR dorada, rodaballo y bagre del canal.....	136
Figura 6.7. Alineamiento de los GHR dorada, rodaballo y bagre del canal.....	138
Figura 6.8. Cladograma de la evolución de los tetrápodos.....	139
Figura 6.9. Variantes de las 5'UTR de mamíferos.....	141
Figura 6.10. Elementos que contribuyen a la transcripción basal de los promotores.....	142
Figura 6.11. Modelo del balance entre acción sistémica y acción compensatoria local.....	148
Figura 6.12. Marcaje de los sitios de unión de la GH en riñón anterior de dorada.....	150
Figura 6.13. Efecto de la GH en macrófagos.....	151
Figura 6.14. Eje hipotalámico-hipofisario-interrenal.....	154
Figura 6.15. Cortisol y densidad de cultivo.....	155
Figura 6.16. Expresión relativa de GRP75, TNF α y CYP1A1.....	157
Figura 6.17. Resumen de las experiencias de dorada.....	160
Figura 6.18. Modelo evolutivo del receptor ancestral. Ritmos circanales de la GH, la PRL y la SL.....	162

Lista de los nombres científicos y comunes de los peces teleósteos citados en este trabajo. Como referencia para el uso del nombre común en español se han usado las bases de datos del sitio web <http://www.fishbase.org>. Cuando existía más de una posibilidad se ha optado por la que aparece como usada por la FAO, si no aparecía ningún nombre común en español se ha usado el nombre común en inglés.

Anguiliformes

Anguilla japonica Anguila japonesa

Beloniformes

Oryzias latipes Medaka

Cipriniformes

Carasius auratus Pez rojo
Catla catla Catla
Cirrhinus mrigala Mrigal carp
Ctenopharygodon idella Carpa china
Cyprinus carpio Carpa
Hypophthalmichthys nobilis Carpa cabezona
Danio rerio Pez cebra
Labeo calbasu Labeo
Labeo rohita Labeo Roho

Esociformes

Esox lucius Lucio

Perciformes

Acanthopagrus butcheri Southern black
bream
Acanthopagrus latus Sargo aleta amarilla
Acanthopagrus schlegelii Black sea bream
Alcolapia grahami Lake Magadi tilapia
Cichlasoma dimerus Chanchita
Dentex dentex Dentón
Dicentrarchus labrax Lubina

<i>Epinephelus coioides</i>	Mero de pintas naranjas
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Listado
<i>Lates calcarifer</i>	Perca gigante
<i>Morone chrysops</i> X <i>Morone saxatilis</i>	Hybrid striped bass
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia de Mozambique
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia del Nilo
<i>Pagrus auratus</i>	Red sea bream
<i>Pagrus major</i>	Dorada del Japón
<i>Seriola quinqueradiata</i>	Medregal del Japón
<i>Sparus aurata</i>	Dorada
<i>Thunnus albacares</i>	Rabil
<i>Thunnus thynnus</i>	Atún rojo
<i>Tilapia butikofferi</i>	Zebra tilapia

Pleuronectiformes

<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Tongue sole
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Fletán del Atlántico
<i>Paralichthys adspersus</i>	Lenguado fino
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Falso halibut del Japón
<i>Scophthalmus maximus</i>	Rodaballo

Salmoniformes

<i>Oncorhynchus masou</i>	Salmón japonés
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arco iris
<i>Oncorhynchus keta</i>	Keta
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmón plateado
<i>Salmo salar</i>	Salmón del Atlántico

Siluriformes

<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre del canal
<i>Silurus meridionalis</i>	<i>Souther catfish</i>

Tetraodontiformes

<i>Takifugu rubripes</i>	<i>Fugu</i>
--------------------------	-------------

Lista de los números de acceso a Genbank de las secuencias utilizadas en la redacción de este trabajo.

GHR-I

Dorada, ARNm	AF438176
Dorada, gen	AH014068
Dorada, región flanqueante en 5' y exón 1	DQ899640
Anguila japonesa (1), ARNm	AB180476
Anguila japonesa (2), ARNm	AB180477
<i>Black sea bream</i> , ARNm	AF502071
Carpa, ARNm	AY691176
Carpa china, ARNm	AY283778
Catla, ARNm	AY691178
Chanchita, ARNm	FJ208943
Falso halibut del Japón, ARNm	AB058418
Fletán de Atlántico, ARNm	DQ062814
Labeo, ARNm	AY691180
Labeo Roho, ARNm	AY691175
Lenguado fino, ARNm	EU004149
Medaka, ARNm	DQ002886
Mero de pintas naranjas, ARNm	EF052273
<i>Migral carp</i> , ARNm	AY691179
Pez rojo, ARNm	AF293417
Pez cebrá, ARNm	EU649774
Rodaballo, ARNm	AF352396
Rodaballo, gen	AY345330
Salmón del Atlántico, ARNm	EU242505
Salmón japonés, ARNm	AB121047
<i>Southern catfish</i> , ARNm	AY336104
Tilapia de Mozambique, ARNm	AB115179
Tilapia del nilo, ARNm	AY973232
<i>Tongue sole</i>	FJ608664
Trucha arco iris, ARNm	AF438178

GHR-II

Dorada, ARNm	AY573601
Dorada, gen	AH014068
Dorada, región flanqueante en 5' y exón 1	DQ899640

Bagre del canal, ARNm	DQ103502
Bagre del canal, gen	AH015381
<i>Black sea bream</i> , ARNm	AY662334
Fletán del Atlántico, ARNm	(Hildahl y cols, 2008)
Medaka, ARNm	DQ010539
Mero de pintas naranjas, ARNm	EF052274
Pez cebra, ARNm	EU649775
Salmón del Atlántico (1), ARNm	AY462105
Salmón del Atlántico (2), ARNm	DQ163908
Salmón japonés, ARNm	AB071216
Salmón plateado (1), ARNm	AF403539
Salmón plateado (2), ARNm	AF403540
<i>Southern catfish</i> , ARNm	AY973231
Tilapia del nilo, ARNm	AY973233
<i>Tongue sole</i>	FJ608665
Trucha arco iris, ARNm	AY573600

GHR

Pez pulmonado	EF158850
Esturión, ARNm	EF158851
Cerdo, ARNm	X54429
Conejo, ARNm	AF015252
Humano, ARNm	NM_000163
Humano, gen	AH002706
Mono, ARNm	U84589
Paloma, ARNm	D84308
Perro, ARNm	AF133835
Pollo, ARNm	M74057
Rata, ARNm	NM_010794
Ratón, ARNm	NM_010284
Tortuga, ARNm	AF211173
<i>Xenopus</i> , ARNm	AF193799

PRLR

Carpa ARNm	AY044448
Carpín dorado, ARNm	AF144012
Ciervo, ARNm	X94953
Humano, ARNm	M31661

Falso halibut del Japón, ARNm	AB047922
Mono, ARNm	AJ272217
Rata, ARNm	NM_012630
Ratón, ARNm	NM_011169
Paloma, ARNm	U07694
Pavo, ARNm	L76587
Pez cebra, ARNm	AY375318
Pollo, ARNm	D13154
Tilapia del nilo, ARNm	L34783
Tritón, ARNm	AB005045
Trucha arco iris, ARNm	AF229197
<i>Xenopus</i> , ARNm	AB030443

1. Prólogo

La acuicultura se define como la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión; estos serán, a lo largo de toda la fase de cría o de cultivo y hasta el momento de su recogida, propiedad de una persona física o jurídica (Reglamento (CE) n° 2792/1999 del Consejo de 17 de diciembre de 1999).

La actividad extractiva derivada de la acuicultura y la pesca fue del orden de 140 millones de Tm en el 2004; de las cuales 106 millones se destinaron al consumo humano, el más alto registrado hasta la fecha (**figura 1.1**). El 43 % de esta partida procedió de la acuicultura. De hecho, gracias a la misma el consumo per cápita de pescado ha crecido moderadamente en los últimos años, a pesar del estancamiento de las pesquerías y del crecimiento de la población.

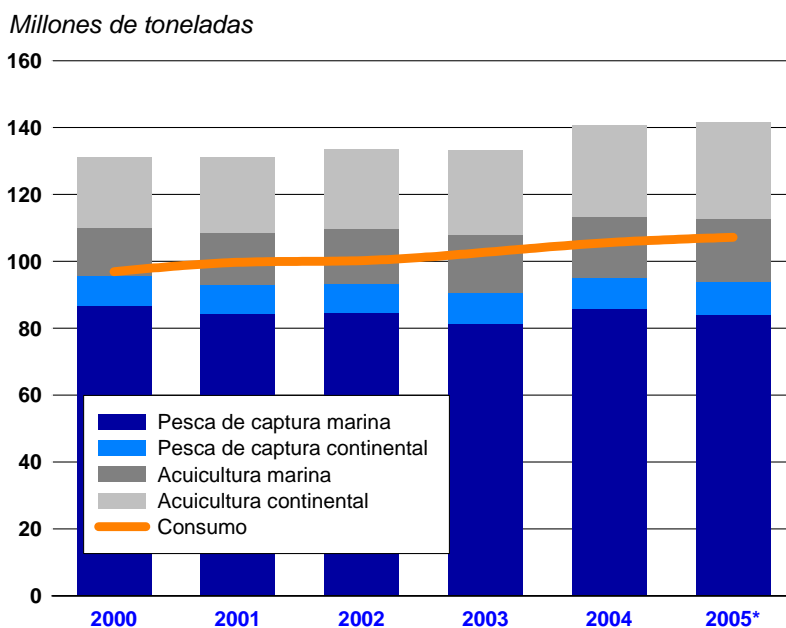


Figura 1.1. Producción mundial de pesca y acuicultura (Datos FAO, 2006).
* estimación preliminar.

Las pesquerías se han mantenido relativamente estables en el último decenio, con la excepción de las fluctuaciones en las capturas de anchoveta peruana debidas al fenómeno austral de El

Niño. No obstante, las fluctuaciones registradas en otras especies y regiones tienden a compensarse entre sí, por lo que el total de las capturas no ha variado sensiblemente. En su conjunto, más del 75 % de las poblaciones ícticas evaluadas están ya plenamente explotadas, sobreexplotadas, agotadas o en recuperación. Estos datos sugieren que tanto la pesca oceánica como la continental han alcanzado su techo. En contrapartida, la acuicultura crece más rápidamente que cualquier otro sector de producción animal. A nivel mundial, su tasa de crecimiento anual es del 8,8 % desde 1970, mientras que las pesquerías han crecido a razón del 1,2 % y los sistemas terrestres de producción de carne al 2,8 %.

Según datos del 2004, el 75 % de la producción global de pescado se destinó a consumo humano. Gran parte de esta producción forma parte de una economía de subsistencia. El máximo exponente de ello es el sureste asiático, en todo caso China es el mayor productor mundial en acuicultura (**figura 1.2A**). Su producción está basada en especies de peces dulceacuícolas (ciprínidos y tilapias), mientras que en países desarrollados la producción piscícola está supeditada a especies marinas carnívoras con un alto valor añadido en el mercado (**figura 1.2B**).

Según las previsiones de la FAO, tanto la producción como la demanda de pescado seguirán en aumento a lo largo de los tres próximos decenios. Sin embargo, estos incrementos irán decreciendo dado el estancamiento de las pesquerías y la presumible ralentización de los incrementos de la producción en acuicultura (**figura 1.3**). Así pues, el informe de la FAO 2006 pone de manifiesto que las previsiones para el periodo 2000-2030 se han cumplido en lo que llevamos de década, aunque la pesca de captura continental y el pescado destinado a fines no alimentarios se sitúan por encima de las previsiones.

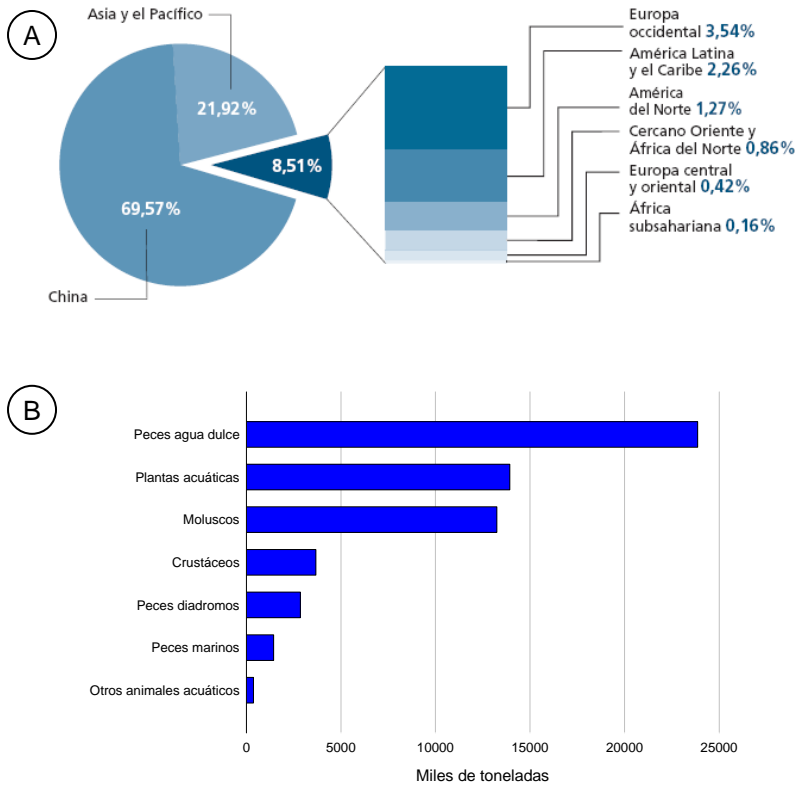


Figura 1.2. Producción acuícola por regiones (A) y grupos de especies (B) (FAO, 2006).

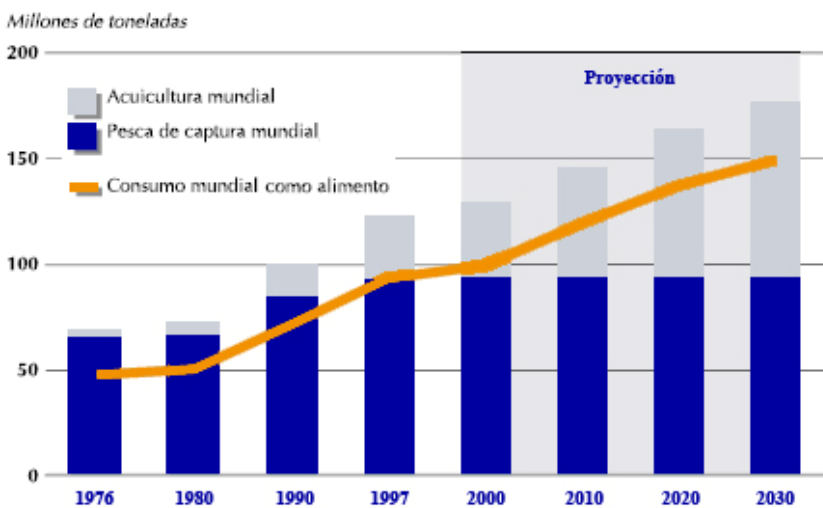


Figura 1.3. Producción y consumo de pescado (FAO, 2002).

La acuicultura mediterránea está basada fundamentalmente en el cultivo de la dorada con una producción de 150.000 Tm en el 2007, un 21 % superior a la registrada en el año 2006. Los datos apuntan a unas 160.000 Tm en el 2008 con Grecia (52,9 %), Turquía (15,9 %), España (14,8 %) e Italia (5,9 %) como países de mayor producción, aunque también se han registrado producciones de cierta cuantía en Egipto, Israel, Chipre, Portugal, Croacia, Malta, Túnez y Marruecos. Además, se está empezando a producir dorada en países como Albania, República dominicana, Emiratos Árabes Unidos, Bosnia, Libia y Kuwait. El conjunto de esta producción acuícola representa el 95 % del total (acuicultura y pesca extractiva) (**figura 1.4**).

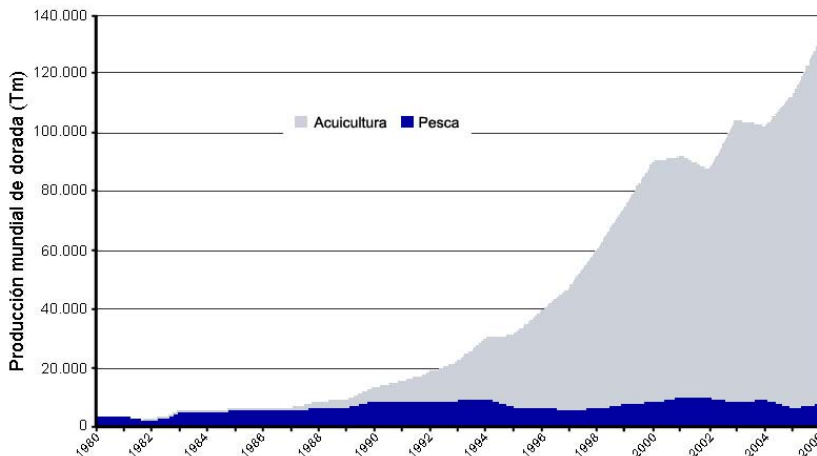


Figura 1.4. Producción mundial de dorada en el periodo 1980 – 2006 (datos de la FAO).

A nivel nacional, la situación es similar y la pesca extractiva de dorada está estancada en unas 1.000 Tm anuales, mientras que la producción en acuicultura fue de unas 18.000 Tm en el 2006. Las previsiones para 2008 – 2009 son de unas 24.000 Tm, por lo que la dorada ocupa el primer lugar en el ranking de peces marinos cultivados en España, seguida de lejos por el atún, la lubina y el rodaballo (**figura 1.5**). Es más, el cultivo del atún está basado en el engorde de juveniles y adultos capturados en el medio salvaje. Además, la práctica totalidad de la producción española se encuentra localizada en Murcia y ha sufrido

considerables reducciones en los últimos cinco años, debido a la imposición de reducciones en las capturas para recuperar los caladeros naturales.

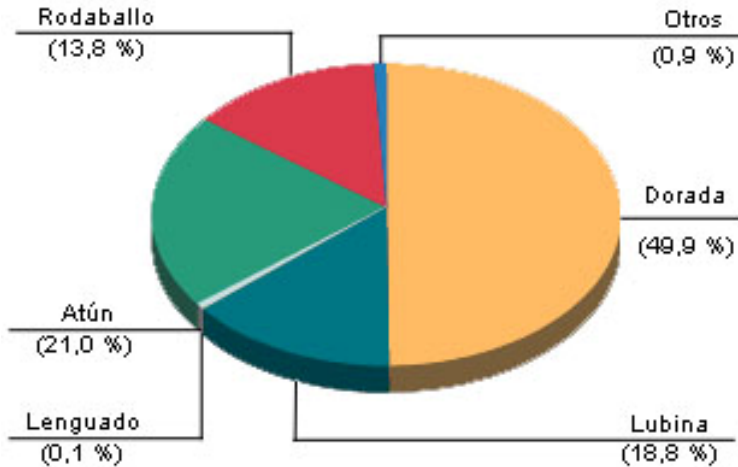


Figura 1.5. Distribución de la producción española por especies en el 2004 (datos de las Consejerías de Agricultura y Pesca de las Comunidades Autónomas).

Por ultimo, reseñar que la producción española de dorada está localizada en la costa mediterránea y las islas Canarias (**figura 1.6**). La Comunidad Valenciana se sitúa a la cabeza de la producción con un 34 % del total en el año 2007, seguida de cerca por las islas Canarias (**figura 1.7**)

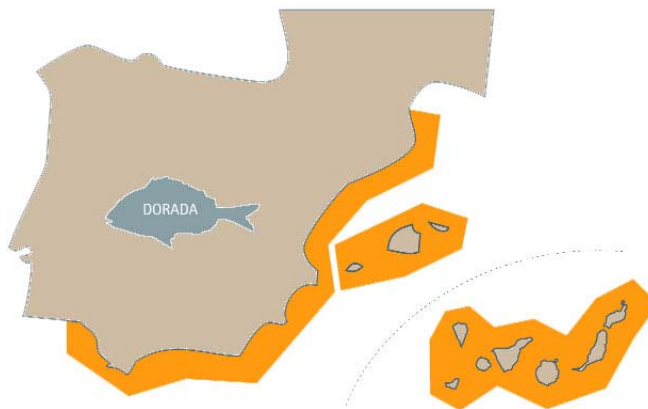


Figura 1.6. Mapa de las zonas productoras de dorada en España.

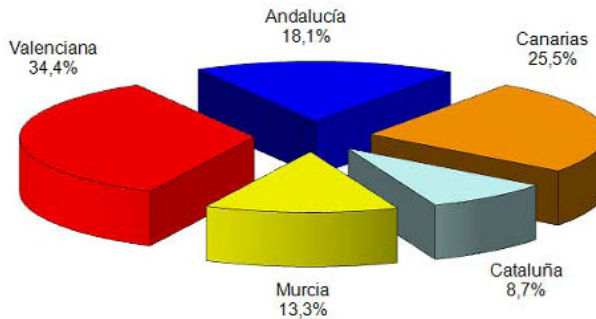


Figura 1.7. Distribución de la producción de dorada por Comunidades Autónomas en el 2007.

La acuicultura es una de las actividades industriales que presenta actualmente una mayor demanda de harinas y aceites de pescado (Mundheim y cols., 2004). De hecho, la partida de harinas de pescado destinada a la acuicultura pasó de un 10 % en 1988 a un 17 % en 1994 (Naylor y cols., 2000). Este paulatino aumento alcanzó el 35 % en el año 2003, y se prevé que rebase el 48 % en el 2010.

El pescado es la fuente más importante de ácidos grasos poli-insaturados omega-3 de cadena larga [ácido eicosapentanoico (20:5n-3, EPA); ácido docosahexanoico (22:6n-3, DHA)] en la dieta humana (Sargent y Tacon, 1999; Sidhu, 2003). Estos ácidos grasos también son esenciales para los peces de origen marino, ya que no pueden sintetizarlos por ellos mismos y necesitan ingerirlos en la dieta (Bell y cols., 1996; Parpoura y Alexis, 2001; Sargent y cols., 2002). Por esta razón, la sustitución total de aceites de pescado como ingrediente o componente de las harinas de pescado no es totalmente factible en piensos de engorde de especies peces de origen marino.

No obstante, dado el estancamiento de las pesquerías a nivel mundial es ineludible maximizar la sustitución de harinas y aceites de pescado por fuentes alternativas de materias primas. Ello por si mismo es beneficioso, ya que los productos de origen marino son fuentes potenciales de residuos químicos (Dioxinas, PCB y furanos) y metales pesados (mercurio y metilmercurio) (Hansen y cols., 1976; Hendricks, 2002). Su eliminación a escala industrial es harto difícil, por lo que se impone la práctica de estrictos criterios de selección y control. Este hecho es especialmente importante cuando se tienen en consideración los

grupos más vulnerables de consumidores: niños, mujeres embarazadas y ancianos (Jacobson y Jacobson, 1996; Sidhu, 2003).

Estos aspectos de sostenibilidad y seguridad alimentaria han sido considerados en el V y VI Programa Marco de la UE. Así, el V Programa Marco financió una serie de proyectos de investigación centrados en el desarrollo y explotación de fuentes alternativas de materias primas:

- RAFOA: Researching alternatives to fish oil for aquaculture.
- PEPPA: Perspectives of plant protein usage in aquaculture.
- GUTINTEGRITY: Gastrointestinal functions and feed intake regulation in Salmonids: impact of dietary vegetable lipids.
- PUFAFEED: Feed for aquatic animals that contains cultivated marine microorganisms as alternatives for fish oil.
- FPPARS: Cloning and functional analysis of fish peroxisome proliferator-activated receptors: the transcriptional control of lipid metabolism in farmed fish species.

Estos proyectos se integraron en la red temática FORM (Fish Oil and Meal Replacement), lo que ha sido el embrión del proyecto AQUAMAX “Sustainable aquafeeds to maximise the health benefits of farmed fish for consumers”.

El grupo de Nutrición y Endocrinología del Crecimiento de Peces del IATS ha participado activamente en el desarrollo de los proyectos PEPPA (2001 – 2004) y AQUAMAX (2006 – 2010). Para ello, ha sido de vital importancia el uso de diferentes componentes del eje somatotrópico (GH, IGF-I, IGFBP, GHR) como marcadores del potencial de crecimiento y del estado nutricional. Además, los resultados de estos proyectos han puesto de manifiesto la importancia del análisis del metabolismo lipídico en el adecuado diseño de las dietas y las estrategias de alimentación.

Durante su estancia predoctoral, el doctorando ha trabajado activamente en el clonaje, secuenciación y análisis de los patrones de expresión génica de varios enzimas (HSL, LPL, HL), citoquinas (TNF α) y factores de transcripción (LXR α , PPAR α , PPAR β , PPAR γ) con un papel clave en la regulación del metabolismo lipídico. Este importante esfuerzo investigador ha dado lugar a 10 publicaciones SCI (ver apartado de objetivos y plan de trabajo). Además, el doctorando ha contribuido decisivamente a la caracterización molecular de los GHR. Esta última parte ha dado lugar a la hipótesis de la duplicación y evolución divergente de los GHR en el genoma de los peces, y es la base de la presente Tesis Doctoral.

2. Introducción

2.1. Familia GH/PRL	13
2.1.1. Origen y evolución	13
2.1.2. Estructura proteica y organización genómica.....	18
2.1.3. Función biológica	21
2.1.3.1. Regulación del crecimiento: eje somatotrópico.....	22
2.2. Receptores de la hormona del crecimiento	25
2.2.1. Superfamilia de receptores de citoquina clase I	25
2.2.2. Receptores de la hormona del crecimiento de tetrápodos	26
2.2.2.1. Transducción de la señal	28
2.2.2.2. Organización genómica y formas alternativas.....	31
2.2.3. GHR de peces	35

2.1. Familia GH/PRL

La hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) son hormonas de origen hipofisario, aunque también son producidas por otros tejidos. Dada su similitud estructural y solapamiento funcional, clásicamente se han englobado dentro de la misma familia proteica (GH/PRL), en la que se han incorporado como nuevos miembros los lactógenos placentarios (PLs) de mamíferos (Niall y cols., 1971) y la somatolactina (SL) de peces (Ono y cols., 1990; Rand-Weaver y cols., 1991).

La familia GH/PRL pertenece a la superfamilia GH/citoquinas que incluye también otras citoquinas como las interleuquinas, los factores estimulantes de colonias o la eritropoyetina. Estas últimas muestran un menor grado de similitud, de cualquier modo comparten un motivo estructural común y un tipo de receptor característico con un único dominio transmembrana (Forsyth y Wallis, 2002).

2.1.1. Origen y evolución

En base a estudios de secuencias, se ha propuesto un origen monofilético para la familia GH/PRL, con un único gen ancestral que habría estado sometido a varios procesos de duplicación y evolución divergente (Niall y cols., 1971).

La GH, en general, ha seguido una evolución altamente conservativa con una tasa de evolución baja (**figura 2.1A**). Así, por ejemplo, las secuencias de GH de esturión y cerdo difieren en un 25 %, aunque divergieron hace unos 400 millones de años. Sin embargo, en mamíferos la tasa de evolución de la GH se ha incrementado marcadamente durante la evolución de los primates y de los artiodáctilos (Wallis, 1994). Las tasas de evolución de la GH en los teleósteos también han sido grandes y variables (**figura 2.1B**), de ahí que hayan marcadas diferencias entre las secuencias de peces y mamíferos e incluso entre los propios teleósteos (Bernardi y cols., 1993; Wallis, 1996).

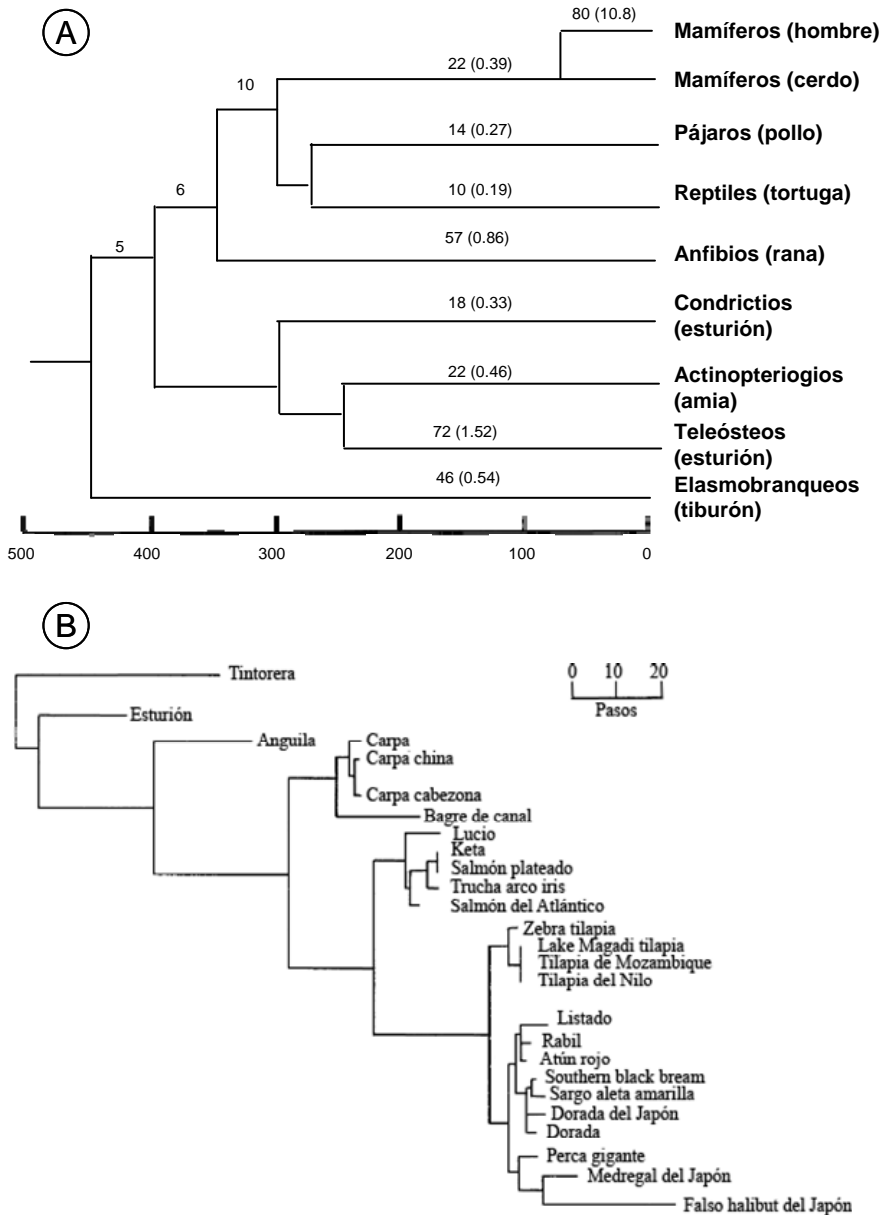


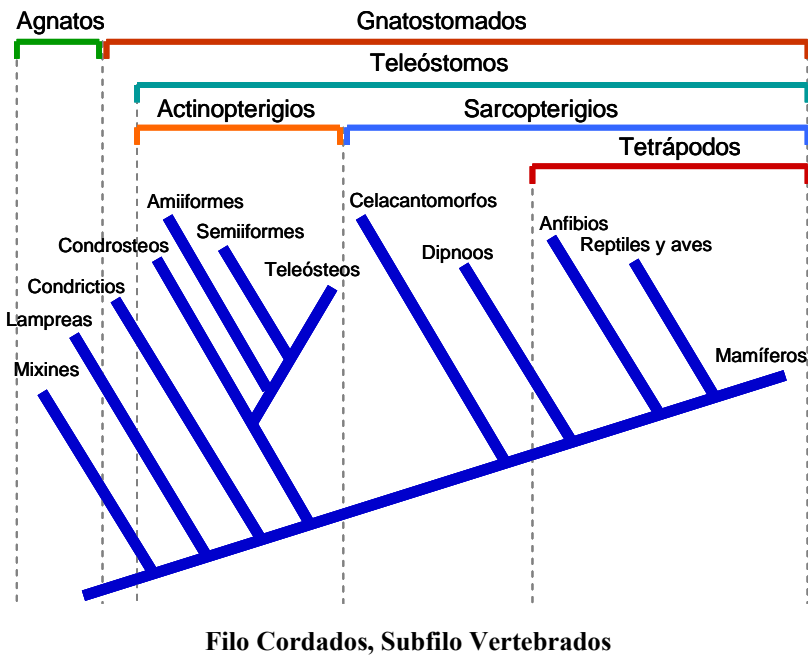
Figura 2.1. Árbol filogenético de la GH en vertebrados (A). Los números sobre las ramas indican los cambios aminoacídicos y los números entre paréntesis la tasa de evolución (modificado de Wallis, 1996). Árbol filogenético de la GH en peces teleósteos (modificado de Bernardi y cols., 1993).

La evolución de la PRL es similar a la de la GH. En general, presenta una tasa de evolución baja que aumenta en ciertos casos (humanos, rumiantes, roedores y elefantes). En peces también pasa algo similar a lo descrito para la GH, ya que este grupo de vertebrados es muy heterogeneo (Wallis, 2000).

A la SL se le ha atribuido el mismo origen que a la GH y la PRL, duplicación seguida de evolución divergente (May y cols., 1999). Estudios en esturión (Amemiya y cols., 1999) y peces pulmonados (Amemiya y cols., 1999; May y cols., 1999) indican que la duplicación inicial debió darse antes de la separación de los Artinopteriogios y los Sarcopterigios (**figura 2.2**). Según esto, la SL estaría presente en todos los teleóstomos pero hasta la fecha no se ha encontrado en tetrápodos, aunque se han llevado a cabo múltiples intentos mediante clonaje y/o búsquedas genómicas. Por lo tanto, la SL debe haberse perdido durante la evolución de los tetrápodos (Kawauchi y Sower, 2006).

En contraposición a la GH y la PRL, la SL está altamente conservada entre los diferentes grupos de peces, lo que indica unas bajas tasas de evolución (Company y cols., 2000). Estudios en trucha arco iris y ciprínidos (Zhu y cols., 2004) han revelado la presencia de dos copias parálogas de SL, que se habrían generado con la duplicación genómica específica de los teleósteos (**figura 2.3**). No obstante, no todos los teleósteos han conservado ambas formas, ya que se ha comprobado que fugu y tetraodon presentan una única copia de SL.

Con respecto al gen original, la teoría más aceptada es que la GH sería el gen ancestral. De acuerdo con ello, la GH habría mantenido su función original de estimulación del crecimiento, mientras que las hormonas derivadas habrían aportado nuevas funciones contribuyendo a la expansión de los vertebrados en el medio terrestre y acuícola. Esta teoría está en consonancia con estudios llevados a cabo en lamprea, en los que se detecta la presencia de GH en ausencia de PRL y SL (Kawauchi y cols., 2002). Así pues, se ha detectado GH en todos los vertebrados, mientras que la presencia de PRL y SL quedaría relegada a los gnatostomados (Kawauchi y Sower, 2006).



Superclase Agnatos (*sin mandíbulas*)

- Clase Mixines
- Clase Cefalaspídomorfos (*lampreas*)

Superclase Gnatostomados (*con mandíbulas*)

- Clase Condrictios (*peces cartilaginosos*)
 - Subclase Holocéfalos (*quimeras*)
 - Subclase Elamobranquios (*tiburones, rayas y torpedos*)

Grado Teleóstomos (*peces óseos*)

- Clase Actinoptergios (*peces de aletas con radios*)
 - Subclase Condrósteos (*esturiones*)
 - Subclase Neoptergios
 - Orden Amiiiformes (*amias*)
 - Orden Semiiformes (*lepidosteos*)
 - División Teleosteos (*peces óseos modernos*)
- Clase Sarcopterigios (*peces de aletas lobuladas*)
 - Subclase Celacantomorfos (*celacanto*)
 - Subclase Porolepimorfa + dipnoos
 - Infraclase dipnoos (*peces pulmonados*)
 - Subclase tetrápodos

Figura 2.2. Cladograma y clasificación filogenética de los vertebrados (modificado de Hickman y cols., 1998; Nelson, 1994).

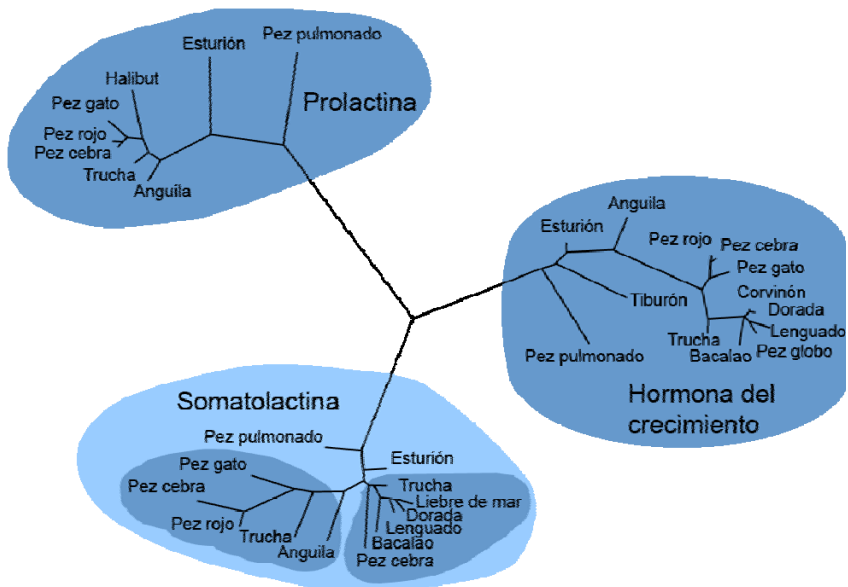


Figura 2.3. Árbol filogenético de la familia de GH/PRL en peces (modificado de Zhu y cols., 2004).

2.1.2. Estructura proteica y organización genómica

La GH, la PRL y la SL se sintetizan en la adenohipófisis de los peces, aunque en diferentes áreas de la misma (**figura 2.4**) (Laiz-Carrión y cols., 2003). La GH se sintetiza en la *pars distalis proximal* (RPD), células somatotropas (Hall y cols., 1986). La PRL se sintetiza en la *pars distalis rostral* (PPD), células lactotropas (Cambré y cols., 1986). La SL se sintetiza en la *pars intermedia* (PI), células somatolactotropas (Ingleton y cols., 1998).

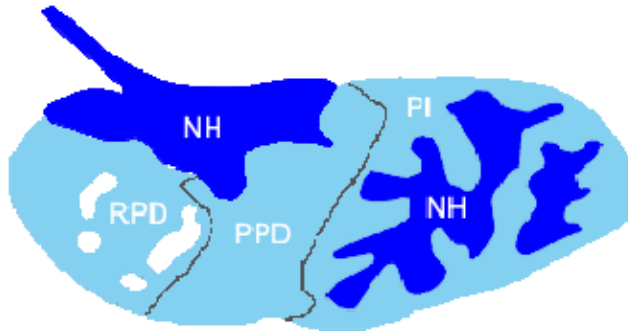


Figura 2.4. Representación esquemática sagital de la hipófisis de un pez teleosteo. Se muestran la neurohipófisis (NH, azul oscuro) y la adenohipófisis (azul claro), que a su vez se divide en *pars distalis rostral* (RPD), *pars distalis proximal* (PPD) y *pars intermedia* (PI). Modificado de Laiz-Carrión y cols. (2003).

La GH, la PRL y la SL se liberan al torrente sanguíneo tras la escisión del péptido señal, dando proteínas maduras de unos 200 aa. La GH de peces oscila entre los 172 aa de halibut y los 190 de anguila y esturión, aunque la mayoría tienen 188 – 189 aa. La PRL de peces tiene unos 186 – 188 aa, unos 10 aa más corta que la PRL de tetrápodos. El tamaño de la SL oscila entre los 203 aa de la anguila y los 215 del pez pulmonado, aunque la mayoría tienen entre 206 y 208 aa (Rand-Weaver y Kawauchi, 1993).

Las hormonas de la familia GH/PRL presentan varios residuos de cisteína implicados en la formación de puentes disulfuro y, en consecuencia, en la conformación tridimensional de estas proteínas. La GH y la PRL de los teleósteos contienen dos puentes disulfuro mientras que la SL, así como la PRL de tetrápodos, esturión y pez pulmonado presentan un puente disulfuro adicional en la región N-terminal (Kawauchi y Sower, 2006). La presencia de este tercer puente disulfuro se ha relacionado con el papel osmorregulador de la PRL, ya que en ausencia del mismo la PRL ovina aumenta considerablemente su acción osmorreguladora en teleósteos (Doneen y cols., 1979). No obstante, la adquisición o pérdida de este tercer puente disulfuro durante la evolución de la familia aún resulta controvertida (ver [figura 2.5](#)).

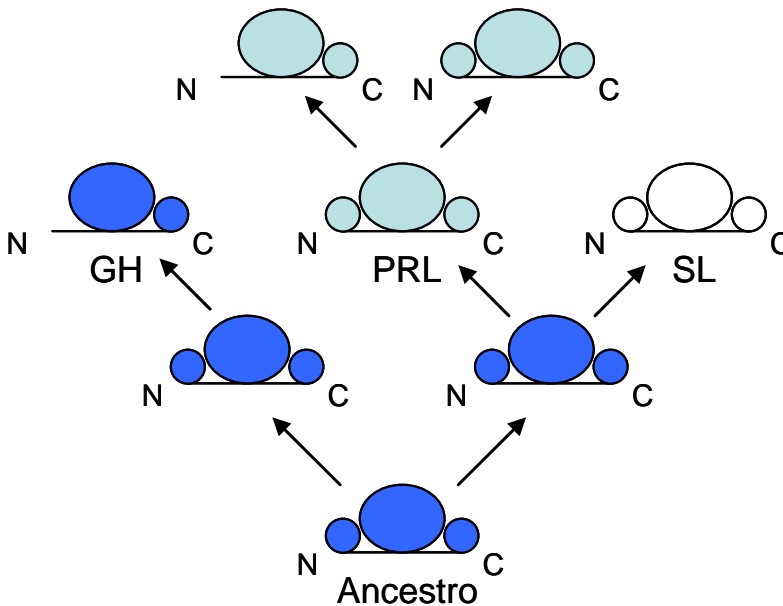


Figura 2.5. Evolución molecular de la familia GH/PRL. Las moléculas se muestran esquemáticamente enfatizando los plegamientos debidos a puentes disulfuro. La PRL de teleósteos ha perdido el primer puente disulfuro (modificado de Kawauchi y Sower, 2006).

Los genes que codifican para la GH se componen de 5 exones y 4 intrones en mamíferos, aves, lampreas (Moriyama y cols., 2006) y teleósteos como los ciprínidos (Noh y cols., 1999; HO y cols., 1991) o los silúridos (Tang y cols., 1993). No obstante, otras especies como los salmónidos, la tilapia, la perca y la dorada (Almuly y cols., 2000) presentan 6 exones y 5 intrones (**figura 2.6**). Este exón adicional proviene de la inserción de un intrón en el último exón. Esta inserción tuvo lugar a lo largo de la evolución de los teleósteos después de la aparición de los cipriniformes, pero antes de la de los salmoniformes, los perciformes y los tetraodontiformes.

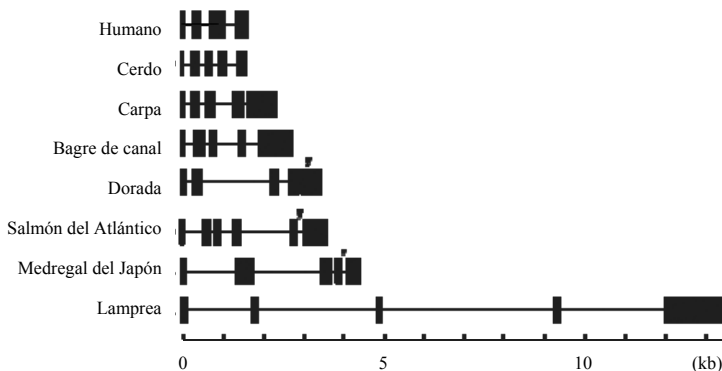


Figura 2.6. Representación esquemática de la estructura exón-intrón del gen de la GH. Bloques, exones. Líneas, intrones. Punta de flecha, intrón adicional (Almuly y cols., 2000; Moriyama y cols., 2006).

Según Kawauchi y Sower (2006), tanto la PRL como la SL presentan 5 exones en todos los organismos estudiados hasta la fecha. Por lo tanto, ésta debió ser la estructura del gen original. A modo de ejemplo, la **figura 2.7** muestra la organización de la GH, la PRL y la SL de dorada.

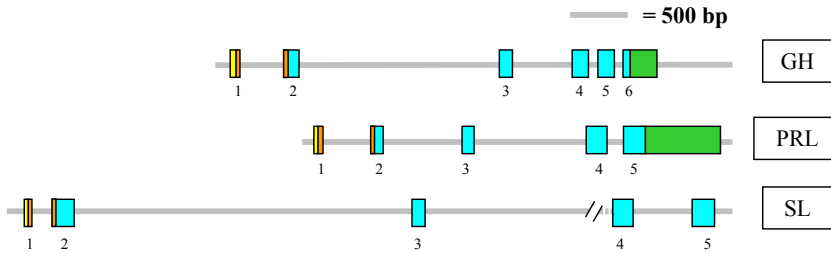


Figura 2.7. Representación esquemática de la estructura exón-intrón de los genes de la GH, la PRL y la SL de dorada (modificado de Astola y cols., 2003; 2004; Funkenstein y cols., 1991). Se aprecia la conservación de la estructura a excepción de la inserción de un intrón adicional en el último exón de la GH. Amarillo, 5'UTR. Naranja, péptido señal. Azul, proteína madura. Verde, 5'UTR.

2.1.3. Función biológica

La GH ha mantenido la estimulación del crecimiento somático como una de las funciones principales a lo largo de la evolución. Aún así, también realiza funciones relacionadas con la maduración sexual y la regulación osmótica (Rand-Weaver y Kawauchi, 1993). También se ha descrito una acción moduladora del sistema inmune tanto en mamíferos (Edwards 3rd y cols., 1992) como en peces (Calduch-Giner y cols., 1995; 1997; Yada, 2007).

La PRL ha evolucionado hacia un amplio abanico de funciones que pueden agruparse en 6 categorías: 1) balance de electrolitos y agua; 2) crecimiento y desarrollo; 3) metabolismo y regulación endocrina; 4) comportamiento; 5) reproducción y 6) regulación de la función inmune (Bole-Feysot y cols., 1998). No obstante, cabe destacar que la función principal de la PRL en los teleosteos es la regulación osmótica (Forsyth y Wallis, 2002).

La SL también presenta un amplio abanico de funciones como son esmoltificación, adaptación al fondo, respuesta al estrés, control de la reproducción, balance ácido-base y metabolismo del calcio, fosfato y sodio (ver Amemiya y cols., 1999; May y cols., 1999).

2.1.3.1. Regulación del crecimiento: eje somatotrópico

El crecimiento es el resultado de un proceso enormemente complejo en el que interactúan factores ambientales, nutricionales y genéticos. El eje somatotrópico, con la GH como pieza central, regula el crecimiento de los vertebrados integrando todos estos factores.

La acción estimuladora del crecimiento de la GH se describió hace más de 50 años en experimentos de incorporación a cartílago de sulfato marcado radiactivamente. Así, mediante inyecciones *in vivo* de GH se ha encontrado incorporación de sulfato. Sin embargo, la GH no muestra la misma actividad al administrarse directamente en preparaciones de cartílago. En base a estos resultados se formuló la hipótesis original de la somatomedina. Según esta hipótesis, la GH estimula la síntesis hepática y la liberación de somatomedina al torrente circulatorio (posteriormente identificada como IGF-I). Siendo la somatomedina quien estimula el crecimiento en última instancia (figura 2.8A).

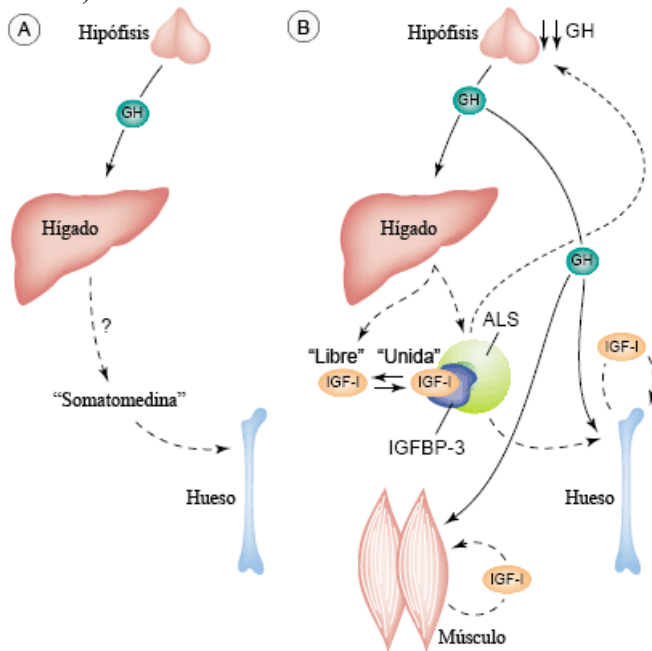


Figura 2.8. Hipótesis de la somatomedina. A, hipótesis inicial en la que la GH estimula la síntesis y liberación de la somatomedina (ahora conocida como IGF-I) en el hígado. B, hipótesis revisada en la que la GH actúa a nivel sistémico (síntesis hepática de la IGF-I) y a nivel local (acción autocrina/paracrina de la IGF-I) (modificado de Le Roith y cols., 2001b).

La hipótesis original cambió en los años 80 con el descubrimiento de que la mayoría de tejidos sintetizan IGF-I. Según la nueva hipótesis, la GH estimula la síntesis y liberación de IGF-I tanto a nivel hepático (acción sistémica) como extrahepático (acción local), siendo la síntesis hepática la mayor fuente de IGF-I circulante. A la IGF-I sintetizada a nivel local se le atribuye una función autocrina y/o paracrina (**figura 2.8B**) (revisado en Butler y Le Roith, 2001; Le Roith y cols., 2001a).

Recientemente se ha propuesto una nueva modificación de la hipótesis para integrar todas las funciones biológicas de la GH y la IGF-I en base a las siguientes observaciones: 1) la GH puede estimular la captación de sulfato en preparaciones de cartílago bajo las condiciones apropiadas. 2) La GH actúa de forma directa (no mediada por IGF) en el crecimiento óseo. 3) Aunque el hígado es la fuente principal de IGF-I circulante, prácticamente todos los tejidos la sintetizan. 4) Se ha detectado la presencia del GHR en casi todos los tejidos indicando que la GH puede ejercer una acción directa sobre ellos. 5) GH e IGF-I muestran algunos efectos biológicos opuestos. La GH incrementa la gluconeogénesis y la lipólisis además de contrarrestar la acción de la insulina mientras que las de la IGF-I aumenta el consumo de glucosa, la lipogénesis y disminuye la gluconeogénesis.

Los autores de esta nueva hipótesis proponen que las IGF, más que meros efectores de la acción de la GH, son hormonas que amplifican las acciones anabólicas de la GH (**figura 2.9**) a la vez que contrarrestan sus efectos sobre el metabolismo de lípidos y azúcares (Kaplan y Cohen, 2007).

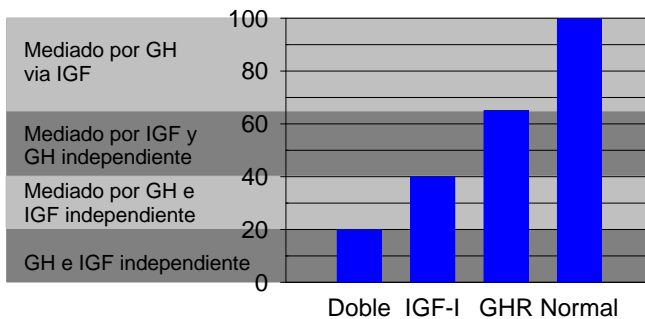


Figura 2.9. Contribución relativa de la GH y la IGF-I al crecimiento postnatal en experimentos de ratones “knockouts” de GHR, IGF-I o ambos genes (modificado de Kaplan y Cohen, 2007).

Aún así, el funcionamiento del eje somatotrópico no está totalmente claro ya que recientes experimentos de deleción génica han demostrado que ratones que no expresan la IGF-I hepática crecen normalmente (ver Le Roith y cols., 2001b).

La complejidad de este sistema refleja la cantidad de elementos que componen el mismo. La secreción hipofisaria de GH está básicamente regulada por dos neuropéptidos hipotalámicos: la hormona liberadora de GH (GHRH, acción estimuladora) y la somatostatina (SRIH, acción inhibidora) (Tuggle y Trenkle, 1996) además de la Ghrelina (acción estimuladora), péptido de origen gástrico (Kojima y cols., 1999). Una vez liberada al torrente circulatorio, la GH se acompleja con proteínas de transporte específicas (GHBP). Las GHBP potencian la acción de la GH incrementando su vida media en sangre. La GH ejerce su acción uniéndose a receptores de membrana específicos (GHR), situados en la superficie celular de los tejidos diana.

En mamíferos hay dos genes que codifican para la IGF (IGF-I, 70 aa, e IGF-II, 67 aa). Estas IGF tienen una elevada homología entre ellas (70 %) y con la proinsulina (50 %). En ratones, ambas IGF son necesarias para el crecimiento fetal pero sólo IGF-I es indispensable para un correcto crecimiento postnatal. Por el contrario, ambas IGF son necesarias para el crecimiento postnatal en humanos y, dado que la expresión de IGF-II no es capaz de compensar totalmente un déficit en IGF-I, no existe un solapamiento funcional total (Le Roith y cols., 2001a).

Las IGF también circulan acomplejadas a proteínas de transporte (IGFBP). Existen 6 IGFBP diferentes que difieren en su regulación y afinidad por IGF-I e IGF-II. En adultos, la mayoría de las IGF circulantes se encuentran formando un complejo con la IGFBP-3 y la subunidad ácido-lábil (ALS). Las IGFBP no son simples proteínas de transporte ya que pueden modular las acciones de las IGF. La IGF-I y II interactúan con dos tipos de receptores con diferencias en su secuencia, estructura y afinidad por el ligando (Denley y cols., 2005).

En peces se ha descrito un sistema muy similar al de mamíferos, aunque existen ciertas diferencias. Las IGF también

circulan en sangre acomplejadas a IGFBP, pero no se ha detectado la existencia de la ALS (Björnsson y cols., 2002; Wood y cols., 2005). Los tejidos de los peces adultos también expresan IGF-I e IGF-II (Caelers y cols., 2004; Duguay y cols., 1996; Peterson y cols., 2004; Vong y cols., 2003) y ambas IGF estimulan el crecimiento al inyectarse en peces juveniles (Chen y cols., 2000). De hecho, se han podido asociar diferencias en crecimiento con una expresión diferencial de ambas IGF (Peterson y cols., 2004; Chauvigné y cols., 2003; Terova y cols., 2007).

2.2. Receptores de la hormona del crecimiento

La hormona del crecimiento ejerce su función uniéndose a receptores específicos de membrana (GHR). Así pues, un tejido será más o menos sensible a la acción de la hormona en función de la cantidad de receptores que posea. Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores de citoquina clase I (Kitamura y cols., 1994).

2.2.1. Superfamilia de receptores de citoquina clase I

Los receptores de esta familia presentan un bajo nivel de homología a nivel de secuencia y varían en su topología. Presentan una región conservada en el dominio extracelular (“*Cytokine receptor Homology Domain*”, CHD) compuesta de unos 200 aa, que es responsable de la interacción con el ligando. La CHD contiene dos dominios fibronectina tipo III dispuestos en tándem. En el primer dominio fibronectina aparecen 4 residuos de cisteína implicados en la formación de 2 puentes disulfuro y en el segundo aparece el motivo de unión a ligando (WSXWS). La principal diferencia entre los receptores de citoquina clase I y II radica en la presencia (clase I) o ausencia (clase II) del CHD. Además, en la porción extracelular, también pueden aparecer varios dominios fibronectina y tipo inmunoglobulina. Estos receptores presentan un único dominio transmembrana y una porción intracelular con dos motivos conservados (BOX 1 y BOX 2) implicados en el anclaje de la quinasa de Janus (Jak) (Bazan, 1990).

La superfamilia se ha dividido en 5 grupos atendiendo a la estructura y homología de las secuencias (**figura 2.10**). El

GHR pertenece al grupo I, que se caracteriza por formar homodímeros en presencia de sus respectivos ligandos y por tener una región extracelular formada únicamente por el CHD. A este grupo también pertenecen los receptores de eritropoyetina, trombopoyetina y PRL, junto con el receptor CL3 de función aún por determinar (Boulay y cols., 2003).

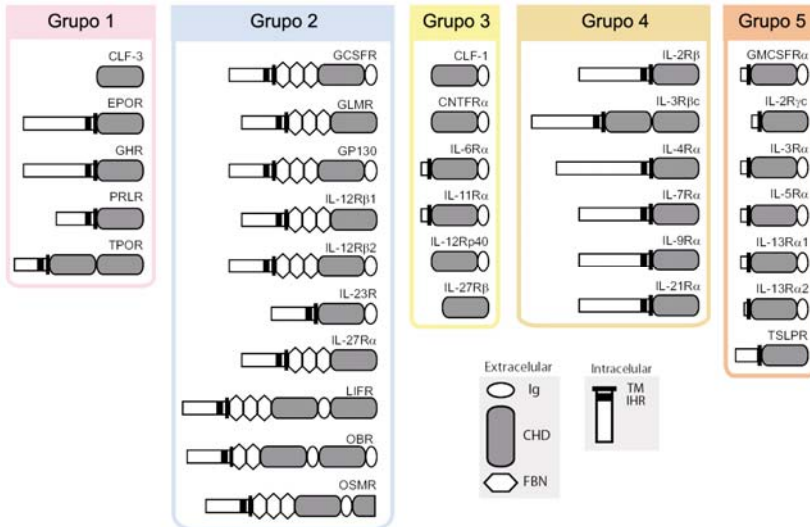


Figura 2.10. Representación esquemática de la topología de los cinco grupos estructurales de los receptores de citoquina clase I. En la región extracelular se indican los dominios inmunoglobulina (Ig), los fibronectina tipo III (FBN) y el CHD, que incluye los puentes disulfuro y el motivo WSXWS. En la región intracelular se indican el dominio transmembrana (TM) y la región de homología intracelular (IHR), que contiene los dominios BOX 1 y BOX 2 (modificado de Liongue y Ward, 2007).

2.2.2. Receptores de la hormona del crecimiento de tetrápodos

El GHR es una proteína de unos 640 aa que al procesarse para eliminar el péptido señal presenta un tamaño de unos 620 aa (Edens y Talamantes, 1998). Experimentalmente, el peso molecular del GHR es de unos 100 – 130 kDa, aunque según su secuencia de aa se calcula un peso molecular de unos 70 kDa. Esta aparente contradicción se ha explicado en base al nivel de glicosilación de la proteína. Así pues, en la región extracelular hay 5 sitios potenciales de N-glicosilación y se ha determinado

que la eliminación conjunta de estos sitios reduce unas 20 veces la afinidad por la GH (Kopchick y Andry, 2000).

La región extracelular del GHR está compuesta por dos dominios de unos 120 aa cada uno, ambos dominios están conectados por un pequeño polipéptido. El dominio N-terminal está implicado en la unión del ligando mientras que el dominio adyacente a la membrana plasmática se le atribuyen funciones estructurales (van den Eijnden y cols., 2006). Cada dominio presenta 7 hojas β , esta estructura secundaria también se encuentra presente en la fibronectina, las inmunoglobulinas y la CD4, aunque únicamente el dominio N-terminal contiene residuos de cisteína. El GHR ha conservado los 2 puentes disulfuro característicos de esta familia de receptores junto con 3 residuos adicionales de cisteína. Dos de estos residuos (quinto y sexto) forman un tercer puente disulfuro, mientras que el séptimo residuo se ha postulado que forma un puente disulfuro intermolecular durante la dimerización del receptor (Argetsinger y Carter-Su, 1996; Zhang y cols., 1999). El motivo WSXWS se ha modificado y se conserva como YGEFS (Thomas, 1998).

En la región intracelular aparecen los dominios conservados BOX 1 y BOX 2 además de unos 8 – 10 residuos de tirosina. El Box 1 es un motivo de 8 aa rico en prolina (Ψ -X-X-X-AL-P-X-P, donde Ψ representa residuos hidrófobos, X cualquier aa, AL residuos alifáticos y P prolina) que se ha conservado como ILPPVPVP (Goujon y cols., 1994). El BOX 2 es menos conocido. Se ha caracterizado como un conjunto de residuos hidrófobos que acaban con uno o dos residuos cargados positivamente (unos 15 aa). El BOX 2 está localizado a unos 30 aa en dirección C-terminal del BOX 1 (Argetsinger y Carter-Su, 1996). Los residuos de tirosina son puntos de fosforilación que sirven de anclaje para diversas moléculas implicadas en la transducción de la señal (**figura 2.11**).

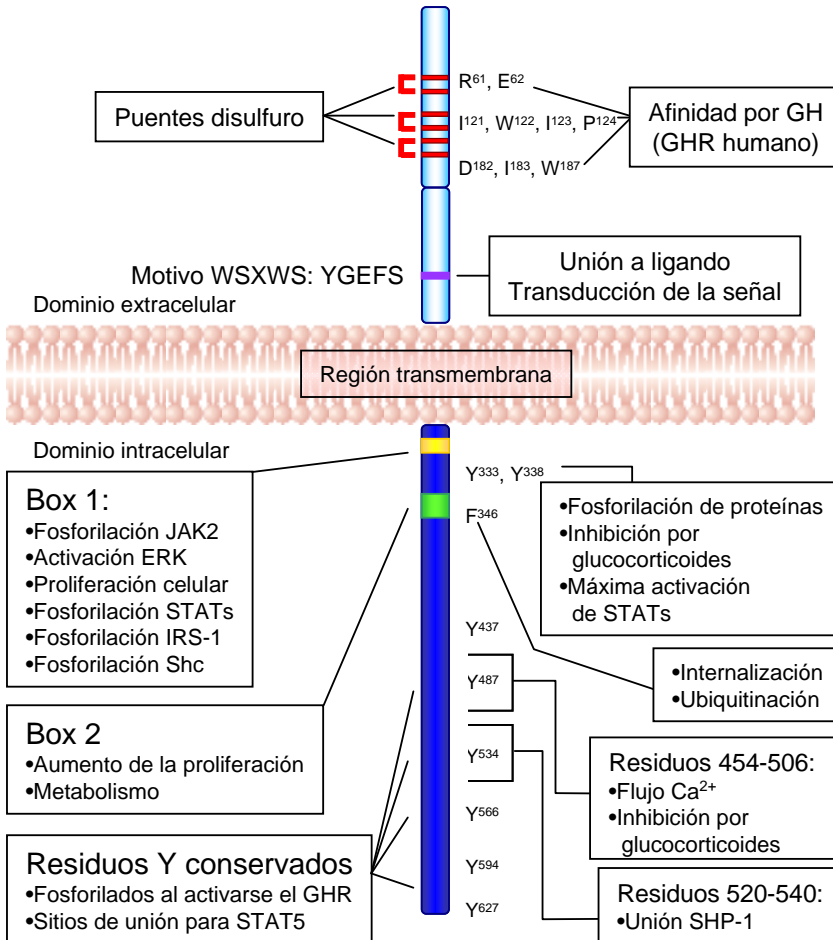


Figura 2.11. Representación esquemática de la estructura del GHR y de sus implicaciones en la unión y/o transducción de la señal de la GH. Si no se indica lo contrario, la numeración corresponde al GHR de rata (modificado de Thomas, 1998).

2.2.2.1. Transducción de la señal

La unión de la GH con su receptor en la superficie celular induce la dimerización del mismo (Cunningham y cols., 1991), lo que conlleva la subsiguiente asociación y activación de la JAK2 (Argetsinger y cols., 1993). A partir de aquí, se inicia un complicado sistema de transducción de la señal en el que se fosforilan los residuos intracelulares de tirosina del GHR (ver **figura 2.11**) y la JAK2 además de diferentes proteínas citosólicas (**figura 2.12**) (Detallado en Argetsinger y Carter-Su, 1996; Herrington y Carter-Su, 2001; Zhu y cols., 2001). Entre estas moléculas se incluyen otros receptores tirosina quinasa

(EGFR) y varias quinasas (Src y FAK), aunque parece que el receptor EGFR se usa simplemente como proteína adaptadora. En este proceso también se incluyen los miembros de la familia de la MAPK (Anderson, 1992), así como miembros del grupo de los sustratos del receptor de insulina (IRS) (Ridderstråle y cols., 1995). Los IRS actuarían como proteínas de anclaje para la posterior activación de otras moléculas, como la fosfatidil inositol-3 quinasa (PI-3K), implicadas en la señalización celular. Los miembros de la familia de los transductores de la señal y activadores de la transcripción (STATs) también son fosforilados por la JAK2 y constituyen el mecanismo principal de regulación génica de la GH (Herrington y cols., 2000).

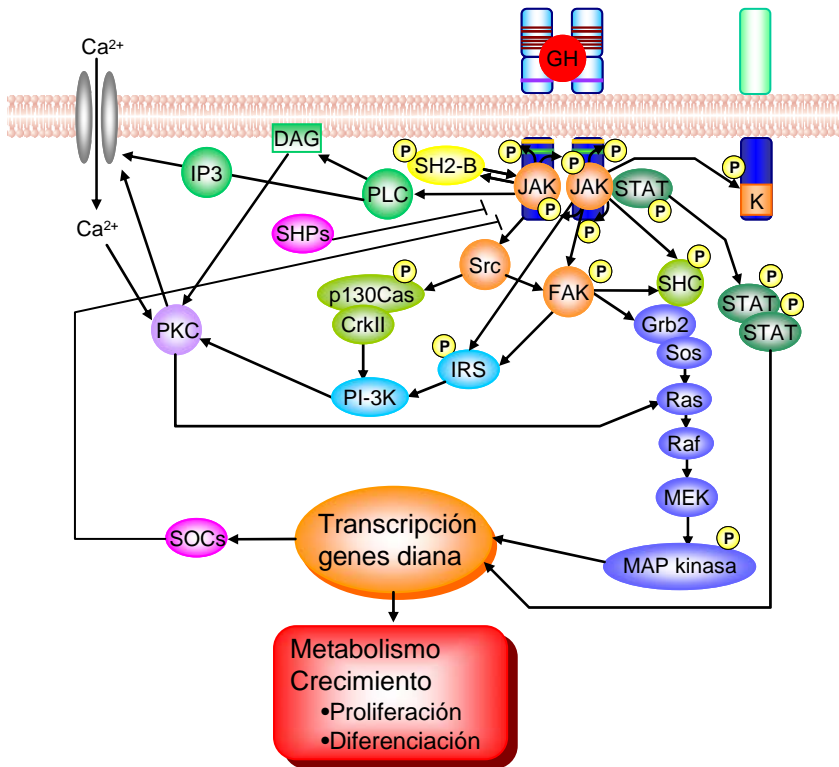


Figura 2.12. Representación esquemática de las principales rutas de señalización intracelular activadas por la GH tras su unión con el GHR (Kopchick y Andry, 2000; modificado de Herrington y Carter-Su, 2001).

La mayoría de estas proteínas participan en la transmisión de la señal de la GH formando parte de complejos multiproteicos (**figura 2.13**). Estos complejos son un mecanismo común en la transducción de la señal de varios receptores e incluyen diferentes enzimas junto con proteínas adaptadoras (Pawson, 1995). Estas proteínas adaptadoras no poseen actividad enzimática de forma intrínseca, pero su habilidad de mediar interacciones proteína-proteína es vital para la transducción de la señal. En el caso de la GH, las proteínas adaptadoras como Grb2, Nck y CrkII tienen como función principal reclutar moléculas efectoras ricas en prolinas para las quinasas de la cascada de señalización (revisado por Zhu y cols., 2001).

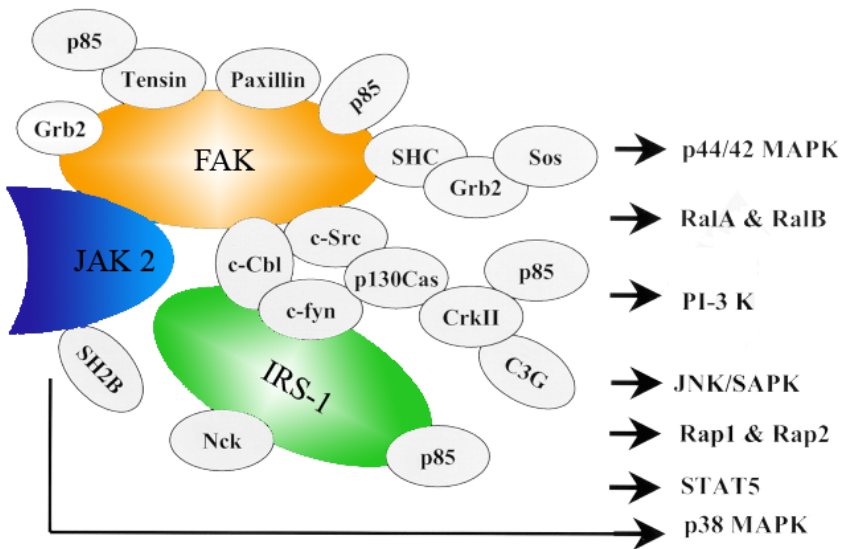


Figura 2.13. Esquema del complejo multiproteico formado tras la estimulación con GH (modificado de Zhu y cols., 2001).

Dentro de este intrincado sistema existen sinergias tanto positivas como negativas. Así, SH2-B es sustrato de la JAK2 a la vez que potencia su actividad y estimula moléculas como STAT5, que están por debajo en la cascada de señalización (Rui y Carter-Su, 1999).

Por otro lado también existen reguladores negativos. Se han caracterizado al menos tres familias de proteínas que inhiben esta cascada de señalización: fosfatasas, supresores de la señalización de citoquinas (SOCS) e inhibidores proteicos de STAT activados (PIAS). Las fosfatasas (SHP-1 y SHP-2) son

capaces de defosforilar diferentes elementos de esta cascada dando lugar a la inhibición de la misma (Jiao y cols., 1996; Kim y cols., 1998). Los SOCS (también llamados CIS, proteínas inducibles por citoquinas que contienen el dominio SH2) están regulados por la GH e inhiben este sistema por interacción directa con JAK, por inhibición de la JAK a través de residuos de tirosina próximos a la membrana o por inhibición de la activación de STAT a nivel de residuos de tirosina distales (Ram y Waxman, 1999). Los PIAS se expresan constitutivamente y sirven y tamponan las STAT que hayan sido activadas en cada momento (Hilton, 1999).

2.2.2.2. Organización genómica y formas alternativas

La estructura exón-intrón del GHR se ha descrito en el hombre (Godowski y cols., 1989; Zou y cols., 1997), ratón (Moffat y cols., 1999) y pollo (Agarwal y cols., 1994) (**figura 2.14**). Esta estructura se ha conservado a lo largo de la evolución mostrando varios exones alternativos que codifican para la 5'UTR, seguidos de 9 exones que codifican para el péptido señal (exón 2), la región extracelular (exones 3 – 7), la región transmembrana (exón 8) y la región intracelular seguida de la 3'UTR (exones 9 y 10).

No obstante, existen ciertas variaciones intra- e inter-específicas y se han identificado dos 5'UTR alternativas en los transcritos de oveja (Adams y cols., 1990; Adams, 1995) y pollo (Agarwal y cols., 1994), 5 en rata (Domene y cols., 1995) y ratón (Southard y cols., 1995; Moffat y cols., 2000), 9 en vaca (Hauser y cols., 1990; Jiang y Lucy, 2001; Heap y cols., 1996) y al menos 8 en hombre (Pekhletsky y cols., 1992; Orlovskii y cols., 2004; Wei y cols., 2006). En todas estas especies, las variantes divergen unas pocas pb antes del condón de la metionina inicial, coincidiendo con el sitio de unión del primer y segundo exón, lo que indica que las variantes corresponden a diferentes exones. Estas variantes se han asociado a diferentes secuencias promotoras y se ha demostrado que una de las 5'UTRs alternativas exhibe una actividad exclusiva o mayoritaria en hígado (Edens y Talamantes, 1998; Orlovskii y cols., 2004). La función de estas variantes no está totalmente clara, aunque debido a la compleja regulación tisular y fisiológica de este

receptor, se han asociado a una diferente estabilidad del mensajero y/o regulación de los promotores.

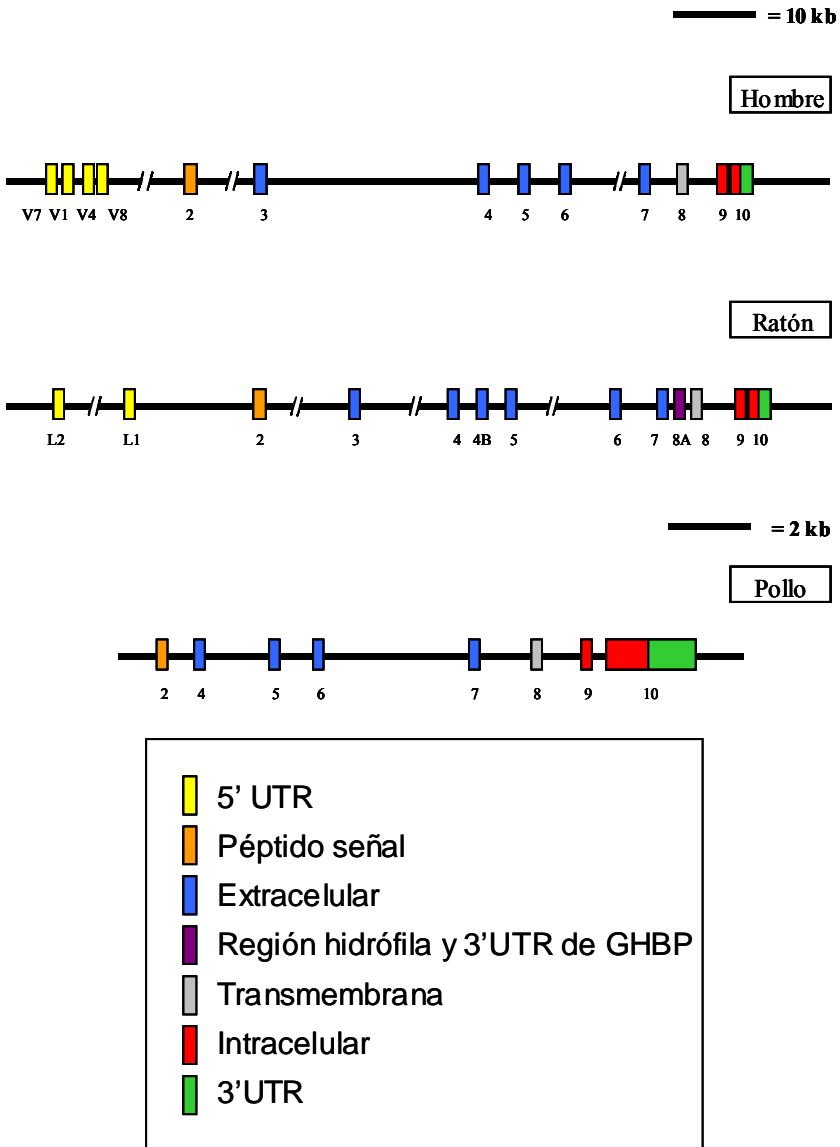


Figura 2.14. Estructura del gen del GHR de hombre, ratón y pollo (modificado de Edens y Talamantes, 1998).

La estructura general exón-intrón del GHR también presenta pequeñas variaciones inter-específicas. En pollo no se ha encontrado un exón homólogo al exón 3, aunque estudios del GHR humano han demostrado que los aa de este exón no son críticos para la unión de la GH (Urbanek y cols., 1993; Sobrier y cols., 1993; Esposito y cols., 1994). La estructura del gen de ratón presenta un exón adicional entre el exón 4 y el 5 (4B). Este exón está presente en todos los transcritos y codifica para 8 aa, que no presentan homología ni siquiera con el GHR de rata. La función de estos aa no se ha estudiado directamente, aunque estudios de cristalografía del GHR humano indican que los aa cercanos a la unión de los exones 4/5 no interaccionan con la GH (de Vos y cols., 1992). El exón 8A de ratón, también presente en rata, está implicado en la formación de las GHBP. Estas GHBP se generan mediante un procesamiento alternativo del mensajero que da lugar a un ARNm más corto en el que, después del exón 7, se inserta el 8A en lugar del 8. Este exón codifica para los últimos 27 aa hidrófilos y la 3'UTR de las GHBP (Edens y cols., 1994; Zhou y cols., 1994).

Por consiguiente, las GHBP (**figura 2.15**) son formas glicosiladas y solubles con un peso molecular de unos 55 kDa (Bass y cols., 1991), que corresponden a la porción extracelular del receptor (Hadden y Prout, 1964). Se calcula que aproximadamente el 60 % de la GH circulante está unida a las GHBP, por lo que actúan como reservorio de la GH circulante (Baumann y cols., 1988). De hecho, *in vivo* la GHBP aumenta la vida media de la GH plasmática. Sin embargo, *in vitro* se ha visto que la GHBP actúa compitiendo con el GHR por la unión al ligando, inhibiendo la transmisión de la señal (Mannor y cols., 1991). No obstante, este efecto antagónico de las GHBP no se ha observado *in vivo*.

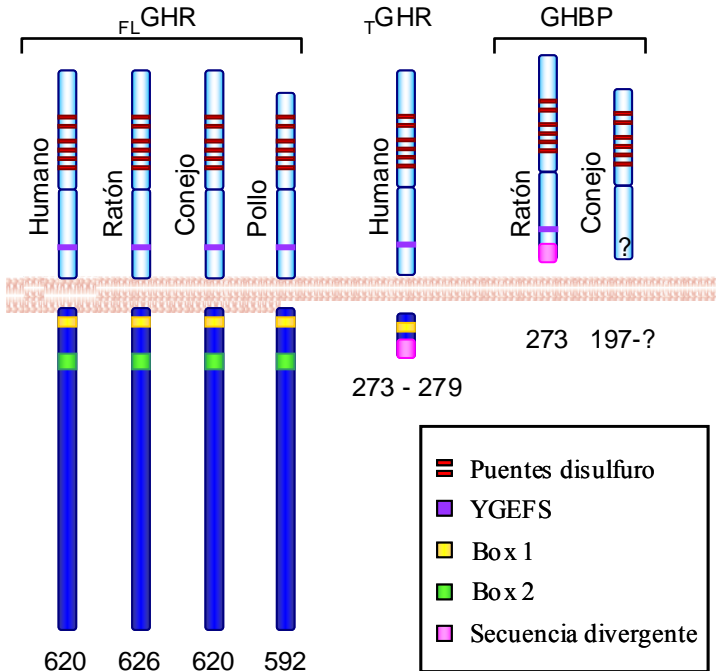


Figura 2.15. Representación esquemática de las formas alternativas del GHR en diferentes especies de tetrápodos. $_{FL}GHR$, forma completa; $_{T}GHR$, forma truncada.

El mecanismo de generación de las GHBP difiere entre especies. En el caso del ratón y la rata se generan mediante procesamiento alternativo tal y como se ha expuesto anteriormente. El caso del conejo es diferente, puesto que la GHBP es generada por escisión proteolítica del receptor dando una proteína de al menos 197 aa (Leung y cols., 1987; Harrison y cols., 1995; Sotiropoulos y cols., 1993). El mono es la única especie donde se han visto ambos mecanismos de generación de las GHBP, proteólisis y procesamiento alternativo (Martini y cols., 1997). En esta especie, el ARNm de la GHBP es igual al del GHR en los primeros 784 pb, pero 8 pb antes de la región transmembrana, contiene una secuencia divergente de 236 pb.

En el hombre, existen dos formas truncadas del GHR generadas por procesamiento alternativo del mensajero (Lewin, 1994; Ross y cols., 1997; Amit y cols., 1997). En ambos casos, las regiones extracelular y transmembrana son idénticas a las descritas para la forma completa del receptor. Los 3 primeros aa de la región intracelular también se conservan, pero a partir de

este punto la secuencia es divergente (ver **figura 2.15**). Una de las formas truncadas se genera por un sitio aceptor alternativo dentro del exón 9, mientras que la otra se debe a una delección completa de este mismo exón. La secuencia divergente en el primer caso consiste en 6 aa, mientras que es de 4 aa en el segundo. Estas formas truncadas inhiben la acción de la GH al competir por el ligando sin desencadenar ninguna señal intracelular, ya que carecen de las secuencias necesarias para reclutar los diversos componentes de la cascada intracelular de transmisión de la señal (ver **figura 2.11** y **2.12**).

2.2.3. GHR de peces

Los GHR de peces se clonaron por primera vez en rodaballo (Calduch-Giner y cols., 2001), por el grupo de Nutrición y Endocrinología del Crecimiento de Peces del IATS. Paralelamente, un grupo de la universidad de Hong Kong hizo lo propio con el GHR del pez rojo (Lee y cols., 2001). Posteriormente, también se ha clonado en otras especies como dorada (Calduch-Giner y cols., 2003), *black sea bream* (Tse y cols., 2003), falso halibut del japon (Nakao y cols., 2004), carpa china (ver lista de n^{os} de acceso a Genbank), *southern catfish* (Jiao y cols., 2006), salmón japonés (Fukada y cols., 2004) y salmón plateado (Raven y cols., 2008).

La organización genómica de los GHR de peces también fue descrita por primera vez por nuestro grupo (Pérez-Sánchez y cols., 2002). Así, la organización genómica de los GHR de rodaballo y dorada nos permitió comprobar que estos genes presentan una estructura muy similar a la descrita en tetrápodos (**figura 2.16**), lo que indica una gran conservación a lo largo de la evolución. Sin embargo, también se observa la presencia de un pequeño intrón adicional (10/10A) en el extremo C-terminal.

En *black sea bream*, se ha descrito una forma alternativa con una inserción de 31 aa en la región intracelular que no altera la pauta de lectura de la proteína (**figura 2.17**). Esta forma larga se genera mediante un procesamiento alternativo del ARNm que no elimina el intrón 10/10A (Tse y cols., 2003). En peces planos, rodaballo (Calduch-Giner y cols., 2001) y falso halibut del japon (Nakao y cols., 2004), se ha descrito la presencia de formas truncadas. Estas formas se generan por un procesamiento

alternativo del ARNm que no elimina el intrón 9/10 (Pérez-Sánchez y cols., 2002; Nakao y cols., 2004). De esta manera, se genera un transcrito que conserva los primeros 28 aa de la región intracelular seguidos de una secuencia divergente de unos 21 – 26 aa y una 3'UTR alternativa (figura 2.16). Al igual que en mamíferos, a estas formas truncadas se les atribuye un papel inhibitorio, ya que carecen de la mayor parte del dominio intracelular.

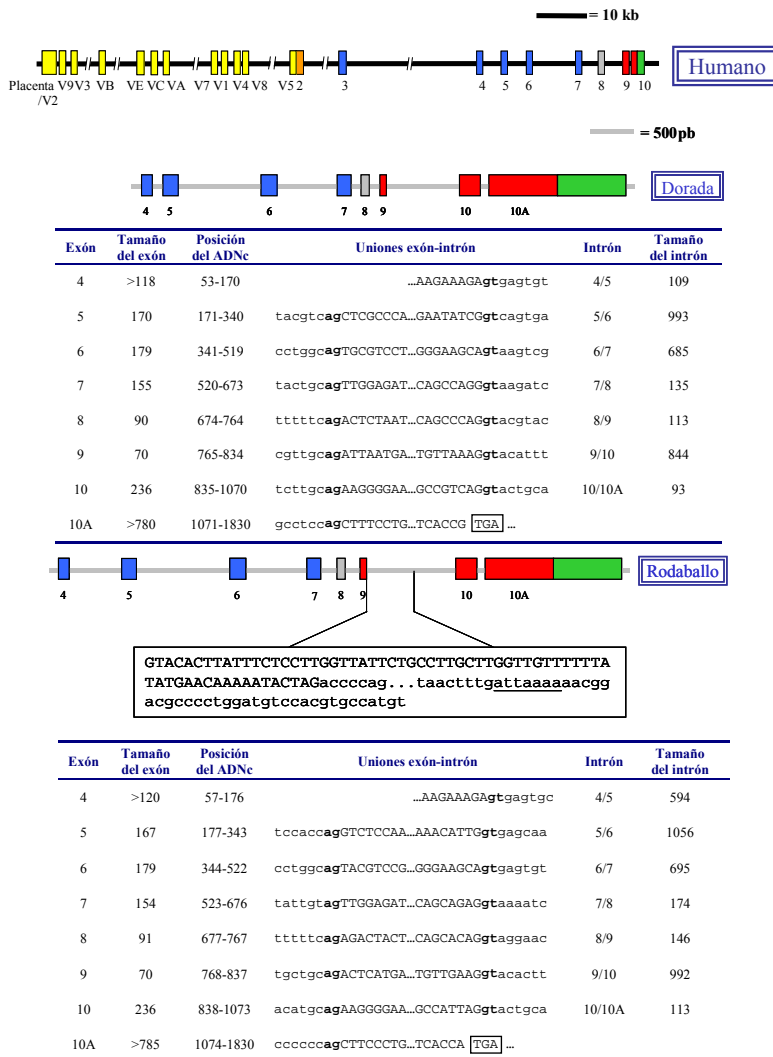


Figura 2.16. Organización exón-intrón de los GHR de hombre, dorada y rodaballo. En la tabla se destacan los tamaños de los exones e intrones, así como su posición en el ADNc y la secuencia de los puntos de unión. El código de colores es igual al de la figura 2.13 (modificado de Pérez-Sánchez y cols., 2002).

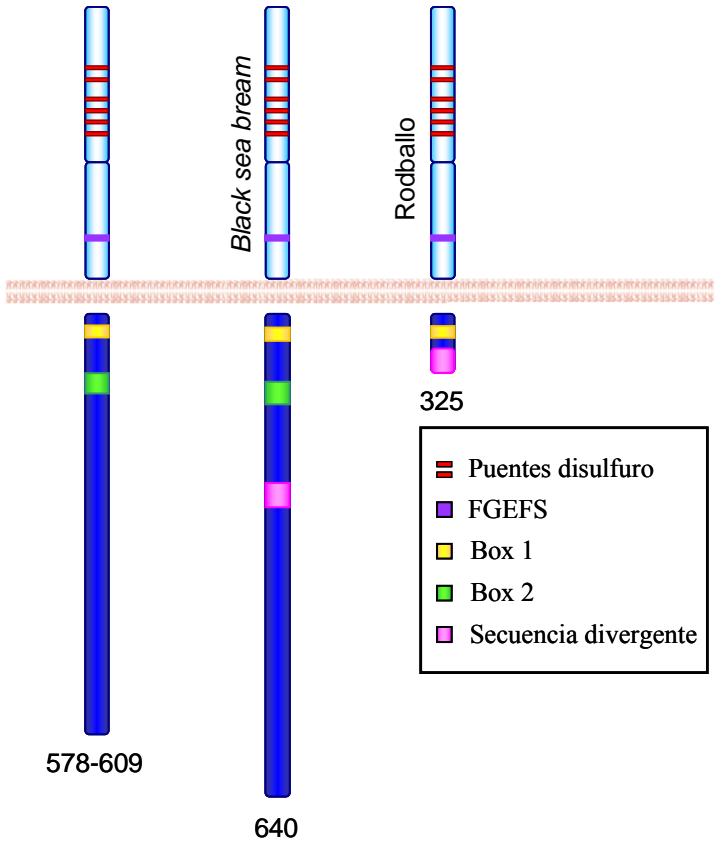


Figura 2.17. Representación esquemática de los GHR de peces con la forma larga de *black sea bream* y la trunca de rodaballo (modificado de Pérez-Sánchez y cols., 2002).

El análisis de los alineamientos (**figura 2.18**) de las primeras secuencias de GHR descritas en peces revelan un alto grado de identidad aminoacídica (35 – 40 %) entre las secuencias de los peces no salmónidos y los tetrápodos. Esto se ve reflejado en una gran conservación de los motivos estructurales de los GHR de tetrápodos. De hecho, los GHR de peces presentan el motivo YGEFS (FGEFS en peces), 7 residuos de cisteína extracelulares, los dominios intracelulares BOX 1 y BOX 2 así como varios residuos intracelulares de tirosina. Sin embargo, la identidad aminoacídica con las secuencias de los tetrápodos disminuye cuando se incluyen en el análisis los salmónidos (27 – 34 %). Además, los GHR de salmónidos muestran una menor conservación de los motivos estructurales: ausencia de dos de los residuos de cisteína extracelulares y un diferente patrón de

residuos intracelulares de tirosina. Estas diferencias se ven reflejadas en los análisis filogenéticos (**figura 2.19A**), apareciendo dos grupos claramente separados: los salmónidos y los no salmónidos.

Inicialmente, ello se explicó como una divergencia evolutiva de los GHR en los salmónidos (Björnsson y cols., 2002). No obstante, un hecho esclarecedor fue la clonación por nuestro grupo del GHR de trucha arco iris (Gómez-Requeni y cols., 2005). De hecho, el análisis filogenético mostró como el receptor de trucha es más próximo al GHR de peces no salmónidos que al de los salmónidos (**figura 2.19B**). Un estudio más detallado de su secuencia revela que presenta las mismas características que los receptores de los peces no salmónidos. Es decir, conserva los residuos de cisteína extracelulares no presentes en los peces salmónidos y el mismo patrón de residuos intracelulares de tirosina. Estos hallazgos nos llevaron a rechazar la hipótesis previa de una divergencia evolutiva y plantear una nueva en la que se postuló la existencia de dos formas alternativas para el gen GHR en los genomas de los peces: la forma de los peces no salmónidos (GHR-I) y la de los peces salmónidos (GHR-II). Esta nueva hipótesis marca el inicio de la presente Tesis Doctoral y ha sido el eje central que ha guiado el desarrollo de la misma.

Figura 2.18. Alineamiento de las secuencias de los GHR de peces y el GHR humano. Los aa idénticos se muestran con fondo negro y los homólogos con fondo gris. Se destacan los residuos de cisteína extracelulares (■, □, □), el motivo FGEFS, los dominios transmembrana, BOX 1 y BOX 2 y los residuos de tirosina intracelulares (▲,▲).



Humano FSGSEATAAIIILSRAPWSLQSVNPLKTNSSKEPKFTKCRSPERETFSCHW 50
 Dorada -----RGSVFVMD--HMTSSAPVGPHFTECISREQETFRCCW 35
 Pez rojo -----SELFTPDPSRGPHFTEGCRSREQETFRCCW 29
 Carpa -----GNGLVSRGSKLFTADPSRGPHFTEGCRSREQETFRCCW 38
 Rodaballo -----PGLAFVSDRDHTNPSAPLEPHFTECISREQETFRCCW 37
 S. japonés -----EPPTSEQALPQIRPQITGCVSHDMNTFRCCW 31
 S. plateado -----QEPPTSKQALFQIRPQITGCVSHDMNTFRCCW 32

Humano TDEVHHGKTNLCPTQIFYTRRNTQEWTEWKECPDYVSAGENSIFYNSSF 100
 Dorada SPGGEHNLSPGALRVFYLK--KLSPNSEWKECEPYSHLKR--ECFFDVMH 82
 Pez rojo SAGIFQNLTEPGALRVFYMT--KHALS--EWQECPDYTRTVKNECYFNKTF 76
 Carpa SAGIFQNLTEPGALRVFYQT--KNALSSWKECPDYTHTVENECYFNKTF 86
 Rodaballo SPGGEHNLSPGALRVFYFK--KESPTSEWRECPQYIHSNR--ECFFDKNH 84
 S. japonés NVGIFQNLTEPRDLRMFYIYINNNKISPKEWSECPNYMADRIDECCFNEBSY 81
 S. plateado NVGIFQNLTEPRDLRFYIYINDRNISPKEWSECPRY--ADRTNECFNEBSY 81

Humano TSIWIPYCKLITNSG---GTVDEKCFVDEIVQDPDPIALNWTLLNVSLT 147
 Dorada TSVWIPYCMQLRGNVNTYLDDEDYCFVTVENIVRPDPPVSLNWTLLNISPS 132
 Pez rojo TQIWTISYCIQLRSVR--ENITYDEACFTVENIVHPDPPICLNWTLLNVSR 125
 Carpa THIWISYCIQLRSVP--QNTYDEACFTVENIVHPDPPICLNWTLLNVSL 135
 Rodaballo TSIWIPYCMQLRSQN--TTFNDDDCFTVENIVRPDPPVSLNWTLLNISPS 133
 S. japonés TKVWITYSVQLRSGD--QDNLTYDEVIFTVBEIIVEPDPPIALNWTLLNVGLT 130
 S. plateado TKVWITYSVQLRSGD--QDILTYXEVIFTVBEIIVEPDPPIALNWTLLNVGLT 129

Humano GIHADIQVRWEAPRNADIQKGMVLELEYLOKVEVNETKMKMMDPILITSV 197
 Dorada GLSYDVMVNWEPSPSADVGACWMRIEYEQYTERNTTWEALEMOPHTQQ 182
 Pez rojo GLHYDILVWRWAPPSPSADVQMGWMSLEYQVQYRVRNNSHWEMLDLESQTQQ 175
 Carpa GLHFDILVWRWAPPSPSADVQMGWMSLVYQVQYRVRNNSQWEMLDLESQTQQ 185
 Rodaballo GLSYDVMVNWEPSPSADVRTGWMRIEYEQYRERNTTKWEALEMOPQSQQ 183
 S. japonés GSHFDIMVSWEPSPSADVSMGWMLLOYEQYREVNSTLWRTVDLEKGMQR 180
 S. plateado GSHFDIMVSWEPSPSADVSMGWMLLOYEQYREVNSTLWRTVDLEKGMQR 179

Humano PVYSIKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLVYVILPQMSQFTCEEDFYF 247
 Dorada TIYGLQIGKEYEVHTRCRMCAAFVKFGFSDSVFIQVTEIPSDSN----F 228
 Pez rojo SIYGLHTDKEYEVRVRCMKIAFDNFGFSDSIIHVVAQIPSKEST----F 221
 Carpa SIYGLHTDKEYEVRVRCMKSAFDNFGFSDSIIHVVAQIASKEST----F 231
 Rodaballo TIYGLHIGKEYEVHTRCRMCAAFKFGFSSSIFIHVTEIPSRFT----F 229
 S. japonés SLYGLRINTDHEVRVRCMTLASRNFGEFSDPIVIH---IPTKESR----F 223
 S. plateado SLYGLRSNTDNEVRVRCMTLASRNFGEFSDSIFIH---IPTKESR----L 222

FGFEFS

Humano PWLLIIIFGIFGLTVMFLVFLFSKQORLKMILIPPVVPKIKIGIDPELLK 297
 Dorada PFKLALIFGLVGLILILILIGISQQPRLMMILLPPVPAPKIKIGIDPELLK 278
 Pez rojo PTLVLVIFGIMIGVILLVLLVIFSQQRLMVIPLPPIAPKIKIGIDPELLK 271
 Carpa LTLVLIFGIMIGVILLVLLVIFSQQRLMVIPLPPIAPKIKIGIDPELLK 281
 Rodaballo FLAVVLVFGIVGILILIMLLIVSQQHRMLMILLPPVPAPKIKIGIDPELLK 279
 S. japonés FVTVLVFAALGLAVILMLVIYSQQQLMMILLPPIPKIKIGIDPELLK 273
 S. plateado FVTVLVFAALGLAVILMLVIYSQQQLMVIPLPPIPKIKIGIDPELLK 272

TRANSMEMBRANA

BOX 1

Humano ECKLEEVNTILAIHDS----YKFEFHSDDSWVEFIELDIDEP----DEK 338
 Dorada KGKLDLNLFLSLGGMGGLSTYAFDFYQDEPWVEFIEVPAEDADAEEKKE 328
 Pez rojo NGKLDQLNSLSSQDM----YKDFYHEDPWVEFIEQLDLDDE----AEK 312
 Carpa NGKLDQLNSLSSQDM----YKDFYHEDPWVEFIEQLDLDDE----AEK 322
 Rodaballo KGKLDLNLFLSLGGMGGLSTYAFDFYQDEPWVEFIEFIELDIADSGEKED 329
 S. japonés KGKLAELTSLGDPD----LRELYGDPWVEFIEELMEEF----NDR 314
 S. plateado KGKLAELTSLGGIPD----LRELYSDPWVEFIEELMEEF----NDR 313

BOX 2

Humano T E S D T D R L L S S D H ----- E K S H S N L G V K D G D S G R T S C E P D L L E T D 380
 Dorada N Q G S D T Q R L L D P P Q P V S H M N I G C A N A V S F P - D D D S G R A S C Y D P D L L H D Q D 377
 Pez rojo N E S S D T Q H L L G L S R ----- S G S S H V L N F K S D D D S G R A S C Y D P E L L P N P E 355
 Carpa N S G S D T Q H L L G L S H ----- S D S S R V L N F K S D D D S G R A S C Y D P E T F D P E 365
 Rodaballo N Q G S D T Q R L L L A L S Q P V S H M N I G C S N A I S F P - D D D S G R A S C Y D P D L L D Q E 378
 S. japonés L T E L D T Q C L M D R S P ----- S S D C P P T I G F G D D D S G R A S C D P D L P E P E 358
 S.plateado L T V L D T Q C L M D H C A ----- S S D C P P T I G I F R D D D S G R A S C D P D L H P E 357



Humano F N -- A N D I H E G T S E V A P P Q R L K G E A D L L C L D Q K N Q N N S P Y H D A C P A T Q O P 428
 Dorada T L M L M A T L L P Q P E D G E ----- D S F 397
 Pez rojo D --- L A T L L P G H S G R G D ----- N H P 372
 Carpa D --- L A S L L P G H S G R G E ----- Q H P 382
 Rodaballo T L M L M A T L L P Q P E G G E ----- A S L 398
 S. japonés A F - P F H P L L S N T S P S L E ----- P S G 377
 S.plateado A -- P F H S L L P N T S H A L E ----- P S C 375

Humano S V I Q A E K N K P Q L P T E G A E S T H Q A A H I Q L S N F S S L S N I D F Y A Q V S D I T P A 478
 Dorada D V V E R A P V I ----- E R S E R P L V Q T Q T G G E Q T W I N T D F Y A Q V S N V M P S 439
 Pez rojo L V S R S S S I P D L G V Q Q T S E V K E T P I Q K O P A V P - S W V N M D F Y A Q V S D F T P A 421
 Carpa L V S R S S S I P D L G V Q Q T S E V V E T P I Q T O P A V P - S W V N M D F Y A Q V S D F T P A 431
 Rodaballo D V E E G A S A S ----- E R S K R A L I Q T O T A G P Q T W V N T D F Y A Q V S N V M P S 440
 S. japonés - A S T E A S S P ----- V Q T P T T G M I L W A V P --- G R E D L Y T Q V S E V R P S 414
 S.plateado L A S T K A S S P ----- V Q T P T T E D S P W A A P --- G R E D L Y T Q V N E V G P T 413



Humano G S V V L S P G Q K N K A G M S Q C D M H P ----- E M V S L C Q E N F L M D 513
 Dorada G G V V L S P G Q L R F Q E S T S A A E D E A Q K K G K G S E D - S E K T Q K E L Q F O L L V V 488
 Pez rojo G G V V L S P G Q ----- L N S S L E K K K E ----- E N E K K - I Q F Q L V S D 454
 Carpa G G V V L S P G Q ----- L N N S P E K K K E ----- E N E K K K I Q L Q L L S D 465
 Rodaballo G V V L S P G Q O L R I Q E S T S A T E E E K K N I K E S E D R G E D E K K Q K E L Q F O L L V 490
 S. japonés G E V L L M P E E Q S -- K V E K D A E E K A K E G ----- K E K E K P R K E F O L L V V 453
 S.plateado G E V L L I N E E Q R -- N V E E N S E K D E K E ----- N E K E K K K E F O L L V V 451

Humano N --- A M F C E A D A K K C I P V A P H I K V E S H I Q P S L N Q E D I Y I T T E S ----- L 554
 Dorada P P E G S G Y T T E S N A R Q I S T - P P S T P M P G S G Y Q T I H P Q P V E T K P A A ----- T 532
 Pez rojo G --- A Y T S E N T A R Q L S A N V P S S P G P E Q G Y Q T F P T Q A V E G T S E R G V P G C P 500
 Carpa G --- A Y T S E N M A R Q L S S D V P P S P S P E Q G Y Q S L P T Q A V E G N L W N G E Y L V S 511
 Rodaballo P P E G S G Y A T E S H A R Q I G T - P P S S P M P G E G Y Q T I L P R -- O R R E N P ----- Q 532
 S. japonés N A D G G Y T T E L D A G K M S A K L P T G R S S - Q P A P T E D S R L V Q G Q E F R - E Y Q S L 501
 S.plateado N A D V G G Y T S E L D A G K M S A R L P T G R A S - Q P A P T E D S S L V Q G Q E F G - E Y Q S L 499



Humano T T A A G R P G T G E H V P G S E -- M P V P D Y T S I H I V Q S P Q C L I L N A T A L P L P D K E 602
 Dorada A E N N Q S P Y I L P D S P Q S O F F A P V A D Y T V V Q E V D S Q H S L L L N P P P R Q - S P P P 581
 Pez rojo P S D S O M P Y L L P E A P P S P I L P P V S D Y T V V Q E V D A Q H S L L L N P P S S Q P A I C P 550
 Carpa A S D S Q T P Y L L P E A P P V E I L P P V S D Y T V V Q E V D A Q H S L L L N P P S S Q P T V C S 561
 Rodaballo W I D N Q S P Y I A P D S P Q F S A P V S D Y T V V Q E V D T E H S L L L N P P P H Q - S T P P 581
 S. japonés Y F E A E M P P I P P A S P V S P - L L P L S V Y T M V E G V D R O N S L L L K P S P P P - A P Q P 549
 S.plateado Y F E A E M P P I P P A S P V S P - L P P V S A Y T M V E G V G R O N S L L L K P G P T P - A P Q P 547



Humano F L S S ----- C G Y V S T D Q L N K L M P 620
 Dorada C L P H H E T K A L A A M P V G Y V T P D L L G N L S P 609
 Pez rojo H S P N K H L P A M P T M P M G Y L T P D L L G N L T P 578
 Carpa H S P N K H L P A L P T M P M G Y L T P D L L G N L T P 589
 Rodaballo C L P Q H P F K A L P A M P V G Y L T P D L L G H L S P 609
 S. japonés V L T K L P L F T G -- T P E G Y L T P D L L G N I T P 575
 S.plateado V L T K L P L E T P -- T P E G Y L T P D L L G N I T P 573



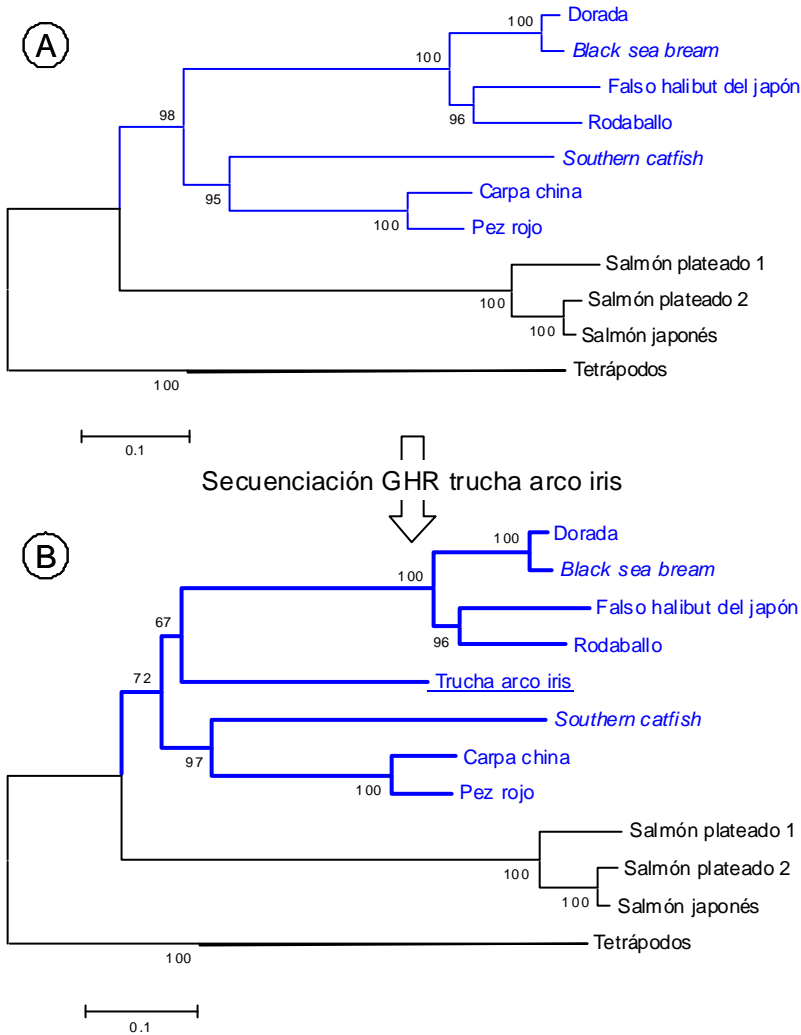


Figura 2.19. Análisis filogenético de los GHR de vertebrados, se aprecia que dentro del grupo de los peces aparecen dos subgrupos claramente diferenciados, los peces no salmónidos (azul) y los peces salmónidos (A). Árbol filogenético de los GHR de vertebrados incluyendo la secuencia de trucha arco iris (B). Árboles construidos siguiendo el método de reconstrucción de Neighbor-Joining con el modelo de corrección de Poisson (nº de sitios: 721 y 723, respectivamente). El soporte de los nodos se ha calculado mediante Bootstrap (1000 réplicas). La rama de tetrápodos engloba las secuencias que aparecen en la lista de nº de acceso a Genbank.

3. Objetivos y plan de trabajo

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los **objetivos de la presente Tesis Doctoral** son:

1. Abordar la caracterización molecular y organización genómica de los receptores de la hormona del crecimiento en peces teleósteos.
2. Analizar la divergencia evolutiva de los receptores de la hormona del crecimiento en los peces teleósteos.
3. Analizar en dorada el patrón de regulación transcripcional de los receptores de la hormona del crecimiento.
4. Definir en dorada el uso de los receptores de la hormona del crecimiento como biomarcadores de crecimiento y estrés por confinamiento y exposición a patógeno.

En base a estos objetivos se desarrolló el siguiente **plan de trabajo**:

1. Secuenciación del GHR-II en especies representativas de perciformes (dorada y lubina), salmoniformes (trucha) y pleuronectiformes (rodaballo) lo que incluye:
 - a. Diseño de cebadores degenerados y amplificación por PCR de fragmentos de GHR-II en trucha, dorada, lubina y rodaballo
 - b. Completar la secuencia parcial del GHR-II de dorada mediante 5' y 3'RACE
2. Determinación de la organización genómica del GHR-I y II de dorada y análisis de su región 5' flanquante a través de:
 - a. Determinación del sitio de inicio de la transcripción
 - b. Amplificación por PCR de ADN genómico

- c. Generación de librerías genómicas (GenomeWalker)
3. Análisis de la expresión génica del GHR-I y II de dorada mediante PCR en tiempo real en diferentes modelos experimentales:
 - a. Ayuno
 - b. Estación
 - c. Edad
 - d. Exposición al parásito intestinal *Enteromyxum leei*
 - e. Estrés por confinamiento

La investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral está enmarcada dentro del Proyecto Europeo Aquafirst del VI Programa Marco (*Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance markers assisted selection in fish and shellfish*, contrato nº SSP98-CT-2004-513692) y en el Proyecto Aquagenomics (*Improvement of Aquaculture Production by the use of biotechnological tools*) de la convocatoria Ingenio – 2010.

El estudio de la regulación de los GHR de dorada en respuesta a la exposición al parásito E. leei se desarrolló en colaboración con el grupo de investigación de Patología de Peces, Departamento de Biología, Cultivo y Patología de Especies Marinas del IATS.

Los resultados obtenidos a la largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral han dado lugar a 4 publicaciones SCI (ver anexo) y 2 publicaciones no SCI en la serie Avances en Endocrinología Comparada:

- **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA y Pérez-Sánchez J (2005). Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). General and Comparative Endocrinology 142, 193-203.
- **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA y Pérez-Sánchez J (2007). Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region. Journal of Endocrinology 194, 361-372.
- Calduch-Giner JA, **Saera-Vila A** y Pérez-Sánchez J (2007). Genomic duplication and evolutive divergence of fish growth hormone receptors. Physiological implications for growth hormone and somatolactin mediated effects. Avancos em Endocrinologia Comparativa III, 39 – 46.
- Sitjà-Bobadilla A, Calduch-Giner JA, **Saera-Vila A**, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P y Pérez-Sánchez J (2008). Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. Fish & Shellfish Immunology 24, 610-619.
- **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA y Pérez-Sánchez J (2008). Stress-mediated effects on the liver GH/IGF axis of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Functional partitioning of GH receptors. Avances en Endocrinología Comparada IV, 59 – 62.

- **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA, Prunet P y Pérez-Sánchez J (2009). Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement. Differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology* 154A, 197-203.

Durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, el doctorando también ha participado en 10 publicaciones SCI relacionadas directa o indirectamente con la misma:

- Pérez-Sánchez J, Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P, **Saera-Vila A**, Astola A y Valdivia MM (2002). Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of fish growth hormone receptors. *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 243-258. Publicado en 2004.
- **Saera-Vila, A**, Calduch-Giner, J.A, Gómez-Requeni, P, Médale, F, Kaushik, S y Pérez-Sánchez, J (2005). Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142B, 224-232.
- **Saera-Vila, A**, Calduch-Giner, J.A, Navarro, I y Pérez-Sánchez, J (2007). Tumour necrosis factor (TNF) α as a regulator of fat tissue mass in the Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 146B, 338-345.
- Benedito-Palos L, **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA, Kaushik S y Pérez-Sánchez J (2007). Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267, 199 – 212.

- Bermejo-Nogales A, **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA, Navarro JC, Sitjà-Bobadilla A y Pérez-Sánchez J (2007). Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in relation to redox homeostasis. *Aquaculture* 267, 213 – 224.
- Albalat A, **Saera-Vila A**, Capilla E, Gutiérrez J, Pérez-Sánchez J y Navarro I (2007). Insulin regulation of lipoprotein lipase (LPL) activity and expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 148B, 151-159.
- Bermejo-Nogales A, Benedito-Palos L, **Saera-Vila A**, Calduch-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A y Pérez-Sánchez J (2008). Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/mortalin/mtHsp70/PBP74/HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 149B, 428 – 438.
- Benedito-Palos L, Navarro JC, Bermejo-Nogales A, **Saera-Vila A**, Kaushik S y Pérez-Sánchez J (2009). The time course of fish oil wash-out follows a simple dilution model in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of vegetable oils. *Aquaculture* 288, 98-105.
- Cruz-García L, **Saera-Vila A**, Navarro, I, Calduch-Giner JA y Pérez-Sánchez J (2009). Targets for TNF α -induced lipolysis in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) adipocytes isolated from lean and fat juvenile fish. *Journal of Experimental Biology* 212, 2254 – 2260.
- **Saera-Vila A**, Benedito-Palos L, Sitjà-Bobadilla A, Nácher-Mestre J, Serrano S, Kaushik S y Pérez-Sánchez J (2009). Assessment of the health and antioxidant trade-off in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed alternative diets with low levels of contaminants. *Aquaculture* 296, 87 – 95.

4. Material y Métodos

4.1. Extracción de ARN.....	53
4.2. Retrotranscripción.....	56
4.3. Secuenciación del ADNc del GHR-II.....	56
4.3.1. Diseño de cebadores	56
4.3.2. Amplificación y secuenciación.....	57
4.3.3. Amplificación de los extremos 5' y 3'	59
4.4. Inicio de la transcripción.....	61
4.5. Organización genómica.....	62
4.5.1. Extracción de ADN genómico.....	62
4.5.2. Amplificación por PCR	63
4.5.3. Librerías genómicas.....	64
4.6. Análisis bioinformáticos.....	65
4.7. Análisis de la expresión génica.....	65
4.8. Ensayos bioquímicos.....	72
4.8.1. GH e IGF-I	72
4.8.1.1. Radioyodación	74
4.8.1.2. Radioinmunoensayos de GH e IGF-I	75
4.8.3. Cortisol	78
4.8.4. Glucosa	79
4.9. Animales en experimentación.....	80
4.9.1. Condiciones de cultivo	80
4.9.2. Muestreos	81
4.9.2.1. Biomasa	81
4.9.2.2. Sangre y tejidos	82
4.10. Modelos experimentales.....	82
4.10.1. Ayuno	82
4.10.2. Estación	82
4.10.3. Edad.....	83
4.10.4. Reto frente a patógeno.....	84
4.10.4.1. Diseño experimental	84
4.10.4.2. Detección del parásito	86
4.10.5. Estrés por confinamiento	87
4.11. Análisis estadísticos.....	89

4.1. Extracción de ARN

El ARN total fue extraído de manera rutinaria por el método del fenol-cloroformo-isotiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN extraído se cuantificó mediante lecturas de absorbancia a 260 nm y su pureza se comprobó mediante el cociente de absorbancias a 260 y 280 nm dando valores de 1,9 – 2,1. La integridad fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído en condiciones desnaturalizantes. Una vez cuantificadas, las muestras se guardaron a – 80° C.

Para las extracciones masivas de ARN total se utilizó el equipo ABI PRISM[®] 6100 Nucleic Acid Prepstation (Applied biosystems) ya que, al ser semiautomático, agiliza y estandariza el procesamiento de un número elevado de muestras. La extracción se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante con mínimas modificaciones para optimizar la extracción. En resumen, el tejido se homogenizó usando un tampón de extracción (25 mg/ml) que contiene detergente y guanidinio. La mezcla resultante se incubó *overnight* a – 20° C. Tras la incubación, se aplicó un tratamiento con proteinasa K (2 horas a 25° C). En este paso las muestras están listas para introducirse en las placas de extracción, que contienen una membrana especialmente diseñada para esta aplicación. Tras varios lavados con dos soluciones diferentes suministradas por el fabricante, las muestras se recogieron en tampón de elución. En el protocolo se incluyeron lavados con un tampón que contiene DNasa para eliminar las posibles trazas de ADN. El proceso se resume en la **figura 4.1**. Se analizó la cantidad y calidad del ARN extraído y las muestras se almacenaron a – 80° C.



Figura 4.1. Esquema de los principales pasos de la extracción de ARN mediante el equipo ABI PRISM[®] 6100.

El ARN poliadenilado fue purificado mediante el kit PolyATracts (Promega, Madison, WI). Esta técnica se basa en el uso de oligo (dT) biotinilados que hibridan con la región poli (A) del extremo 3' de los ARNm. Estos híbridos se capturan mediante estreptavidina conjugada a partículas paramagnéticas (figura 4.2).

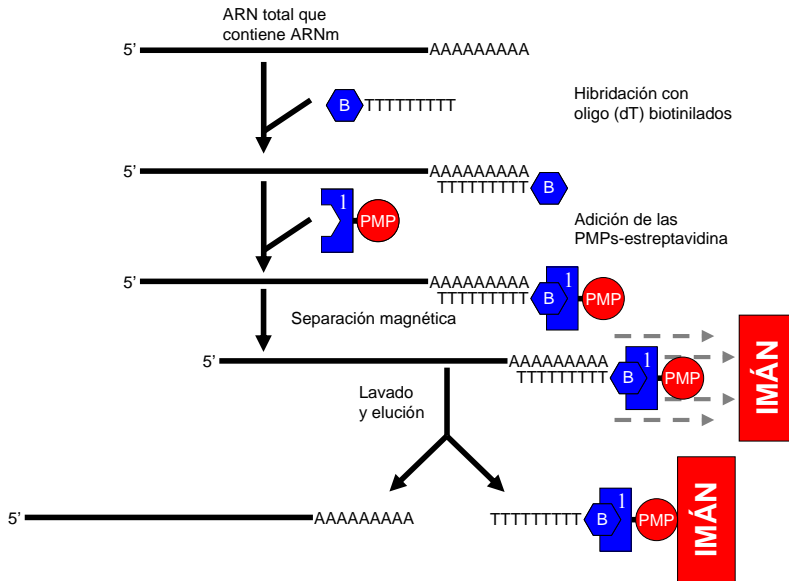


Figura 4.2. Diagrama esquemático del procedimiento de aislamiento de ARNm empleado con el kit PolyATracts. B, biotina; PMP, partículas paramagnéticas; I, estreptavidina.

4.2. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción (RT) de las extracciones rutinarias de ARN, el ARN total se trató con DNasa I. Posteriormente, 2 µg de ARN se desnaturalizaron a 65° C durante 5 minutos y se pusieron inmediatamente en hielo. La RT se realizó con 200 unidades de SuperScript II (Life Technologies, Gaithersburg, MD), utilizando un oligo (dT)₁₇ como cebador de anclaje. Los controles negativos fueron reacciones sin transcriptasa reversa. El ADN codificante (ADNc) se trató con RNasa H (2 unidades) y se guardó a – 20° C hasta su amplificación por PCR.

En las extracciones de ARN masivas, las RT se hicieron usando el kit comercial High-Capacity Archive de Applied biosystems siguiendo las recomendaciones del fabricante. En resumen, 500 ng de ARN total, 250 unidades de MultiScribe™ Reverse transcriptase y cebadores universales se incubaron a 25° C durante 10 minutos, 2 horas a 37° C y 5 segundos a 85° C para inactivar el enzima. Los controles negativos fueron reacciones sin transcriptasa reversa. El ADNc se guardó a – 20° C hasta su amplificación por PCR.

4.3. Secuenciación del ADNc del GHR-II

4.3.1. Diseño de cebadores

Para secuenciar el ADNc del GHR-II de dorada, trucha, lubina y rodaballo, se diseñaron cebadores degenerados en zonas conservadas según los alineamientos de las secuencias de GHR de salmónidos disponibles en Genbank (Salmón japonés y salmón plateado 1 y 2). En concreto, se diseñaron 2 cebadores directos (GHR-1 y GHR-2) y dos reversos (GHR-3 y GHR-4) según se muestra en la **figura 4.3**. El cebador GHR-1 se encuentra situado unos pocos nucleótidos en dirección 5' del codón que codifica para la metionina inicial; el GHR-2 se encuentra en el dominio citoplasmático *Box 2*; el GHR-3 se encuentra 360 nucleótidos en dirección 5' del codón de parada y el GHR-4 unos pocos nucleótidos en dirección 3' del codón de parada.

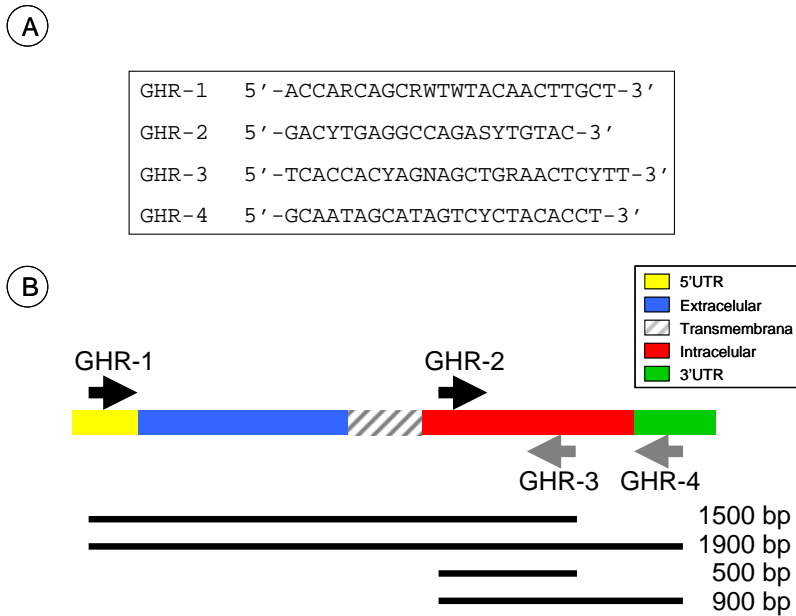


Figura 4.3. Cebadores degenerados diseñados para la secuenciación del GHR-II de trucha, dorada, lubina y rodaballo (A). Localización de los cebadores y tamaño esperado de los fragmentos de PCR (B). Los cebadores directos se muestran con flechas negras y los reversos con flechas grises.

4.3.2. Amplificación y secuenciación

La amplificación del GHR-II se llevó a cabo mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la PCR, se usaron como molde 2 μ l de las reacciones de RT en un volumen total de 50 μ l. La mezcla de reacción incluyó 1,5 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 5 μ l de tampón de PCR 10X, 1 μ l de dNTPs (cada uno de ellos a una concentración 10 mM), 5 μ l de cada cebador (10 μ M) y 2 unidades de ADN Taq Platinum Polimerasa (Life Technologies). Las combinaciones de cebadores usadas fueron GHR-1/GHR-3, GHR-1/GHR-4, GHR-2/GHR-3 y GHR-2/GHR-4. Como molde se usaron reacciones de RT provenientes de hígado de dorada, lubina, trucha arco iris y rodaballo. Las condiciones de la PCR (**figura 4.4**) se detallan a continuación.

- 35 ciclos de:
 1. Desnaturalización: 45 segundos a 94° C.
 2. Hibridación: 60 segundos a 55° C.
 3. Extensión: 90 segundos a 72° C.

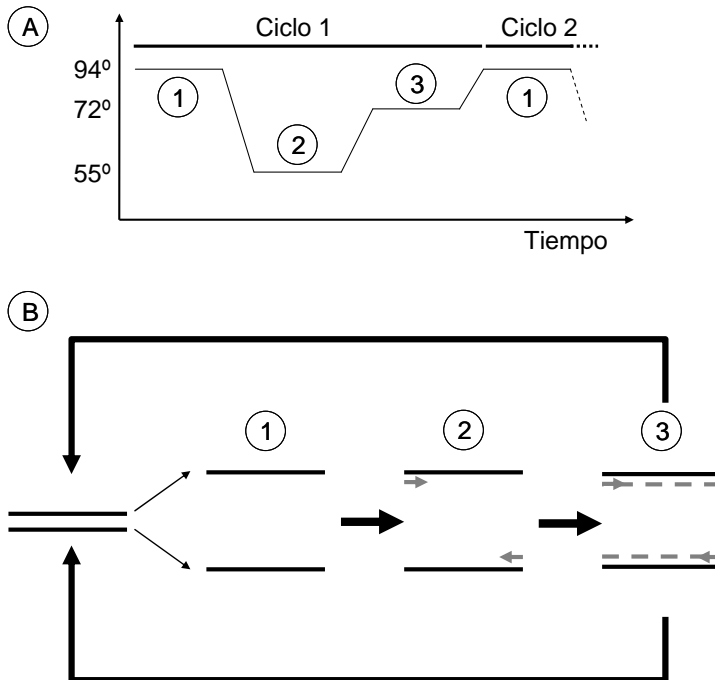


Figura 4.4. Variación de la temperatura en los ciclos de una PCR (A). Ejemplo de amplificación de una cadena molde a lo largo de las fases de un ciclo de PCR (B). Las fases de desnaturalización (1), hibridación (2) y extensión (3) están indicadas. Las flechas grises representan los cebadores y la línea gris discontinua la cadena recién sintetizada.

Los productos amplificados fueron purificados a partir de gel de agarosa de bajo punto de fusión usando el kit comercial QIAquick Gel Extraction de QIAGEN. Una vez purificados, los productos de PCR (30 – 50 ng/ μ l) fueron secuenciados en el Servicio de secuenciación de ADN del IBMCP, por el método de los didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos (ABI PRISM dRhodamine terminator cyler sequencing kit, PerkinElmer).

4.3.3. Amplificación de los extremos 5' y 3'

El extremo 5' del GHR-II de dorada se amplificó mediante 5'RACE usando un kit comercial (Life Technologies). El fundamento de esta técnica está esquematizado en la **figura 4.5**. De acuerdo con ello, 200 ng de ARNm hepático fueron retrotranscritos con un cebador específico (5'-GAACTCCTTCTTTGCTTTC-3'), localizado en la región intracelular a 336 nucleótidos en dirección 5' del codón de parada de la traducción. Después del tratamiento con RNasa H, el ADNc fue purificado (columna de filtración GlassMAX Spin Cartridge). El producto resultante se trató con deoxinucleotidil transferasa terminal y dCTP (60 minutos a 4°C) para añadirle una cola de oligo (dC) en el extremo 5'. La PCR (35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 54° C y 3 minutos a 72° C) se llevó a cabo con un cebador universal que contiene una secuencia de poli-dG y un oligonucleótido específico como cebador reverso (5'-GCTTGGCTCGCTGGCGGTCTGGCAC-3').

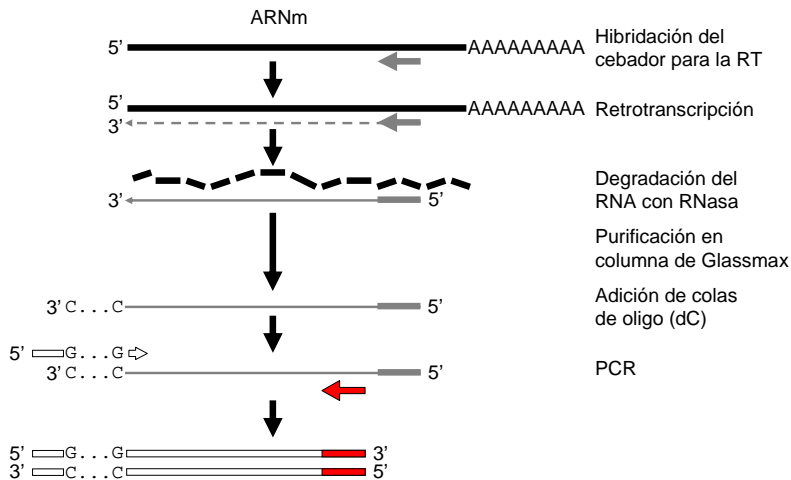


Figura 4.5. Esquema de la 5'RACE. Los cebadores específicos se indican con flechas grises (RT) o rojas (PCR). El cebador universal del kit se indica en blanco.

La **figura 4.6** muestra el procedimiento para amplificar el extremo 3' del GHR-II de dorada mediante 3'RACE. Dos μg de ARN total hepático se trataron con DNasa y se retrotranscribieron con un oligo (dT)₃₀ unido a una secuencia de anclaje (Clontech, Palo Alto, CA). La amplificación se realizó

con un cebador específico, localizado en la región intracelular a 583 nucleótidos en dirección 5' del codón de parada de la traducción (5'-CGACCCTGAAGCATCGCCTTTCCATCC-3'). El cebador reverse es complementario la secuencia de anclaje. Como se aprecia en la **figura 4.6**, en la 1ª PCR se usa realmente una mezcla de dos cebadores reversos (uno azul-blanco y el otro sólo azul). La PCR consistió en 30 ciclos de 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 62° C y 3 minutos a 72° C; con una fase final de extensión de 15 minutos a 72° C. A continuación, se llevó a cabo una PCR anidada (35 ciclos de 45 segundos a 94° C, 60 segundos a 60° C y 90 segundos a 72° C, con una extensión final de 15 minutos a 72° C) con 1 µl de la primera reacción y un cebador directo (5'-GAAGTGTCGTGCCAGACCGCCAGCGAG-3') situado en la región intracelular a 543 nucleótidos en dirección 5' del codón de parada de la traducción. Los productos amplificados en la 5'RACE y en la 3'RACE se purificaron y secuenciaron.

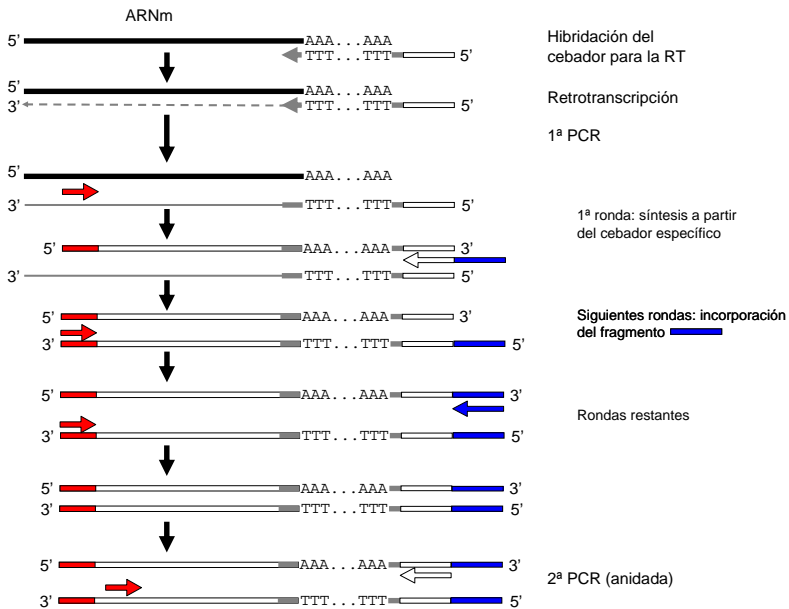


Figura 4.6. Esquema de la 3'RACE. Los cebadores específicos se indican con flechas rojas. Los cebadores universales del kit se indican en gris (RT), blanco-azul (1ª PCR), azul (1ª PCR) y blanco (2ª PCR).

4.4. Inicio de la transcripción

Para localizar el inicio de transcripción del GHR-I y II de dorada, se usó la técnica del RACE mediada por RNA ligasa (RLM-RACE) (figura 4.7). A diferencia del RACE convencional, esta técnica amplifica únicamente los extremos 5' de los ARNm completos, es decir, aquellos que conservan la caperuza (7^mG-P-P-P) en su extremo 5'. Para ello, se usó el kit comercial First Choice® RLM-RACE de Ambion siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un μg de ARN total se defosforiló con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) para eliminar los extremos $5'\text{PO}_4$ de los ARN parcialmente degradados. Luego se realizó una extracción con

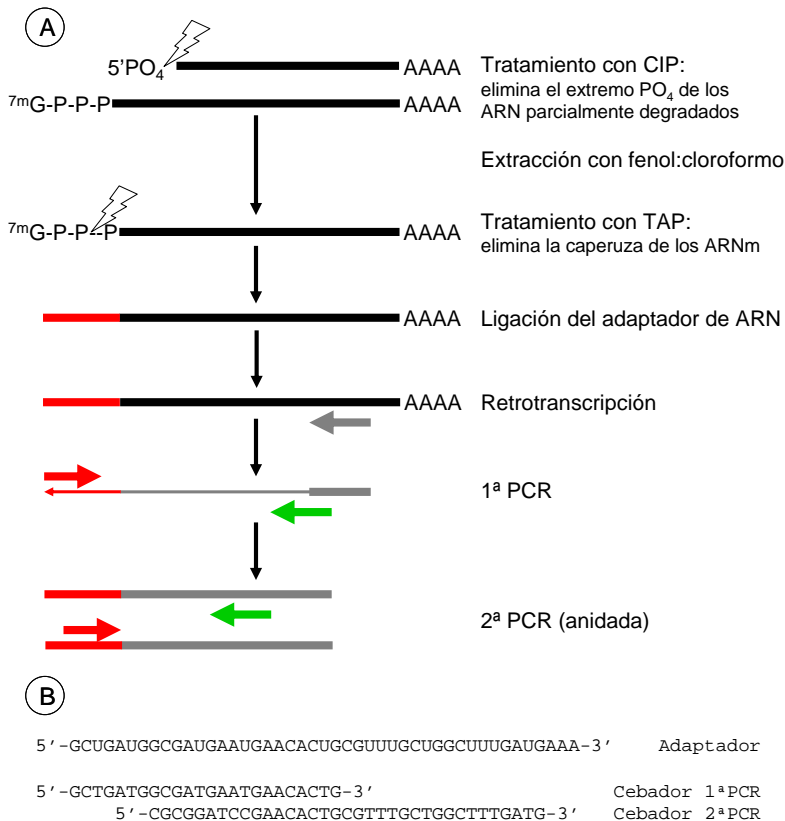


Figura 4.7. Esquema general del RLM-RACE (A) y secuencia nucleotídica del adaptador y los cebadores suministrados en el kit (B). Cebadores específicos, flechas grises (RT) o verdes (PCR). Cebadores del kit, flechas rojas.

fenol:cloroformo y el producto extraído se trató con la pirofosfatasa ácida del tabaco (TAP) para eliminar la caperuza de los ARNm. A estos ARNm se les ligó un adaptador de ARN mediante tratamiento con el enzima T4 RNA ligasa y se procedió a hacer una RT usando un cebador específico para cada gen de interés. Estas RT se usaron como molde en una estrategia de PCR anidada usando los cebadores suministrados con el kit, complementarios a la secuencia del adaptador, y dos cebadores específicos del gen deseado. Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados siguiendo el procedimiento habitual.

4.5. Organización genómica

La organización genómica del GHR-II se determinó mediante dos técnicas diferentes: amplificación por PCR y construcción de librerías genómicas. Mediante PCR se determinó la posición de los exones 6, 7, 8, 9 y 10. Las librerías genómicas se utilizaron para obtener la posición de los exones 1, 2, 4 y 5.

La organización del GHR-I, parcialmente descrita (exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 10A) en Pérez-Sánchez y cols. (2002), se completó con la posición de los exones 1, 2 y 4 mediante el análisis de las librerías genómicas.

4.5.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico (ADNg) se extrajo con el kit High Pure PCR Template Preparation de Roche. 25 μ l de sangre fueron tratados con proteínasa K (10 minutos a 70° C), RNasa A (30 minutos a 37° C) y el producto obtenido se transfirió a una columna de purificación. Esta columna fue eluida con tampón Tris-HCl (10 mM, PH=7,2) para obtener el ADNg. La concentración del ADNg extraído se determinó mediante lecturas de absorbancia a 260 nm y su pureza fue comprobada con el cociente de absorbancias a 260 y 280 nm. La integridad del ADNg fue testada mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.5.2. Amplificación por PCR

Para determinar la organización genómica del GHR-II, se diseñaron cebadores directos y reversos (**tabla 4.1**) en base a las uniones exón-intrón descritas para el GHR-I de rodaballo y dorada (ver **figura 2.15**). Estos cebadores fueron usados en una reacción de PCR (35 ciclos, 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 55 – 57° C y 3 minutos a 72° C) con 100 ng de ADNg como molde. Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados según el procedimiento habitual.

Tabla 4. 1. Cebadores usados para la determinación por PCR de la organización genómica del GHR-II de dorada. D, cebador directo; r, cebador reverso.

Cebador		Posición en el ADNc
gGHR-1d	GACCGAGTGTCTCCTCACTACAGCATC	240-264
gGHR-2r	TGGACCTCATACTGTAGCGTCATCC	536-512
gGHR-3d	GACCTGACCTGGACAACACTGAATG	412-436
gGHR-4r	GGGATGTGGACGAATATGGAGTCG	707-684
gGHR-5d	TTTGGA CTTAAACACAACGTCAATCACG	604-631
gGHR-6r	AACATCAGGATGGCCACTAAACACAAG	782-756
gGHR-7d	CGAGTTTCCCGGTGGTGGCTC	719-739
gGHR-8r	TGGGTCCCGGAACAGGAGG	844-826
gGHR-9d	CTTTTGCCTCCTGTTCCGGG	820-839
gGHR-10r	GAGTGCAGTTGGAGGACAGGGA	1057-1036
gGHR-11d	AAGCTGAGAGAGTTGACATCCATCTTGG	883-910
gGHR-12r	GGTCTGGCACGACACTTCCTTG	1197-1176
gGHR-13d	CGACCCTGAAGCATCGCCTTTC	1125-1146
gGHR-14r	CTGACATTTCGACGCTCAACAGG	1860-1839

4.5.3. Librerías genómicas

Las librerías genómicas fueron generadas usando el kit GenomeWalker (BD Biosciences), siguiendo las recomendaciones del manual de usuario (figura 4.8). En concreto, se generaron 4 librerías a partir de 2,5 µg de ADNg digerido con *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* o *StuI*. Al ADNg fragmentado y purificado se ligaron unos adaptadores sintéticos con la enzima T4 DNA ligasa. Para las amplificaciones por PCR (35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 57° C y 5 minutos a 72° C) se diseñaron dos cebadores específicos para el extremo de la secuencia conocida. Estos cebadores fueron usados, junto con otros dos cebadores contra la secuencia del adaptador, en una estrategia de PCR anidada. Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados por el método habitual.

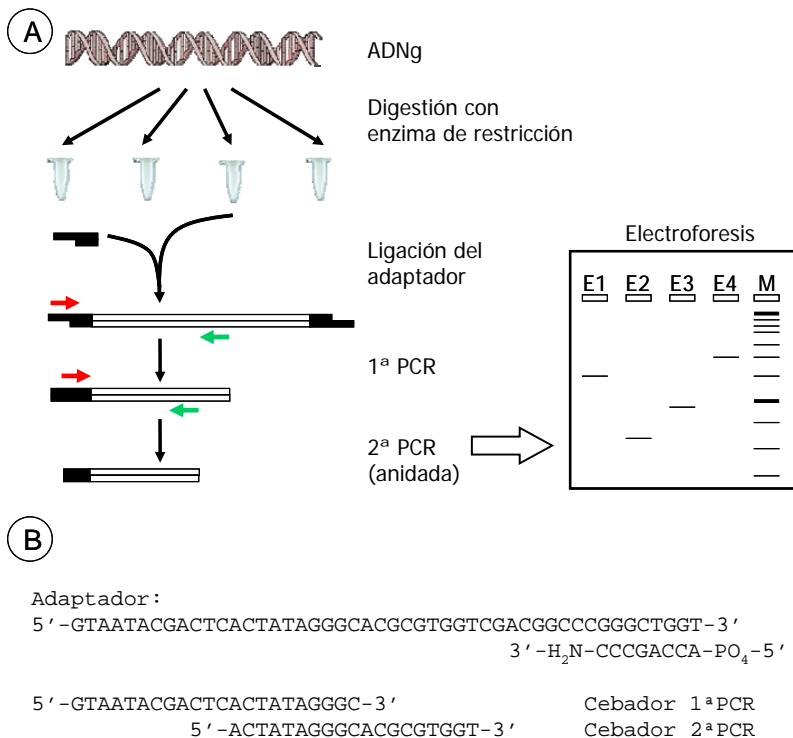


Figura 4.8. Esquema general del kit GenomeWalker (A). Cebadores específicos, flechas verdes. Cebadores del kit, flechas rojas. Secuencia nucleotídica del adaptador y cebadores suministrados en el kit (B).

4.6. Análisis bioinformáticos

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se alinearon con el ClustalX (Thompson y cols., 1997) y la edición de los alineamientos se hizo con el programa informático GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>). Los cebadores se diseñaron mediante el Gene Runner (Hastings Software). Los cromatogramas de secuenciación se analizaron con el Chromas (<http://www.techneysisium.com.au>). Se usó el paquete Staden (<http://www.sanger.ac.uk/Software/production/staden>) para ensamblar los contigs. Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 4.0 (Tamura y cols., 2007).

La posición del péptido señal de las secuencias se identificó mediante la aplicación web PSORT Prediction Server (<http://psort.nibb.ac.jp>). La región transmembrana se identificó por medio de la aplicación HMM-TOP, disponible vía web (<http://www.enzim.hu/hmmtop>). Los sitios de N-glicosilación se identificaron con la aplicación que dispone el Gene Runner a tal efecto. Las bases genómicas consultadas fueron las del proyecto ensembl (<http://www.ensembl.org>). El análisis de los sitios potenciales de unión de factores de transcripción se llevó a cabo con el MatInspector (<http://www.genomatix.de>).

4.7. Análisis de la expresión génica

La cuantificación de la expresión génica se hizo mediante PCR en tiempo real usando SYBR Green I como fluoróforo. El SYBR Green I se une al ADN de doble cadena permitiendo valorar en cada ciclo la cantidad de ADN amplificado. El fundamento de esta técnica se muestra en la **figura 4.9**. El SYBR Green I libre muestra poca fluorescencia, por lo tanto durante la fase de desnaturalización la fluorescencia es mínima. Durante la fase de hibridación, unas pocas moléculas de SYBR Green I se unen a la doble cadena de ADN dando lugar a un aumento de la fluorescencia emitida. Durante la extensión, se unen cada vez más moléculas al nuevo ADN sintetizado y este incremento de la fluorescencia se puede registrar en cada ciclo. En la desnaturalización del siguiente ciclo, el SYBR Green I se libera y la fluorescencia vuelve a los niveles iniciales.

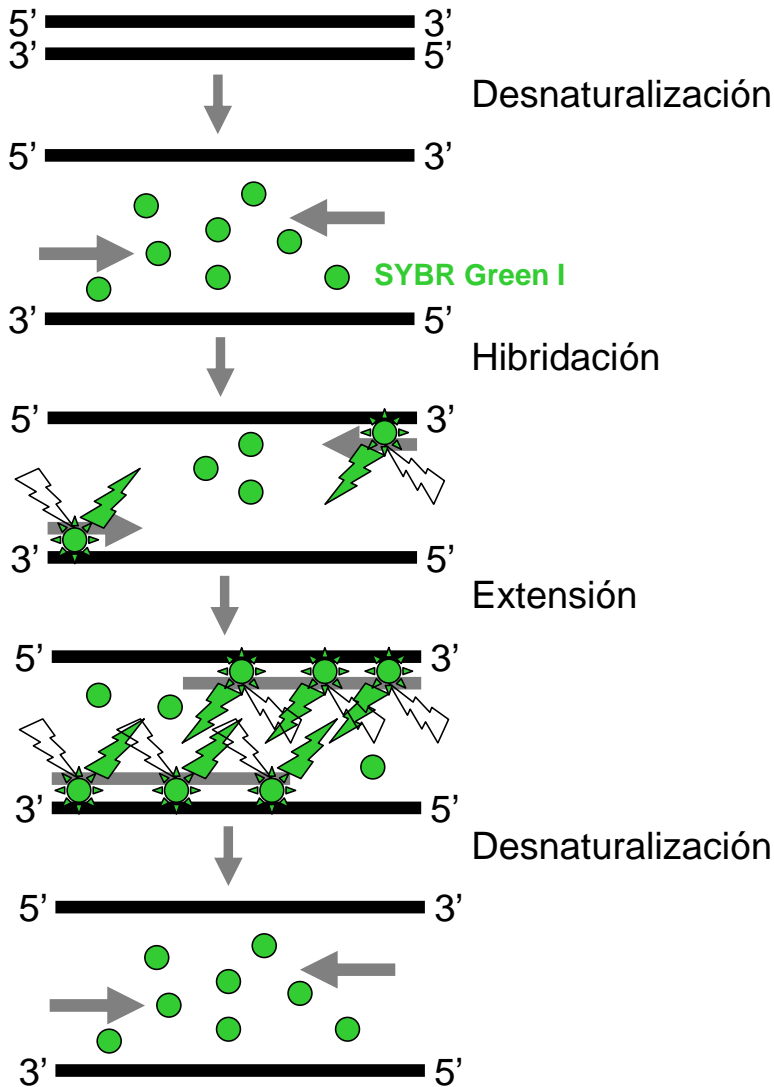


Figura 4.9. Fundamento de la técnica de PCR en tiempo real usando SYBR Green I.

La extracción de ARN y la RT se realizaron según se ha descrito en el apartado 4.1. Para llevar a cabo las reacciones de PCR se sintetizaron cebadores específicos para cada uno de los genes a medir (tabla 4.2). La amplificación y el análisis de los resultados se hicieron con el equipo iCycler IQ Real-time Detection System de Biorad. El volumen final de reacción fue de 25 μ l usando IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) y cebadores

específicos a una concentración de 0,3 – 0,9 μM . El protocolo de reacción fue:

- Desnaturalización inicial: 3 minutos a 95° C
- 40 ciclos:
 1. Desnaturalización: 15 segundos a 95° C
 2. Hibridación/Extensión: 1 minuto a 60° C

Tabla 4. 2. Cebadores utilizados en la PCR en tiempo real. D, cebador directo; r, cebador reverso

Gen	Cebador	Posición en el ADNc
GHR-I	d ACCTGTCAGCCACCACATGA	1275-1294
	r TCGTGCAGATCTGGGTCGTA	1373-1354
GHR-II	d GAGTGAACCCGGCCTGACAG	1690-1709
	r GCGGTGGTATCTGATTCATGGT	1764-1743
IGF-I	d TGTCTAGCGCTCTTTCCCTTTCA	112-133
	r AGAGGGTGTGGCTACAGGAGATAC	195-172
IGF-II	d TGGGATCGTAGAGGAGTGTGTGT	406-427
	r CTGTAGAGAGGTGGCCGACA	514-495
β -actina	d TCCTGCGGAATCCATGAGA	811-829
	r GACGTCGCACTTCATGATGCT	861-841

Para calcular la eficiencia de la reacción, se utilizaron diluciones seriadas de un producto de PCR purificado y cuantificado que contiene la región amplificada por los cebadores de tiempo real (**tabla 4.2**). El rango dinámico fue de al menos 5 órdenes de magnitud (**figura 4.10A**). La eficiencia de reacción para cada gen de interés fue la misma para diluciones seriadas de RT y del producto amplificado por PCR, oscilando siempre entre el 90 y el 100 %.

En estos ensayos, el aumento de la fluorescencia se corresponde con la cantidad de producto formado. En la **figura 4.10B** se muestra el modelo teórico de amplificación. Durante los ciclos iniciales de la PCR no se encuentran apenas

variaciones en la fluorescencia emitida, ya que la mayoría de la misma proviene del SYBR Green I libre. Este nivel de fluorescencia inicial se considera la línea de base de la amplificación. Posteriormente, se detecta un incremento en la fluorescencia por encima de la línea de base. Este incremento es debido a que, con el paso de los ciclos de la PCR, ha ido aumentando la cantidad de ADN presente y, por lo tanto, la fluorescencia debida al SYBR Green I unido (**figura 4.10C**). A este punto en concreto se le denomina ciclo umbral (Ct) y se define como el número de ciclos en que la fluorescencia supera el umbral fijado.

Finalmente, el cálculo la expresión génica relativa (ER) se hizo mediante el método delta-delta Ct (Livak y Schmittgen, 2001). Este es el método más conocido y usado para calcular la expresión génica mediante PCR en tiempo real. Consiste básicamente en restar el Ct del gen de estudio del Ct del gen control de la misma muestra, este es el primer delta. Una vez hecho esto se resta el delta de la muestra referencia (placebo, tejido normal, etc) al delta de las todas las muestras, incluida la propia referencia, dando el segundo delta. Cuando elevamos 2 al resultado del segundo delta, obtenemos la expresión relativa de las diferentes muestras.

$$ER = 2^{-[(Ct_{estudio} - Ct_{control})_{muestra} - (Ct_{estudio} - Ct_{control})_{referencia}]}$$

La elección de un buen gen control siempre es complicada ya que, incluso los genes constitutivos, pueden presentar variaciones en su expresión entre tejidos o diferentes condiciones fisiológicas. Para determinar el mejor gen control se analizó la expresión de una batería de genes candidatos (ARNr 18S, factor de elongación 1- α , α -tubulina y la β -actina) en diferentes tejidos de dorada bajo diferentes condiciones fisiológicas. La β -actina fue el gen que presentó una expresión más estable en todas las condiciones y tejidos analizados. Por lo tanto, la β -actina fue elegida como gen control en las experiencias de esta Tesis Doctoral.

La especificidad de los productos amplificados se verificó mediante secuenciación y análisis de las curvas de fusión. Este análisis fue realizado rutinariamente tras cada reacción de PCR en tiempo real.

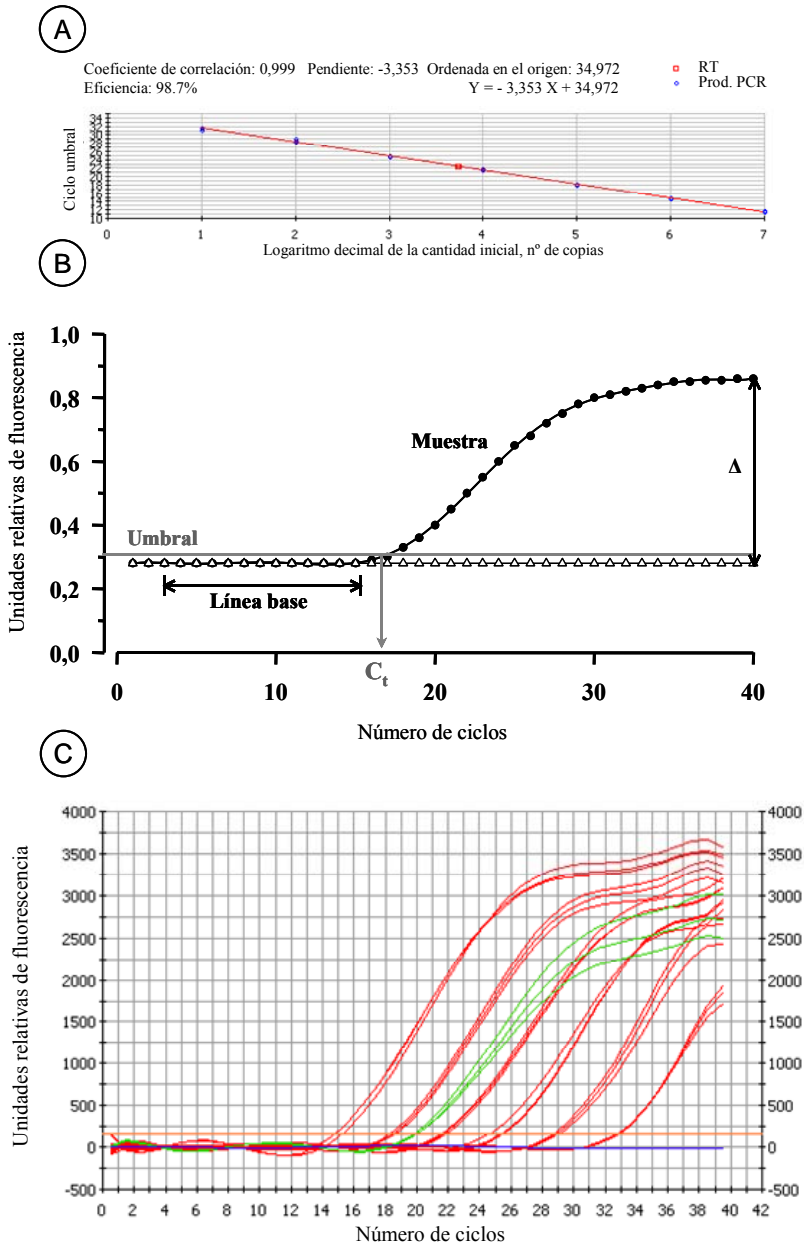


Figura 4.10. Ejemplo de unas diluciones de producto de PCR en una PCR en tiempo real (A). Se muestra el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta, la ordenada en el origen y la ecuación de la recta. La eficiencia de la reacción de PCR se calcula como $\text{Eficiencia} = ((10^{(-1/\text{pendiente})}) - 1) \times 100$. Modelo teórico de amplificación en una PCR en tiempo real (B). Ciclo umbral, C_t . Gráfico real de fluorescencia en función del número de ciclos (C). Diluciones seriadas de producto de PCR, rojo. RT ejemplo, verde. Controles negativos, azul. Umbral, naranja.

El análisis de las curvas de fusión se basa en diferenciar los diversos fragmentos amplificados en una PCR a través de su temperatura de fusión (T_m). Este análisis es posible gracias al hecho de que el SYBR Green I emite mucha más fluorescencia cuando está unido a ADN de doble cadena. Una vez finalizada la PCR en tiempo real, se aumenta progresivamente la temperatura y se monitoriza la fluorescencia emitida. Se empieza por una temperatura baja, en la cual todos los fragmentos están como ADN de doble cadena. Al alcanzar la T_m de un fragmento, se observa un descenso repentino de fluorescencia debido a que el ADN se desnaturaliza, pasa de doble cadena a cadena simple. Al representar la primera derivada (dF/dT) frente a la temperatura, cada descenso de fluorescencia se convierte en un pico (**figura 4.11**). Así, detectamos tanto picos como descensos de temperatura o, lo que es lo mismo, fragmentos de ADN (Ririe y cols., 1997).

El protocolo utilizado para obtener las curvas de fusión fue el siguiente:

- 1 ciclo de 1 minuto a 95° C.
- 1 ciclo de 1 minuto a 55° C.
- 80 ciclos de 10 segundos, aumentando la temperatura 0,5° C/ciclo.

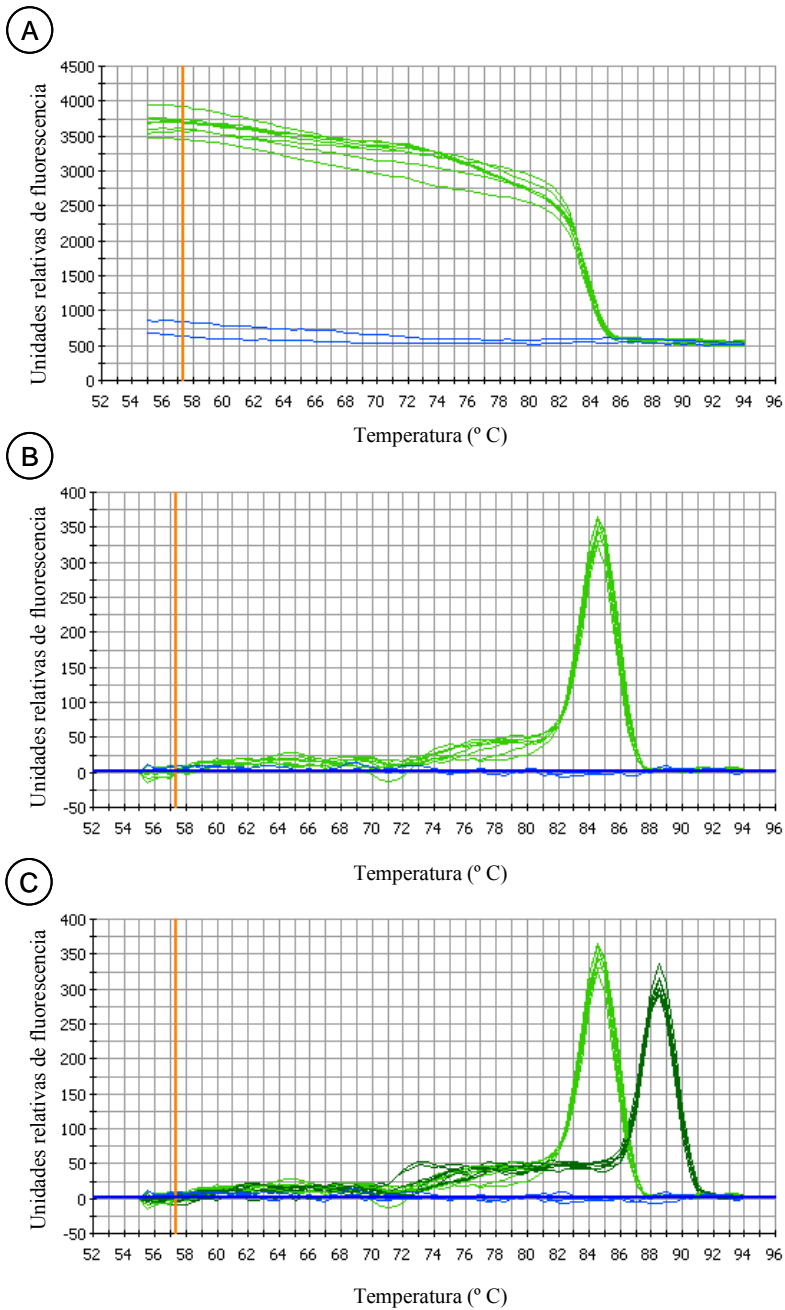


Figura 4.11. Ejemplo de representación de curvas de fusión (A). Representación de las derivadas de los datos anteriores (B) y la misma representación para dos fragmentos diferentes (C). Se puede apreciar que cada fragmento da un pico diferenciado al representar las derivadas. Muestras, verde. Controles negativos, azul.

4.8. Ensayos bioquímicos

4.8.1. GH e IGF-I

Los niveles plasmáticos de GH se analizaron mediante un radioinmunoensayo (RIA) homólogo con anticuerpos específicos contra proteínas recombinantes de GH de dorada (Le Bail y cols., 1993). La GH recombinante (Martínez-Barberá y cols., 1994) se utilizó como trazador y estándar de acuerdo con los protocolos desarrollados en nuestro laboratorio (Martínez-Barberá y cols., 1995).

La concentración de IGF-I total se determinó mediante RIA genérico de peces, previamente validado en este laboratorio (Vega-Rubín de Celis y cols., 2004), dada la elevada identidad entre las IGF de peces (94 – 100%).

El RIA es un método radioinmunométrico que se basa en la formación específica de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) usando Ag marcados radiactivamente (Ag*). Por lo tanto, a la gran especificidad de las uniones Ag-Ac se le suma la gran sensibilidad de los métodos radiactivos. En nuestro caso, el Ag (GH o IGF-I) no marcado y una cantidad conocida de Ag* compiten por los sitios de unión al Ac primario. La fracción de Ag*, que finalmente es precipitada como complejo Ag-Ac por un Ac secundario (IgG de cabra anticonejo), es inversamente proporcional a la concentración de Ag presente en la muestra original (**figura 4.12**).

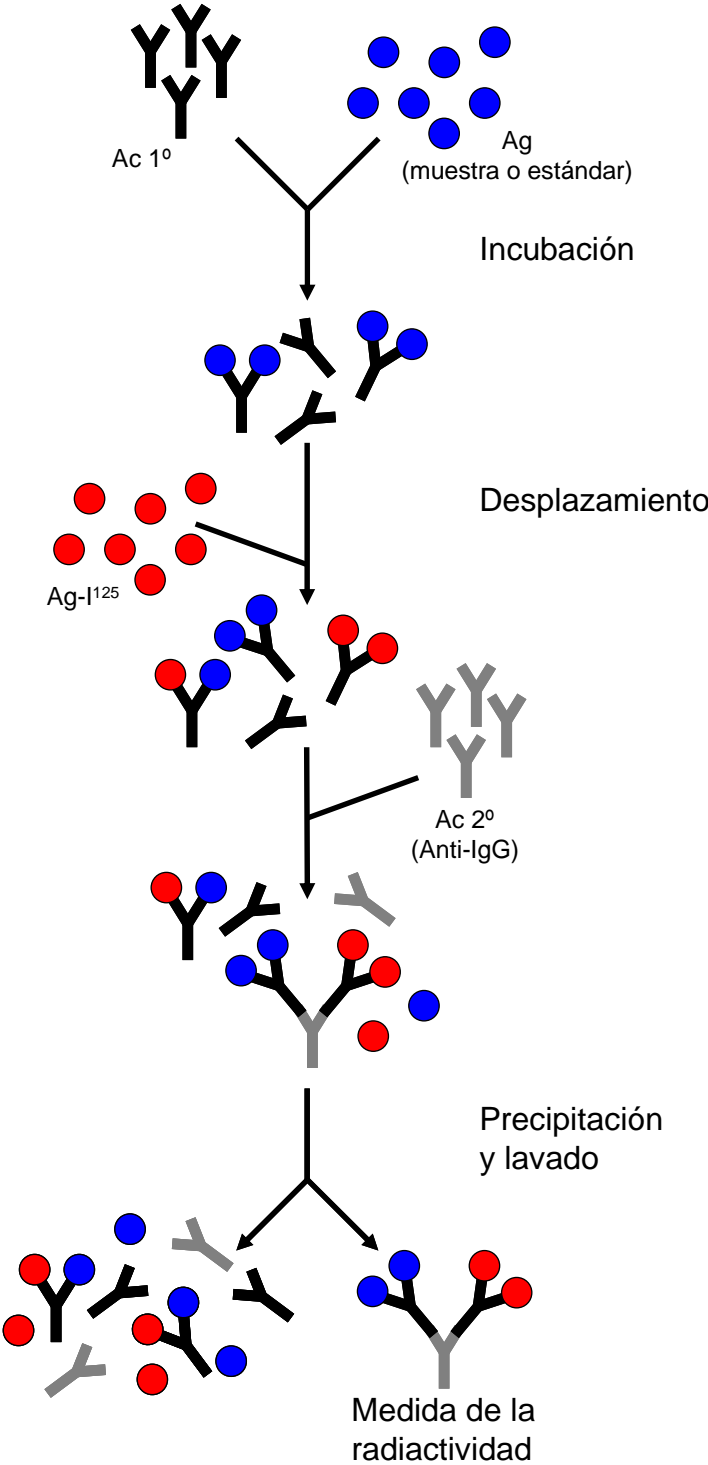
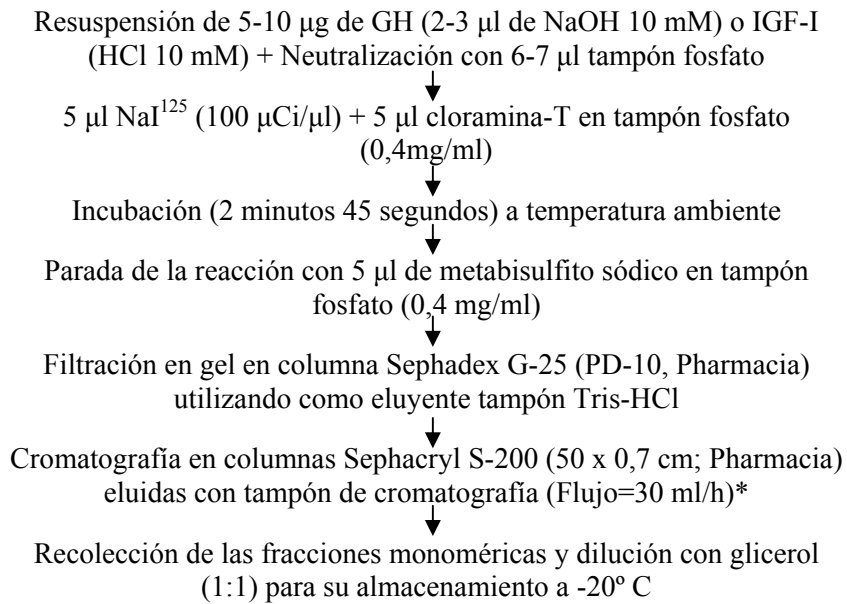


Figura 4.12. Esquema del funcionamiento de un RIA de doble anticuerpo.

4.8.1.1. Radioyodación

El marcaje con I^{125} de la GH y la IGF-I se llevó a cabo según el método de la cloramina-T (Greenwood y cols., 1963). El yodo no unido se separó mediante cromatografía de filtración en gel (PD-10, farmacia) y el trazador se purificó en una segunda cromatografía con Sephacryl S-200 (GH) o Sephacryl S-100 (IGF-I). Para más detalles ver el protocolo adjunto.



Tampón fosfato 0,3 M: NaH_2PO_4 0,15 M, Na_2HPO_4 0,15 M, NaCl al 1% (pH = 7,2).

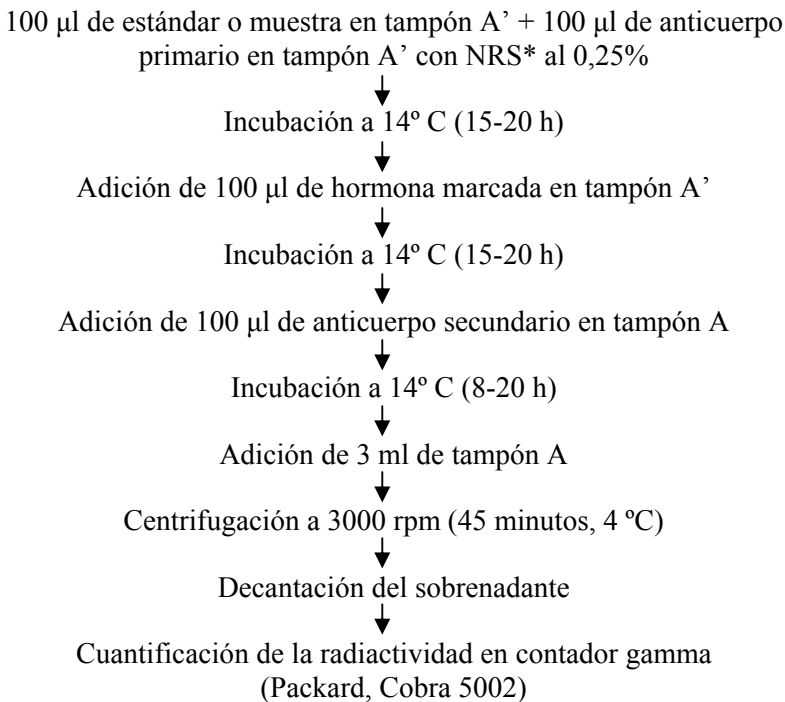
Tampón Tris-HCl: Tris-HCl 20 mM, NaN_3 al 0,05%, BSA al 1% (pH = 7,2).

Tampón de cromatografía: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, NaN_3 0,02%, BSA al 0,3% (pH = 7,5).

* Las columnas de Sephacryl se calibran previamente con un estándar de BioRad: γ -globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobina de caballo (17 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa).

4.8.1.2. Radioinmunoensayos de GH e IGF-I

La GH recombinante se obtuvo usando protocolos desarrollados en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cadiz para ésta y otras hormonas de peces (Calduch-Giner y cols., 1998; Company y cols., 2001; Martínez-Barberá y cols., 1994). El anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal de conejo específico contra la GH de dorada (Le Bail y cols., 1993) y el anticuerpo secundario es IgG de cabra anticonejo (Biogenesis, Poole, Reino Unido). El protocolo detallado se describe a continuación (ver **figura 4.13**).

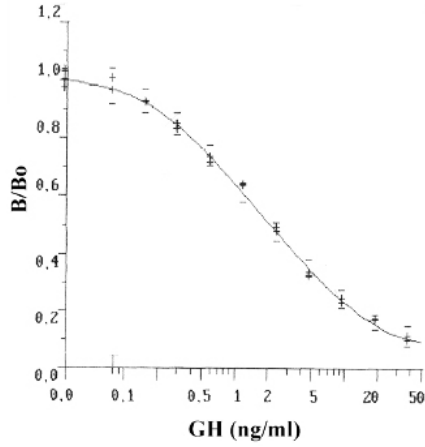


Tampón A: Tris-HCl 50 mM, MgCl₂·(6 H₂O) 10 mM, NaN₃ al 0,05% (pH = 7.5).

Tampón A': Tris-HCl 50 mM, MgCl₂·(6 H₂O) 10 mM, NaN₃ al 0,05%, Tritón X-100 al 0,1%, BSA al 1% (pH = 7,5).

* *NRS*: Suero pre-inmune de conejo

(A)



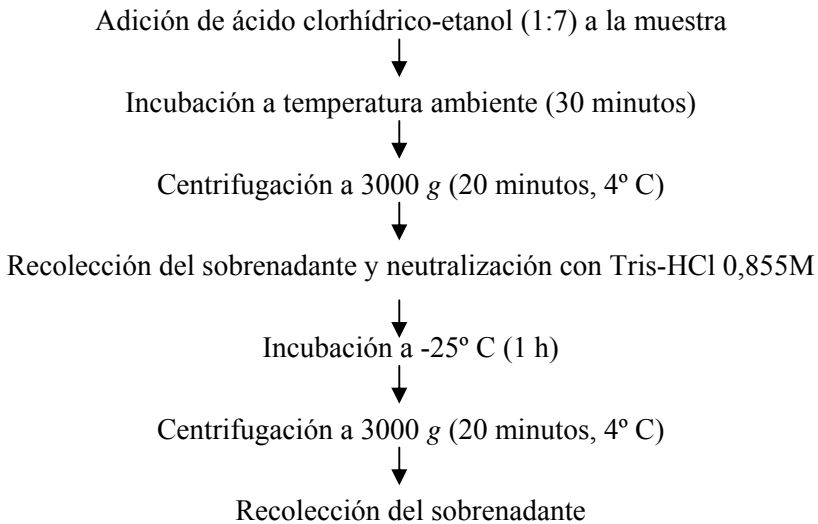
(B)

	Total	Blanco	B ₀	Estándar	Muestra
Tampón A ⁷	-	200 µl	100 µl	-	75 µl
GH	-	-	-	100 µl	-
Muestra	-	-	-	-	25 µl
Anticuerpo 1 ^o (1:4000)	-	-	100 µl	100 µl	100 µl
GH I ¹²⁵	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Anticuerpo 2 ^o (1:20)	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Volumen total	100 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

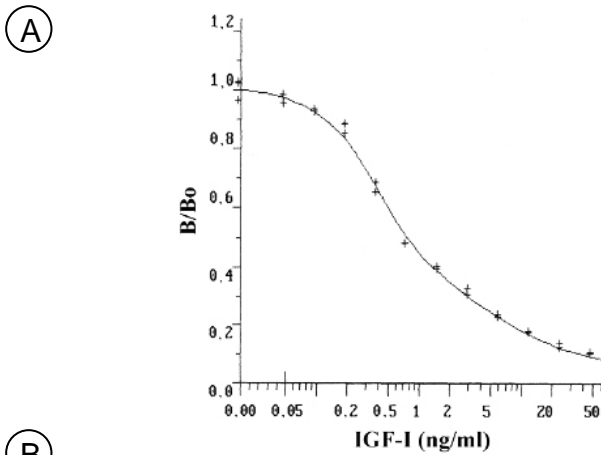
Trazador (cpm/100 µl): 12000; ED₅₀ (ng/ml): 1,8; Sensibilidad (ng/ml): 0,15

Figura 4.13. Curva de desplazamiento de la GH recombinante de dorada usada como curva estándar en el RIA (A). Representación esquemática del los RIA de GH (B).

La IGF-I viaja en plasma asociada a IGFBP y para su correcta cuantificación es necesaria una disociación previa. Para ello, se utilizó el método de crioprecipitación (Shimizu y cols., 2000), descrito a continuación.



En el RIA de IGF-I, se utilizó IGF-I recombinante de *red sea bream* (GroPep, Australia) como trazador y estándar porque presenta un 100% de similitud aminoacídica con la IGF-I de dorada. Como anticuerpo primario se utilizó suero anti-IGF-I de perca gigante (GroPep). La reacción cruzada de este anticuerpo con la IGF-I recombinante de *red sea bream* (GroPep), perca gigante (GroPep) y dorada (Fine y cols., 1997) es del 100%. El protocolo seguido fue similar al descrito para la GH con pequeñas modificaciones (**figura 4.14**).



	Total	Blanco	B ₀	Estándar	Muestra
Tampón A ^o	-	200 µl	100 µl	-	75 µl
IGF-I	-	-	-	100 µl	-
Muestra	-	-	-	-	25 µl
Anticuerpo 1 ^o (1:8000)	-	-	100 µl	100 µl	100 µl
IGF-I I ¹²⁵	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Anticuerpo 2 ^o (1:20)	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Volumen total	100 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

Trazador (cpm/100 µl): 15000; ED₅₀ (ng/ml): 0,7-0,8; Sensibilidad (ng/ml): 0,05

Figura 4.14. Curva de desplazamiento de la IGF-I recombinante de *red sea bream* usada como curva estándar en el RIA(A). Representación esquemática del RIA de IGF-I (B).

4.8.3. Cortisol

Los niveles plasmáticos de cortisol se determinaron mediante ELISA usando un kit comercial (DSL- 10- 2000 ACTIVE™ Cortisol EIA Kit, Diagnostic System Laboratories), basado en la competición del cortisol presente en las muestras con el complejo cortisol-peroxidasa por un número fijo de sitios de unión a anticuerpos. La cantidad de cortisol marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en las muestras. Como solución cromógena se usó la tetrametilbenzidina (TMB). La concentración de cortisol presente en las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 450 y 595 nm e interpolando los resultados en una recta patrón (figura 4.15).

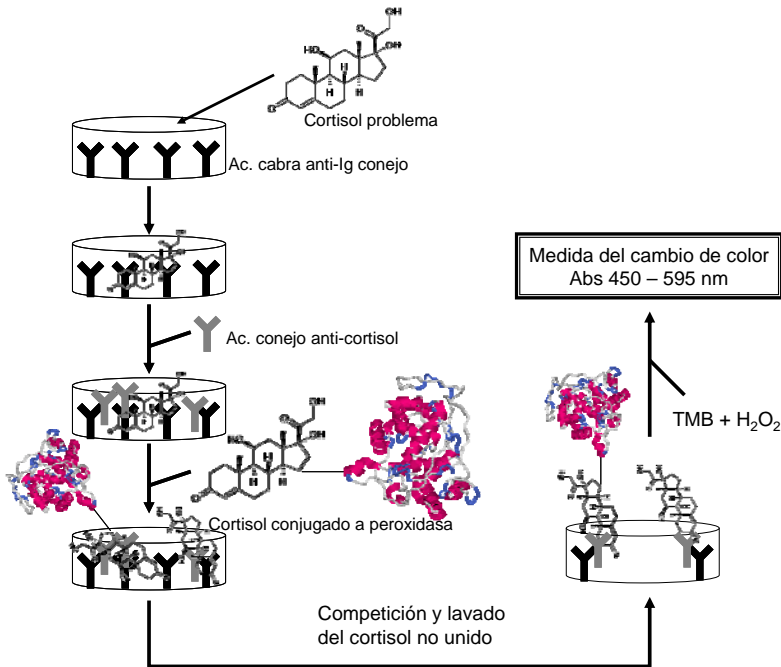
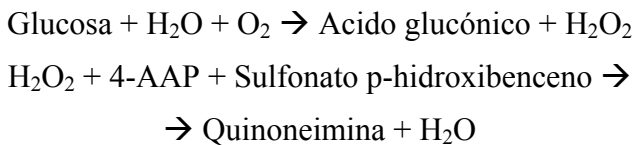


Figura 4.15. Esquema del ELISA de cortisol.

4.8.4. Glucosa

La concentración plasmática de glucosa fue determinada mediante espectrofotometría según el método de Trinder (1969), empleando para ello un kit comercial (Sigma 315-100). Las reacciones enzimáticas implicadas en este ensayo son las siguientes:



La quinoneimina es un cromóforo que muestra absorbancia a 505 nm y la intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

4.9. Animales en experimentación

4.9.1. Condiciones de cultivo

Juveniles de dorada, procedentes de un stock atlántico (FMD, Burdeos), se alimentaron a saciedad visual durante 3-4 semanas (periodo de aclimatación) antes de ser distribuidos aleatoriamente en tanques de cultivo según las necesidades de cada experiencia (**figura 4.16**).



Figura 4.16. Instalaciones de cultivo del grupo de Nutrición y Endocrinología del Crecimiento de Peces del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (A). Tanques de cultivo de 500 (B) y 2500 (C) litros usados en las diferentes experiencias.

La concentración de oxígeno en el agua de salida de los tanques nunca estuvo por debajo del 80% de saturación. El caudal de entrada se mantuvo constante a un mínimo de 2 renovaciones/hora y la densidad de cultivo de los animales no superó los 20 Kg/m³. Los animales se mantuvieron en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (40° 5'N; 0° 10'E), con un rango de temperatura del agua de 11 – 14° C en invierno, y de 20 – 27° C en verano. Se usaron dietas comerciales basadas en harinas de pescado (Proaqua, España) y los animales se alimentaron a saciedad visual. Estas fueron las condiciones generales de cultivo con la salvedad de requerimientos específicos de alguna experiencia en concreto.

Todos los procedimientos detallados en esta memoria están de acuerdo con las regulaciones institucionales y nacionales (tabla de revisión del Instituto de Acuicultura de Torre de la sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y con la actual legislación de la Unión Europea sobre el manejo de animales en experimentación.

4.9.2. Muestreos

En todos los muestreos de biomasa y sangre-tejidos, los peces fueron anestesiados con ácido 3-aminobenzoico éster (MS-222, Sigma) a una concentración de 100 mg/l. De forma rutinaria los animales ayunaron el día de la manipulación y fueron sacrificados de un golpe seco en la cabeza.

4.9.2.1. Biomasa

En los muestreos de biomasa los peces se pesaron en grupos de 10 – 15 individuos. Los parámetros usados para estimar el crecimiento y la ingesta fueron la tasa instantánea de crecimiento (SGR, %) y la ingesta diaria por pez (DFI, g/pez día).

$$\text{SGR} = \frac{\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}}{\text{N}^\circ \text{ de días}} \times 100$$

$$\text{DFI} = \frac{\text{alimento ingerido (g peso seco)}}{\text{N}^\circ \text{ peces} \times \text{N}^\circ \text{ de días}}$$

4.9.2.2. Sangre y tejidos

La sangre se extrajo mediante punción caudal con jeringas heparinizadas. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos a una temperatura de 4° C. El plasma obtenido se separó en diferentes alícuotas y se guardó a – 20° C hasta posteriores análisis.

Los tejidos se extrajeron usando material de disección estéril (8 horas a 200° C). Entre tejidos y/o individuos las posibles contaminaciones se eliminaron limpiando el material con NaOH 0,5 M estéril y enjuagando con agua DEPC (1 ml/l) antes de volver a usarse. Los tejidos extraídos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y, una vez finalizado el muestreo, fueron almacenados a – 80° C.

4.10. Modelos experimentales

4.10.1. Ayuno

Machos de dorada de dos años de edad (560 g de peso medio) se distribuyeron en dos tanques de 500 litros y se alimentaron a saciedad visual durante dos meses. A mitad de verano, uno de los dos grupos dejó de ser alimentado durante dos semanas, lo que supuso un 5% de pérdida de masa corporal, mientras que el grupo control siguió alimentándose normalmente.

Una vez finalizado el periodo de ayuno, se sacrificaron 8 animales por tanque y se extrajeron los tejidos (hígado, tejido adiposo visceral y músculo esquelético blanco) para su posterior análisis transcripcional.

4.10.2. Estación

Juveniles de dorada de 8 meses de edad (20 – 25 g) se mantuvieron por triplicado en tanques de 2500 litros hasta alcanzar la talla comercial.

Mensualmente se hicieron muestreos de biomasa para calcular el SGR. Periódicamente (octubre, enero, mayo y julio) se sacrificaron 5 peces por tanque (15 por punto de muestreo) y se extrajeron muestras de sangre y tejidos (hígado, tejido adiposo

visceral y músculo esquelético blanco) para analizarlas posteriormente.

4.10.3. Edad

La dorada es una especie hermafrodita protándrica. Por lo tanto el sexo varía con la edad, aunque los factores que disparan este cambio no están totalmente claros. Inicialmente los individuos maduran como machos hasta que, pasados unos dos años, revierten a hembras (figura 4.17). Así, peces de 1 (machos inmaduros), 2 (machos maduros) y 3 (hembras maduras) años de edad se repartieron por triplicado en tanques de 2500 litros. En julio, época del año con un mayor crecimiento, se sacrificaron 5 animales por tanque (15 por edad) y se tomaron muestras de sangre y tejidos (hígado, tejido adiposo visceral y músculo esquelético blanco) para analizarse posteriormente.

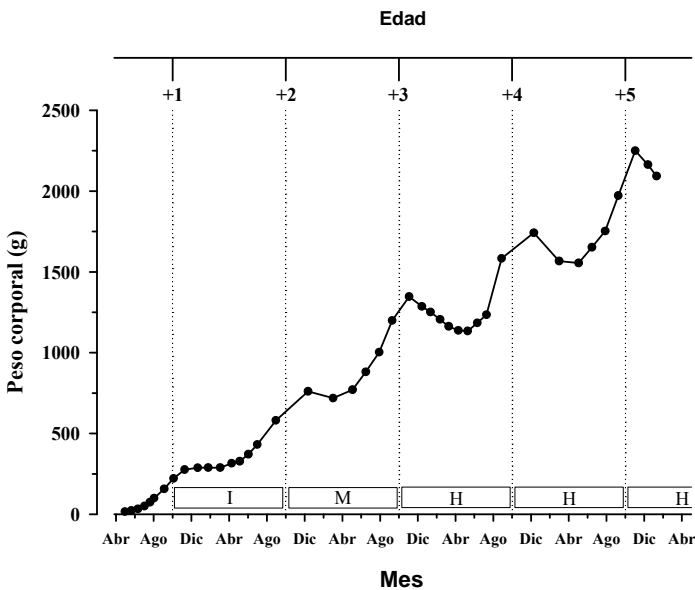


Figura 4.17. Curva de crecimiento de doradas en cultivo en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. I, machos inmaduros. M, machos maduros. H, hembras maduras.

4.10.4. Reto frente a patógeno

4.10.4.1. Diseño experimental

La experiencia de infección se realizó con doradas de un origen sin constancia de infecciones previas por enteromixosis. Aun así, los animales fueron analizadas para descartar una posible infección inicial con *Enteromyxum leei*. Tras la aclimatación a nuestras instalaciones, los peces se dividieron en dos grupos, controles y receptores. Cada grupo (132 individuos con un peso medio de 134 g) se dividió en dos tanques de 200 litros. Los peces receptores recibieron agua contaminada con *E. leei* según describen Sitjà-Bobadilla y cols. (2007), es decir, los receptores reciben únicamente agua de otro tanque con 24 donantes (127,3 g de peso medio, 54% de prevalencia de infección) procedentes de un reservorio de peces infectados. Los peces control fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de caudal y concentración de oxígeno, pero sin recibir agua contaminada. El fotoperiodo siguió las fluctuaciones naturales de nuestra latitud, mientras que la temperatura del agua se mantuvo siempre superior a 18° C (18 – 23° C) en un circuito abierto de agua de mar (salinidad 37,5%), filtrada a 5 µm e irradiada con luz ultravioleta. El caudal fue de 10 l/min. y la saturación de oxígeno no bajó del 85%. Los peces se alimentaron con pienso comercial al 1% de su peso corporal (**figura 4.18**).

Al inicio de la experiencia (día 0), se tomaron muestras del grupo no expuesto. La progresión de la infección fue analizada tomando muestras de ambos grupos a los 27, 50, 90 y 113 días después de la exposición. En cada muestreo se eligieron al azar peces (6 – 24) de ambos grupos que fueron pesados y medidos. El día 90 se tomaron muestras no letales para PCR de peces de ambos grupos. El resto de días (27, 50 y 113), los peces fueron sacrificados por exceso de anestesia (MS-222; 100 mg/l). Una porción del intestino posterior se fijó en formalina tamponada al 10% para la detección histológica del parásito y otra porción se utilizó para la detección por PCR. Además, en el último muestreo (día 113) se tomaron muestras de riñón anterior para analizar la expresión génica. No se registró mortalidad en ningún grupo, los peces infectados no mostraron el síndrome emaciático, típico de fases terminales de enteromixosis.

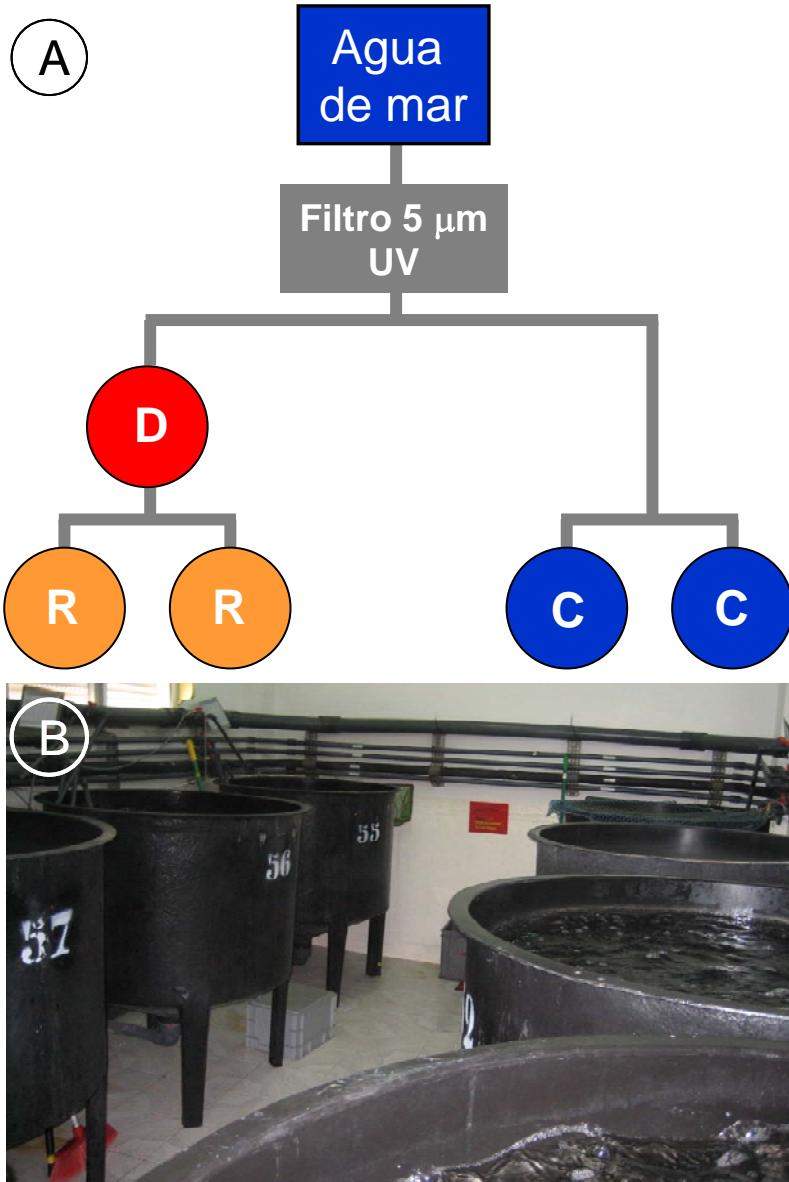


Figura 4.18. Esquema del diseño experimental usado en el modelo de reto frente a patógeno (A). Tanques usados en la experiencia (B).

4.10.4.2. Detección del parásito

La detección del parásito se hizo mediante técnicas histológicas y/o moleculares. La prevalencia de infección en cada punto de muestreo se calculó tomando en consideración los peces diagnosticados como positivos para la infección por *E. leei* mediante cualquiera de las dos técnicas (o ambas). La intensidad media de infección se calculó solamente para los peces diagnosticados por técnicas histológicas, atendiendo al número de estadios del parásito por campo de observación al microscopio a 120x. Se siguió la siguiente escala:

- Baja: estadios dispersos en algunos campos.
- Media: más de diez estadios en todos los campos.
- Alta: más de treinta estadios en todos los campos.

4.10.4.2.1. Técnicas histológicas

Para realizar los cortes histológicos, las porciones fijadas de intestino anterior fueron incluidas en resina Technovit (Kulzer, heraeus). Los cortes fueron de 1 μm de grosor y se tiñeron con azul de toluidina.

4.10.4.2.2. Técnicas moleculares

El diagnóstico molecular se hizo mediante PCR usando cebadores específicos para el ADN ribosómico de *E. leei* según describen Palenzuela y cols. (2004). Este procedimiento fue validado previamente mediante observación histológica del tracto digestivo, dando como resultado una alta sensibilidad y especificidad. Se tomaron dos tipos de muestras, letales y no letales. Las letales consistieron en una pequeña porción del intestino anterior, las no letales en un raspado rectal usando un hisopo de algodón.

El diagnóstico mediante muestras no letales se utilizó antes de empezar la experiencia y en el muestreo del día 90. De esta manera se ajustó la fecha del último muestreo asegurando un número suficiente de peces infectados para poder realizar las comparaciones necesarias. En el resto de muestreos, el diagnóstico fue hecho mediante muestras letales.

4.10.5. Estrés por confinamiento

Para el estudio del estrés por confinamiento, juveniles de dorada (10 – 15 g) fueron distribuidos en tanques de 500 litros, en un circuito cerrado de agua de mar. Este circuito contaba con filtros físicos y biológicos además de una unidad para calentar el agua. De esta manera se mantuvo la temperatura del agua siempre por encima de 18° C (18 – 24° C). Los peces crecieron de julio a diciembre a una densidad de 8 – 10 Kg/m³ mostrando un SGR de 1,9 ± 0,1 g. Los peces se alimentaron con pienso comercial (Proaqua) a saciedad visual. La alimentación cesó un día antes de empezar la experiencia de confinamiento. Los peces de 6 de los tanques de 500 litros fueron usados como grupos control para cada uno de los tiempos de muestreo (1,5, 3, 6, 12, 24, 72 y 120 horas), por lo que permanecieron sin tocar hasta el muestreo. En los grupos de peces estresados se aumentó la densidad de cultivo hasta 117 – 123 Kg/m³. Para esto se transfirieron grupos de 10 peces desde otros dos tanques de 500 litros a unos cilindros de 10 litros de volumen colocados en tanques de 90 litros. Se ajustó el flujo de agua (10 l/min.) para mantener una buena calidad de la misma (oxígeno > 5 ppm, amonio < 0.02 mg/l). Un grupo adicional de 10 peces se utilizó como tiempo cero (**figura 4.19**).

Durante el experimento no se observó mortalidad alguna. En cada uno de los tiempos de muestreo, se tomaron muestras de sangre e hígado de ocho peces del grupo control y otros ocho peces del grupo de peces estresados tal y como se ha descrito anteriormente.

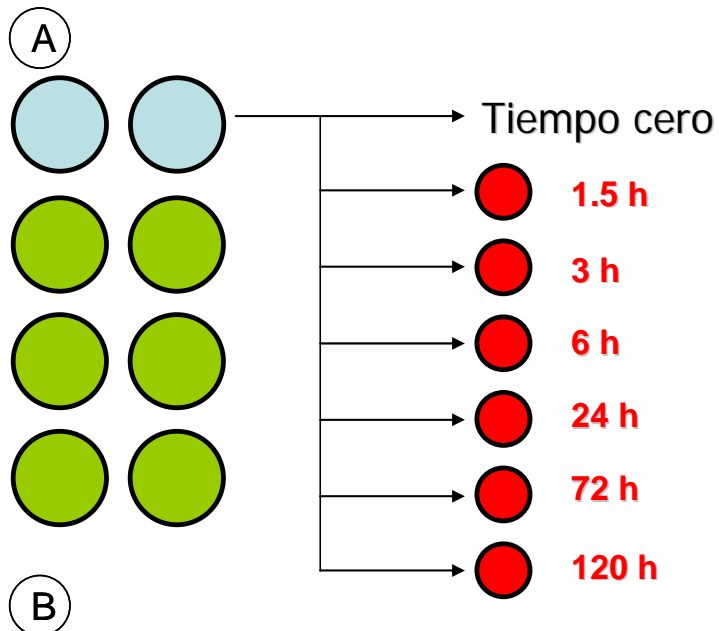


Figura 4.19. Esquema del diseño experimental usado en el modelo de estrés por confinamiento (A). Verde, controles. Azul, tanques para el tiempo cero y los tanques de estrés. Rojo, estresados. Sistema usado para confinar a los peces en los tanques de 90 litros (B).

4.11. Análisis estadísticos

El tratamiento estadístico de los datos se hizo con el programa SPSS o el Sigma Stat (SPSS Inc.). Las comparaciones entre dos grupos se hicieron mediante el test de la *t* de Student. Las comparaciones entre varios grupos se hicieron usando el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y, como análisis a posteriori, el método de Student-Newman-Keuls a una significación de $P < 0,05$. Cuando fallaron los test de normalidad o igualdad de varianzas se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido del método de Dunn. Para el análisis de correlaciones se usó el método de Pearson.

5. Resultados

5.1. Secuenciación del GHR-II	93
5.2. Organización genómica de los GHR de dorada .	102
5.2.1. Sitio de inicio de la transcripción	102
5.2.2. Estructura exón-intrón	102
5.2.3. Región flanqueante en 5'	105
5.3. Modelos experimentales.....	109
5.3.1. Ayuno	109
5.3.2. Estación	110
5.3.3. Edad	114
5.3.4. Reto frente a parásito.....	118
5.3.4.1. Progresión de la infección	118
5.3.4.2. Análisis de la expresión génica	119
5.3.5. Estrés por confinamiento	121
5.3.5.1. Marcadores plasmáticos de estrés	121
5.3.5.2. Eje GH-IGF	122
5.4. Anexo: Resumen de las correlaciones	126

5.1. Secuenciación del GHR-II

Para demostrar la presencia del GHR-II en trucha, dorada, lubina y rodaballo se siguió una estrategia de cebadores degenerados según se indica en el apartado 4.3.1.

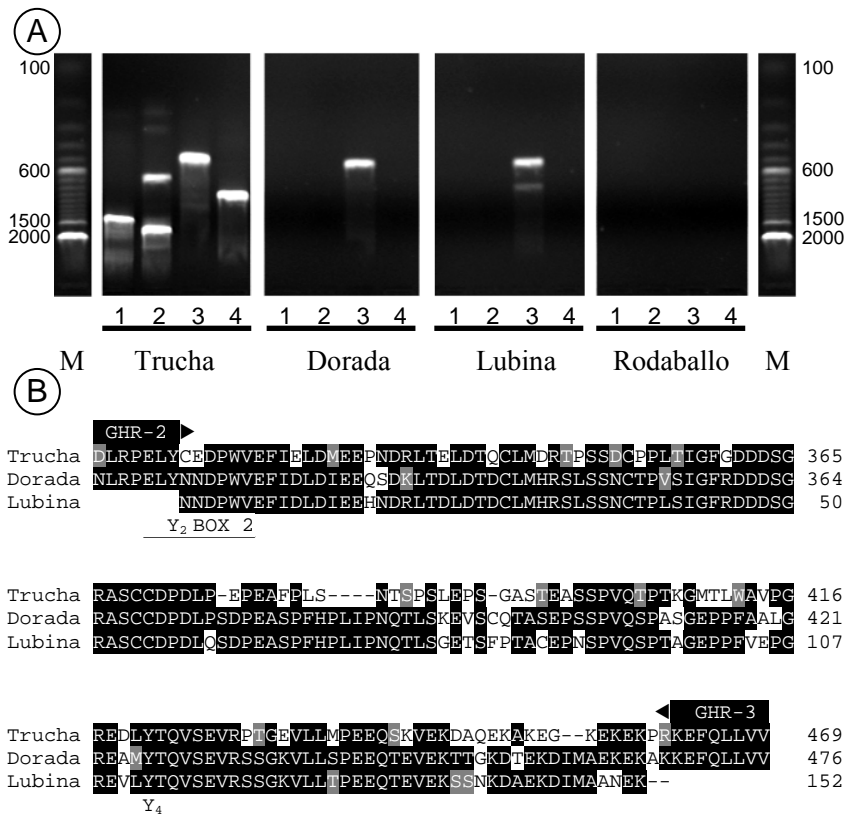


Figura 5.1. A, electroforesis de los productos de la PCR hepática con cebadores degenerados (1, GHR-1/GHR-3; 2, GHR-1/GHR-4; 3, GHR-2/GHR-3; 4, GHR-2/GHR-4). B, alineamiento de las secuencias parciales del GHR-II (500 bp) de trucha, dorada y lubina.

En trucha, las cuatro combinaciones de cebadores dieron bandas solapadas del tamaño esperado (**figura 5.1**) de acuerdo con la estrategia propuesta en la **figura 4.3**. Al ensamblar todas las secuencias en un solo “*contig*”, se obtuvo una secuencia nucleotídica de 1798 pb que presenta una pauta de lectura abierta (ORF) de 591 aa. Esta secuencia proteica consta de un péptido señal de 20 aa, un dominio extracelular de 224 aa, un dominio transmembrana de 20 aa y un dominio intracelular de 327 aa (**figura 5.2**).

```

-17                                     tatacaggatgaacagc

  1  M A T S H I L F I C L V L I L T V V S Q
  1  ATGGCAACTTCCCACATTCTCTTCATTGCTTGTCTCATCTAACAGTTGTGTGCGAG

 21  E P P T S E Q A L P Q I R P Q I T G C1 V
 61  GAGCCGCCAACTTCTGAACAAGCCCTGCCCCAGATCCGCCCCAGATCACTGGCTGTGTC

 41  S H D M N T F R C2 R W N V G T F Q N L T
121  TCCCATGACATGAACACGTTCCGCTGCGAGATGGAATGTCGGAACATTCAGAACCTCACA

 61  E P G D L R M F Y Y I N D T N I S P K E
181  GAGCCCGGAGACCTGCGGATGTTCTACTACATCAATGACACGAACATATCTCCCAAAGAG

 81  W S E C3 P N Y M A D R I D E C4 F F N E S
241  TGGAGTGAGTGTCTCTAACTACATGGCTGACAGGATAGACGAGTCTCTTCTCAATGAAAGC

101  Y T K V W I T Y S V Q L R S G D Q D N L
301  TACACGAAGGTCTGGATAACCTACAGTGTCCAACTCCGCTCTGGCGATCAGGATAATCTC

121  Y D E V I F T V E D I V E P D P P I A L
361  TATGACGAGGTCACTTCTCACTGTGGAAGACATCGTGAACAGACCCCTCCAATAGCGCTG

141  N W T L L N V G L T G S H F D I M V S W
421  AACTGGACCTGTGAATGTGGGTCTAACCGGGAGCCACTTTGACATCATGGTGAGCTGG

161  E P P H S A D V S M G W M T L Q Y E V Q
481  GAGCCGCCACACTCTGCAGACGTGTCTATGGGCTGGATGACGCTACAATACGAGGTGCAG

181  Y R E V N S T L W R M V N L E K G R Q R
541  TACCGTGAGGTCAATTCAACTGTGGAGGATGGTGAACCTTGAGAAGGGGAGGCAGCGG

201  S L Y G L R T N T D H E V R V R C7 K T L
601  TCGTGTACGGGCTGCGACCAACACAGATCACGAGGTCAGGTTGAGTGCAGAGACGCTG

221  A S R N F G E F S D P I V I H I P T K E
661  GCATCCCGTAATTTTGGGGAATTCAGCGACCCCATAGTCATACACATCCCCACTAAAGAG

241  S R F P V T V L L V F A A L G L A V I L
721  TCCCGATTCCAGTTACTGTCTCTGTCTTTGCTGCCTTGGGTTTAGCAGTCATCTCA

261  I L V I Y0 S Q Q Q K L M M I L L P P I P
781  ATACTGGTCATCTATTCCAGCAACAGAAGTTGATGATGATTCTCCTGCCTCCAATTCCT

281  G P K I K G I D P E L F K K G K L A E L
841  GGTCCCAAATCAAAGGAATCGACCCTGAGCTCTTCAAGAAAGGTAAGTTGGCTGAGCTG

```

301 T S I L G D H P D L R P E L **Y2** C E D P W
 901 ACCTCCATCCTGGGCGACCACCTGACCTGAGGCCAGAGCTG**TACT**TGTGAAGACCCCTGG

321 V E F I E L D M E E P N D R L T E L D T
 961 GTGGAGTTCATCGAGCTGGACATGGAGGAGCCCAACGACAGGCTGACTGAGCTGGACACA

341 Q C L M D R T P S S D C P P L T I G F G
 1021 CAGTGTGATGGACCGCACGCCCTCCTCAGACTGTCCCCTCTCACCATTGGCTTCGGA

361 D D D S G R A S C C D P D L P E P E A F
 1081 GATGACGACTCTGGCCGGGCCAGCTGCTGTGACCCTGATCTGCCTGAACCAGAGGCCTTT

381 P L S N T S P S L E P S G A S T E A S S
 1141 CCCCTCTCAAACACGACCCAGCCTGGAGCCCTCTGGTCCAGCACTGAGGCCAGCTCC

401 P V Q T P T K G M T L W A V P G R E D L
 1201 CCAGTCCAGACCCCAACAAAGGGATGACTCTCTGGGCTGTCCCTGGCAGGGAGGACCTC

421 **Y4** T Q V S E V R P T G E V L L M P E E Q
 1261 **TAT**ACCAGGTGAGCGAGGTGAGACCCACTGGCGAAGTGTCTGCTGATGCCTGAGGAGCAG

441 S K V E K D A Q E K A K E G K E K E K P
 1321 AGCAAGGTTGAGAAGGATGCACAGGAGAAGGCTAAGGAGGGAAAGGAGAAGAGAGCCG

461 R K E F Q L L V V N A D G G G **Y5** T T E L
 1381 AGGAAGGAGTTTCAGCTGCTGGTGGTGAATGCTGACGGGGGAGGT**TAC**ACCACAGAGTTA

481 D A G K M S A K L P T G R G S Q P A P T
 1441 GACGCTGGGAAGATGAGTGCCAAACTCCCCACTGGGAGAGGCAGCCAGCCTGCCCAACA

501 E D S R L V Q G Q P F G E **Y6'** Q S L **Y6"** F E
 1501 GAGGATAGTAGGCTTGTGCAGGGACAGCCCTTTGGGGAG**TAC**CAGAGCCTG**TACT**TTGAG

521 A E M P P I P P A S P V S S L L P L S V
 1561 GCTGAAATGCCCCCATCCCACCTGCCTCGCCCGTTTCTCTACTGCTCCCTCTCTCTGTG

541 **Y7** T M V E G V D R Q N S L L L K P S P P
 1621 **TAC**ACCATGGTGGAGGGAGTGACAGGCAGAACAGCCTCCTTCTGAAGCCAGCCCCCA

561 P A P Q P V L T K L P L P T P T P E G **Y8**
 1681 CCTGCACCCAGCCAGTCCCTAACCAAGCTGCCCTTCTCTACACCTACACCAGAGGG**TAG**

581 L T P D L L G N V T P *
 1741 CTGACCCTGACCTACTAGGAAATGTTACACCGTAAActcag

Figura 5.2. Secuencias nucleotídica y aminoacídica del GHR-II de trucha numeradas a partir del primer nucleótido que codifica para la metionina inicial. Péptido señal, subrayado. Sitios de N-glicosilación, subrayado doble. Residuos de cisteína extracelulares, **■**. Residuos de tirosina intracelulares, **■**. Motivo FGEFS, negrita y enmarcado. Residuos de tirosina intracelulares no conservados en el GHR-I, **■**. Dominio transmembrana, **■**.

En dorada y lubina, la PCR con cebadores degenerados sólo dio resultados positivos con la combinación GHR-2/GHR-3 (**figura 5.1**). En rodaballo ninguna de las combinaciones posibles dio resultado positivo. El fragmento de lubina presenta una identidad aminoacídica del 87 % y 61 % con el fragmento equivalente de dorada y trucha. Este fragmento inicial de dorada se completó mediante 5' y 3' RACE (apartado 4.3.3), obteniéndose una secuencia nucleotídica de 2179 pb que codifica para una ORF de 583 aa con un péptido señal de 17 aa, un dominio extracelular de 221 aa, un dominio transmembrana de 25 aa y un dominio intracelular de 320 aa (**figura 5.3**).

```

-187                                     actcaca
-180 gagaccgtcagccagggcagggtttcttcgacagcgtcaccagcttacatggagctcgggt
-120 gaacagtttctgtgtggttctcagcgggtatctgcggtctgaacgcgggactgttagagtt
-60 tgtgttgtgtgcagttggatgaggagcggagctgcagactgctgtccacgcgctcgacacc

1  M A A A L T L L F C L Y I L T S S A L E
1  ATGGCTGCCGCTCTCACTCTGCCTTCTGCCTATACATCTTGACTTCTTCAGCGCTGGAA

21  S A S E Q V H P Q R D P H L T G C1 V S A
61  TCAGCCTCAGAGCAAGTCCACCCTCAGAGGGACCCACCTCACTGGCTGTGTCTCTGCC

41  N M E T F R C2 R W N V G T L Q N L S K P
121 AACATGGAGACTTTCGGCTGCAGATGGAATGTGGCACTCTCCAGAACTCTCCAAGCCG

61  G E L R L F Y I N K L S P L D P P K E W
181 GGAGAGCTCCGCTATTCTACATTAACAAATTATCCCCTTGATCCTCCTAAAGAGTGG

81  T E C3 P H Y S I D R P N E C4 F F N K N H
241 ACCGAGTCTCCTCACTACAGCATCGACAGGCCAAACGAGTGCCTTCTTCAACAAGAACCAC

101  T S V W T P Y K V Q L R S R D E S T L Y
301 ACATCGGTCTGGACACCTTACAAAGTCCAGCTCCGCTCGAGGGACGAATCCACCCTCTAC

121  D E N T F T V D A I V Q P D P P V D L T
361 GACGAGAACACGTTACCGTCGATGCCATCGTGCAACCAGATCCTCCAGTTGACCTGACC

141  W T T L N E S L S G T Y Y D I I L S W K
421 TGGACAACACTGAATGAAAGTCTGAGTGGCACTTATTATGACATTATACTGAGCTGGAAG

161  P P Q S A D V A M G W M T L Q Y E V Q Y
481 CCGCTCAGTCTGCAGACGTGGCGATGGGATGGATGACGCTACAGTATGAGGTCCAGTAC

181  R S A S S D L W H A V E P V T V T Q R S
541 CGCAGCGCCAGCTCTGACCTGTGGCATGCGGTGGAGCCTGTGACAGTACCCAAACGGTCT

201  L F G L K H N V N H E V R V R C7 K M L A
601 CTTTTTGGACTTAAACACAACGTCAATCACGAGGTTCCGGTCCGGTGCAGAAAATGCTGGCT

221  G K E F G E F S D S I F V H I P A K V S
661 GGGAAAGAGTTCCGGAGAATTCAGCTCACTCCATATTCGTCCACATCCC GGCGAAAGTGTGC

241  S F P V V A L L L F G A L C L V A I L M
721 AGTTTCCGGTGGTGGCTCTGCTTCTCTTTGGCGCCTTGTTTGTAGTGGCCATCCTGATG

```

261 L V I I S Q Q E K L M F I L L P P V P G
 781 TTAGTCATCATATATCGCAGCAGGAAAAGTTGATGTTTATTCTTTTGCCTCTGTTCGGGA

281 P K I R G I D P E L L K K G K L R E L T
 841 CCCAAAATAAGAGGAATAGACCCCGAACTGCTCAAGAAAGGGAAGCTGAGAGAGTTGACA

301 S I L G G P P N L R P E L Y2 N N D P W V
 901 TCCATCTTGGGCGGCCCCCTAATCTGAGGCCGGAGCTG **TAC**ACAACACGCCCTGGGTG

321 E F I D L D I E E Q S D K L T D L D T D
 961 GAATTCATCGACCTGGACATCGAGGAGCAAAGCGACAAGCTCACAGACCTGGACACAGAC

341 C L M H R S L S S N C T P V S I G F R D
 1021 TGTCTCATGCACCGCTCCCTGTCTCCAACCTGCACTCCCGTTTCTATTGGCTTCAGAGAT

361 D D S G R A S C C D P D L P S D P E A S
 1081 GATGACTCAGGTGGGCCAGCTGCTGCGACCCAGATCTCCCAGCGACCTGAAGCATCG

381 P F H P L I P N Q T L S K E V S C Q T A
 1141 CCTTTCATCTCTCATCCCAAATCAAACCTCAGCAAGGAAGTGTCTGTCAGACCGCC

401 S E P S S P V Q S P A S G E P P F A A L
 1201 AGCGAGCCAAGCTCCCCAGTCCAGAGCCCGCCTCTGGAGAGCCTCCTTTTGCAGCACTG

421 G R E A M Y4 T Q V S E V R S S G K V L L
 1261 GGCAGAGAGGCTATG **TAC**ACCAGGTGAGTGAGGTGAGGTGCTCTGGCAAGGTGCTGCTG

441 S P E E Q T E V E K T T G K D T E K D I
 1321 TCGCCTGAGGAACAGACCGAGGTGGAGAAAACCACTGGCAAAGACACGGAGAAAGACATC

461 M A E K E K A K K E F Q L L V V N A D H
 1381 ATGGCGGAGAAGGAGAAAGCAAAGAAGGAGTTCCAGCTCCTGGTGGTGAATGCAGATCAC

481 G G Y5 T S E L N A G K M S P R L S I G D
 1441 GGGGTT **TAC**ACCTCAGAACTCAACGCAGGGAAAATGAGCCCGAGGTTGTCCATAGGAGAC

501 Q S E P G L T G D L S P L P P A S P Y6 H
 1501 CAGAGTGAACCCGGCTGACAGGAGACTTGAGTCTTTGCCACCCGCTCACCT **TAC**CAT

521 E S D T T A V S P L P P A P V Y7 T V V E
 1561 GAATCAGATACCACCGCCGTGTCCTCTTCCCCCTGCTCCTGTCT **TAC**ACCGTGGTAGAA

541 G V D R Q N S L L L T P N S T P A P Q L
 1621 GGTGTTGACAGGCAGAACAGCCTCTTACTGACACCAAACCAACACCTGCCCCCGAGCTG

561 I I P K T M P T P G G Y8 L T P D L L G S
 1681 ATAATCCCGAAGACCATGCCAACACCAGGCGGCT **TAC**CTGACCCCTGACCTTCTGGGAAGC

581 I T P *
 1741 ATCACACCATAGatcagcagcgaacgtgcatgggtaagactgggtcaatcaaaagagatag
 1801 gcttgggaacagtcttggggattgactattgagggccccctggtgagcgtcgaatgtcag
 1861 ctctcctgaaatagtttggaggggaggggcatctgtgcctgtcctgccaccacctctgcc
 1921 tcctctggcctcccactgtccctcagacagggccgtaacatcgagtttggtagagggg
 1981 ggacgagcacac

Figura 5.3. Secuencias nucleotídica y aminoacídica del GHR-II de dorada numeradas a partir del primer nucleótido que codifica para la metionina inicial. Péptido señal, subrayado. Sitios de N-glicosilación, subrayado doble. Residuos de cisteína extracelulares, ■. Residuos de tirosina intracelulares, ■. Motivo FGEFS, negrita y enmarcado. Residuos de tirosina intracelulares no conservados en el GHR-I, ■. Dominio transmembrana, ■.

Una vez completadas las secuencias de GHR-II de trucha y dorada, se realizaron búsquedas en las bases de datos genómicas del proyecto ensembl (<http://www.ensembl.org>). Como resultado de estas búsquedas se encontraron predicciones similares a GHR-I y II en fugu (GHR-I, ENSTRUG00000015040; GHR-II, ENSTRUG00000013005) y pez cebra (GHR-I, ENSDARG00000054771; GHR-II, ENSDARG00000007671).

Al alinear las secuencias de GHR-II de dorada y trucha con otras secuencias disponibles en salmonidos (**figura 5.4**) se observa la conservación en el dominio extracelular del motivo de unión a hormona (FGEFS) característico de los GHR, además de 5 de los 7 residuos de cisteína (C1, C2, C3, C4 y C7) de los GHR de tetrápodos. En el dominio intracelular, se conservan los dominios BOX 1 y BOX 2 y 5 de los residuos de tirosina descritos en el GHR-I de peces. La secuencia consenso también contiene 3 residuos adicionales de tirosina (Y0, Y6', Y6'') de los cuales sólo uno se conserva en el GHR-II de dorada (Y6'').

C1

S.plateado 1	ma	sh	il	f	i	c	l	v	l	v	l	s	Q	E	P	P	T	S	K	Q	A	L	F	Q	I	R	P	O	I	T	G	C	V	S	H	D	M	N	T	F	R	48					
S.japonés	ma	t	s	y	i	l	f	i	c	l	l	i	l	t	v	v	s	g	E	P	T	S	E	Q	A	L	P	Q	I	R	P	O	I	T	G	C	V	S	H	D	M	N	T	F	R	48	
S.plateado 2	ma	t	s	r	i	l	f	i	c	l	l	i	l	t	v	v	s	g	E	P	T	S	E	Q	A	L	P	Q	I	R	P	O	I	T	G	C	V	S	H	D	M	N	T	F	R	48	
Trucha	ma	t	sh	i	l	f	i	c	l	v	l	l	i	t	v	v	s	g	E	P	T	S	E	Q	A	L	P	Q	I	R	P	O	I	T	G	C	V	S	H	D	M	N	T	F	R	48	
Dorada	ma	a	a	l	t	l	i	f	c	l	v	l	i	l	t	-	s	A	L	E	S	A	S	E	Q	V	H	P	Q	R	D	P	H	I	T	G	C	V	S	A	N	M	E	T	F	R	46

		C2		C3		C4																																											
S.plateado 1	CR	W	N	V	G	T	F	Q	N	L	T	E	P	R	D	L	R	I	F	Y	I	N	D	R	N	I	S	P	-	K	E	W	G	E	C	P	-	R	Y	A	D	R	I	N	E	C	94		
S.japonés	CR	W	N	V	G	T	F	Q	N	L	T	E	P	R	D	L	R	M	F	Y	I	N	N	K	N	I	S	P	-	K	E	W	S	E	C	P	N	Y	M	A	D	R	I	D	E	C	95		
S.plateado 2	CR	W	N	V	G	T	F	Q	N	L	T	E	P	R	D	L	R	M	F	Y	I	N	N	K	N	I	S	P	-	K	E	W	S	E	C	P	N	Y	M	A	D	R	I	D	E	C	95		
Trucha	CR	W	N	V	G	T	F	Q	N	L	T	E	P	R	D	L	R	M	F	Y	I	N	D	R	N	I	S	P	-	K	E	W	S	E	C	P	N	Y	M	A	D	R	I	D	E	C	95		
Dorada	CR	W	N	V	G	T	F	Q	N	L	S	K	P	G	E	L	R	L	F	Y	I	N	K	L	S	P	I	D	P	P	-	K	E	W	T	E	C	P	H	Y	S	I	D	R	P	N	E	C	94

N-glic

S.plateado 1	FF	NE	S	Y	K	V	W	M	T	Y	S	V	Q	L	R	S	G	D	Q	D	I	L	Y	M	E	V	I	F	T	V	E	D	I	V	E	P	D	P	P	I	A	L	N	W	T	142
S.japonés	FF	NE	S	Y	K	V	W	I	T	Y	S	V	Q	L	R	S	G	D	Q	D	N	L	Y	D	E	V	I	F	T	V	E	I	V	E	P	D	P	P	I	A	L	N	W	T	143	
S.plateado 2	FF	NE	S	Y	K	V	W	I	T	Y	S	V	Q	L	R	S	G	D	Q	D	N	L	Y	D	E	V	I	F	T	V	E	I	V	E	P	D	P	P	I	A	L	N	W	T	143	
Trucha	FF	NE	S	Y	K	V	W	I	T	Y	S	V	Q	L	R	S	G	D	Q	D	N	L	Y	D	E	V	I	F	T	V	E	I	V	E	P	D	P	P	I	A	L	N	W	T	143	
Dorada	FF	N	K	N	H	S	V	W	T	F	Y	K	V	Q	L	R	S	R	D	E	S	T	L	Y	D	E	N	T	F	T	V	D	A	L	V	O	P	P	P	V	D	L	T	W	142	

N-glic

S.plateado 1	L	N	V	L	T	G	S	H	F	D	I	M	L	S	W	E	P	P	H	S	A	D	V	S	M	G	W	M	T	L	O	Y	E	V	O	Y	R	E	V	N	S	T	L	W	R	T	190
S.japonés	L	N	V	L	T	G	S	H	F	D	I	M	V	S	W	E	P	P	H	S	A	D	V	S	M	G	W	M	T	L	O	Y	E	V	O	Y	R	E	V	N	S	T	L	W	R	M	191
S.plateado 2	L	N	V	L	T	G	S	H	F	D	I	M	V	S	W	E	P	P	H	S	A	D	V	S	M	G	W	M	T	L	O	Y	E	V	O	Y	R	E	V	N	S	T	L	W	R	M	191
Trucha	L	N	V	L	T	G	S	H	F	D	I	M	V	S	W	E	P	P	H	S	A	D	V	S	M	G	W	M	T	L	O	Y	E	V	O	Y	R	E	V	N	S	T	L	W	R	M	191
Dorada	T	L	N	E	S	L	E	G	T	Y	D	I	L	S	W	K	P	P	O	S	A	D	V	A	M	G	W	M	T	L	O	Y	E	V	O	Y	R	S	A	S	D	L	W	H	A	190	

N-glic

C7

S.plateado 1	V	L	E	K	G	R	O	R	S	L	Y	G	L	R	T	N	T	D	N	E	V	R	V	R	C	K	T	L	A	S	R	N	F	G	E	F	S	D	S	I	F	I	H	I	P	T	K	238
S.japonés	V	L	E	K	G	R	O	R	S	L	Y	G	L	R	T	N	T	D	N	E	V	R	V	R	C	K	T	L	A	S	R	N	F	G	E	F	S	D	P	I	V	I	H	I	P	T	K	239
S.plateado 2	V	L	E	K	G	R	O	R	S	L	Y	G	L	R	T	N	T	D	N	E	V	R	V	R	C	K	T	L	A	S	R	N	F	G	E	F	S	D	P	I	V	I	H	I	P	T	K	239
Trucha	V	L	E	K	G	R	O	R	S	L	Y	G	L	R	T	N	T	D	N	E	V	R	V	R	C	K	T	L	A	S	R	N	F	G	E	F	S	D	P	I	V	I	H	I	P	T	K	239
Dorada	V	E	P	V	T	V	T	O	R	S	L	E	G	L	K	H	N	V	N	H	E	V	R	V	R	C	K	M	L	A	G	E	F	G	E	F	S	D	S	I	F	V	H	I	P	A	K	238

FGEFS

X0

S.plateado 1	E	S	R	L	P	V	T	V	L	L	V	F	A	A	L	G	L	A	V	I	L	M	L	V	I	Y	S	Q	Q	K	L	M	V	I	L	P	P	I	P	G	P	K	I	K	G	I	286
S.japonés	E	S	R	F	P	V	T	V	L	L	V	F	A	A	L	G	L	A	V	I	L	M	L	V	I	Y	S	Q	Q	K	L	M	M	I	L	P	P	I	P	G	P	K	I	K	G	I	287
S.plateado 2	E	S	R	F	P	V	T	V	L	L	V	F	A	A	L	G	L	A	V	I	L	M	L	V	I	Y	S	Q	Q	K	L	M	M	I	L	P	P	I	P	G	P	K	I	K	G	I	287
Trucha	E	S	R	F	P	V	T	V	L	L	V	F	A	A	L	G	L	A	V	I	L	M	L	V	I	Y	S	Q	Q	K	L	M	M	I	L	P	P	I	P	G	P	K	I	K	G	I	287
Dorada	V	S	S	F	P	V	A	L	L	F	G	A	L	C	L	V	A	L	M	L	V	I	I	S	Q	E	K	L	M	F	I	L	P	P	I	P	G	P	K	I	R	G	I	286			

Dominio transmembrana BOX 1

X2

S.plateado 1	D	P	E	L	F	K	K	G	K	L	A	E	L	T	S	I	L	G	I	P	D	L	R	P	D	L	Y	S	D	P	W	V	E	F	I	E	L	D	M	E	E	P	N	D	R	L	334	
S.japonés	D	P	E	L	F	K	K	G	K	L	A	E	L	T	S	I	L	G	D	H	P	D	L	R	P	E	L	Y	S	D	P	W	V	E	F	I	E	L	D	M	E	E	P	N	D	R	L	335
S.plateado 2	D	P	E	L	F	K	K	G	K	L	A	E	L	T	S	I	L	G	D	H	P	D	L	R	P	E	L	Y	S	D	P	W	V	E	F	I	E	L	D	M	E	E	P	N	D	R	L	335
Trucha	D	P	E	L	F	K	K	G	K	L	A	E	L	T	S	I	L	G	D	H	P	D	L	R	P	E	L	Y	S	D	P	W	V	E	F	I	E	L	D	M	E	E	P	N	D	R	L	335
Dorada	D	P	E	L	L	K	K	G	K	L	R	E	L	T	S	I	L	G	P	P	N	L	R	P	E	L	Y	N	N	D	P	W	V	E	F	I	D	L	D	E	E	Q	S	D	K	L	334	

BOX 2

S.plateado 1	T	V	L	D	T	Q	C	L	M	D	R	S	P	S	S	D	C	P	P	I	T	I	G	F	R	D	D	S	G	R	A	S	C	C	D	P	D	L	H	-	D	P	E	A	F	F	H	381
S.japonés	T	E	L	D	T	Q	C	L	M	D	R	S	P	S	S	D	C	P	P	L	T	I	G	F	G	D	D	S	G	R	A	S	C	C	D	P	D	L	P	-	E	P	E	A	F	F	382	
S.plateado 2	T	E	L	D	T	Q	C	L	M	D	R	S	P	S	S	D	C	P	P	L	T	I	G	F	G	D	D	S	G	R	A	S	C	C	D	P	D	L	P	-	E	P	E	A	F	F	382	
Trucha	T	E	L	D	T	Q	C	L	M	D	R	S	P	S	S	D	C	P	P	L	T	I	G	F	G	D	D	S	G	R	A	S	C	C	D	P	D	L	P	-	E	P	E	A	F	F	381	
Dorada	T	D	L	D	T	C	L	M	H	R	S	L	S	S	N	C	T	P	V	S	I	G	F	R	D	D	S	G	R	A	S	C	C	D	P	D	L	P	S	D	P	E	A	S	F	382		

X3

S.plateado 1	S	-	L	L	E	N	T	S	H	A	L	E	P	S	C	L	A	S	T	K	A	S	S	P	V	Q	T	P	T	T	E	S	P	W	A	A	P	G	R	E	D	L	Y	O	V	N	428	
S.japonés	H	P	L	L	S	N	T	S	P	S	L	E	P	S	-	G	A	S	T	E	A	S	S	P	V	Q	T	P	T	T	G	M	T	L	W	A	V	P	G	R	E	D	L	Y	O	V	S	429
S.plateado 2	H	P	L	L	S	N	T	S	P	S	L	E	P	S	-	G	A	S	T	E	A	S	S	P	V	Q	T	P	T	T	G	M	T	L	W	A	V	P	G	R	E	D	L	Y	O	V	S	429
Trucha	-	-	-	L	S	N	T	S	P	S	L	E	P	S	-	G	A	S	T	E	A	S	S	P	V	Q	T	P	T	T	G	M	T	L	W	A	V	P	G	R	E	D	L	Y	O	V	S	425
Dorada	H	P	L	L	P	N	O	L	S	K	E	V	S	C	Q	T	A	S	E	F	S	S	P	V	Q	S	P	A	S	C	E	P	P	A	A	L	G	R	E	A	M	Y	T	O	V	S	430	

S.plateado 1	EVGPTGEVLLTNEEQRNVEENSEKDEKEN--EKEKKKKEFQLLVVNA	473
S.japonés	EVRPQGEVLLMPPEQSKVEKDAEEKAKEGK--EKEKPRKEFQLLVVNA	475
S.plateado 2	EVRPTGEVLLMPPEQSKVEKDAEEKAKEEM--GKQKPRKEFQLLVVNA	475
Trucha	EVRPTGEVLLMPPEQSKVEKDAEEKAKEGK--EKEKPRKEFQLLVVNA	471
Dorada	EVRSSGKVLVLSPEEQTEVEKTTGKDTEKDIMAEEKAKAKKEFQLLVVNA	478
S.plateado 1	DVGGYTS ⁵⁵ ELDAGKMSARLPTGRASQAPATEDS ⁵⁶ SLVQGPFG ^{56'} EYQSLYF ^{56"}	521
S.japonés	DGGGYTTELDAGKMSAKLPTGRSSOPAPATEDSRLVQGPFR ^{56'} EYQSLYF ^{56"}	523
S.plateado 2	DRGGYTTELDAGKMSAKLPTGRSSOPAPATEDSRLVQGPFG ^{56'} EYQSLYF ^{56"}	523
Trucha	DGGGYTTELDAGKMSAKLPTGRSSOPAPATEDSRLVQGPFG ^{56'} EYQSLYF ^{56"}	519
Dorada	DHGGYTSELNAGKMSPRLSIGDQSE ⁵⁶ PGLTGDLSP ^{56'} LP-----PASP ^{56"} VH	514
S.plateado 1	EAEMPPIPPASPVSPL ⁵⁷ PPVSA ⁵⁷ YTMVEGVCRONSLLLKPCFT ⁵⁷ PAPQPV ⁵⁷ L	569
S.japonés	EAEMPPIPPASPVSPL ⁵⁷ PLSVYTMVEGVDRONSLLLKPSPPPAPQPV ⁵⁷ L	571
S.plateado 2	EAEMPPIPP ⁵⁷ SPVSP ⁵⁷ LLPLSVYTMVEGVDRONSLLLKPSPPPAP ⁵⁷ HPV ⁵⁷ L	571
Trucha	EAEMPPIPPASPVS ⁵⁷ SL ⁵⁷ LLPLSVYTMVEGVDRONSLLLKPSPPPAPQPV ⁵⁷ L	567
Dorada	ES-----DT ⁵⁷ AVSPL ⁵⁷ PPAFVY ⁵⁷ TMVEGVDRONSLLLT ⁵⁷ ENSTPAPQL ⁵⁷ IT ⁵⁷	562
S.plateado 1	TKLPLPTPTPEGYLTPDLLGNITP	593
S.japonés	TKLPLPTGTPEGYLTPDLLGNITP	595
S.plateado 2	TKLPLPTPTPEGYLTPDLLGNITP	595
Trucha	TKLPLPTPTPEGYLTPDLLGNVTP	591
Dorada	PKT---MPTPGCYLTPDLLGSITP	583

Figura 5.4. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del GHR-II de peces. Los aa idénticos aparecen sobre fondo negro mientras que los homólogos sobre fondo gris. Los residuos extracelulares de cisteína (C) y los intracelulares de tirosina (Y) se han numerado siguiendo la numeración del GHR humano. Los sitios potenciales de N-glicosilación, el motivo FGEFS, el dominio transmembrana y los dominios intracelulares BOX 1 y BOX 2 están enmarcados. Residuos intracelulares de tirosina conservados en el GHR-I, ■. Residuos adicionales de tirosina en el GHR-II, ■. Péptido señal, minúsculas.

El análisis de las secuencias de GHR-I y II en peces salmónidos y no salmónidos revela un alto grado de identidad aminoacídica (GHR-I, 50 – 80 %; GHR-II 80 – 90 %) que disminuye hasta el 29 – 31 % cuando se comparan entre sí el GHR-I y GHR-II de trucha y dorada. De hecho, el análisis filogenético, incluyendo los PRLR como “*outgroup*”, reveló dos grupos claramente diferenciados que se corresponden con los GHR de tetrápodos y de peces. A su vez, este segundo grupo se divide en dos subgrupos igualmente soportados en sus nodos; el primero con las secuencias de GHR-I y el segundo con las de GHR-II en el que se incluyen las nuevas secuencias de trucha y dorada (figura 5.5).

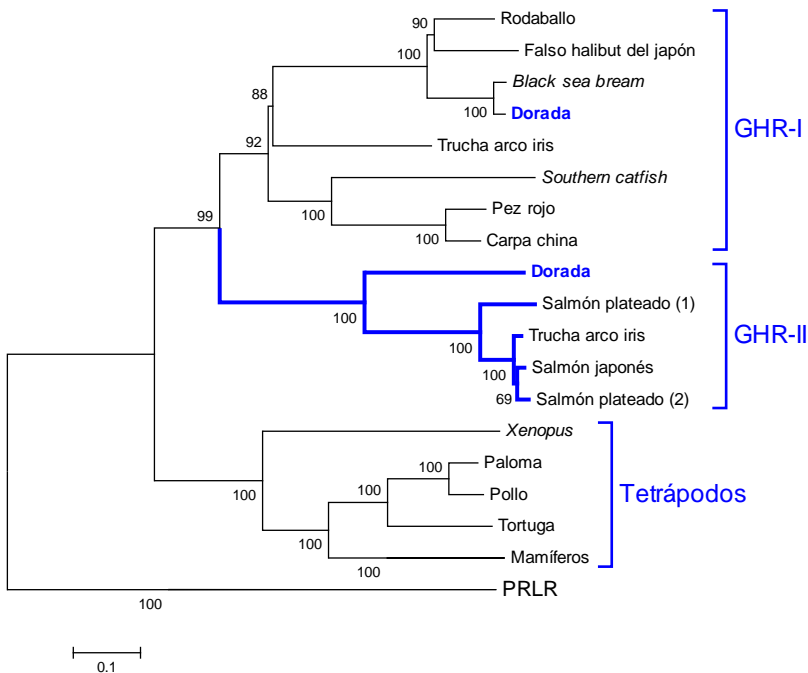


Figura 5.5. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de GHR (nº de sitios: 904), se han incluido las secuencias de PRLR como “*outgroup*”. El árbol se ha construido siguiendo el método de reconstrucción de Neighbor-Joining con el modelo de corrección de Poisson. El soporte de los nodos se ha calculado mediante Bootstrap (1000 réplicas). La ramas de mamíferos y PRLR agrupan las secuencias que aparecen en la lista de n^{os} de acceso a Genbank.

5.2. Organización genómica de los GHR de dorada

5.2.1. Sitio de inicio de la transcripción

La posición exacta del sitio de inicio de la transcripción de los GHR de dorada se determinó mediante RLM-RACE según lo descrito en el apartado 4.4. De esta manera se definió un único sitio de inicio de la transcripción para el GHR-I y GHR-II, situado a 382 o 189 pb en dirección 5' del codón que codifica para la metionina inicial.

5.2.2. Estructura exón-intrón

La determinación de la estructura exón-intrón de los GHR de dorada se abordó mediante dos técnicas diferentes (apartado 4.5: amplificación por PCR y construcción de librerías genómicas). Combinando ambas técnicas se completó la estructura exón-intrón del GHR-I, inicialmente descrita de forma parcial en Pérez-Sánchez y cols. (2002), a la vez que se describió por primera vez la estructura completa del GHR-II (**figura 5.6**).

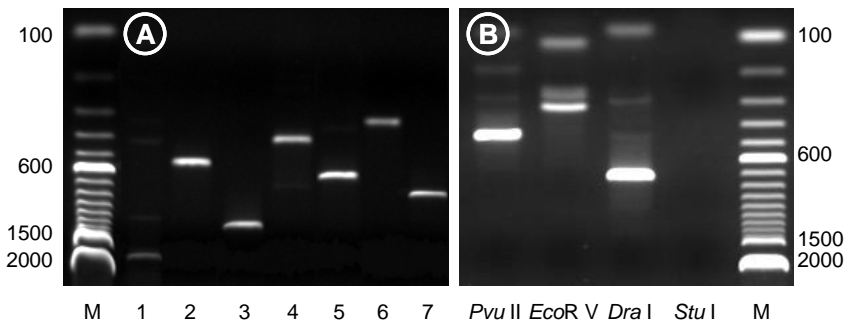


Figura 5.6. Determinación de la estructura exón-intrón del GHR-I y II de dorada. A, resultado de la aproximación por PCR usada en la determinación de la estructura del GHR-II (M, Marcador de pesos moleculares; 1, intrón entre los exones 5/6; 2, intrón 6/7; 3, intrón 7/8; 4, intrón 8/9; 5, intrón 9/10; 6, 10/10A; 7, 10A/3'UTR). B, ejemplo del resultado obtenido con las bibliotecas genómicas del GenomeWalker usadas para completar la estructura del GHR-I y II.

Ambos genes muestran una estricta conservación de las uniones exón-intrón (**figura 5.7, tabla 5.1 y 5.2**) con la salvedad del intrón 10/10A únicamente presente en el GHR-I. Así pues, los dos receptores de dorada están formados por 9/10 exónes homólogos a los descritos en el gen humano. El exón 1 codifica para la 5'UTR, el 2 para el péptido señal, los exones 4 – 7 para el dominio extracelular, el exón 8 para el dominio transmembrana y el resto de exones para el dominio intracelular y la 3'UTR (**figura 5.8**). Todas las uniones exón-intrón cumplen la regla GT-AG.

	EXÓN 2	
GHR-I	MAVFSSSSSSSSSSSSSSSSSSTSNLLLLLVSSLDWLSTRGVSFVMDHMTS	50
GHR-II	MAAA-----LTLFLCFLYL-TSSALESASEQ-----	25
	** * * * * *	
	EXÓN 4	
GHR-I	SA-PV-GPHFTECISREQETFRCWWSPPGGFHNLSPPGALRVFYLKKSPN	98
GHR-II	-WHPQRDPHLTGCVSANMETFRCRWNVGTLQNLKPGELRLFYINKLSPL	74
	* *	
	EXÓN 5	
GHR-I	S--EWKECPEYSHLKR-ECFFDVNHTSVWIPYCMQLRGQNVVTYLDEDY	144
GHR-II	DPPKEWTECPHYSIDRPNCECFNKNHTSVWTPYKVLRSRDESTLYDEN-	123
	* *	
	EXÓN 6	
GHR-I	CFTVENIVRPDPPVSLNWTLLNISPGLSYDVMVNWEPSPADVAGWMR	194
GHR-II	TFTVDAIVQDPDPVLTWTTLNESLSGTYIDIILSWKPPQSADVAMGWT	173
	* *	
	EXÓN 6	EXÓN 7
GHR-I	IBEIQYTERNTTWEALEMQPHTQQTIIYGLQIGKEYEVHRCRMQAFVK	244
GHR-II	LQYEVQYRSASSDLWHAVEPVTVTQRSLFGLKHNVNHEVVRCKMLAGKE	223
	* *	
	EXÓN 7	EXÓN 8
GHR-I	FGEFSDSVFIQVTEIPSQDSNFPFKLALIFGVLGILILLIGISQQPRRL	294
GHR-II	FGEFSDSIFVH--IPAKVSSFPVVALLLFGALCLVAILMLVIIISQQEKL	270
	* *	
	EXÓN 9	EXÓN 10
GHR-I	MMILLPPVPAPKIKGIDPELLKKGKLDLNFILSGGGMGLSTYAPDFYQ	344
GHR-II	MFILLPPVPGPKIRGIDPELLKKGKLRELTSILGGP-----PNLRPELYN	315
	* *	
	EXÓN 10	
GHR-I	DEPWVEFIEVDAEDAADAEEENQGSQTQRLLDPPQPVSHMNTGCANAV	394
GHR-II	NDPWVEFIDLDIEEQSDKLTDLDTDCLMHRSLS-----SNCTP--VSI	356
	* *	
	EXÓN 10A	
GHR-I	SFPDDDSGRASCYDPDLHDQDTLMLMATLLPQPEDGEDSFDVVERAPVI	444
GHR-II	GFRDDDSGRASCCDPDLPSPDPEASPFHPLIPNQTLSKEVSCQTASEPSSP	406
	* *	
	EXÓN 10A	
GHR-I	ERSERPLVQTQTGGPQTWLNITDFYAQVSNVMPSSGGVVLSPGQQLRFQEST	494
GHR-II	VQS---PASGEPFPAALGREAMYTVQVSEVRSSGKVLSPPEEQTEVEKTT	452
	* *	

```

                                EXÓN 10A
GHR-I  SAAEDEAOKKGGSEDSSEKTKQKELQFQLLVVDPEGSGYTTESNARQIST 544
GHR-II  -----GKDTEKDIMAEEKAKKEFQLLVVNADHGGYTSELNAGKMSP 494
          *                **                .*****.                ***.* ** .*

                                EXÓN 10A
GHR-I  PPSTPMPGSGYQTIHPQVETKPAATAENNQSPYILPDSPOSQFFAPVAD 594
GHR-II  RLSIGDQSEPLTGDLSPLP-----PASPYHESDTTAVSPLPPAPV 535
          *                *                .                ***                *                .                *

                                EXÓN 10A
GHR-I  YTVVQEVDSQHSLLLNPQRQSPPPCLPHHPKALAAMPVGYVTPDLLGN 644
GHR-II  YTVVEGVDRQNSLLLTNPSTPAPQLIIPKT----MPTPGGYLTPDLLGS 580
          ****. ** * **** *                *                .                *                * ** .*****

GHR-I  LSP 647
GHR-II  ITP 583
          ..*
    
```

Figura 5.7. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del GHR-I y II de dorada con alternancia de colores para mostrar los diferentes exones. El fondo negro indica que el corte entre ambos exones se encuentra en el codón que codifica para ese aa. Aminoácidos idénticos (*) y homólogos (.)

Tabla 5. 1. Estructura exón-intrón del GHR-I de dorada

Exón	bp	Posición en ADNc	Uniones exón-intrón	Intrón	bp
1	378	-382/-5	...ACCAACgtaagt	1/2	9100
2	158	-4/154	tcagagCATCAT...CATCAGgtaggt	2/4	>2114
4	130	155/277	tttcagCCCCCG...GAAAGAgtgagt	4/5	109
5	170	278/454	cgtcagCTCGCC...ATATCGgtcagt	5/6	993
6	179	455/633	tggcagTGCCTC...GAAGCgtaagt	6/7	685
7	154	634/787	ctgcagTTGGAG...GCCAGGgtaaga	7/8	137
8	91	788/878	tttcagACTCTA...GCCCAGgtacgt	8/9	113
9	70	879/948	ttgcagATTAAT...TAAAGgtacat	9/10	846
10	236	949/1184	ttgcagAAGGGG...CGTCAGgtactg	10/10A	95
10A	>760	1185/1944	ctccagCTTTC...		

Tabla 5. 2. Estructura exón-intrón del GHR-II de dorada

Exón	bp	Posición en ADNc	Uniones exón-intrón	Intrón	bp
1	180	-189/-10	...CCAGCGgtgagt	1/2	>404
2	85	-9/76	CTCGAC...AGCAAGgtatgt	2/4	6700
4	136	77/212	ctacagTCCACC...CAAATT	4/5	>443
5	179	213/391	ttgcagATCCCC...CCATCGgtgagt	5/6	1600
6	179	392/570	ctgcagTGCAAC...CATGCGgtgggt	6/7	221
7	145	571/715	atacagGTGGAG...CGAAAAGgtaaac	7/8	1003
8	91	716/806	ccccagTGTCGA...GGAAAAGgtacgt	8/9	267
9	70	807/876	ccaaagGTTGAT...CTCAAGgtatat	9/10	426
10	>962	877/1838	taacagAAAGGG...		

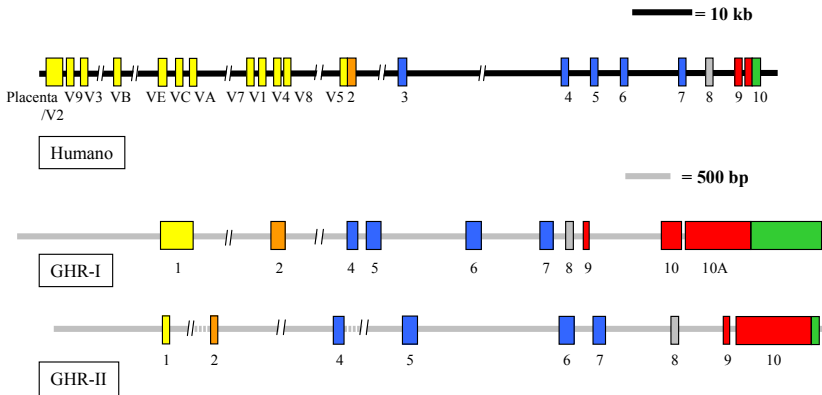


Figura 5.8. Esquema de la estructura exón-intrón del GHR-I y II de dorada y el GHR humano. Amarillo, 5'UTR. Naranja, péptido señal. Azul, dominio extracelular. Gris, dominio transmembrana. Rojo, dominio intracelular. Verde, 5'UTR

5.2.3. Región flanqueante en 5'

A partir de las librerías genómicas generadas mediante el Genome Walker se secuenciaron 1589 pb y 1262 pb en dirección 5' del inicio de transcripción del GHR-I y del GHR-II. El análisis de las secuencias obtenidas no reveló ninguna secuencia TATA cerca del sitio de inicio de la transcripción. Sin embargo, en ambos genes se detectó la presencia de secuencias similares al consenso del Inr que marcan el sitio de inicio de la transcripción. Además, se identificaron secuencias similares al consenso del “*Downstream promoter element*” (DPE), situadas 38 pb (GHR-I) y 29 pb (GHR-II) en dirección 3' del sitio de inicio de la transcripción. En la región proximal, el GHR-I también contiene un consenso CCAAT y una secuencia rica en GC (**figura 5.9**) que podría unir los factores ZBP-89 o Sp1; mientras que en el GHR-II contiene varios sitios de unión para proteínas activadoras (AP-1 y AP-4) y elementos sensibles al AMPc (CRE) (**figura 5.10**).

Otros sitios potenciales de unión de factores de transcripción fueron identificados con el paquete informático MatInspector. A modo de resumen, los resultados de este análisis se muestran en la **tabla 5.3**. Ambos genes presentan un elevado número de sitios potenciales de regulación relacionados con el desarrollo, la hematopoyesis y el sistema inmune aunque ello es especialmente evidente en el caso del GHR-I.

← **Figura 5.9.** Secuencia nucleotídica de la región flanqueante en 5' del GHR-I de dorada. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Los consensos GC, CCAAT, Inr y DPE están subrayados. Exón 1, mayúsculas.


aatgcaggcaatgctcattcagcagtctcctcattgttttgact	-1218
cattaacacaaaaancgactccactagacactaacacactacac	-1173
caaacactacanaacacactaactanacactccaaacacgctaaa	-1128
tgtcacaaatctctcaactctcaatatacgctgtccatacaccgac	-1083
cgctgctgctgtcattcatctgcctacgtcccccncacaacttc	-1038
ctgttcctcaacaaccaaacttgctgcttggacacttttcgtgaca	-993
aaagccngtttttaccatttcttctcctgcaccagacacaaagcaaa	-948
cgtgacagcaatgttcgcgaaaaagcggacattatttaccctaag	-903
tccggtttttggacgtgccgggtgcgcccggctccttcgctcgggag	-858
gtgggcccgtgtgggtgggctagcggctagcagctanctacacang	-813
aacatccacagattcctattccactttgttgcgcgctgtctccg	-768
gatctcctcagaccggaacagactcggctcggactcctttatgctc	-723
cattaatacacacaacagtcagtttagatgcaacgaaacagaacggga	-678
ccgaaccgctggcaaaatcccgggtccagctcgcgcttctgcaggt	-633
ataaatctgcttgtttcttaaggtgggctctgcagtgattggctc	-588
tgggtgcgcacgtgactgtgggtggctccgggtggacaatgcttgcga	-543
at ttgtaaagcattttatgaaataatttattaacggctcggatcat	-498
tgcagtcacaaaaaatgcgaagtcgcacacccttaaaccacgcag	-453
cagccatgttgtaagtctcaggtcagctctgatcctgatccgcaga	-408
gatatttgaggaaacacacacacacacacacacacagacagaca	-363
gacagagattccttgcttttatagagagaggatttcatgtagttt	-318
actgcatacagccagaatattactaaagtaataattactaaaaaca	-273
ctttttatatacagatacttttgactcaattactatttgtacagag	-228
AP-1	
gccttttacat tttagaaaagtacctttactccttactcaagtatga	-183
AP-1	
t ttttgagtactttggcaacactgtcagtgttcctggacagctgc	-138
AP-4	
<u>gggttgttttcctgctgtactcagactccaccgacagatggcgcc</u>	-93
AP-4	
attctctccgcctcagaaccagccgggggactattacagctgtgc	-48
AP-4	
tgctgctgctgctgctgctgctgctgggtccacacacacactcacacac	-3
 <u>acACACT</u> CACAGAGACCGTCAGCCAGGCAG <u>GGTTT</u> CTTCGACAGC	43
<u>Inr</u> CRE <u>DPE</u> CRE	
<u>GTCACCAGCTTACATGGAGCTCGGTTGAACAGTTTCTGTGTGGTT</u>	88
CRE	
CTCAGCGGGTATCTGCGGTCTGAACGCGGACTGTTAGAGTTTGTG	133
TTGTTGCAGTTGGATGAGGGAGCGGAGCTGCAGACTGCTGTCCAG	178
CGgtgagtgactctcatgtccgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtcacc	223
agctgcatgtaaagc...	238

Figura 5.10. Secuencia nucleotídica de la región flanqueante en 5' del GHR-II de dorada. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Los consensos Inr, DPE y CRE así como los de los factores AP-1 y AP-4 están subrayados. Exón 1, mayúsculas.

Tabla 5. 3. Sitios potenciales de unión de factores transcripción localizados en la región flanqueante en 5' de los GHR de dorada.

	GHR-I	GHR-II
Factores esqueléticos y de desarrollo		
Factor de union al elemento regulador Atp1a1 (AREB)	23	17
Represor transcripcional Gfi (" <i>Growth factor independence</i> ")	8	8
Proteínas con homeodominio relacionado al gen caudal de vertebrados (CDX1)	5	2
Factores hematopoyéticos, oncogénicos y antioncogénicos		
Reguladores transcripcionales celulares y virales similares a myb (c-MYB and v-MYB)	7	3
p53	3	1
Supresor de tumores de Wilms	1	1
Factores relacionados con el sistema inmune		
Familia de dedos de Zinc Ikaros (IK-2)	8	3
Proteína transformante mieloide - EVI1 (MEL1)	10	1
Factores de la leucemia mielógena aguda humana (AML1)	3	1
Factores nucleares de células T activadas (NFAT)	3	1
Proteína de unión a la secuencia rica en AT especial (SATB1)	2	5
Factores humanos y murinos ETS1 (c-ETS-1, NERF1a, Pu.1)	1	5

5.3. Modelos experimentales

5.3.1. Ayuno

La **figura 5.11** muestra el efecto del ayuno sobre la expresión de GHR-I y II en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. Con independencia del estado nutricional, la expresión del GHR-I fue notablemente más alta en hígado que en tejido adiposo y músculo. Por el contrario, la expresión del GHR-II mostró un carácter más uniforme aunque se vio afectada igualmente por el ayuno. Así pues, tanto en hígado como en tejido adiposo, el ayuno disminuyó de manera similar la expresión de ambos receptores. Sin embargo, la respuesta fue diferente a nivel muscular y el ayuno no afectó al GHR-I, pero incrementó la expresión del GHR-II.

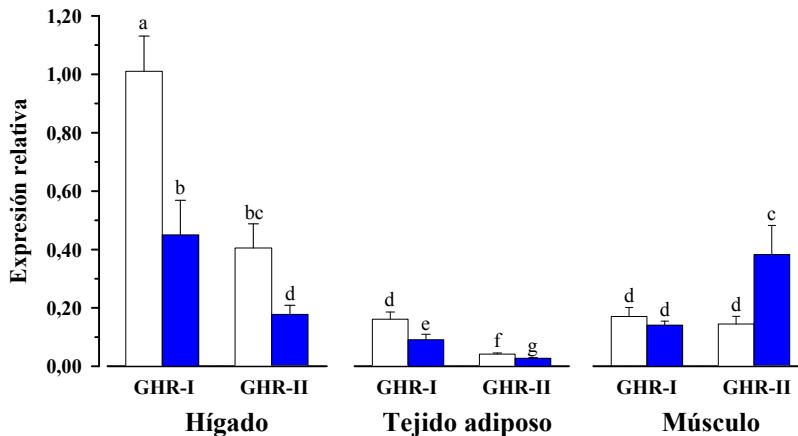


Figura 5.11. Expresión relativa del GHR-I y II en hígado, tejido adiposo visceral y músculo esquelético blanco de doradas alimentadas (blanco) o ayunadas (azul). El valor más alto se ha tomado como referencia para la normalización de los datos. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 6 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

5.3.2. Estación

Los niveles circulantes de GH e IGF-I variaron conjuntamente siguiendo los cambios estacionales en los factores ambientales y las tasas de crecimiento. De acuerdo con ello, las concentraciones más altas de GH (**figura 5.12C**) e IGF-I (**figura 5.12D**) se alcanzaron con el pico estival de crecimiento (**figura 5.12B**).

A nivel hepático, los transcritos de GHR-I incrementaron a la vez que las tasas de crecimiento llegando al máximo de expresión en julio (**figura 5.13A**). Sin embargo, en tejido adiposo (**figura 5.13B**) y músculo (**figura 5.13C**), la máxima expresión se dio en enero. En hígado, el GHR-II siguió el mismo patrón de expresión que el GHR-I (**figura 5.13D**), pero en tejido adiposo y músculo mostró un comportamiento diferencial. Así pues, en tejido adiposo el pico de expresión del GHR-II se alcanzó en julio (**figura 5.13E**), mientras que en músculo la expresión de este receptor se mantuvo alta de enero a julio (**figura 5.13F**).

El patrón de expresión de IGF también presentó variaciones específicas según la estación y el tejido. A nivel hepático, la mayor expresión de IGF-I se dio en julio (**figura 5.14A**), estando estrechamente correlacionada con los niveles circulantes de IGF-I ($r=0,77$ y $P<0,001$) y la expresión en hígado de GHR-I ($r=0,703$ y $P<0,05$) y GHR-II ($r=0,804$ y $P<0,001$). La expresión extrahepática de IGF-I (tejido adiposo y músculo) fue uno o dos ordenes de magnitud menor que la hepática, y no se encontraron diferencias significativas con la época del año (**figura 5.14B y C**).

La expresión de IGF-II no presentó cambios estacionales a nivel hepático (**figura 5.14D**). Sin embargo, su expresión en los tejidos periféricos se mantuvo relativamente alta mostrando en enero un máximo de expresión en tejido adiposo y músculo (**figura 5.14E y F**). De hecho, se encontró una correlación positiva entre la expresión de IGF-II y el GHR-I en músculo ($r=0,479$ y $P<0,001$) y tejido adiposo ($r=0,528$ y $P<0,05$).

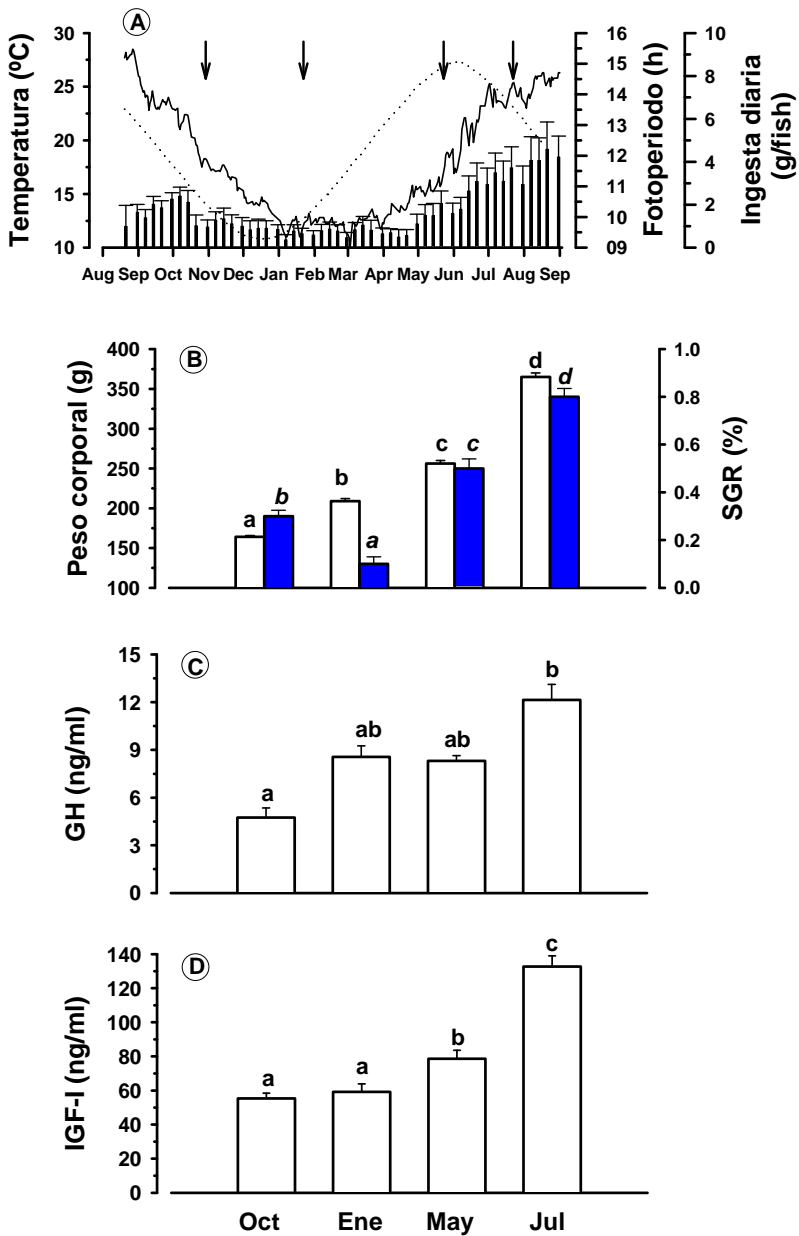


Figura 5.12. Cambios estacionales en la temperatura (línea continua), el fotoperiodo (línea de puntos) y la ingesta diaria por pez (barras) a lo largo del periodo experimental. Las flechas indican los puntos de muestreo (A). Peso corporal (blanco) y tasa instantánea de crecimiento (SGR; azul) en los puntos de muestreo (B), niveles plasmáticos de GH (C) e IGF-I (D). Los parámetros de crecimiento son la media de tres tanques y los datos de hormonas son la media de 10 peces (media \pm error estándar). Valores con distintas letras son significativamente diferentes (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

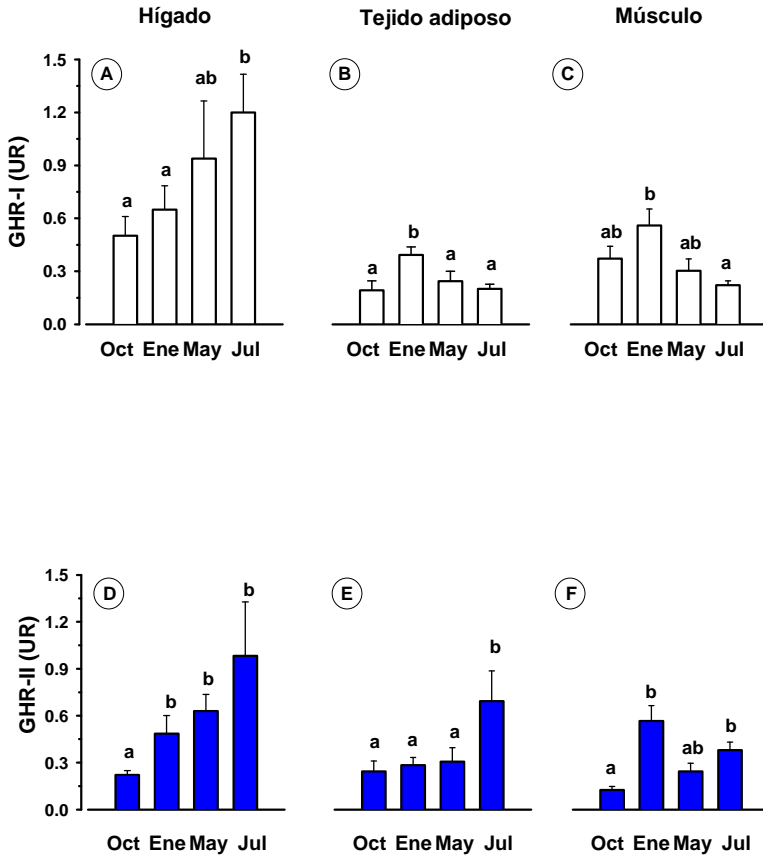


Figura 5.13. Cambios estacionales en la expresión relativa (unidades relativas, UR) del GHR-I y II de dorada. Los datos de cada gen se han normalizado independientemente y se representan como la media \pm error estándar de 6 peces. Valores con distintas letras indican diferencias significativas dentro de cada tejido (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

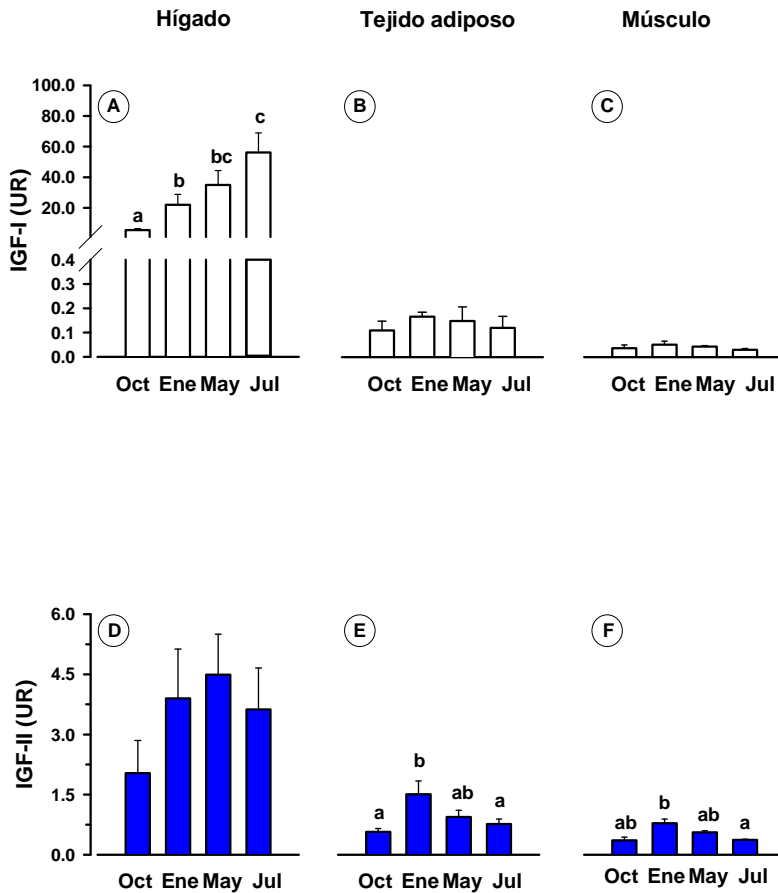


Figura 5.14. Cambios estacionales en la expresión relativa (unidades relativas, UR) de IGF-I y II de dorada. Los datos de cada gen se han normalizado independientemente y se representan como la media \pm error estándar de 6 peces. Valores con distintas letras indican diferencias significativas dentro de cada tejido (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

5.3.3. Edad

Las tasas de crecimiento así como los niveles circulantes de GH e IGF-I disminuyeron progresiva y significativamente con la edad al comparar entre sí individuos de 1, 2 y 3 años (**figura 5.15**).

Los peces de mayor edad también mostraron una disminución de la expresión de GHR-I a nivel hepático (**figura 5.16A**). No se encontraron variaciones en el tejido adiposo (**figura 5.16B**), pero la expresión de GHR-I aumentó significativamente con la edad a nivel muscular (**figura 5.16C**). El GHR-II no mostró cambios significativos de expresión con la edad en ninguno de los tejidos analizados (**figura 5.16D, E y F**).

La expresión hepática de IGF-I disminuyó significativamente con la edad (**figura 5.17A**). Esta tendencia fue opuesta a la del músculo (**figura 5.17C**), por lo que se dio una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la expresión de IGF-I y la de GHR-I a nivel hepático ($r=0,602$ y $P<0,05$) y muscular ($r=0,626$ y $P<0,05$). El patrón de expresión de IGF-II fue similar al de IGF-I, pero no se detectaron diferencias significativas con la edad debido, en gran parte, al mayor grado de variación individual (**figura 5.17**).

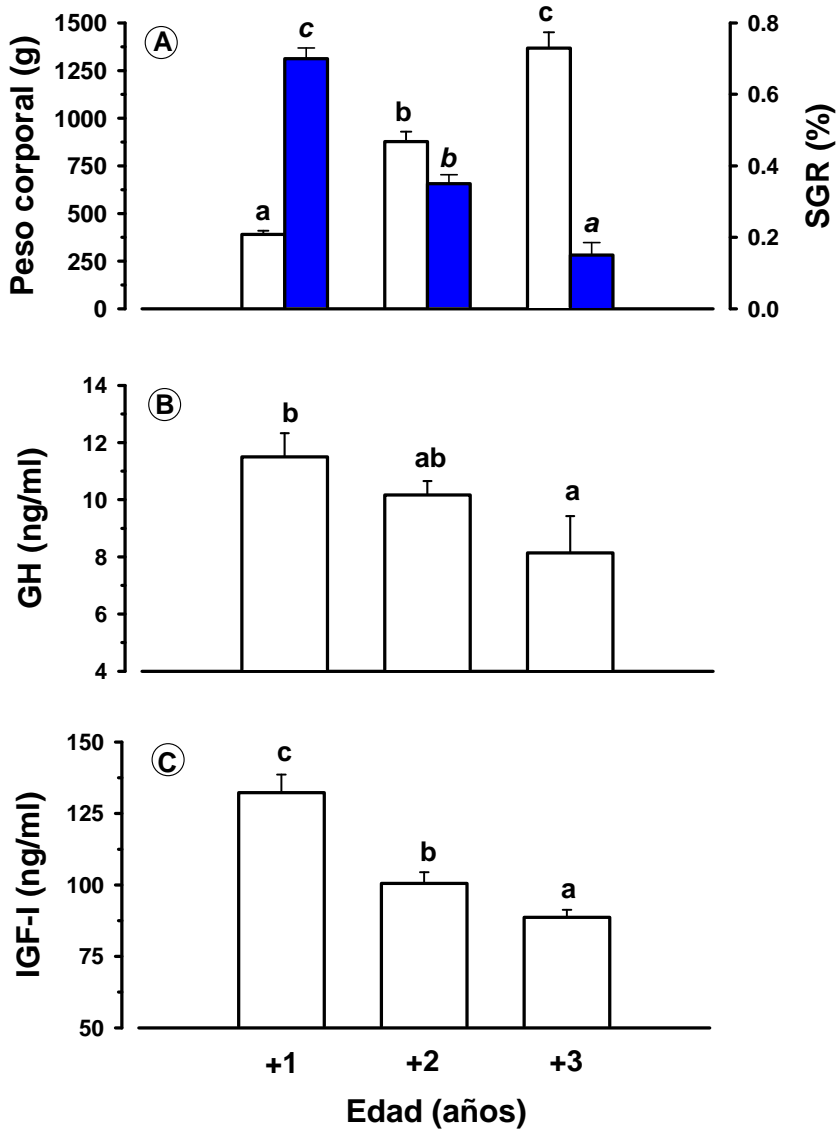


Figura 5.15. A, efecto de la edad sobre el peso corporal (blanco) y la tasa instantánea de crecimiento (SGR; azul); B, niveles plasmáticos de GH; C, niveles plasmáticos de IGF-I. Los parámetros de crecimiento son la media de tres tanques mientras que los datos de hormonas son la media de 10 peces (media \pm error estándar). Valores con distintas letras son significativamente diferentes (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

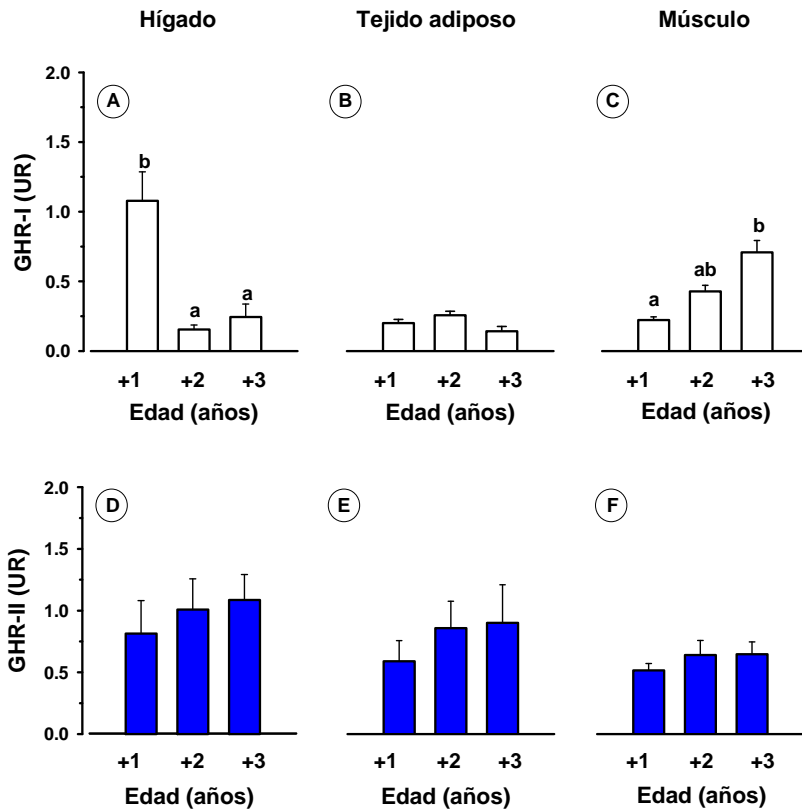


Figura 5.16. Efecto de la edad sobre la expresión relativa (unidades relativas, UR) del GHR-I y II de dorada. Los datos de cada gen se han normalizado independientemente y se representan como la media \pm error estándar de 6 peces. En cada tejido, valores con distintas letras son significativamente diferentes (Student-Newman-Keuls, $P < 0.05$).

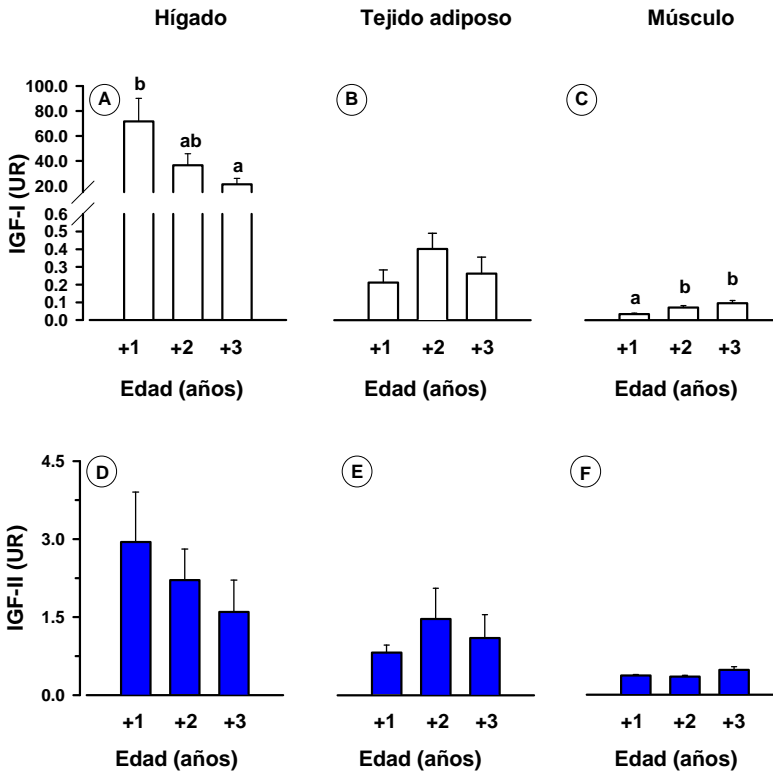


Figura 5.17. Efectos de la edad sobre la expresión relativa (unidades relativas, UR) de IGF-I y II de dorada. Los datos de cada gen se han normalizado independientemente y se representan como la media \pm error estándar de 6 peces. En cada tejido, valores con distintas letras son significativamente diferentes (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

5.3.4. Reto frente a parásito

5.3.4.1. Progresión de la infección

En el modelo de infección por *Enteromyxum leei* los peces control estuvieron en todo momento libres de infección. En los peces receptores, la prevalencia e intensidad media de infección incrementó progresivamente a lo largo de la experiencia, alcanzando un 68% de prevalencia y una alta intensidad de infección en el último punto de muestreo (113 días) como muestra la **tabla 5.4**. Así pues, al final de la experiencia los animales muestreados se dividieron en 3 grupos correspondientes a controles (n=14), receptores no parasitados (n=9) y receptores parasitados (n=19).

Tabla 5.4. Análisis de la progresión de la infección en los peces expuestos a *E. leei*. P, prevalencia; MI, intensidad media de infección.

Días	Peso corporal (g) ^a		Infección por <i>E. leei</i> en peces receptores	
	Controles	Receptores	P (%)	MI
0	134,0 (6)	134,5 (6)	0	—
27	139,3 (16)	141,2 (16)	12,5	Baja
50	148,3 (16)	155,8 (16)	18,8	Media
90 ^b	170,3 (28)	172,9 (28)	53,6	—
113	181,1 (14)	178,3 (28)	67,8	Alta

^a entre paréntesis se indica el número de peces muestreados

^b MI se calcula mediante el análisis histológico y dado que a los 90 días solo se analizó la prevalencia de infección mediante PCR no se puede calcular

En las primeras etapas de la infección, la mayoría de los parásitos se encontraron en estadio de célula primaria, en ocasiones secundaria, pero siempre localizados en la parte basal del epitelio intestinal (**figura 5.18A**). En el último punto de muestreo la mayoría de los peces infectados presentaban esporoblastos y/o esporas maduras infiltrados/as en el epitelio intestinal (**figura 5.18B**). De hecho, los cortes histológicos de estos peces revelaron una elevada afectación del epitelio intestinal y los estadios parasitarios ocupaban extensas áreas, apareciendo enterocitos parcialmente desubicados y con el núcleo hipertrofiado. Además, se encontró una gran tasa de infiltración de granulocitos eosinófilos en la mucosa y submucosa intestinal así como abundantes células rodlet.

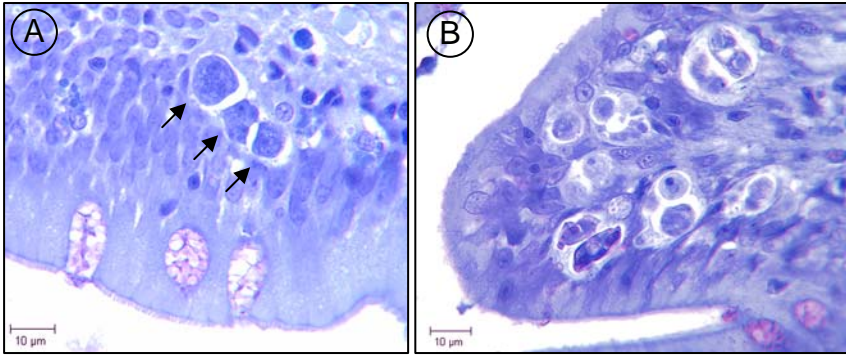


Figura 5.18. Secciones histológicas de intestino de doradas parasitadas con *E. lei* a los 27 (A) y 113 (B) días post-exposición. Las flechas indican estadios proliferativos del parásito.

5.3.4.2. Análisis de la expresión génica

La expresión relativa de los GHR e IGF se analizó en el riñón anterior de peces receptores parasitados y no parasitados, normalizándose los resultados con respecto a los valores detectados en los peces control.

La expresión de GHR-I disminuyó significativamente en los peces receptores parasitados, pero aumentó significativamente en los peces receptores no parasitados (**figura 5.19**). En la misma figura se muestra que el patrón de expresión de IGF-I fue similar al de GHR-I tanto en peces receptores parasitados como en no parasitados. De esta manera, la expresión de IGF-I disminuyó significativamente en los peces receptores parasitados y aumentó significativamente en los peces receptores no parasitados. Por el contrario, tanto el GHR-II como la IGF-II no se vieron afectados por la exposición al patógeno en los peces parasitados ni en los no parasitados (**figura 5.19**).

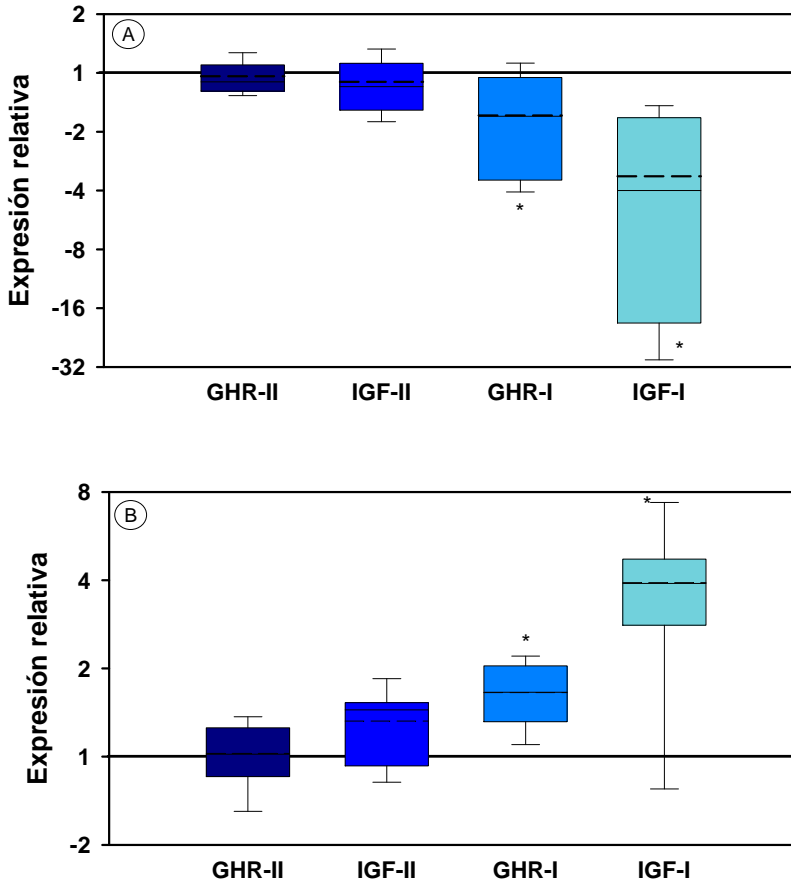


Figura 5.19. Efecto de la exposición a *E. leei* sobre la expresión relativa del GHR-I, GHR-II, IGF-I e IGF-II en riñón anterior de doradas receptoras parasitadas (A) y no parasitadas (B) tras 113 días de exposición. La expresión de cada gen se ha normalizado respecto a la expresión de sí mismo en los peces control (1 indica que no hay cambios de expresión, 2 indica una expresión dos veces mayor y -2 dos veces menor). La línea continua indica la mediana y la discontinua la media (n=8). Las diferencias con el grupo control se analizaron mediante el test de la t de Student (*, $P < 0,05$).

5.3.5. Estrés por confinamiento

5.3.5.1. Marcadores plasmáticos de estrés

En el modelo de estrés por confinamiento los niveles plasmáticos de cortisol y glucosa se analizaron como marcadores convencionales de estrés.

Los niveles de cortisol en los peces control (< 3 ng/ml) no variaron significativamente a lo largo de la experiencia (**figura 5.20A**). Los peces estresados mostraron un pico de 60 – 70 ng/ml tras 1,5 horas de confinamiento, recuperándose los niveles de los controles a las 6 horas post-confinamiento. Después de 24 horas de confinamiento, los peces estresados mostraron un segundo pico de cortisol (~ 70 ng/ml) con una recuperación de los niveles basales a las 120 horas post-confinamiento.

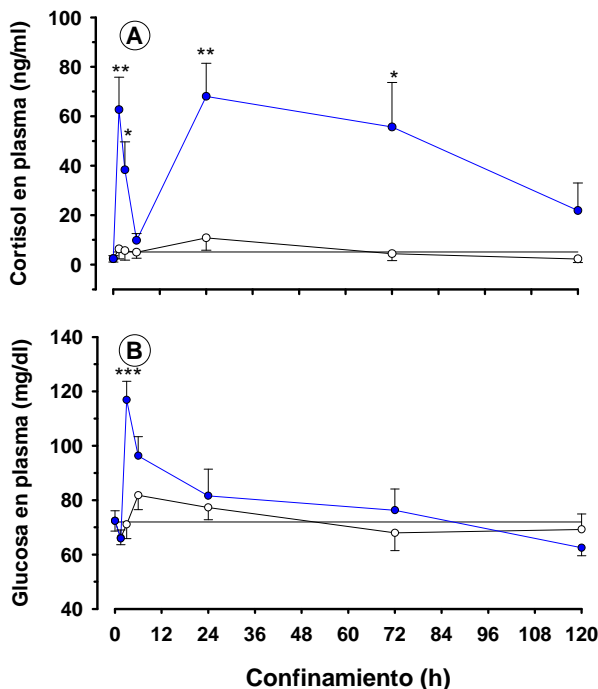


Figura 5.20. Efecto del estrés por confinamiento sobre los niveles plasmáticos de cortisol (A) y glucosa (B) en doradas control (blanco) y estresadas (azul). Los valores se representan como la media ± error estándar de 6-8 animales. La línea horizontal representa la media de los valores de los peces control. En cada punto de muestreo, las diferencias entre controles y estresados se analizaron mediante el test de la t de Student (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Los niveles plasmáticos de glucosa en los peces control no mostraron variaciones significativas en el transcurso de la experiencia. En los peces estresados, la glucemia se duplicó a las 3 horas post-confinamiento, recuperándose los valores basales a las 24 horas post-confinamiento (**figura 5.20B**).

5.3.5.2. Eje GH-IGF

Los peces control y estresados ayunaron durante la experiencia de estrés por confinamiento y la concentración plasmática de GH aumentó significativamente a las 72 y 120 horas post-confinamiento (**figura 5.21A**). Este incremento de GH estuvo parcialmente enmascarado por el confinamiento, por lo que los peces estresados mostraron niveles más bajos en los 2 últimos puntos de muestreo (72 y 120 horas post-confinamiento).

En los controles, los niveles más bajos de IGF-I se detectaron en el último punto de muestreo (120 horas post-confinamiento; **figura 5.21B**). A las 6, 24 y 72 horas post-confinamiento los niveles de IGF-I fueron significativamente más bajos en los peces estresados que en los controles, recuperándose los valores control a las 120 horas post-confinamiento.

A las 6, 24, 72 y 120 horas post-confinamiento, la expresión de GHR-I no se vio afectada por el estrés por confinamiento (**figura 5.22A**). A las 6 horas post-confinamiento, el estrés por confinamiento no modificó la expresión hepática de GHR-II pero la disminuyó posteriormente (**figura 5.22B**). Esta reducción en el número de transcritos que codifican para el GHR-II fue estadísticamente significativa a las 24 y 120 horas post-confinamiento.

La **figura 5.23** muestra el efecto del confinamiento sobre la expresión hepática de IGF-I e IGF-II. En ambos casos, se observó una reducción estadísticamente significativa a las 24 horas post-confinamiento con una recuperación de los niveles basales en los muestreos posteriores, aunque a las 120 horas post-confinamiento todavía se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Estos cambios en la expresión de IGF-I ($r=0,605$ y $P<0,05$) y la expresión de IGF-II ($r=0,514$ y $P<0,05$) estuvieron correlacionados con la expresión hepática de GHR-I.

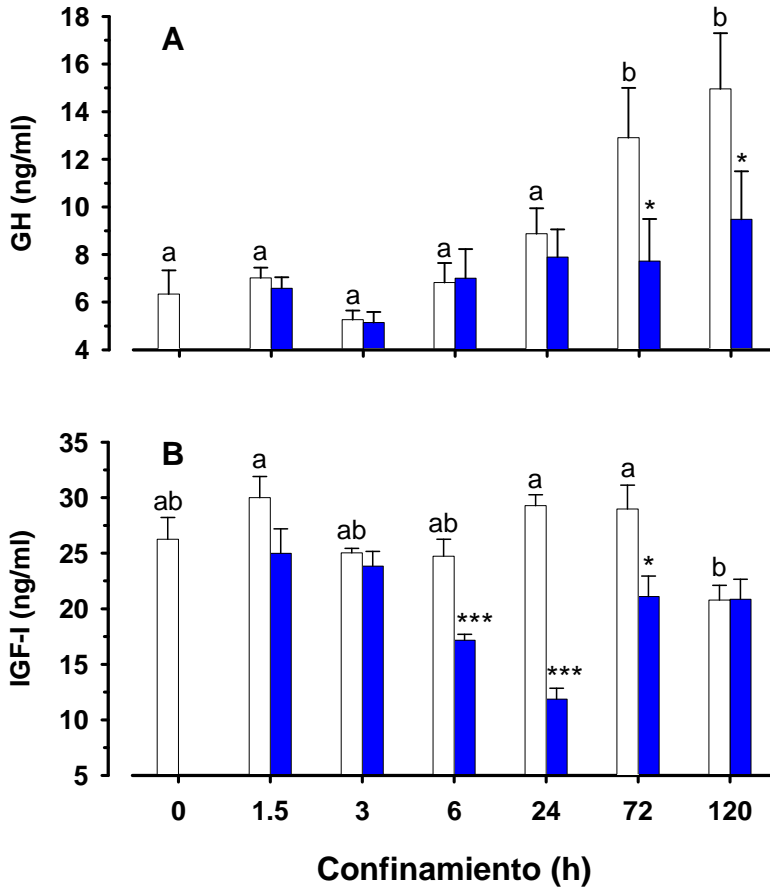


Figura 5.21. Efecto del estrés por confinamiento sobre los niveles plasmáticos de GH (A) e IGF-I (B) en doradas control (blanco) y estresadas (azul). Los valores se representan como la media \pm error estándar de 6-8 animales. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con el tiempo de muestreo en los peces control (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$). En cada punto de muestreo, las diferencias entre valores de peces control y estresados se analizaron mediante el test de la t de Student (*, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$).

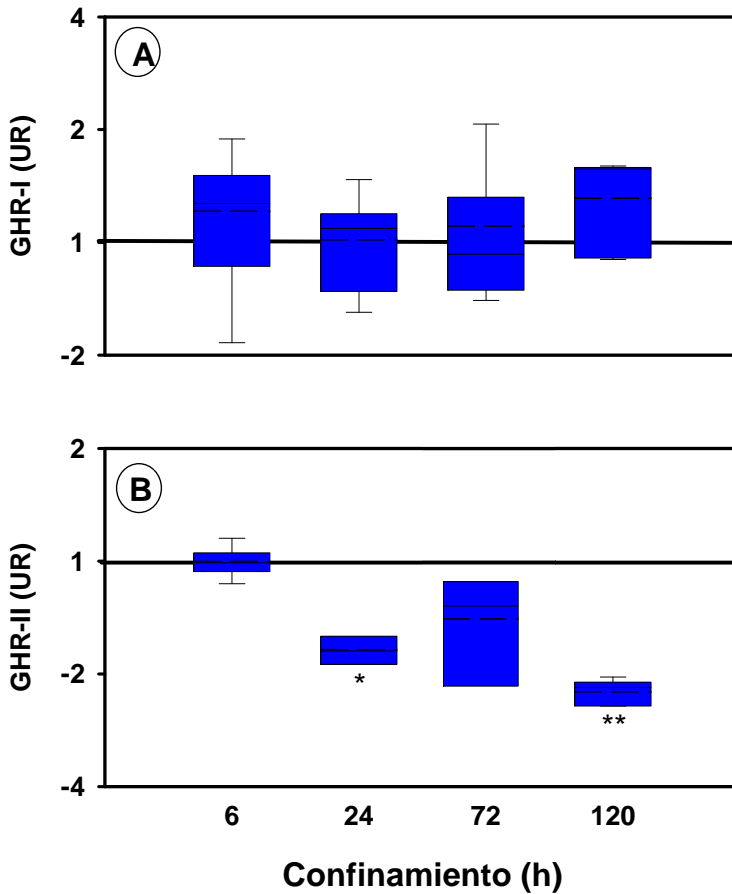


Figura 5.22. Efecto del estrés por confinamiento sobre la expresión relativa (unidades relativas, UR) de GHR-I (A) y GHR-II (B) en hígado de dorada. En cada punto de muestreo, la expresión génica se ha normalizado con respecto a los valores de los peces control en ese mismo punto (1 indica que no hay cambios de expresión, 2 indica una expresión dos veces mayor y -2 dos veces menor). La línea continua indica la mediana y la discontinua la media ($n=8$). En cada punto de muestreo, las diferencias con el grupo control se analizaron mediante el test de la *t* de Student (*, $P<0,05$; **, $P<0,01$).

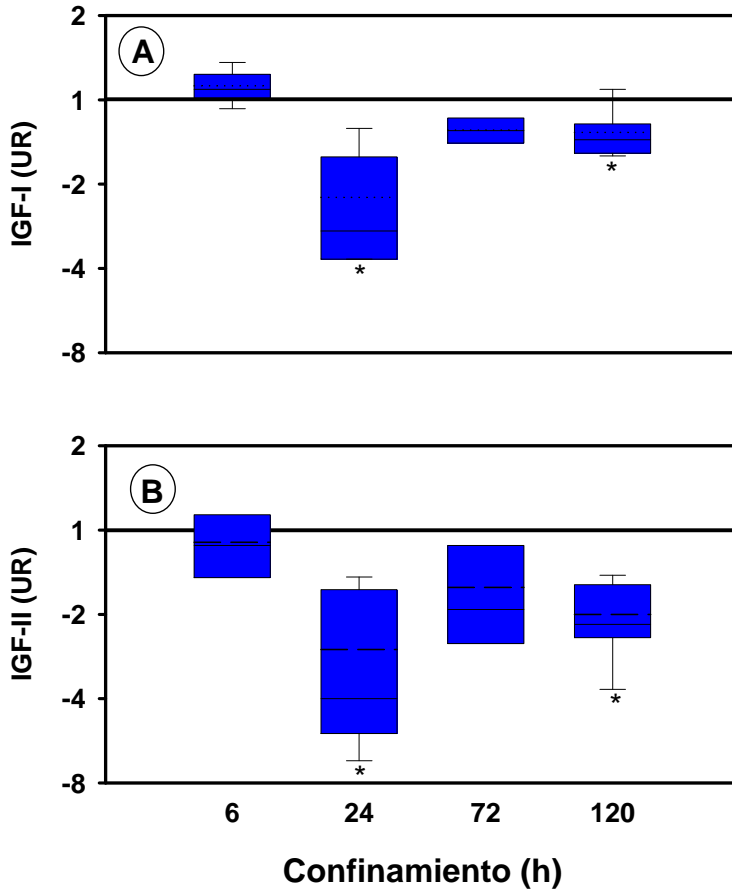


Figura 5.23. Efecto del estrés por confinamiento sobre la expresión relativa (unidades relativas, UR) de IGF-I (A) e IGF-II (B) en hígado de dorada. En cada punto de muestreo, la expresión génica se ha normalizado respecto a la expresión de los peces control en ese mismo punto (1 indica que no hay cambios de expresión, 2 indica una expresión dos veces mayor y -2 dos veces menor). La línea continua indica la mediana y la discontinua la media ($n=8$). En cada punto de muestreo, las diferencias con el grupo control se han analizado mediante el test de la t de Student (*, $P<0,05$).

5.4. Anexo: Resumen de las correlaciones

A modo de resumen, en la **tabla 5.5** se incluyen las correlaciones entre los niveles plasmáticos de GH e IGF-I así como la expresión de IGF-I, IGF-II, GHR-I y GHR-II en diferentes tejidos de doradas de las experiencias de estación, edad y estrés por confinamiento.

Tabla 5. 5. Resumen de las correlaciones encontradas en las diferentes experiencias. Coeficiente de correlación, r. P valor, P.

Estación		r	P
Sangre	GH vs. IGF-I	0,68	< 0,001
Hígado	GHR-I vs. IGF-I	0,703	<0,05
	GHR-II vs. IGF-I	0,804	< 0,001
	GHR-I vs. GHR-II	0,711	< 0,001
Sangre/hígado	IGF-I vs. IGF-I ¹	0,77	< 0,001
Tejido adiposo	GHR-I vs. IGF-II	0,528	<0,05
Músculo	GHR-I vs. IGF-II	0,479	< 0,001
Edad			
Sangre	GH vs. IGF-I	0,544	<0,05
Hígado	GHR-I vs. IGF-I	0,682	<0,05
Sangre/hígado	IGF-I vs. IGF-I ¹	0,782	< 0,001
Músculo	GHR-I vs. IGF-I	0,626	<0,05
Estrés			
Hígado	GHR-II vs. IGF-I	0,605	<0,05
	GHR-II vs. IGF-II	0,514	<0,05

¹ Correlación entre IGF-I circulante y expresión hepática de la misma

6. Discusión

6.1. Duplicación del GHR en el genoma de peces....	129
6.2. Organización genómica de los GHR de peces ...	135
6.2.1. Sitio de inicio de la transcripción y región flanqueante en 5'	140
6.3. Regulación transcripcional de los GHR de dorada	144

6.1. Duplicación del GHR en el genoma de peces

Los resultados de la presente Tesis Doctoral mostraron la presencia de dos genes que codifican para sendos GHR en el genoma de peces. Así pues, el GHR-II de trucha presenta un bajo nivel de identidad aminoacídica (46 %) con el GHR-I previamente descrito en trucha. Sin embargo, esta identidad aumenta considerablemente (86 – 97 %) cuando se compara con los GHR descritos inicialmente en salmónidos (GHR-II). De igual manera, los fragmentos clonados en lubina y dorada presentan un mayor grado de identidad con los GHR-II (48 % lubina, 60 % dorada) que con los GHR-I (30 % lubina, ~ 40 % dorada). Estos resultados se ven apoyados por los análisis filogenéticos (**figura 5.5**) y las predicciones de las bases genómicas de fugu y pez cebra. Con posterioridad, la duplicación del GHR ha sido confirmada por diferentes autores en otras especies de peces como *black sea bream*, *southern catfish* y tilapia del Nilo (Jiao y cols., 2006), dentón (Bermejo-Nogales y cols., 2007), la medaka (Fukamachi y cols., 2005), el mero de pintas naranjas (Li y cols., 2007), la tilapia de Mozambique (Pierce y cols., 2007) y salmón del Atlántico (Benedet y cols., 2008). Es más, la duplicación del GHR resulta especialmente evidente al realizar un nuevo análisis filogenético con todas las secuencias actualmente disponibles (**figura 6.1**).

Nuestros resultados también sugieren un silenciamiento y/o pérdida genómica del GHR-II en los peces planos. Este fenómeno podría estar relacionado con la presencia de formas truncadas de GHR-I en estas especies, que al carecer de la mayor parte de la región intracelular tendrían una función inhibitoria (Calduch-Giner y cols., 2001; Nakao y cols., 2004). Sin embargo, esta hipótesis queda descartada tras la reciente publicación o deposición en las bases de datos de Genbank de secuencias parciales de GHR-II del fletán del Atlántico (Hildahl y cols., 2008) y *tongue sole* (**figura 6.2**).

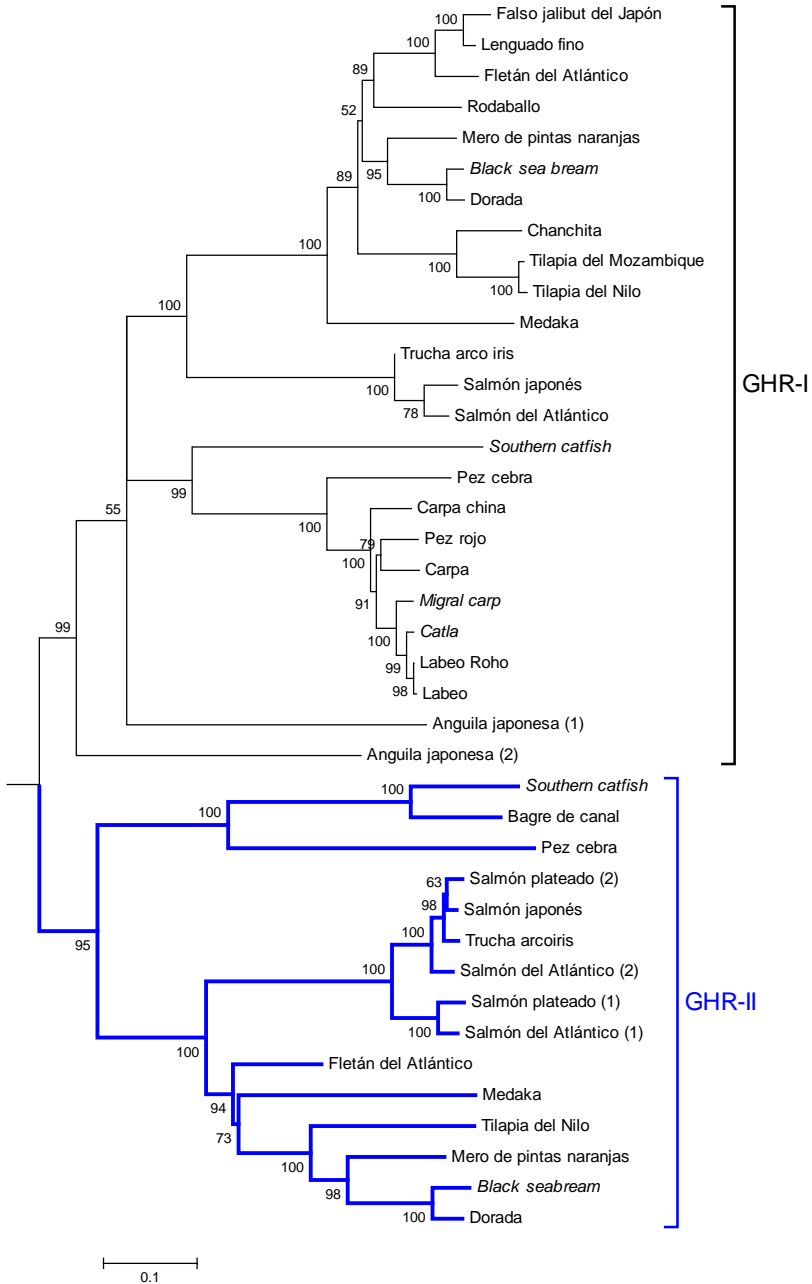


Figura 6.1. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de los GHR disponibles en la actualidad (nº de sitios: 1000). La reconstrucción incluye las secuencias de tetrápodos y las de PRLR (“outgroup”); se muestra únicamente la parte correspondiente a los peces teleósteos. El árbol se ha construido siguiendo el método de reconstrucción de Neighbor-Joining con el modelo de corrección de Poisson. El soporte de los nodos se ha calculado mediante Bootstrap (1000 réplicas).

Trucha	MATSHILFLCLVLIITVVSQEPPTSEQALPQIRPQTGCVSHDMNTFRCRWNVG	54
Dorada	MAAA--LTILFCLYLILTSSALESASEOVHPQRDPHLTGCVSANMETFRCRWNVG	52
Sole	MVAACLGSILFLLNIFAVLPVGSASLEDVPRQPHLIGCVSANMETFRCRWNVG	54
Fletán	MAPAAPLAVLVLC-----LHFFFASTQVLPERRPHITGCVSNMETFRCRWNVG	49
Trucha	TFQNLTEPGDLRFYIINDTNTIS-PKEWSECPNYMADRIDECCFNESYTKVWVIT	107
Dorada	TLQNLKPKGELRLRFYINKLSPLDPPKEWTECPHYSIDRPNECCFNKNNHTSVWTP	106
Sole	TFQNLKPKGDLRLFYINKKSP LAPPLDWSECPHYITDRPNECCFNETYTSVWTY	108
Fletán	TFQNLSEPGALRLRFYFNKIPSPDSPKNWSECPHYSTERPNECCFNKNNHTVWVIT	103
Trucha	YSVQLRSGDQDNLYDEVIPTVEDIVEPDPPIALNWTLNLVGLTIGSHEDIMVSWE	161
Dorada	YKVLQRSRDESTLYDENTFTVDAIVQPPPPVDLITWTLNLSLSGTYDYDILSWK	160
Sole	YSVQLRSRGGYVLYDEDEFNVQDIVQPPPVNLKMLLNVSVSSTYYDIMVSWK	162
Fletán	YSVQLHSADRITVLYDEDDLIVQDIVQPPAFSLNWTLNLVNSSTGTHYDIMLSWK	157
Trucha	PPHSADVSMGWMTLQYEVQYREVNSTLWRMNVNLEKGRORSLYGLRTNTDHEVRV	215
Dorada	PPQSAADVAMGWMTLQYEVQYRSASDLDWHAVEPVTVTQRSLFGLKHNVNHEVRV	214
Sole	PPESADVEMGWMTLQYEVQYRDLNAEEWLITVDLVKSTHRSLYGLQSSVNHEIRV	216
Fletán	PPESADVCMGWMRLQYEVQHRDVSNDLWKASELVLSTHRSLYGLQTNVNHEVRV	211
Trucha	RCKTLASRNFGFEFSDPIVTHIPTKEISRFPVTVLLVFAALGLAVILILVIVSQQQ	269
Dorada	RCKMLAGKEFGEFSDSIFVHIPAKVSSFPVVALLLFGALCLVAIIMLVIIISQQE	268
Sole	RCKMLAGKDFGGEFSSIFVHIPSKVSRFPVMGLLIFGALCLVAIIMLVIIISQQE	270
Fletán	RCKMFAAKDFGEFSDSIFVHIPSKVSRFPVVALLIFGALGLAAILMLVLIISQQE	265
		GHR-2
Trucha	KLMFILLPPVPGPKIKGIDPELFFKKGKLAELTSLGDDHDPDLRPELYCEDPWVEF	323
Dorada	KLMFILLPPVPGPKIRGIDPELLKKGKRELTSILGGPPNLRPELYNNDPWVEF	322
Sole	KLMFILLPPVPGPKIKGIDPELLKQCKLRELKSLILGGPPDLRPELYNSDPWVEY	324
Fletán	KLMFILLPPVPGP-----	278
Trucha	IELDMEEPNDRLTELDTCCLMDRTPSSDCPELITIGFCDDDSGRASCCDPLP-E	376
Dorada	IDLDTEEQSDPKLTLDTDCMLHRSLSSNCTPVSIGFRDDDSGRASCCDPLPSD	376
Sole	IDLDLIDKHNDRLSEHDNNFTVDHSVSDNCL---IGFRDDDSGRASCCDPLPIE	375
Fletán	-----	-
Trucha	PEAFELSNTPSLEBS-----GASTEASSPVQTPTKCMTLWAVPGREDLYTQVS	425
Dorada	PEASPFHPLIPNQILSKEVSCQTASEPSSPVQSPASGEPPEAFALGREAMYTOVS	430
Sole	PEVLNFHPLIPN--LSREI--YSEAFQPCLEPQSLVTEAP-----GSDEAMYTOVS	422
Fletán	-----	-
		GHR-3
Trucha	EVRPTEGEVLLMPEEOSKVEKDAQKAKE--GKEKEKPKRKEFOLLVFNADGGGYT	477
Dorada	EVRSSGKVLSPPEOTEVEKTIIGKDEKDIMAEKEKAKKEFOLLVFNADHGGGYT	484
Sole	EVRSSGKVLSPPEQAEALNPSSQNT-----	448
Fletán	-----	-
Trucha	TELDAGKMSAKLPTEGRGSPAPTEDSRLVQGPFGEYQSLYFEAEMPPIPPASP	531
Dorada	SELNAGKMSPRLSIGDQSEPGLICDLSPAPP-----ASPYHESDT-----IA	526
Sole	-----	-
Fletán	-----	-

```

Trucha VSLLLELSVYTVVEGVDRQNSLLKPSPPAPQPVLTKLPLPTPTPEGYLTPDL 585
Dorada VSPLPEAPVYTVVEGVDRQNSLLTENSTPAPQLIIPKT---MPTPEGYLTPDL 577
Sole -----
Fletán -----

Trucha LCNVTP 591
Dorada LGSITP 583
Sole -----
Fletán -----

```

Figura 6.2. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del GHR-II de trucha arco iris, dorada, *tongue sole* y fletán de Atlántico. Aminoácidos idénticos, fondo negro. Aminoácidos homólogos, fondo gris. Se indica la posición de los cebadores GHR-2 y GHR-3 usados en la secuenciación del GHR-II de dorada, lubina y trucha.

Con independencia del nivel de identidad aminoacídica, los GHR de dorada y otras especies de peces presentan importantes diferencias en lo que respecta a motivos estructurales típicamente conservados en los GHR. En la región extracelular, la diferencia más notable es la ausencia de un tercer puente disulfuro en el GHR-II. La función de los puentes disulfuro intramoleculares es mantener la estructura tridimensional de la proteína (Mathews y van Holde, 1998). Por tanto, la ausencia de alguno de ellos podría dar lugar a una diferente conformación de la región extracelular (**figura 6.3**) y alterar las interacciones ligando-receptor. Estudios de mutagénesis-dirigida en el GHR de conejo (van den Eijnden y cols., 2006) indican que el primer puente disulfuro es importante en la maduración del receptor, mientras que el segundo lo es en la unión del ligando. Por el contrario, las mutaciones que eliminan el tercer puente disulfuro no afectan de forma aparente el proceso de señalización intracelular.

De esta manera, aunque los GHR de peces puedan presentar una diferente conformación tridimensional en su región extracelular, la presencia o ausencia del tercer puente disulfuro parece no afectar significativamente a su funcionalidad. Así pues, el GHR-I de pez rojo (Lee y cols., 2001), el GHR-I de *black sea bream* (Tse y cols., 2003) y el GHR-II del salmón del Atlántico (Benedet y cols., 2005) son capaces de estimular la proliferación celular y la actividad del promotor Spi 2.1 en estudios de cotransfección tras el tratamiento con GH. Trabajos posteriores tanto con el GHR-I como con el GHR-II de *black sea*

bream, muestran que el GHR-I es capaz de activar los promotores Spi 2.1, β -caseína y c-fos; mientras que el GHR-II activa el Spi 2.1 y β -caseína pero no el c-fos (Jiao y cols., 2006).

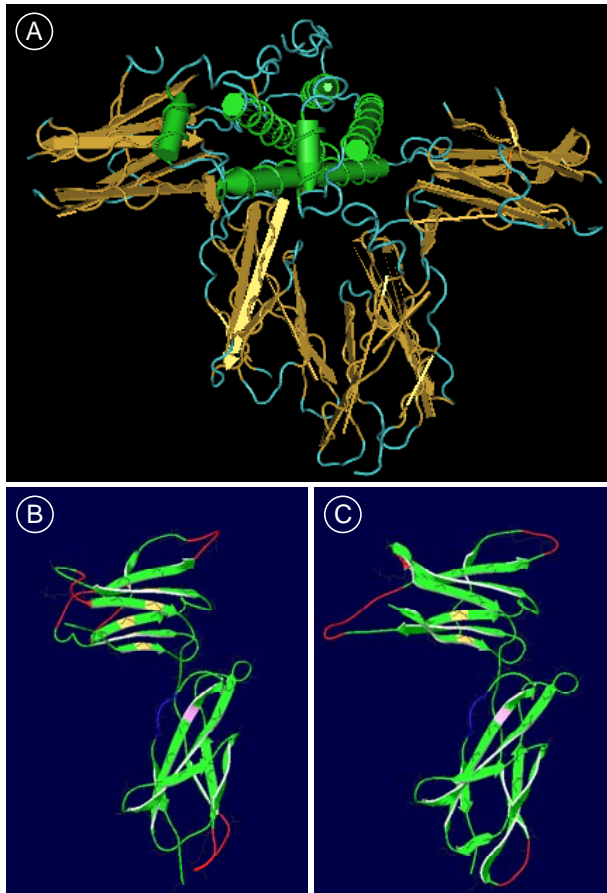


Figura 6.3. Estructura del complejo formado por la GH y la región extracelular de dos GHR humanos (A) (de Vos y cols., 1992). Representación de la estructura de la región extracelular del GHR-I (B) y GHR-II (C) de dorada predicha por el Swiss-modelling server (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>). Amarillo, residuos de cisteína que forman puentes disulfuro. Púrpura, residuo de cisteína que forma puentes disulfuro inter-moleculares. Azul, motivo FGEFS.

Los dos receptores de peces conservan los motivos BOX 1 y BOX 2 y varios residuos de tirosina, de manera similar a su homólogo en tetrápodos (Kopchick y Andry, 2000). Como se ha comentado en la introducción (apartado 2.2.2), las tirosinas de la región intracelular se fosforilan tras la unión de la hormona con el receptor sirviendo de punto de anclaje para los componentes de la cascada de señalización intracelular (Argetsinger y Carter-Su, 1996). Estudios de sustitución de estos residuos de tirosina por otros de fenilalanina muestran que los residuos 487, 534, 566 y 627 son necesarios para la activación transcripcional mediada por STAT5. Sin embargo, la presencia de uno de ellos es suficiente (Hansen y cols., 1996; Wang y cols., 1996). En peces, el patrón de residuos de tirosina difiere entre ambos receptores, apareciendo unos residuos conservados en ambos receptores y otros específicos de cada receptor (**figura 2.18**). Aunque no podemos excluir que exista cierta redundancia en el uso de los residuos de tirosina, este patrón diferencial podría generar diferencias en la transmisión de la señal descritas en *black sea bream* (Jiao y cols., 2006).

La duplicación de genes e incluso de genomas enteros es uno de los mecanismos que permiten la incorporación de cambios y/o nuevas funciones a través de la evolución de los seres vivos (Taylor y cols., 2001; Wagner, 2001). Así, la poliploidía es un fenómeno de sobra conocido en peces y se han propuesto de 2 a 6 rondas de duplicación genómica (**figura 6.4**) a lo largo de su evolución (Volf, 2005; Zhou y cols., 2002). Los salmónidos, entre otras especies, están considerados tetraploides recientes, pudiendo ser éste el origen de las diferentes isoformas de GHR-II descritas en este orden de teleósteos (Very y cols., 2005; Benedet y cols., 2005). Sin embargo, la duplicación que



Figura 6.4. Esquema de las diferentes rondas de duplicación genómica sufridas a lo largo de la evolución y especiación de los peces. Modificado de Zhou y cols. (2002).

dio lugar a la aparición del GHR-I y GHR-II debió suceder tras la separación de los linajes de los condrosteos y los neopterigios (ver **figura 2.2**), ya que se ha detectado la presencia de ambos receptores en todos los peces teleósteos, pero no en pez pulmonado o esturión (Fukamachi y Meyer, 2007), en los que aparece un único GHR (**figura 6.5**).

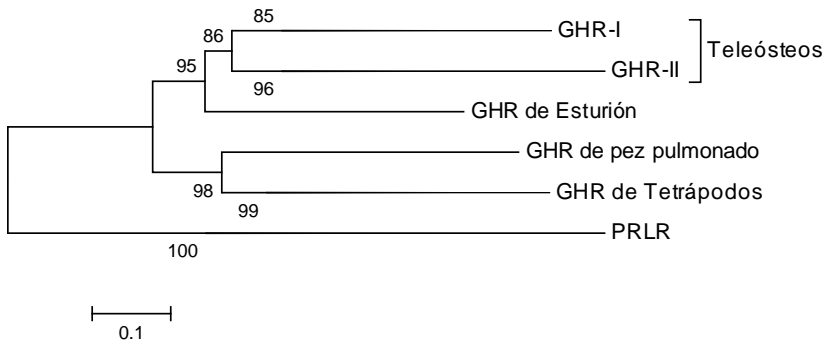


Figura 6.5. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de los GHR de peces teleósteos, esturión, pez pulmonado y tetrápodos junto con las de los PRLR (“*outgroup*”). Las ramas de GHR-I, GHR-II y tetrápodos se han agrupado. El árbol se ha construido siguiendo el método de reconstrucción de Neighbor-Joining (nº de sitios: 987) con el modelo de corrección de Poisson. El soporte de los nodos se ha calculado mediante Bootstrap (1000 réplicas).

6.2. Organización genómica de los GHR de peces

La estructura del GHR se ha conservado notablemente a lo largo de la evolución de los vertebrados. Este hecho se aprecia perfectamente al comparar los GHR de dorada y rodaballo con el GHR de mamíferos y aves (**figura 6.6**). De hecho, los GHR-I y II de dorada presentan una estricta conservación de los puntos de unión entre los diferentes exones (**figura 5.7**). Esta conservación se da también en el GHR-I de rodaballo (Pérez-Sánchez y cols., 2002) y del falso halibut del Japón (Nakao y cols., 2004) (**figura 6.7**). De esta manera, uno o varios exones codifican para la 5’UTR. El exón 2 codifica para el péptido señal. Los exones 3, 4, 5, 6 y 7 codifican para la región extracelular. El exón 8 codifica para la región transmembrana y los exones restantes codifican para la región intracelular y la 3’UTR.

Una excepción es el GHR-II de bagre del canal (Small y cols., 2006). En este GHR aparecen fusionados los exones 5 y 6 por un lado; y los exones 7, 8 y 9 por otro (**figura 6.6 y 6.7**).

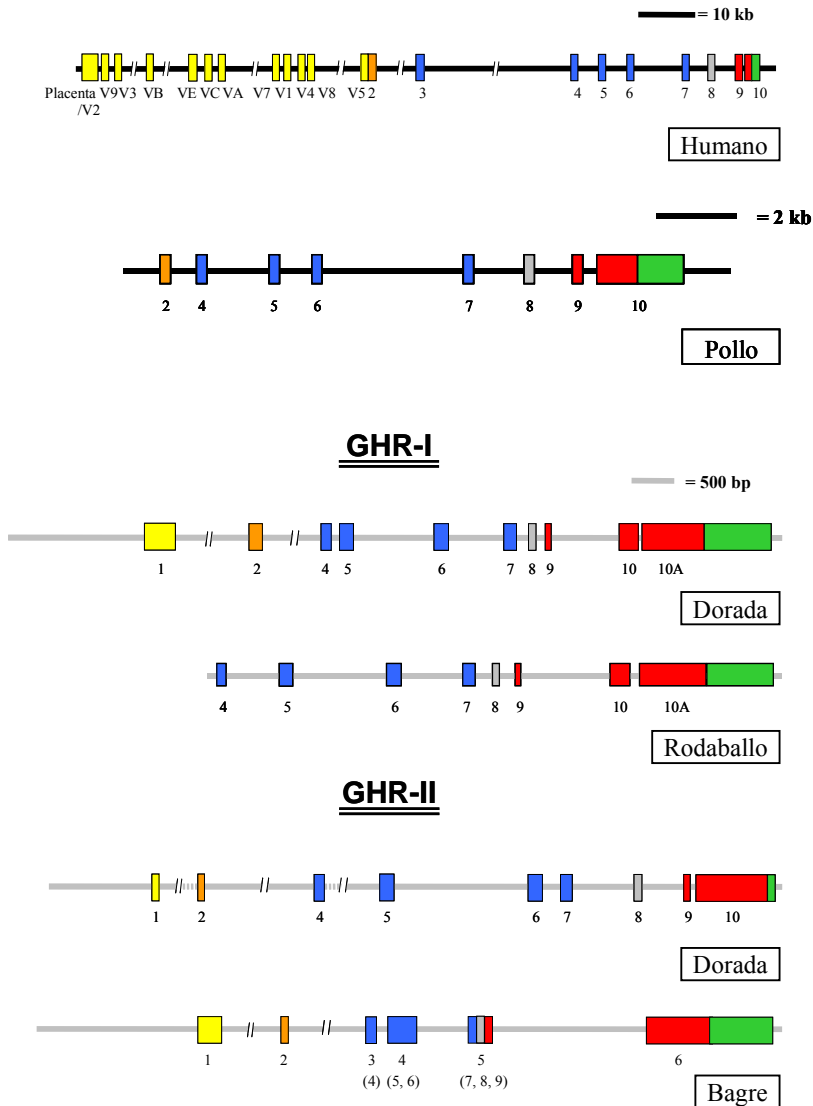


Figura 6.6. Esquema de la organización exón-intrón de los GHR de dorada, rodaballo (Pérez-Sánchez y cols., 2002), bagre del canal (Small y cols., 2006), pollo y hombre (Edens y Talamantes, 1998). Amarillo, 5'UTR; naranja, péptido señal; azul, dominio extracelular; gris, dominio transmembrana; rojo, dominio intracelular; verde, 5'UTR. La numeración se corresponde con la del gen humano, en bagre se indica entre paréntesis.

EXÓN 10/10A (EXÓN 7, b)			
hGHR	EESDTRLLSSD-----HEKSHSN-LGVKGDSDGRTSCCEPDILETDF	399	
rGHR-I	QGSDTQRLALALSQPVSHHMNIGCSNAISFPDDDSGRASCYDPDLLDQET	403	
dGHR-I	QGSDTQRLDPPQPVSHHMNTGCANAVSFPDDDSGRASCYDPDLHDQDT	416	
dGHR-II	TDLDTDCMLHRS-----LSSNCTPVSIGFRDDDSGRASCCDPDLPSDPE	378	
bGHR-II	EGLDTPLLFDKS-----HVSDSPPTSSGFQDDDSGRASCCDPDLSDHDH	378	
EXÓN 10/10A (EXÓN 7, b)			
hGHR	NANDIHEGTSEVAQPQRLKGEADLLCLDQKNQNNSPYHDACPATQQPSV	448	
rGHR-I	LMLMATLLPGQPE-----GGEASLDVEEGASASERSKRAL	438	
dGHR-I	LMLMATLLPGQPE-----DGEDSFVVERAPVIERSERPL	451	
dGHR-II	ASPFHPLIPNQTL-----SKEVSCQTASEPSSP-----	406	
bGHR-II	QDANHPSTSAQDC-----FHTFIPPENLGLSLQP-----	406	
EXÓN 10/10A (EXÓN 7, b)			
hGHR	IQAENKPKQPLPTEGAESTHQAAHIQLSNPSSLSNIDFYAQVSDITPAG	497	
rGHR-I	IQTQTAGPQ-----TWVNTDFYAQVSNVMPSG	465	
dGHR-I	VQTQTGGPQ-----TWLNTDFYAQVSNVMPSG	478	
dGHR-II	VQSPASGEF-----PFAALGREAMYTQVSEVRSSG	436	
bGHR-II	VVSPAQEP-----AWQNSIYSQVAEIMPCG	431	
EXÓN 10/10A (EXÓN 7, b)			
hGHR	SVVLSPGQK---NKAGMSQCDMHPPEMVS LCQEN-----FLM	530	
rGHR-I	GVVLSPGQQLRIQESTSATEEEKQKNIKESEDRGDEKKQKELQFQLLV	514	
dGHR-I	GVVLSPGQQLRFQESTSAAEDEAQKKGKGS EDS---EEKTQKELQFQLLV	526	
dGHR-II	KVLLSPEEQTEVEKTTGKDKTEKDIMA EKEKAKK-----EFQLLV	476	
bGHR-II	ETLLFPEQ-----NVTDCSVQNKAEYKE-----KNPWMMV	462	
EXÓN 10/10A (EXÓN 7, b)			
hGHR	DNAYFCEADAKKCIPVAPHIKVESHIQPSLNQEDIYITTESLTTAAGRP	579	
rGHR-I	DPEGSGYATESHARQIGTPPSSPMPGEGYQ TILPR--QRRPNPQWIDNQ	561	
dGHR-I	DPEGSGYTTESNARQISTPPSTPMPGSGYQ TILPQPVETKPAATAENNQ	575	
dGHR-II	NADHGGYTSELNAGKMSPRLSIGDQSE PGLTGDLSP---LPPASPYHES	522	
bGHR-II	TLNERGYSTNEPSSSTANPESESN---STPQQCQNPIA---QPEVTPILSA	507	
EXÓN 10/10A (EXÓN 7, b)			
hGHR	GTGEHVPGSE---MPVPDYTSIHIVQSPQGLLILNATALPLP-----	617	
rGHR-I	SPYIAPDSPQFQF SAPVSDYTVVQEV DTEHSLLLNPPPHQSTPPCLPQH	610	
dGHR-I	SPYILPDS PQSQF FAPVADYTVVQEVDSQHSLLLNPPPRQSPPPCLPHH	624	
dGHR-II	DTTAVSPLPP-----APVYTVVEGVDRQNSLLLT PNSTPA-----PQL	560	
bGHR-II	FPILTMPNF-----PVYTMVDGVGWKDSLVLKAS-----	536	
EXÓN 10/10A (EXÓN 7, b)			
hGHR	--DKEFLSSCGYVSTDQLNKIMP	638	
rGHR-I	PFKALPAMPVGYITPDLLGHLSP	633	
dGHR-I	PTKALAAMPVGYVTPDLLGNLSP	647	
dGHR-II	IIPKTMPTPGGYLTPDLLGSITP	583	
bGHR-II	-----KHPGGYLTPELLDSITPNK	555	

Figura 6.7. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del GHR humano (hGHR), GHR-I de dorada (dGHR-I) y rodaballo (rGHR-I) y del GHR-II de dorada (dGHR-II) y bagre del canal (bGHR-II). Los diferentes exones se muestran alternando el color de fondo. Dado que no se conoce el corte entre los exones 2 y 4 de rodaballo ambos aparecen en blanco. El fondo negro indica que la unión entre ambos exones se encuentra en el codón que codifica para ese aa. En la parte superior se indica la numeración de los exones en base a las secuencias de dorada, si hay variaciones en el hombre (h) o bagre del canal (b) se indica entre paréntesis.

Los GHR de aves (Edens y Talamantes, 1998) y peces (inclusive dorada) no contienen un exón homólogo al exón 3 del GHR humano. Incluso en el hombre, se ha demostrado la existencia de isoformas que no contienen este exón. Estas isoformas son generadas mediante procesamiento alternativo y no causan detrimentos aparentes en el desarrollo postnatal (Pantel y cols., 2003). Sin embargo, aparecen diferencias sutiles en crecimiento fetal, índices de adiposidad y respuesta al tratamiento con GH (Binder y cols., 2008; Seidel y cols., 2003; Kratzsch y cols., 2001). Estos datos apuntan a que, sin ser indispensable, este exón podría modular la acción del GHR en humanos. Estudios en marsupiales y monotremas muestran la ausencia de un exón homólogo al 3 (Menzies y cols., 2008). Por tanto, la inserción de este exón ocurrió en los mamíferos, tras la divergencia entre marsupiales y mamíferos placentarios (**figura 6.8**).

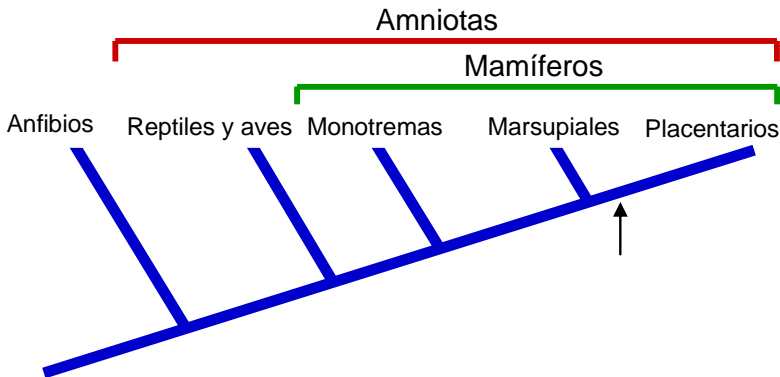


Figura 6.8. Cladograma de la evolución de los tetrápodos. La flecha marca el punto en el que se inserta el exón 3 en el GHR, tras la divergencia de los marsupiales y los placentarios (euterios).

El GHR-I de los peces presenta un intrón adicional (10/10A) en el extremo C-terminal (**figura 2.16** y **6.17**) que no aparece en el resto de organismos (Pérez-Sánchez y cols., 2002; Tse y cols., 2003). Las formas largas descritas en *black sea bream* son generadas mediante un procesamiento alternativo que no elimina este intrón. Este intrón no aparece en el GHR-II (**figura 5.7, 5.8, 6.7** y **6.8**), por lo que se insertó probablemente tras la duplicación y divergencia de los GHR de los peces.

No se han detectado formas alternativas generadas por procesamiento alternativo en el GHR-I (Calduch-Giner y cols.,

2003) ni en el GHR-II de dorada (presente Tesis Doctoral). Así pues, además de la forma completa del GHR, únicamente se han descrito formas truncadas en peces planos (Calduch-Giner y cols., 2001; Hildahl y cols., 2007; Nakao y cols., 2004) y la forma larga de *black sea bream* (Tse y cols., 2003). De todas maneras, no podemos descartar la presencia en peces de formas solubles (GHBP) generadas mediante procesos proteolíticos, de forma similar a lo descrito en mamíferos (Kopchick y Andry, 2000).

6.2.1. Sitio de inicio de la transcripción y región flanqueante en 5'

Los GHR de mamíferos y aves presentan varios exones que codifican para las diferentes 5'UTR alternativas. Cada uno de estos exones se une al exón 2 mediante procesamiento alternativo (Orlovskii y cols., 2004; Edens y Talamantes, 1998; Goodyer y cols., 2001). En el hombre, estas variantes aparecen agrupadas en dos bloques, una se expresa mayoritariamente en hígado y la otra muestra un patrón ubicuo (Goodyer y cols., 2001; Orlovskii y cols., 2004). Esta organización parece estar conservada en el resto de mamíferos (**figura 6.9**), aunque el número de variantes descritas varía entre especies (ver el apartado 2.2.2.2). Así pues, la 5'UTR de expresión ubicua – V2 de humanos (Pekhletsy y cols., 1992), L2 de ratón (Southard y cols., 1995), GHR2 de rata (Domene y cols., 1995) y 1B de rumiantes (Adams, 1995; Heap y cols., 1996) – contiene un consenso CCAAT y una secuencia rica en GC (con sitios de unión para Sp1) en el promotor (Goodyer y cols., 2001; Moffat y cols., 2000). Por otra parte, la 5'UTR específica de hígado – V1 de humanos (Pekhletsy y cols., 1992), L1 de ratón (Southard y cols., 1995), GHR1 de rata (Domene y cols., 1995) y 1A de rumiantes (Adams y cols., 1990; Heap y cols., 1996) – presenta un consenso TATA funcional (Goodyer y cols., 2001).

Esta estructura tan compleja contrasta con la de dorada, dos genes con un único sitio de inicio de la transcripción cada uno. Tampoco aparecen consensos TATA cerca del sitio de inicio de la transcripción en ninguno de los dos GHR de dorada. Sin embargo, aparecen secuencias similares al Inr, tal y como se ha descrito para la 5'UTR ubicua en el GHR

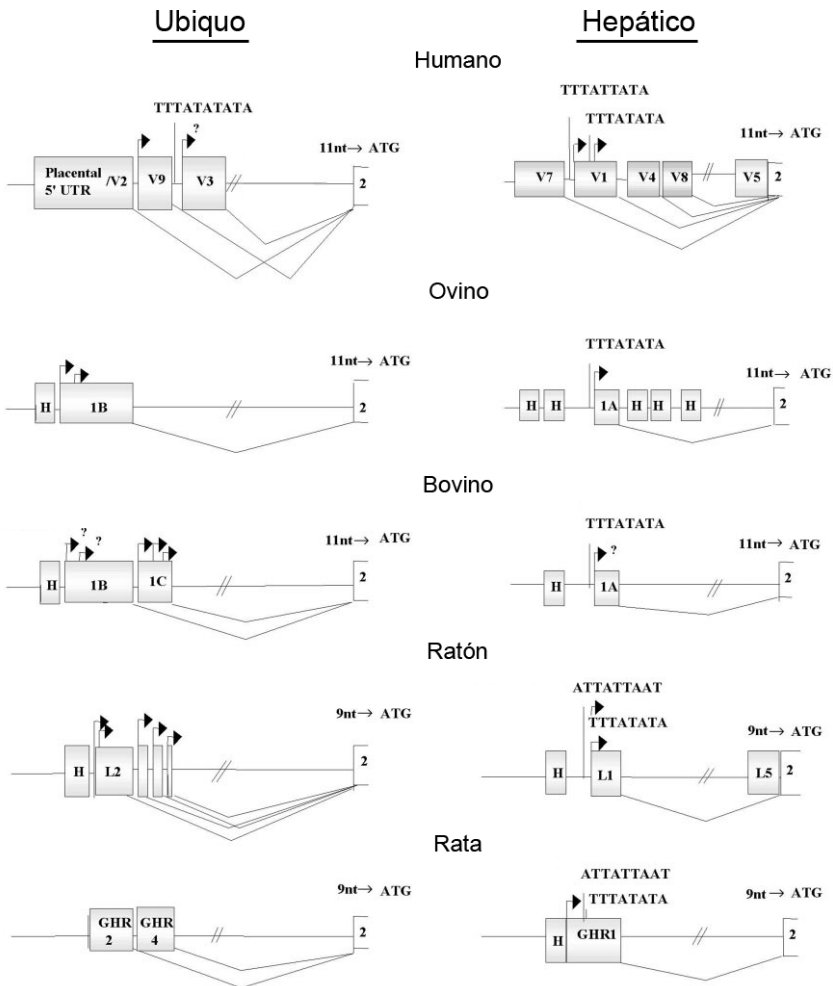


Figura 6.9. Esquema de las variantes de 5'UTR en diferentes mamíferos separadas según pertenecen al bloque de expresión ubícuo o hepático. Las regiones que muestran una alta homología con las 5'UTR humanas y no se han descrito como variantes aparecen marcadas con una H. Se indican los sitios de inicio de la transcripción con una flecha. Modificado de Goodyer y cols. (2001).

bovino, ovino y de ratón (Jiang y cols., 2000). El Inr es un elemento funcionalmente similar al consenso TATA que contiene el sitio de inicio de la transcripción (Smale, 1997). Por consiguiente, parece que el inicio de la transcripción del GHR está marcado en mamíferos y peces por secuencias similares al Inr, inicialmente subestimadas en el genoma de los metazoos (Gross y Oelgeschläger, 2006). El Inr suele ir asociado con el DPE (**figura 6.10**) y los GHR de dorada no son una excepción.

Es más, según Smale y Kadonaga (2003) ambos elementos dirigen el inicio de la transcripción sin la necesidad de un consenso TATA.

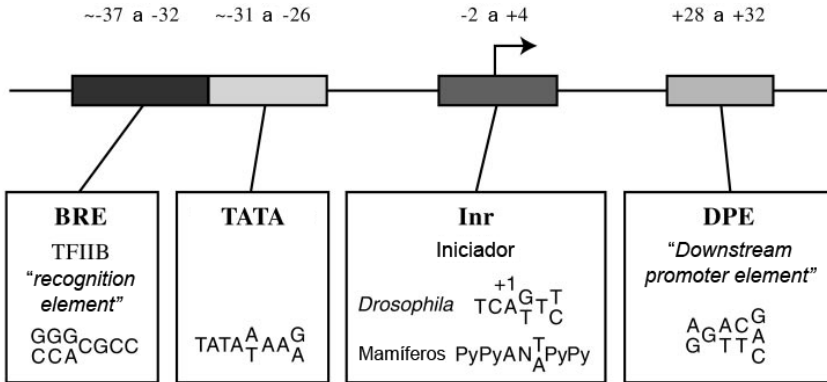


Figura 6.10. Esquema de algunos de los elementos que contribuyen a la transcripción basal de los promotores. Los consensos TATA o Inr pueden funcionar en ausencia de cualquiera de los otros tres, sin embargo el consenso DPE necesita la presencia de un Inr. El consenso BRE, asociado con el TATA, funciona como represor transcripcional. Modificado de Smale y Kadonaga (2003).

Los promotores que no contienen un consenso TATA suelen presentar consensos CCAAT. Los CCAAT aparecen en cualquier orientación entre las posiciones -60 y -80 del sitio de inicio de la transcripción. Además, están conservados entre especies (Mantovani, 1999). Los CCAAT normalmente están rodeados de otros elementos importantes para la actividad del promotor (como Sp1, Wright y cols., 1995) y su interacción es necesaria (Mantovani, 1999). La presencia de zonas ricas en GC (sitios de unión de factores como Sp1) también es común en este tipo de promotores. Así, se han identificado tanto sitios CCAAT como Sp1 funcionales en los promotores de las variantes ubicuas del GHR de mamíferos (Goodyer y cols., 2001). También se ha descrito la presencia de sitios de unión funcionales del factor ZBP-89 en el promotor de la variante 1A bovina (Xu y cols., 2006). En la presente Tesis Doctoral también se muestra la presencia de un consenso CCAAT y una zona rica en GC (con posibles sitios de unión para los factores Sp1 y ZBP-89) en la región flanqueante en 5' del GHR-I de dorada (**figura 5.9**). La presencia de estos elementos sugiere que el control de su transcripción puede estar mediado por mecanismos similares a los descritos en mamíferos.

La diferente organización genómica de peces y mamíferos no es exclusiva del GHR. Un ejemplo bien estudiado es el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF). MITF presenta varias isoformas en mamíferos y aves. Estas isoformas se generan a partir de un único gen a través del uso de promotores alternativos. Por el contrario, en pez cebrá y fugu aparecen dos genes que se corresponden con cada una de las isoformas de mamíferos y aves. Ambas isoformas son necesarias en peces para desarrollar la función de MITF (Lister y cols., 2001; Altschmied y cols., 2002). De hecho, la evolución de estos genes sigue el modelo de subfuncionalización; según el cual tras una duplicación génica cada gen resultante retiene parte de las funciones originales, siendo ambos necesarios (Lynch y Force, 2000).

La gran cantidad de factores encontrados en la región flanqueante del GHR-I y II de dorada (**tabla 5.3**) refleja el carácter pleiotrópico de la GH. Así, la GH, además de regular el crecimiento, está implicada en: a) la respuesta inmune de dorada (Calduch-Giner y cols., 1997) y otras especies (Harris y Bird, 2000; Yada y Nakanishi, 2002); b) el desarrollo (Wargelius y cols., 2005); c) la hematopoyesis (Calduch-Giner y cols., 1995), y procesos tumorales (Yakar y cols., 2005). Es de reseñar la mayor densidad de posibles sitios de unión de factores de transcripción en el GHR-I, lo que sugiere mecanismos de regulación más complejos.

De cualquier forma, en el GHR-II de dorada aparecen una serie de elementos (AP y CRE) que no están presentes en el GHR-I. Estos factores están relacionados con la respuesta al estrés. El consenso CRE interactúa con la familia de factores ATF/CREB (Hai y Hartman, 2001), todos ellos factores relacionados con la respuesta al estrés (Hai y cols., 1999; Andrisani, 1999; Harding y cols., 2003). De hecho, el factor ATF3 se ha descrito como un represor transcripcional ligado a la respuesta hepática al estrés (Allen-Jennings y cols., 2002). AP-1 y AP-4 pueden actuar como represores transcripcionales (Abate y cols., 1991; Glahder y cols., 2003) y su actividad se ve regulada por los glucocorticoides (Rogatsky y cols., 2001; Tsujimoto y cols., 2005) y el balance redox (Prabhakar, 2001; Kim y cols., 2002).

El GHR-II de bagre del canal también presenta varios sitios CRE y AP en su región flanqueante en 5'. La presencia de este conjunto de elementos reguladores en el GHR-II de dorada y bagre del canal sugiere una regulación específica de este receptor en situaciones de estrés. Sin embargo, pueden existir diferencias en los mecanismos moleculares que regulan el inicio de la transcripción del GHR-II en ambas especies, ya que a) la posición de los factores AP y CRE no está conservada, b) el GHR-II de bagre del canal no contiene la asociación de consensos Inr-DPE y c) la organización exón-intrón es diferente.

6.3. Regulación transcripcional de los GHR de dorada

Modelo de acción compensatoria. Tanto en mamíferos como en peces, el hígado es el órgano diana más importante de la GH y la fuente principal de IGF-I plasmática (acción endocrina). Por consiguiente, no es de extrañar que el hígado presente una mayor cantidad de transcritos de GHR tal y como muestran los resultados de la presente Tesis Doctoral (**figura 5.11**) y otros ya publicados en dorada (Calduch-Giner y cols., 2003), anguila (Ozaki y cols., 2006), medaka (Fukamachi y cols., 2005), otros perciformes (Kajimura y cols., 2004; Jiao y cols., 2006), peces planos (Calduch-Giner y cols., 2001; Nakao y cols., 2004), salmónidos (Fukada y cols., 2004; Very y cols., 2005), ciprínidos (Lee y cols., 2001) y silúridos (Small y cols., 2006).

De acuerdo con ello, nuestros modelos experimentales de estación y edad mostraron como variaciones en las tasas de crecimiento van acompañados de cambios en los niveles circulantes de IGF-I (**figura 5.12 y 5.15**), de forma similar a lo ya descrito en lubina (Vega-Rubín de Celis y cols., 2004) y bagre del canal (Silverstein y cols., 2000; Li y cols., 2006). Asimismo, los niveles plasmáticos de IGF-I están positivamente correlacionados con las tasas de crecimiento de la perca gigante y del salmón del Atlántico (Dyer y cols., 2004). De hecho, el efecto de las señales estacionales y nutricionales sobre los niveles circulantes de IGF-I es bien conocido en salmónidos (Dickhoff y cols., 1997; Larsen y cols., 2001; Nordgarden y cols., 2005). Esta asociación también se da en dorada. Así, los niveles circulantes de IGF-I están relacionados en éste y otros

estudios previos con cambios estacionales (Mingarro y cols., 2002) y dietarios (Gómez-Requeni y cols., 2003; 2004; Benedito-Palos y cols., 2007) de las tasas de crecimiento.

De nuestros resultados (experiencias de estación y edad) también se deduce que la IGF-I circulante está altamente correlacionada con los niveles de mensajeros hepáticos de IGF-I (**tabla 5.5**), de manera similar a lo descrito en *hybrid striped bass* (Picha y cols., 2008) y dorada (Calduch-Giner y cols., 2003). Como era de esperar, al comparar el hígado con otros tejidos periféricos también se puso de relieve la mayor expresión de IGF-I a nivel hepático (**figura 5.14** y **5.17**). Ello está en consonancia con los patrones de expresión previamente publicados en dorada (Pérez-Sánchez y cols., 2002; Duguay y cols., 1996) y otras especies de peces (Biga y cols., 2004; Caelers y cols., 2004; Patruno y cols., 2006; Vong y cols., 2003). Asimismo, es importante reseñar la correlación existente a nivel hepático entre la expresión de IGF-I y GHR-I con los cambios asociados a la estación y la edad (**tabla 5.5**). Por el contrario, el GHR-II no varió su expresión a nivel hepático con la edad (**figura 5.16D**), y aunque lo hizo con la estación (**figura 5.13D**), los cambios fisiológicos en la expresión hepática de IGF-I e IGF-II parecen mayoritariamente regulados en dorada por el GHR-I.

En mamíferos, la producción hepática de IGF-I parece no ser esencial para el crecimiento post-natal. Así, ratones con una delección específica de la IGF-I hepática muestran un crecimiento normal, debido a la acción compensatoria de la IGF-I extrahepática (acción autocrina/paracrina) (Le Roith y cols., 2001a; 2001b). Es más, la función de la IGF-I en ratones knockout no se compensa con una sobreexpresión de IGF-II (Moerth y cols., 2007), aunque ambas IGF son capaces de estimular el crecimiento al inyectarse en juveniles de tilapia (Chen y cols., 2000). De hecho, aunque no se detecta en tejidos adultos de ratones y ratas (Rotwein, 1991), la IGF-II se expresa en humanos y gran variedad de peces como carpa (Vong y cols., 2003), trucha arco iris (Chauvigné y cols., 2003), tilapia (Caelers y cols., 2004), bagre del canal (Peterson y cols., 2004) y dorada (Duguay y cols., 1996). En todo caso, es mayoritariamente aceptado que la expresión relativa de IGF-I es mayor en hígado

que en tejidos extrahepáticos, al contrario de lo que acontece con la IGF-II.

En el caso que nos ocupa, la expresión de IGF-I en tejido adiposo y músculo no mostró variaciones significativas con la estación, aunque sí lo hizo la IGF-II que mostró un máximo en enero (**figura 5.14**). La edad también aumentó la expresión muscular de ambas IGF, aunque sólo lo hizo de manera significativa la IGF-I (**figura 5.17**). En base a ello, podemos suponer que este incremento global en la expresión extrahepática de IGF compensó, al menos en parte, la reducción con la edad y la estación fría de la actividad hepática del eje GH/IGF. Este efecto compensatorio sería similar al descrito previamente en ratones con una deleción específica de la IGF-I hepática. En la misma línea, familias de bagre del canal con altas tasas de crecimiento presentan una elevada expresión muscular de IGF-II (Peterson y cols., 2004). Además, en trucha arco iris (Chauvigné y cols., 2003) y lubina (Terova y cols., 2007), el crecimiento compensatorio asociado a experimentos de ayuno-realimentación también parece estar mediado por un incremento de la expresión muscular de IGF. En estos dos últimos trabajos no se midió la expresión de los GHR, pero de nuestros estudios se deduce que el aumento de la expresión de IGF extrahepática estuvo condicionado, en gran parte, por cambios en la expresión del GHR-I (**tabla 5.5**).

Por el contrario, la activación del GHR-II a nivel muscular durante el periodo invernal (**figura 5.13**) y el ayuno estival (**figura 5.11**) sugiere un papel en la reparación y/o supervivencia tisular no mediado por IGF. Aunque el modelo experimental no es comparable, es de resaltar que la expresión del GHR de rata se activa a nivel muscular como un mecanismo de protección en modelos de atrofia muscular (Casse y cols., 2003). En todo caso, a diferencia de lo que podría pasar en peces, esta acción reparadora de la GH requiere la presencia de receptores intactos de IGF-I (Kim y cols., 2005).

Frente a los modelos de acción compensatoria y reparadora, también se han descrito en peces, y más concretamente en dorada, diferentes estados de resistencia a la acción anabólica de la GH. Entre ellos cabe destacar las alteraciones hormonales asociadas al ayuno (Pérez-Sánchez y

cols., 1994) y al uso de fuentes alternativas de proteínas en la dieta (Gómez-Requeni y cols., 2004). En primera instancia, ello es el resultado de una menor expresión de IGF y GHR a nivel hepático, tal y como se ha puesto de relieve con la experiencia de ayuno de la presente Tesis Doctoral (**figura 5.11**). En salmónidos, el ayuno también afecta drásticamente a la producción hepática de IGF-I (Gabillard y cols., 2006; Norbeck y cols., 2007). El sistema somatotrópico de la trucha también se ve comprometido con la sustitución de las harinas de pescado, pero en este caso las alteraciones observadas inciden especialmente sobre la actividad de las IGFBP presentes en el torrente circulatorio (Gómez-Requeni y cols., 2005). Por consiguiente, como tantas veces se ha sugerido en otros sistemas biológicos, las alteraciones que puedan darse a nivel de sistema somatotrópico son especie-dependientes dado la gran heterogeneidad que presentan los teleósteos y los peces en general.

Recientemente, también se ha puesto de relieve en dorada una compleja regulación del sistema somatotrópico con la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales (Benedito-Palos y cols., 2007). De acuerdo con ello, las carencias en ácidos grasos esenciales como resultado de la sustitución total del aceite de pescado van acompañadas de una reducción en la expresión de IGF a nivel hepático y muscular. Por el contrario, una sustitución parcial del 66% comportó una reducción en la expresión hepática del GHR-I y la IGF-I, que aparentemente se vio compensada por un aumento de la expresión del GHR-II que no estuvo acompañada de cambios en la expresión de IGF-I o IGF-II. Sin embargo, cuando los requerimientos en ácidos grasos esenciales están de sobra cubiertos por aceites de origen marino, que a su vez contienen niveles más altos de biocontaminantes que los aceites vegetales, estos efectos compensatorios corren a cargo de la IGF-II muscular con independencia de cambios transcripcionales en los GHR (**ver figura 6.11**).

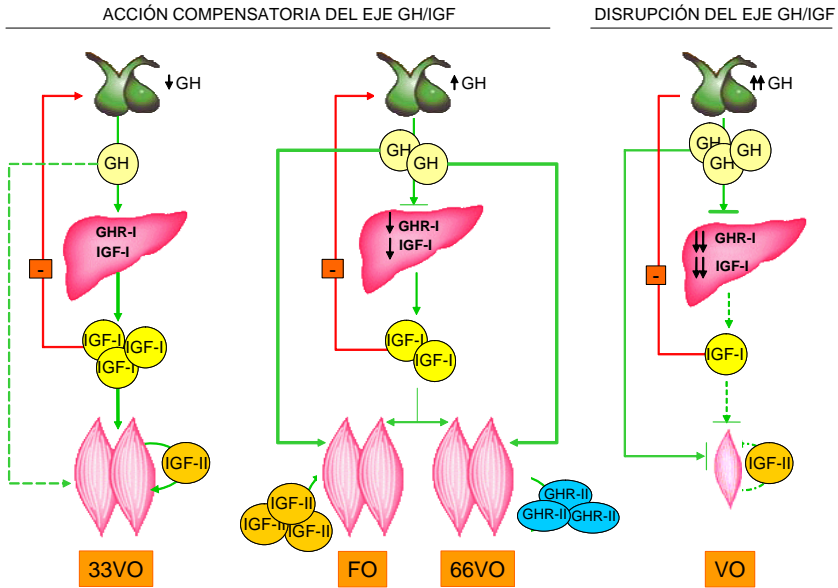


Figura 6.11. Modelo del balance entre acción sistémica y acción compensatoria local. El crecimiento se ve afectado cuando la disminución de la producción hepática de IGF-I (acción sistémica) no se ve compensada a nivel local (dieta VO). En los peces alimentados con la dieta FO esta disminución se ve compensada por la acción de la IGF-II a nivel local mientras que en los peces alimentados con la dieta 66VO esta acción compensatoria la realiza el GHR-II. El grupo 33VO es el valor de referencia al poseer esta dieta niveles bajos de biocontaminantes, a la vez que cubre sobradamente los requerimientos en ácidos grasos esenciales. Modificado de Benedito-Palos y cols. (2007).

Respuesta inmune. La primera barrera del sistema inmune de los peces está formada por los epitelios (piel, branquias e intestino) y el mucus que segregan. El mucus contiene agentes antibacterianos como lisozima, lectinas y proteasas. Una vez que los patógenos atraviesan esta barrera se desencadenan dos respuestas, innata y adaptativa. La respuesta innata reconoce genéricamente al patógeno y previene su dispersión. La respuesta adaptativa reconoce específicamente los antígenos de la superficie celular del patógeno. La infección es eliminada mediante la síntesis de anticuerpos específicos y linfocitos citotóxicos. Esta respuesta genera memoria de forma que en una segunda exposición el sistema inmune reaccionaría más rápidamente. Hay que destacar que, en animales ectotermos como los peces, el tiempo de respuesta varía significativamente en función de la temperatura ambiental. Por consiguiente, la respuesta innata es de especial importancia en este tipo de organismos (Yada y Nakanishi, 2002).

Combatir exitosamente o no una infección depende en gran medida de la proliferación de las células del sistema inmune. Por lo tanto, este sistema puede considerarse, en cierto modo, un modelo particular de crecimiento. Estudios pioneros llevados a cabo por el grupo de Nutrición y Endocrinología del Crecimiento de Peces del IATS demostraron la presencia de sitios de unión de la GH en riñón anterior de dorada (Calduch-Giner y cols., 1995), el equivalente a la médula ósea de los mamíferos. Los sitios de unión fueron apreciables en mieloblastos, mielocitos, eosinófilos y neutrófilos inmaduros además de monocitos y linfocitos (**figura 6.12**). Es más, la GH estimuló el crecimiento de leucocitos aislados de riñón anterior de dorada (Calduch-Giner y cols., 1995). Así, macrófagos de dorada tratados con GH (Calduch-Giner y cols., 1997) mostraron mayor activación, tamaño y actividad fagocítica, asociada a un incremento del número de lamelipodios (a su vez más ramificados, **figura 6.13**). En consecuencia, la GH posee un papel claramente inmuno-estimulador en dorada, que también ha sido descrito en otras especies de peces (Yada, 2007).

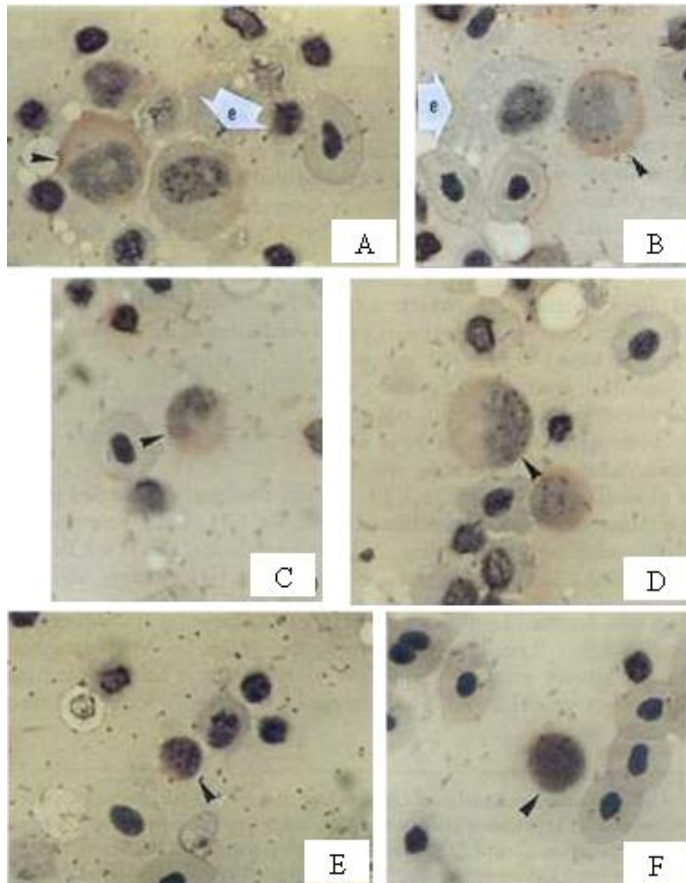


Figura 6.12. Marcaje (membrana citoplasmática) con GH biotilada de sus sitios de unión específicos en extensiones de riñón anterior de dorada. A, mieloblastos (cabeza de flecha) y eosinófilos inmaduros (e). B, mielocito (cabeza de flecha) y eosinófilo maduro no teñido (e). C, neutrófilo inmaduro (cabeza de flecha). D, monocito (cabeza de flecha). E, linfocito pequeño (cabeza de flecha). F, linfocito grande (cabeza de flecha). Modificado de Calduch-Giner y cols. (1995).

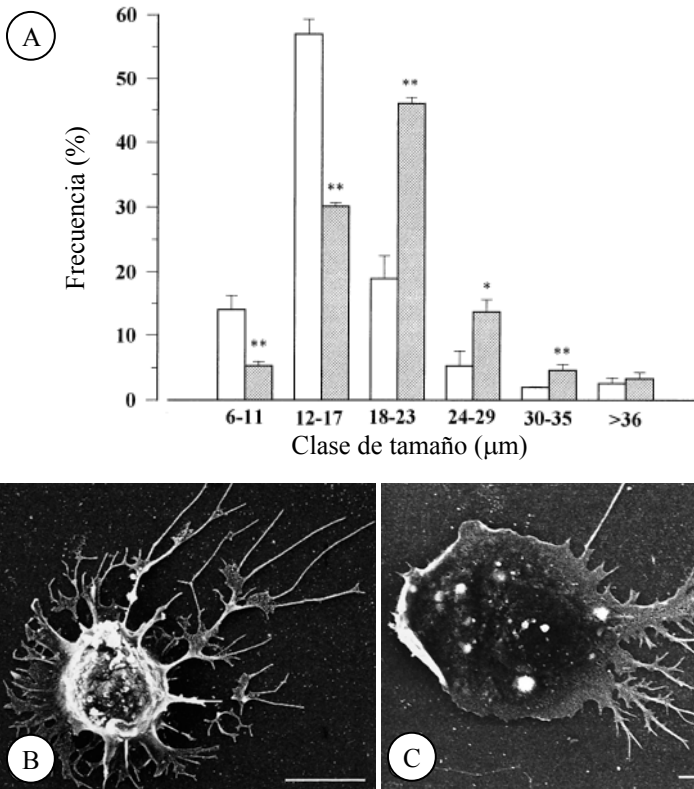


Figura 6.13. Efecto del tratamiento con GH en cultivos primarios de macrófagos aislados de riñón anterior de dorada. A, tamaño de las células de cultivos tratados (gris) y sin tratar (blanco). Fotografías de microscopio electrónico de barrido de macrófagos tratados (B) y no tratados (C). Modificado de Calduch-Giner y cols. (1997).

Para analizar más detalladamente la relación entre el eje somatotrópico y el sistema inmune se llevó a cabo en esta Tesis Doctoral una infección experimental, usando *E. leei* como modelo infeccioso (apartado 4.10.4). El método de transmisión por efluente (**figura 4.17**) es suficientemente efectivo y consistente (asegura la suficiente presión de infección) para asegurar el contacto del parásito con todos los peces receptores de una manera homogénea y continua (Sitjà-Bobadilla y cols., 2007). A pesar de ello, al final del periodo de exposición (113 días, **tabla 5.4** y **figura 5.18**), se identificaron tres grupos experimentales: a) peces control (peces no expuestos al efluente contaminado), b) peces expuestos y no parasitados y c) peces expuestos y parasitados.

Tomando como referencia los peces control, la expresión relativa del GHR-I y la IGF-I en el riñón anterior de los peces expuestos mostró un patrón opuesto en base a progresión (expuestos y parasitados) o no (expuestos y no parasitados) de la enfermedad (**figura 5.19**). Así, la expresión del GHR-I y de la IGF-I aumentó significativamente en los peces aparentemente resistentes a la enfermedad (expuestos y no parasitados). Si tenemos en cuenta el efecto estimulador de la IGF-I sobre el crecimiento de los leucocitos de riñón anterior de dorada (Calduch-Giner y cols., 1995), ello sugiere una mayor capacidad o ventaja selectiva de estos animales para combatir la infección. Por el contrario, la expresión relativa del GHR-I y de la IGF-I disminuyó en los peces parasitados. En esta misma línea, el efecto inmuno-depresor del estradiol comporta en tilapia una disminución de la expresión de IGF en riñón anterior y bazo (Shved y cols., 2009).

En contra de lo expuesto anteriormente, la expresión del GHR-II y la IGF-II no varió con la exposición al parásito, tanto en los peces parasitados como en los no parasitados. En consecuencia, este es un nuevo caso de regulación diferencial del GHR-I y GHR-II de dorada, según el cual la expresión de IGF-I volvería a estar mayoritariamente mediada por los cambios de expresión del GHR-I.

Estrés por confinamiento. En acuicultura, como en otras prácticas de producción animal, se tiende a incrementar la densidad de cultivo para aumentar la rentabilidad de la explotación. Sin embargo, esta práctica puede tener efectos negativos, dada la acción perniciosa del estrés por confinamiento sobre el sistema inmune, la reproducción y el crecimiento (Pickering, 1993; Van Weerd y Komen, 1998). De ahí, que en la presente Tesis Doctoral se haya hecho especial hincapié en la regulación de eje somatotrópico por el estrés por confinamiento, de acuerdo con el modelo experimental planteado en el apartado 4.10.5.

El eje hipotalámico – hipofisareo – interrenal (HPI) juega un papel clave en la regulación de la respuesta al estrés, siendo la glucosa y el cortisol los efectores últimos de este sistema (**figura**

6.14). Por consiguiente, no es de extrañar que los niveles circulantes de cortisol y glucosa sean considerados marcadores clásicos de estrés en peces y vertebrados superiores (Barton y Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). En nuestro caso, la concentración plasmática de cortisol en los peces control estuvo dentro de los niveles óptimos descritos para peces (Pickering y Pottinger, 1989). Es más, la respuesta del cortisol y la glucosa frente al estrés por confinamiento (**figura 5.20**) se correspondió con los datos disponibles para esta especie (Sangiao-Alvarellos y cols., 2005; Ortuno y cols., 2001). En concreto, la concentración del cortisol (60 – 70 ng/ml) alcanzó los valores esperados en animales confinados a una densidad de aproximadamente 120 kg/m³ (**figura 6.15**); mientras que en la bibliografía se han registrado valores de 15 – 20 ng/ml a 26 – 30 kg/m³ (Barton y cols., 2005; Rotllant y cols., 2000), 40 ng/ml a 70 kg/m³ (Sangiao-Alvarellos y cols., 2005) y 178 ng/ml a 200 kg/m³ (Rotllant y cols., 2001).

Con independencia que la intensidad respuesta sea proporcional a la intensidad del estímulo, los niveles circulantes de cortisol en los animales estresados mostraron un carácter bimodal (**figura 5.20A**). Resultados similares han sido descritos en esta misma especie por Arends y cols. (1999). Estos autores atribuyen el primer pico de cortisol a una rápida activación del eje HPI, que desembocaría en un agotamiento y/o una retroalimentación negativa del mismo. Por el contrario, el segundo pico se considera ACTH independiente. Si asumimos esta hipótesis de trabajo, ello explicaría que el primer pico de cortisol (1,5 – 3 horas de confinamiento) fuese coincidente con el pico de glucemia; mientras que el segundo pico de cortisol (24 – 72 horas) coincidió con la recuperación de los niveles basales de glucemia.

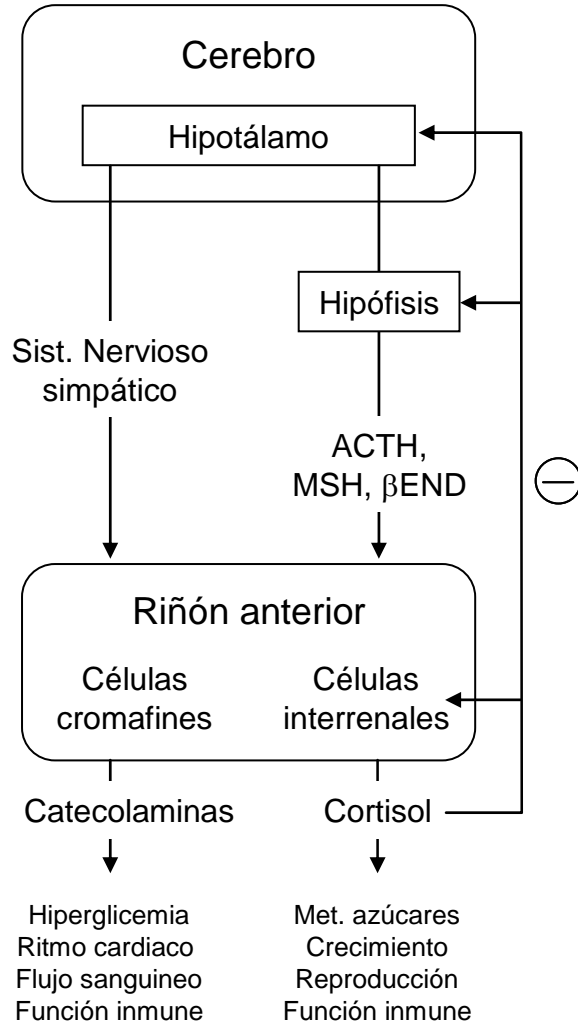


Figura 6.14. Eje hipotalámico – hipofisario – interrenal (HPI). ACTH, hormona corticotropa; MSH, hormona estimulante de melanoforos; β -END, β -endorfina. Modificado de Wendelaar Bonga (1997).

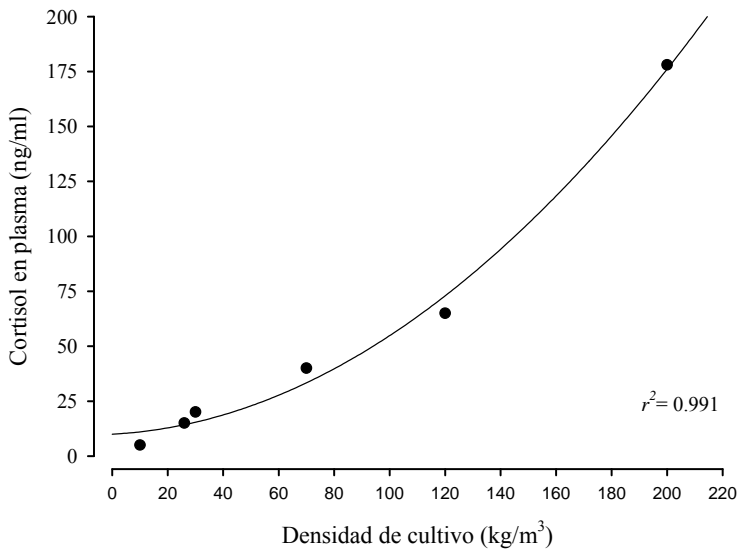


Figura 6.15. Representación de los valores máximos de cortisol (ng/ml) frente a la densidad de cultivo (kg/m³). Datos de los trabajos citados en el texto y del presente trabajo.

De forma paralela al desarrollo de esta Tesis Doctoral, también se midió la expresión hepática de la mortalina (GRP75), el citocromo P450 1A1 (CYP1A1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) como marcadores moleculares de estrés oxidativo y equilibrio redox (ver documento anexo, Saera-Vila y cols., 2009).

La GRP75 es un miembro de la familia de proteínas de respuesta al choque térmico (HSP). Las HSP están implicadas en la eliminación de las proteínas desnaturalizadas en situaciones de estrés (Kaul y cols., 2007). La GRP75 mitocondrial y su homólogo en levaduras (SSC1p) realizan funciones constitutivas y son esenciales para la vida (Craig y cols., 1989; Kaul y cols., 2007). En peces la GRP75 está poco estudiada, pero peces cebra con una mutación en la misma muestran serios problemas sanguíneos (Craven y cols., 2005). Además, su expresión se activa a nivel hepático en modelos toxicogénicos de pez cebra (Lam y cols., 2006) y en experiencias de confinamiento a corto (120 Kg/m³, 24 horas) y largo plazo (45-50 Kg/m³, tres semanas) de dorada (Bermejo-Nogales y cols., 2008). Comparativamente con la dorada, la GRP75 también muestra una mayor expresión

en dentón, otro espárido de potencial interés para la acuicultura mediterránea pero con un comportamiento agónico en condiciones de cultivo estándar (Bermejo-Nogales y cols., 2007). Por tanto, si tenemos en cuenta esta información previa, la GRP75 es un buen biomarcador de estrés, y su rápida respuesta tras el confinamiento de los animales (**figura 6.16A**), sería indicativo de una respuesta adaptativa a corto plazo, posiblemente seguida de un restablecimiento del equilibrio redox a las 120 horas. Esta idea está en consonancia con una menor expresión hepática de la CYP1A1 y TNF α (**figura 6.16B y C**) que se mantuvo hasta el último punto de muestreo.

El TNF α es una citoquina con un demostrado papel en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en hepatocitos y otros tipos celulares (Yang y cols., 2007). Es más, el estrés disminuye su expresión hepática en ratas (Connor y cols., 2005) y aumenta la del *TNF decoy receptor* (receptor de función inhibitoria) en trucha (Momoda y cols., 2007). El CYP1A1 es una enzima clave en los procesos de detoxificación de compuestos endógenos y exógenos (van der Oost y cols., 2003). Sin embargo, estas reacciones generan radicales libres como subproducto, los cuales pueden llegar a dañar seriamente los diferentes componentes celulares. Este estado de alto riesgo de daño oxidativo puede llegar a reprimir la actividad del CYP1A1 (Barouki y Morel, 2001). De ahí que, en ambientes con una alta carga de biocontaminantes, peces con una baja expresión hepática de CYP1A1 pueden presentar una ventaja adaptativa (Bello y cols., 2001; Nacci y cols., 2002). Resultados similares se han descrito en mamíferos (Qin y Meng, 2005), por lo que éste parece ser un mecanismo de defensa altamente conservado a lo largo de la evolución. En este sentido, la baja expresión de CYP1A1 en el hígado de dentón debe interpretarse como parte de la respuesta fisiológica del animal para una mejor adaptación a un medio hostil (Bermejo-Nogales y cols., 2007).

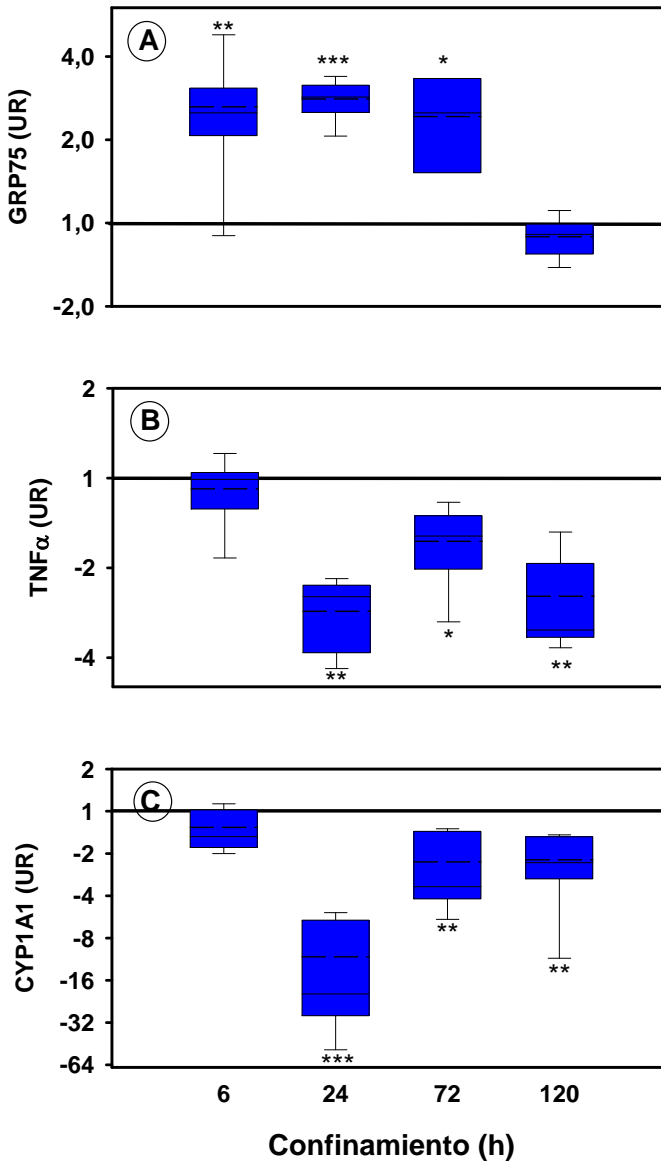


Figura 6.16. Diagrama de cajas de la expresión relativa (unidades relativas, UR) de GRP75 (A), TNF α (B) y CYP1A1 (C) en hígado de doradas sometidas a estrés por confinamiento. La expresión en cada punto se ha normalizado respecto a la expresión de los peces control en ese mismo punto (1 indica que no hay cambios, 2 indica una expresión dos veces mayor y -2 dos veces menor). La línea continua dentro de la caja indica la mediana y la discontinua la media (n=8). En cada punto, las diferencias con el grupo control se han analizado mediante el test de la t de Student (*, $P<0,05$; **, $P<0,01$; ***, $P<0,001$). Modificado de Saera-Vila y cols. (2009).

En este escenario de respuestas adaptativas de GRP75, TNF α , CYP1A1 y marcadores clásicos de estrés (cortisol y glucosa), se procedió a analizar los efectos del confinamiento sobre el eje hepático GH/IGF. El efecto del estrés sobre la GH se ha descrito en un amplio abanico de especies de peces (Deane y Woo, 2009). A modo de resumen, los niveles circulantes de GH disminuyen con el confinamiento en trucha arco iris (Pickering y cols., 1991), salmón del Atlántico (Wilkinson y cols., 2006), tilapia del Nilo (Auperin y cols., 1997) y dorada (Rotllant y cols., 2000; 2001). Por el contrario, es bien sabido que la desensibilización hepática en respuesta al ayuno comporta una menor producción de IGF-I, que en última instancia desemboca en un incremento de la GH circulante, como consecuencia de una menor retroalimentación negativa por parte de la IGF-I sobre la síntesis y liberación de GH hipofisaria (Pérez-Sánchez y cols., 1992; 1995).

Dado que el estrés por si mismo inhibe la ingesta, en nuestro modelo experimental optamos por mantener los animales ayunados a lo largo del periodo experimental de 5 días. Si tenemos en cuenta que la experiencia se llevó a cabo a finales de otoño con una ingesta voluntaria de alimento próxima a la ración de mantenimiento, esta privación de alimento debe entenderse como un factor de escasa incidencia fisiológica. En todo caso, supone un mal menor ya que en sentido estricto, si se hubiese optado por alimentar a los peces se tendría que haber diseñado un modelo de “*pair-fed*” con las dificultades asociadas al mismo, al ser extremadamente difícil una cuantificación real de la ingesta en peces confinados. Teniendo en cuenta todo lo anterior, no es de extrañar que la GH circulante en los peces del grupo control mostrase un incremento progresivo propio de un estado ayuno (**figura 5.21**). La misma tendencia se intuye en los peces confinados. No obstante, este incremento fue menor que en los controles, lo que se puede interpretar como un efecto enmascarador del estrés por confinamiento.

El confinamiento afectó tanto a la expresión hepática de IGF-I e IGF-II (**figura 5.23**) como a sus niveles plasmáticos (**figura 5.21**). Es más, al igual que en los modelos experimentales descritos anteriormente, los niveles circulantes de IGF-I volvieron a reflejar la expresión hepática de la misma. Es

de suponer una relación similar para la IGF-II, aunque no ello pudo ser confirmado experimentalmente dada la inexistencia de un ensayo específico para medir la IGF-II circulante de dorada. En todo caso, la asunción de una reducción en los niveles circulantes de IGF-II está de acuerdo con los trabajos llevados a cabo en el salmón del Atlántico (Wilkinson y cols., 2006).

De nuestros resultados también se deduce que el estrés por confinamiento reduce en dorada la expresión hepática de los receptores de GH. Esta respuesta fue persistente en el tiempo, pero fue una vez más de carácter diferencial y afectó sólo al GHR-II, mientras que el GHR-I no mostró en ningún tiempo de muestreo cambios significativos a nivel transcripcional (**figura 5.22**). Por el momento, no se han abordado estudios similares en otras especies de peces. Es más, un estudio reciente en tilapia, con un único punto de muestreo, revela un resultado opuesto al descrito por nosotros (Uchida y cols., 2009). Posiblemente ello indica diferencias inter-específicas, aunque también puede ser indicativo de un diferente diseño experimental, en donde la anoxia prime sobre el efecto del confinamiento de *per se*. De ello se deduce la necesidad de una mejor estandarización de los retos específicos de estrés. En todo caso, parece evidente que no hay un modelo único de respuesta, tal y como se deduce de experiencias *in vivo* e *in vitro*, en las que se contempla el efecto del cortisol sobre la expresión de los GHR. Jiao y cols. (2006) observaron que la expresión hepática del GHR-I aumenta en *black sea bream* al inyectar cortisol. Hepatocitos de trucha tratados con dexametasona presentaron incrementos en la expresión de GHR-II (Pierce y cols., 2005). Small y cols. (2006) describieron una disminución en la expresión hepática de GHR-II en individuos de bagre del canal alimentados con cortisol durante 4 semanas.

Con independencia de estas aparentes contradicciones, la idea de consenso es que la respuesta del GHR-I y GHR-II es diferente ante un estado de estrés. En el caso concreto de la dorada, ello está en consonancia con la diferente organización de la región flanquante en 5' de GHR-I y GHR-II. Como ya se ha comentado anteriormente (apartado 6.2.1), el promotor del GHR-II es rico en elementos reguladores (CRE y AP) relacionados con la respuesta al estrés (**figura 5.10**). Es más,

cuando nosotros mismos hemos retomado las secuencias del GHR-II de bagre del canal también hemos observado una importante concentración de estos elementos reguladores en la región 5' flanqueante. Esta circunstancia contribuiría a explicar que tanto en dorada como en bagre del canal (Small y cols., 2006) el GHR-II respondiese a una situación de estrés.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, el GHR-I aparece como el receptor que tiene un papel clave en la regulación del crecimiento y las IGF en función de la estación, la edad y el estado nutricional e inmuno-patológico. Por el contrario, el GHR-II presenta una función dual preservando la viabilidad tisular a nivel muscular y limitando el crecimiento y la producción de IGF en condiciones de estrés (figura 6.17). De todos modos, no se puede excluir cierta redundancia funcional entre ambos receptores, de manera similar a lo descrito para el receptor de secretagogos de GH en *black sea bream* (Chan y Cheng, 2004).

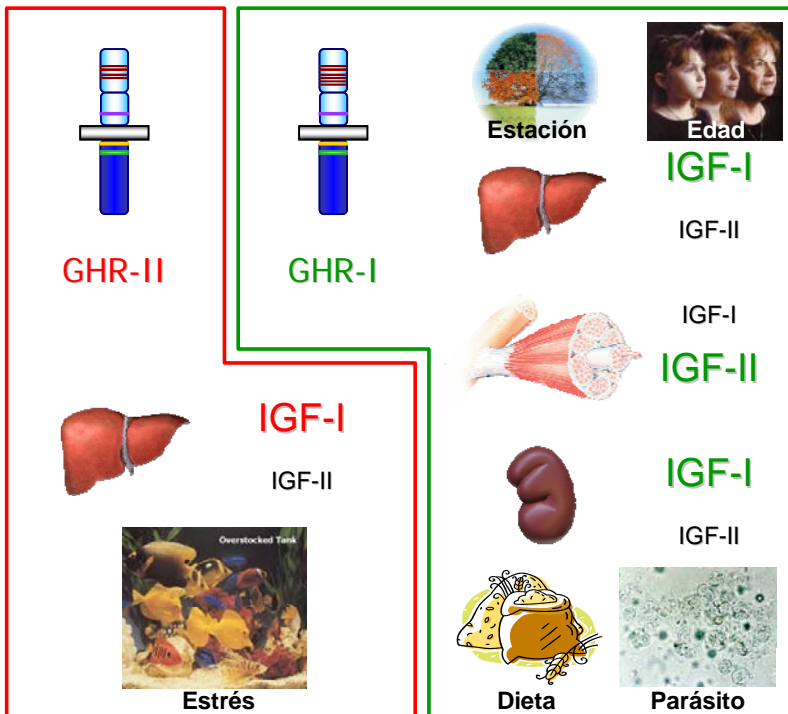


Figura 6.17. Esquema resumen de los resultados obtenidos en las diferentes experiencias de dorada.

Otra cuestión es la especificidad o promiscuidad de los receptores de la GH. Hay evidencias experimentales de que el GHR-I de salmónidos es capaz de unirse a la SL con una afinidad mayor que la mostrada por la GH (Fukada y cols., 2005); mientras que el GHR-II se une específicamente a la GH (Fukada y cols., 2004). Por el contrario, ensayos de transfección en *black sea bream* sugieren que ambos receptores son específicos de la GH (Jiao y cols., 2006). En anguila, los receptores de la GH también parecen ser exclusivos (Ozaki y cols., 2006). Otros peces primitivos como el esturión y pez pulmonado parecen tener un receptor promiscuo que interaccionaría tanto con la GH como con la SL (Fukamachi y Meyer, 2007). De acuerdo con todo ello, la hipótesis más plausible es que la forma ancestral del GHR sería un receptor promiscuo, que se habría duplicado y conservado en los actuales teleósteos siguiendo el modelo de subfuncionalización. Así, el GHR-I conservaría esta promiscuidad ancestral, mientras que el GHR-II habría evolucionado como un receptor específico de GH (**figura 6.18A**). Aun así, en condiciones fisiológicas, resulta poco probable que exista una competencia real de todos y cada uno de los miembros de la familia GH/PRL por un determinado receptor. Ello está avalado por estudios *in vivo* en dorada, en los que se ha demostrado una clara secuencia temporal en los ritmos circanuales de la GH, la PRL y la SL (Mingarro y cols., 2002; Pérez-Sánchez y cols., 2002). Este modelo asume: a) el pico de primavera-verano de la GH estimula la ingesta y el crecimiento estival, b) el pico de la PRL promueve la deposición de grasa durante la segunda mitad del verano y c) el pico otoñal de la SL promueve el disparo de la pubertad una vez alcanzado un tamaño y adiposidad críticos (**figura 6.18B**).

A modo de corolario, si pensamos en una llave y una cerradura como ejemplo de la interacción hormona-receptor, estamos hablando de 3 llaves y 3 cerraduras. La llave PRL abriría únicamente la cerradura PRLR. La llave GH sería algo así como una llave maestra que abre las cerraduras GHR-I y GHR-II. La llave SL también abriría la cerradura GHR-I, pero no existiría posibilidad de confusiones ya que cada llave se usa en épocas diferentes. Este símil también sirve para ilustrar como aunque una llave (la SL) entre o encaje en una cerradura (el

GHR-I) no significa que sea capaz de girar y abrir el pestillo (activar el receptor y desencadenar una señalización intracelular).

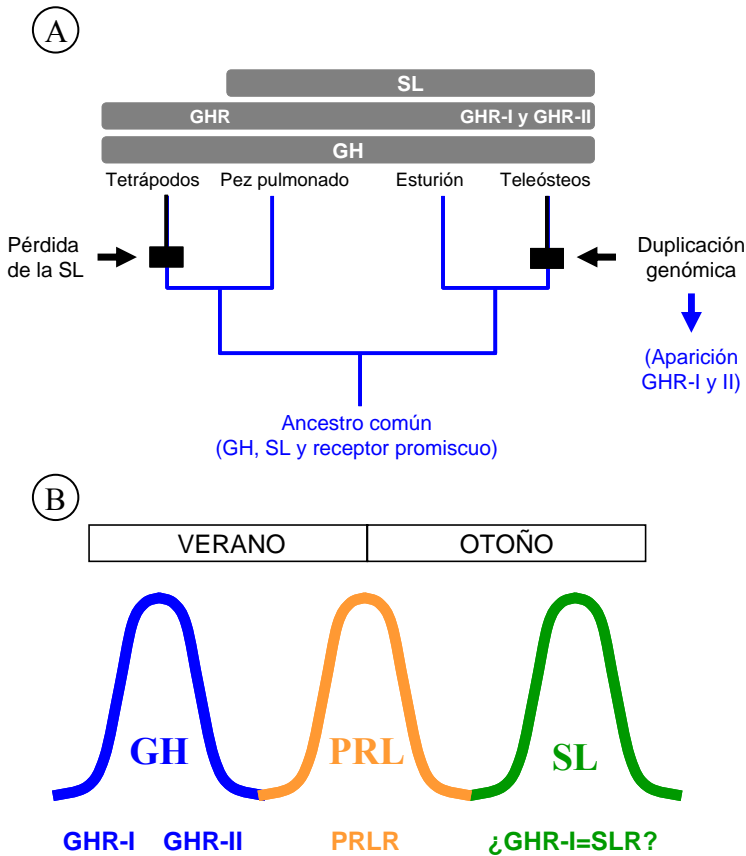


Figura 6.18. A, modelo evolutivo del receptor ancestral de la GH y la SL. Modificado de Fukamachi y Meller (2007). B, representación de los ritmos circunales de la GH, la PRL y la SL y el receptor con el que interacciona. Modificado de Pérez-Sánchez y cols. (2002).

7. Conclusiones

PRIMERA: En dorada, trucha y lubina se ha demostrado la presencia de dos GHR que se habrían adquirido por duplicación genómica en los primeros ancestros de los peces teleósteos.

SEGUNDA: El GHR-I de trucha y dorada mantiene los rasgos estructurales propios del GHR de tetrápodos, mientras que el GHR-II ha perdido el tercer par de cisteínas extracelulares y presenta un patrón característico de tirosinas intracelulares.

TERCERA: La organización exón-intrón del GHR-I y GHR-II de dorada está altamente conservada a lo largo de la evolución de los vertebrados y presenta 9/10 exones.

CUARTA: No se han detectado isoformas de los GHR de dorada generadas por procesamiento alternativo del ARNm.

QUINTA: Los GHR de dorada presentan un único sitio de inicio de transcripción que apunta a un proceso de evolución por subfuncionalización.

SEXTA: El sitio de inicio de la transcripción del GHR-I y GHR-II de dorada está marcado por los consensos Inr-DPE.

SÉPTIMA: La gran variedad de sitios potenciales de regulación presentes en la región flanqueante del GHR-I y GHR-II de dorada está en consonancia con la acción pleiotrópica de la GH.

OCTAVA: El hígado es el órgano diana por excelencia de la GH y los cambios en la concentración de IGF-I circulante son fiel reflejo de la expresión de IGF-I a nivel hepático.

NOVENA: En los modelos de estación, edad e infección la expresión del GHR-I está altamente correlacionada con los cambios de expresión de IGF-I e IGF-II.

DÉCIMA: En el modelo de estrés por confinamiento, la disminución de la expresión hepática de la IGF-I e IGF-II es fiel reflejo de los cambios en la expresión hepática del GHR-II.

UNDÉCIMA: El papel clave del GHR-II en el modelo de estrés por confinamiento está en consonancia con la presencia de sitios AP y CRE en su región flanqueante.

DUODÉCIMA: El modelo propuesto aboga por una regulación diferencial de los GHR de dorada, aunque no se puede excluir un cierto solapamiento funcional con independencia de que estos receptores sean promiscuos o específicos de la GH.

8. Bibliografia

A

Abate, C., Luk, D. y Curran, T., 1991. Transcriptional regulation by Fos and Jun In vitro - interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3624-3632.

Adams, T.E., Baker, L., Fiddes, R.J. y Brandon, M.R., 1990. The sheep growth hormone receptor: molecular cloning and ontogeny of mRNA expression in the liver. *Mol Cell Endocrinol.* 73, 135-145.

Adams, T.E., 1995. Differential expression of growth hormone receptor messenger RNA from a second promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108, 23-33.

Agarwal, S.K., Cogburn, L.A. y Burnside, J., 1994. Dysfunctional growth hormone receptor in a strain of sex-linked dwarf chicken: evidence for a mutation in the intracellular domain. *J Endocrinol.* 142, 427-434.

Allen-Jennings, A.E., Hartman, M.G., Kociba, G.J. y Hai, T., 2002. The roles of ATF3 in liver dysfunction and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 20020-20025.

Almuly, R., Cavari, B., Ferstman, H., Kolodny, O. y Funkenstein, B., 2000. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: Identification of minisatellite polymorphism in intron I. *Genome* 43, 836-845.

Altschmied, J., Delfgaauw, J., Wilde, B., Duschl, J., Bouneau, L., Volff, J.N. y Schartl, M., 2002. Subfunctionalization of duplicate *mitf* genes associated with differential degeneration of alternative exons in fish. *Genetics* 161, 259-267.

Amemiya, Y., Sogabe, Y., Nozaki, M., Takahashi, A. y Kawauchi, H., 1999. Somatolactin in the white sturgeon and african lungfish and Its evolutionary significance. *General and Comparative Endocrinology* 114, 181-190.

Amit, T., Bergman, T., Dastot, F., Youdim, M.B.H., Amselem, S. y Hochberg, Z., 1997. A membrane-fixed, truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3813-3817.

Anderson, N.G., 1992. Growth hormone activates mitogen-activated protein kinase and S6 kinase and promotes intracellular tyrosine phosphorylation in 3T3-F442A preadipocytes. *Biochem J.* 284, 649-652.

Andrisani, O.M., 1999. CREB-mediated transcriptional control. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 9, 19-32.

Arends, R.J., Mancera, J.M., Muñoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E. y Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J Endocrinol* 163, 149-157.

Argetsinger, L.S. y Carter-Su, C., 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* 76, 1089-1107.

Argetsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Ihle, J.N. y Carter-Su, C., 1993. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74, 237-244.

Astola, A., Calduch-Giner, J.A., Ortiz, M., Pérez-Sánchez, J. y Valdivia, M.M., 2004. Genomic structure and functional analysis of promoter region of somatolactin gene of sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biotechnology* 6, 411-418.

Astola, A., Ortiz, M., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J. y Valdivia, M.M., 2003. Isolation of *Sparus auratus* prolactin gene and activity of the cis-acting regulatory elements. *General and Comparative Endocrinology* 134, 57-61.

Auperin, B., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Fostier, A. y Prunet, P., 1997. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology* 108, 35-44.

B

Barouki, R. y Morel, Y., 2001. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochemical Pharmacology* 61, 511-516.

Barton, B.A. y Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1, 3-26.

Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L. y Tort, L., 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research* 36, 172-179.

Bass, S.H., Mulkerrin, M.G. y Wells, J.A., 1991. A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4498-4502.

Baumann, G., Amburn, K. y Shaw, M.A., 1988. The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology*. 122, 976-984.

Bazan, J.F., 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6934-6938.

Bell, M.V., Dick, J.R., Thrush, M. y Navarro, J.C., 1996. Decreased 20:4n-6/20:5n-3 ratio in sperm from cultured sea bass *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared to wild fish. *Aquaculture* 144, 189-199.

Bello, S.M., Franks, D.G., Stegeman, J.J. y Hahn, M.E., 2001. Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: In vivo and in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol. Sci.* 60, 77-91.

Benedet, S., Johansson, V., Sweeney, G., Galay-Burgos, M. y Björnsson, B., 2005. Cloning of two Atlantic salmon growth hormone receptor isoforms and *in vitro* ligand-binding response. *Fish Physiol Biochem* 31, 315-329.

Benedet, S., Björnsson, B.T., Taranger, G.L. y Andersson, E., 2008. Cloning of somatolactin alpha, beta forms and the somatolactin receptor in Atlantic salmon: seasonal expression profile in pituitary and ovary of maturing female broodstock. *Reprod. Biol Endocrinol.* 6, 42.

Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S. y Pérez-Sánchez, J., 2007. Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267, 199-212.

Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A. y Pérez-Sánchez, J., 2008. Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/mortalin/mtHsp70/PBP74/HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149, 428-438.

Bermejo-Nogales, A., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Navarro, J.C., Sitjà-Bobadilla, A. y Pérez-Sánchez, J., 2007. Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in relation to redox homeostasis. *Aquaculture* 267, 213-224.

Bernardi, G., D'Onofrio, G., Caccio', S. y Bernardi, G., 1993. Molecular phylogeny of bony fishes, based on the amino acid sequence of the growth hormone. *Journal of Molecular Evolution* 37, 644-649.

Biga, P.R., Schelling, G.T., Hardy, R.W., Cain, K.D., Overturf, K. y Ott, T.L., 2004. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH

mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 135, 324-333.

Binder, G., Trebar, B., Baur, F., Schweizer, R. y Ranke, M.B., 2008. Homozygosity of the d3-growth hormone receptor polymorphism is associated with a high total effect of GH on growth and a low BMI in girls with Turner syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 68, 567-572.

Björnsson, B.T., Johansson, V., Benedet, S., Einarsdottir, I.E., Hildahl, J., Agustsson, T. y Jönsson, E., 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 227-242.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. y Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19, 225-268.

Boulay, J.L., O'Shea, J.J. y Paul, W.E., 2003. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity* 19, 159-163.

Butler, A.A. y Le Roith, D., 2001. Control of growth by the somatotrophic axis: Growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annual Review of Physiology* 63, 141-164.

C

Caelters, A., Berishvili, G., Meli, M.L., Eppler, E. y Reinecke, M., 2004. Establishment of a real-time RT-PCR for the determination of absolute amounts of IGF-I and IGF-II gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia. *Gen. comp. endocrinol.* 137, 196-204.

Calduch-Giner, J.A., Pendón, C., Valdivia, M.M. y Pérez-Sánchez, J., 1998. Recombinant somatolactin as a stable and bioactive protein in a cell culture bioassay: development and validation of a sensitive and reproducible radioimmunoassay. *J Endocrinol* 156, 441-447.

Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P. y Pérez-Sánchez, J., 1995. Evidence for a direct action of GH on haemopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Endocrinol* 146, 459-467.

Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D. y Pérez-Sánchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136, 1-13.

Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J. y Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269-3273.

Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P. y Pérez-Sánchez, J., 1997. Growth hormone as an in vitro phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell and Tissue Research* 287, 535-540.

Cambré, M.L., Verdonck, W., Ollevier, F., Vandesaende, F., Batten, T.F.C. y Kühn, E.R., 1986. Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* 61, 368-375.

Casse, A.H., Desplanches, D., Mayet-Sornay, M.H., Raccurt, M., Jegou, S. y Morel, G., 2003. Growth hormone receptor expression in atrophying muscle fibers of rats. *Endocrinology* 144, 3692-3697.

Chan, C.B. y Cheng, C.H.K., 2004. Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 214, 81-95.

Chauvigné, F., Gabillard, J.C., Weil, C. y Rescan, P.Y., 2003. Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6,

and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology* 132, 209-215.

Chen, J.Y., Chen, J.C., Chang, C.Y., Shen, S.C., Chen, M.S. y Wu, J.L., 2000. Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides. *Aquaculture* 181, 347-360.

Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Company, R., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M.M. y Pérez-Sánchez, J., 2001. Somatotropic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130, 435-445.

Company, R., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M. y Pérez-Sánchez, J., 2000. cDNA cloning and sequence of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 127, 183-192.

Connor, T.J., Brewer, C., Kelly, J.P. y Harkin, A., 2005. Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production. *Journal of Neuroimmunology* 159, 119-128.

Craig, E.A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kosc-Smithers, J. y Nicolet, C.M., 1989. SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3000-3008.

Craven, S.E., French, D., Ye, W., de Sauvage, F. y Rosenthal, A., 2005. Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood* 105, 3528-3534.

Cunningham, B.C., Ultsch, M., de Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R. y Wells, J.A., 1991. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254, 821-825.

D

de Vos, A.M., Ultsch, M. y Kossiakoff, A.A., 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.

Deane, E. y Woo, N., 2009. Modulation of fish growth hormone levels by salinity, temperature, pollutants and aquaculture related stress: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19, 97-120.

Denley, A., Cosgrove, L.J., Booker, G.W., Wallace, J.C. y Forbes, B.E., 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 421-439.

Dickhoff, W.W., Beckman, B.R., Larsen, D.A., Duan, C. y Moriyama, S., 1997. The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 231-236.

Domene, H.M., Cassorla, F., Werner, H., Roberts, C.T., Jr. y Leroith, D., 1995. Rat growth hormone receptor/growth hormone-binding protein mRNAs with divergent 5'-untranslated regions are expressed in a tissue-specific manner. *DNA Cell Biol.* 14, 195-204.

Doneen, B.A., Bewley, T.A. y Li, C.H., 1979. Studies on prolactin. Selective reduction of the disulfide bonds of the ovine hormone. *Biochemistry* 18, 4851-4860.

Duguay, S.J., Lai-Zhang, J., Steiner, D.F., Funkenstein, B. y Chan, S.J., 1996. Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNAs in *Sparus aurata*. *J. Mol. Endocrinol.* 16, 123-132.

Dyer, A.R., Barlow, C.G., Bransden, M.P., Carter, C.G., Glencross, B.D., Richardson, N., Thomas, P.M., Williams, K.C. y Carragher, J.F., 2004. Correlation of plasma IGF-I concentrations and growth rate in aquacultured finfish: a tool for assessing the potential of new diets. *Aquaculture* 236, 583-592.

E

Edens, A., Southard, J.N. y Talamantes, F., 1994. Mouse growth hormone-binding protein and growth hormone receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinology* 135, 2802-2805.

Edens, A. y Talamantes, F., 1998. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev* 19, 559-582.

Edwards 3rd, C.K., Arkins, S., Yunger, L.M., Blum, A., Dantzer, R. y Kelley, K.W., 1992. The macrophage-activating properties of growth-hormone. *Cellular and Molecular Neurobiology* 12, 499-510.

Esposito, N., Paterlini, P., Kelly, P.A., Postel-Vinay, M.C. y Finidori, J., 1994. Expression of two isoforms of the human growth hormone receptor in normal liver and hepatocarcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 103, 13-20.

F

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2002. El estado actual de la pesca y la acuicultura. FAO Fisheries Department, Rome.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2006. El estado actual de la pesca y la acuicultura. FAO Fisheries Department, Rome.

Fine, M., Amuly, R., Sandowski, Y., Marchant, T.A., Chan, S.J., Gertler, A. y Funkenstein, B., 1997. Recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) insulin-like growth factor-I: subcloning, expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *J Endocrinol* 153, 139-150.

Forsyth, I.A. y Wallis, M., 2002. Growth hormone and prolactin—molecular and functional evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, 291-312.

Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A.L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P. y Dickhoff, W.W., 2004. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *General and Comparative Endocrinology* 139, 61-71.

Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A.L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P. y Dickhoff, W.W., 2005. Identification of the salmon somatolactin receptor, a new member of the cytokine receptor family. *Endocrinology* 146, 2354-2361.

Fukamachi, S. y Meyer, A., 2007. Evolution of receptors for growth hormone and somatolactin in fish and land vertebrates: Lessons from the Lungfish and Sturgeon orthologues. *Journal of Molecular Evolution* 65, 359-372.

Fukamachi, S., Yada, T. y Mitani, H., 2005. Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptors. *Genetics* 171, 1875-1883.

Funkenstein, B., Chen, TT., Powers, DA. y Cavari, B., 1991. Cloning and sequencing of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene* 103, 246-247.

G

Gabillard, J.C., Kamangar, B.B. y Montserrat, N., 2006. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology* 191, 15-24.

Glahder, J.A., Hansen, C.N., Vinther, J., Madsen, B.S. y Norrild, B., 2003. A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA. *Journal of General Virology* 84, 3429-3441.

Godowski, P.J., Leung, D.W., Meacham, L.R., Galgani, J.P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P.S., Parks, J.S., Laron, Z. y Wood, W.I., 1989. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 8083-8087.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S. y Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S.J. y Pérez-Sánchez, J., 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749-767.

Gómez-Requeni, P., Calduch-Giner, J., Vega-Rubín de Celis, S., Médale, F., Kaushik, S.J. y Pérez-Sánchez, J., 2005. Regulation of the somatotropic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 94, 353-361.

Goodyer, C.G., Zogopoulos, G., Schwartzbauer, G., Zheng, H., Hendy, G.N. y Menon, R.K., 2001. Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5'-flanking region. *Endocrinology* 142, 1923-1934.

Goujon, L., Allevato, G., Simonin, G., Paquereau, L., Cam, A.L., Clark, J., Nielsen, J.H., Djiane, J., Postel-Vinay, M., Edery, M. y Kelly, P.A., 1994. Cytoplasmic sequences of the growth hormone receptor necessary for signal transduction. *PNAS* 91, 957-961.

Greenwood, F.C., Hunter, W.M. y Glover, J.S., 1963. The preparation of ^{131}I -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J.* 89:114-23., 114-123.

Gross, P. y Oelgeschläger, T., 2006. Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochemical Society symposia* 225-236.

H

Hadden, D. y Prout, T., 1964. A growth hormone binding protein in normal human serum. *Nature* 202, 1342-1343.

Hai, T., Wolfgang, C.D., Marsee, D.K., Allen, A.E. y Sivaprasad, U., 1999. ATF3 and stress responses. *Gene Expression* 7, 321-335.

Hai, T. y Hartman, M.G., 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1-11.

Hall, T.R., Harvey, S. y Scanes, C.G., 1986. Control of growth hormone secretion in the vertebrates: A comparative survey. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 84, 231-253.

Hansen, L.G., Wiekhorst, W.B. y Simon, J., 1976. Effects of dietary Aroclor 1242 on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and the selective accumulation of PCB components. *J. Fish. Res. Board Can.* 33, 1343-1352.

Hansen, L.H., Wang, X., Kopchick, J.J., Bouchelouche, P., Nielsen, J.H., Galsgaard, E.D. y Billestrup, N., 1996. Identification of tyrosine residues in the intracellular domain of the growth hormone receptor required for transcriptional signaling and Stat5 activation. *J. Biol. Chem.* 271, 12669-12673.

Harding, H.P., Zhang, Y.H., Zeng, H.Q., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. y Ron, D., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell* 11, 619-633.

Harris, J. y Bird, D.J., 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 77, 163-176.

Harrison, S.M., Barnard, R., Ho, K.Y., Rajkovic, I. y Waters, M.J., 1995. Control of growth hormone (GH) binding protein release from human hepatoma cells expressing full-length GH receptor. *Endocrinology* 136, 651-659.

Hauser, S.D., McGrath, M.F., Collier, R.J. y Krivi, G.G., 1990. Cloning and in vivo expression of bovine growth hormone receptor mRNA. *Mol Cell Endocrinol.* 72, 187-200.

Heap, D., Collier, R.J., Boyd, C.K. y Lucy, M.C., 1996. Expression of alternate growth hormone receptor messenger rna in ovary and uterus of cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 13, 421-430.

Hendricks, J.D., 2002. Adventitious toxins. En: Halver, J.E. y Hardy, R.W. (eds.), Academic Press, San Diego, pp. 601-649.

Herrington, J., Smit, L.S., Schwartz, J. y Carter-Su, C., 2000. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene.* 19, 2585-2597.

Herrington, J. y Carter-Su, C., 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12, 252-257.

Hickman, C.P., Roberts, L.S. y Parson, A., 1998. Principios integrales de zoología. McGraw-Hill · Interamericana, Madrid.

Hildahl, J., Power, D., Björnsson, B.T. y Einarsdóttir, I.E., 2008. Involvement of growth hormone-insulin-like growth factor I system in cranial remodeling during halibut metamorphosis as indicated by tissue- and stage-specific receptor gene expression and the presence of growth hormone receptor protein. *Cell and Tissue Research* 320, 211-225.

Hildahl, J., Sweeney, G., Galay-Burgos, M., Einarsdóttir, I.E. y Björnsson, B.T., 2007. Cloning of Atlantic halibut growth

hormone receptor genes and quantitative gene expression during metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology* 151, 143-152.

Hilton, D.J., 1999. Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 55, 1568-1577.

HO, W., Wong, M.W. y Chan, A.P., 1991. Cloning and sequencing of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth-hormone gene. *Biochimica et biophysica acta* 1090, 245-248.

I

Ingleton, P.M., Power, D.M., Canario, A.V., Martin, T.J. y nks, J.A., 1998. Parathyroid hormone-related protein and somatolactin in sea bream (*Sparus aurata*) brain and pituitary. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839, 370-371.

J

Jacobson, J. y Jacobson, S., 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *New Engl. J. Med.* 335, 783-789.

Jiang, H., Okamura, C.S., Boyd, C.K. y Lucy, M.C., 2000. Identification of Sp1 as the transcription factor for the alternative promoter P2 of the bovine growth hormone receptor gene. *J Mol Endocrinol* 24, 203-214.

Jiang, H. y Lucy, M.C., 2001. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene* 265, 45-53.

Jiao, B., Huang, X., Chan, C.B., Zhang, L., Wang, D. y Cheng, C.H.K., 2006. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *J Mol Endocrinol* 36, 23-40.

Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Plataniias, L.C. y Yi, T., 1996. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2- domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6985-6992.

K

Kajimura, S., Kawaguchi, N., Kaneko, T., Kawazoe, I., Hirano, T., Visitacion, N., Grau, E.G. y Aida, K., 2004. Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. *J Endocrinol* 181, 65-76.

Kaplan, S.A. y Cohen, P., 2007. The Somatomedin Hypothesis 2007: 50 Years Later. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4529-4535.

Kaul, S.C., Deocaris, C.C. y Wadhwa, R., 2007. Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. *Experimental Gerontology* 42, 263-274.

Kawauchi, H. y Sower, S.A., 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *General and Comparative Endocrinology* 148, 3-14.

Kawauchi, H., Suzuki, K., Yamazaki, T., Moriyama, S., Nozaki, M., Yamaguchi, K., Takahashi, A., Youson, J. y Sower, S.A., 2002. Identification of growth hormone in the sea lamprey, an extant representative of a group of the most ancient vertebrates. *Endocrinology* 143, 4916-4921.

Kim, H.J., Jung, K.J., Yu, B.P., Cho, C.G., Choi, J.S. y Chung, H.Y., 2002. Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 123, 1589-1595.

Kim, H., Barton, E., Muja, N., Yakar, S., Pennisi, P. y LeRoith, D., 2005. Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo. *Endocrinology* 146, 1772-1779.

Kim, S.O., Jiang, J., Yi, W., Feng, G.S. y Frank, S.J., 1998. Involvement of the Src homology 2-containing tyrosine phosphatase SHP-2 in growth hormone signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 2344-2354.

Kitamura, T., Ogorochi, T. y Miyajima, A., 1994. Multimeric cytokine receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 5, 8-14.

Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. y Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.

Kopchick, J.J. y Andry, J.M., 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 293-314.

Kratzsch, J., Wu, Z., Kiess, W., Dehmel, B., Bosse-Henck, A., Reuter, W., Pflaum, C.D. y Strasburger, C.J., 2001. The exon 3-retaining and the exon 3-deleted forms of the growth hormone-binding protein (GHBP) in human serum are regulated differently. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 54, 61-68.

L

Laiz-Carrión, R., del Mar Segura-Noguera, M., del Pilar Martín del Río, M. y Mancera, J.M., 2003. Ontogeny of adenohypophyseal cells in the pituitary of the American shad (*Alosa sapidissima*). *General and Comparative Endocrinology* 132, 454-464.

Lam, S.H., Winata, C.L., Tong, Y., Korzh, S., Lim, W.S., Korzh, V., Spitsbergen, J., Mathavan, S., Miller, L.D., Liu, E.T. y Gong, Z., 2006. Transcriptome kinetics of arsenic-induced adaptive response in zebrafish liver. *Physiological Genomics* 27, 351-361.

Larsen, D.A., Beckman, B.R. y Dickhoff, W.W., 2001. The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and endocrine physiology (insulin, insulin-like growth factor-I, and thyroxine) of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 123, 308-323.

Le Bail, P.-Y., Mourot, B., Zohar, J. y Pérez-Sánchez, J., 1993. Application of a sensitive radioimmunoassay for the measurement of growth hormone in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and other sparid fish. *Canadian Journal of Zoology* 71, 1500-1505.

Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L. y Butler, A., 2001a. The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22, 53-74.

Le Roith, D., Scavo, L. y Butler, A., 2001b. What is the role of circulating IGF-I? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12, 48-52.

Lee, L.T.O., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L.Y. y Cheng, C.H.K., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 270, 121-129.

Leung, D.W., Spencer, S.A., Cachianes, G., Hammonds, R.G., Collins, C., Henzel, W.J., Barnard, R., Waters, M.J. y Wood, W.I., 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330, 537-543.

Lewin, B., 1994. *Genes V*. Oxford University Press, New York.

Li, M.H., Peterson, B.C., Janes, C.L. y Robinson, E.H., 2006. Comparison of diets containing various fish meal levels on growth performance, body composition, and insulin-like growth factor-I of juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus* of different strains. *Aquaculture* 253, 628-635.

Li, Y., Liu, X., Zhang, Y., Zhu, P. y Lin, H., 2007. Molecular cloning, characterization and distribution of two types of growth hormone receptor in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology* 152, 111-122.

Liongue, C. y Ward, A., 2007. Evolution of Class I cytokine receptors. *BMC Evolutionary Biology* 7, 120.

Lister, J.A., Close, J. y Raible, D.W., 2001. Duplicate mitf genes in zebrafish: complementary expression and conservation of melanogenic potential. *Dev. Biol.* 237, 333-344.

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402-408.

Lynch, M. y Force, A., 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459-473.

M

Mannor, D.A., Winer, L.M., Shaw, M.A. y Baumann, G., 1991. Plasma growth hormone (GH)-binding proteins: effect on GH binding to receptors and GH action. *J Clin Endocrinol Metab.* 73, 30-34.

Mantovani, R., 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239, 15-27.

Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Calduch-Giner, J.A., Rodríguez, R.B., Valdivia, M.M. y Pérez-Sánchez, J., 1995. The use of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp Biochem. Physiol A Physiol* 110, 335-340.

Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., Pérez-Sánchez, J. y Valdivia, M.M., 1994. Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead seabream growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* 96, 179-188.

Martini, J.F., Pezet, A., Guezennec, C.Y., Edery, M., Postel-Vinay, M.C. y Kelly, P.A., 1997. Monkey growth hormone (GH) receptor gene expression. Evidence for two mechanisms for the generation of the GH binding protein. *J. Biol. Chem.* 272, 18951-18958.

Mathews, C.K. y van Holde, K.E., 1998. *Bioquímica*. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U., Madrid.

May, D., Alrubaian, J., Patel, S., Dores, R.M. y Rand-Weaver, M., 1999. Studies on the GH/SL gene family: cloning of african lungfish (*Protopterus annectens*) growth hormone and somatolactin and toad (*Bufo marinus*) growth hormone. General and Comparative Endocrinology 113, 121-135.

Menzies, B.R., Shaw, G., Fletcher, T.P., Pask, A.J. y Renfree, M.B., 2008. Exon 3 of the growth hormone receptor (GH-R) is specific to eutherian mammals. Molecular and Cellular Endocrinology 296, 64-68.

Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Martínez Valdivia, M. y Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. Gen. comp. endocrinol. 128, 102-111.

Moerth, C., Schneider, M.R., Renner-Mueller, I., Blutke, A., Elmlinger, M.W., Erben, R.G., Camacho-Hübner, C., Hoeflich, A. y Wolf, E., 2007. Postnatally Elevated Levels of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-II Fail to Rescue the Dwarfism of IGF-I-Deficient Mice except Kidney Weight. Endocrinology 148, 441-451.

Moffat, J.C., Edens, A. y Talamantes, F., 1999. Structure and expression of the mouse growth hormone receptor/growth hormone binding-protein gene. J Mol Endocrinol 23, 33-44.

Moffat, J.G., Dao, H. y Talamantes, F., 2000. Alternative 5'-untranslated regions of mouse GH receptor/binding protein messenger RNA are derived from sequences adjacent to the major L2 promoter. J Endocrinol 167, 145-152.

Momoda, T.S., Schwindt, A.R., Feist, G.W., Gerwick, L., Bayne, C.J. y Schreck, C.B., 2007. Gene expression in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during the stress response. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics 2, 303-315.

Moriyama, S., Oda, M., Takahashi, A., Sower, S.A. y Kawauchi, H., 2006. Genomic structure of the sea lamprey growth hormone-

encoding gene. *General and Comparative Endocrinology* 148, 33-40.

Mundheim, H., Aksnes, A. y Hope, B., 2004. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture* 237, 315-331.

N

Nacci, D.E., Kohan, M., Pelletier, M. y George, E., 2002. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquatic Toxicology* 57, 203-215.

Nakao, N., Higashimoto, Y., Ohkubo, T., Yoshizato, H., Nakai, N., Nakashima, K. y Tanaka, M., 2004. Characterization of structure and expression of the growth hormone receptor gene of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Endocrinol* 182, 157-164.

Naylor, N., Goldberg, R., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H. y Troell, M., 2000. Effects of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017-1024.

Nelson, J.S., 1994. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, I.Y. y Greenwood, F.C., 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A.* 68, 866-870.

Noh, J.K., Cho, K.N., Nam, Y.K., Kim, D.S. y Kim, C.G., 1999. Genomic organization and sequence of the mud loach (*Misgurnus mizolepis*) growth hormone gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes. *Mol Cells.* 9, 638-645.

Norbeck, L.A., Kittilson, J.D. y Sheridan, M.A., 2007. Resolving the growth-promoting and metabolic effects of growth hormone: Differential regulation of GH-IGF-I system components. *General and Comparative Endocrinology* 151, 332-341.

Nordgarden, U., Hansen, T., Hemre, G.I., Sundby, A. y Björnsson, B.T., 2005. Endocrine growth regulation of adult Atlantic salmon in seawater: The effects of light regime on plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I, and insulin levels. *Aquaculture* 250, 862-871.

O

Ono, M., Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T., Noso, Y. y Kawauchi, H., 1990. cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *PNAS* 87, 4330-4334.

Orlovskii, I.V., Sverdlova, P.S. y Rubtsov, P.M., 2004. Fine structure, expression, and polymorphism of the human growth hormone receptor gene. *Molecular Biology* 38, 24-33.

Ortuno, J., Esteban, M.A. y Meseguer, J., 2001. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish & Shellfish Immunology* 11, 187-197.

Ozaki, Y., Fukada, H., Kazeto, Y., Adachi, S., Hara, A. y Yamauchi, K., 2006. Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 143, 422-431.

P

Palenzuela, O., Agnetti, F., Albiñana, G., Alvarez-Pellitero, P., Athanassoupoulou, F., Crespo, S., Ghittino, C., Golomazou, H., Le Breton, A., Lipshitz, A., Marques, A., Padrós, F., Ram, S. y Raymond, J.C., 2004. Applicability of PCR screening for the monitoring of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infection in Mediterranean Aquaculture: an epidemiological survey in sparid

facilities. European Aquaculture Society Special Publication 34, 639-640.

Pantel, J., Grulich-Henn, J., Bettendorf, M., Strasburger, C.J., Heinrich, U. y Amselem, S., 2003. Heterozygous nonsense mutation in exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) in severe GH insensitivity (Laron Syndrome) and the issue of the origin and function of the GHRd3 isoform. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1705-1710.

Parpoura, A.C.R. y Alexis, M.N., 2001. Effects of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquaculture International* 9, 463-476.

Patrino, M., Maccatrozzo, L., Funkenstein, B. y Radaelli, G., 2006. Cloning and expression of insulin-like growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 144, 137-151.

Pawson, T., 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-580.

Pekhletsky, R.I., Chernov, B.K. y Rubtsov, P.M., 1992. Variants of the 5'-untranslated sequence of human growth hormone receptor mRNA. *Molecular and Cellular Endocrinology* 90, 103-109.

Pérez-Sánchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A. y Valdivia, M.M., 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 243-258.

Pérez-Sánchez, J., Marti-Palanca, H. y Le Bail, P.-Y., 1994. Homologous growth hormone (GH) binding in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *J. Fish Biol.* 44, 287-301.

Pérez-Sánchez, J., Weil, C. y Le Bail, P.-Y., 1992. Effects of human insulin-like growth factor-I on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *Journal of Experimental Zoology* 262, 287-290.

Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H. y Kaushik, S.J., 1995. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546-552.

Peterson, B.C., Waldbieser, G.C. y Bilodeau, L., 2004. IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 139, 317-323.

Picha, M.E., Turano, M.J., Tipsmark, C.K. y Borski, R.J., 2008. Regulation of endocrine and paracrine sources of Igfs and Gh receptor during compensatory growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *J Endocrinol* 199, 81-94.

Pickering, A. y Pottinger, T., 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 253-258.

Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture* 111, 51-63.

Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., Carragher, J.F. y Le Bail, P.Y., 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 83, 86-93.

Pierce, A.L., Fox, B.K., Davis, L.K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T. y Grau, E.G., 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *General and Comparative Endocrinology* 154, 31-40.

Pierce, A.L., Fukada, H. y Dickhoff, W.W., 2005. Metabolic hormones modulate the effect of growth hormone (GH) on insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA level in primary culture of salmon hepatocytes. *The Journal of endocrinology* 184, 341-349.

Prabhakar, N.R., 2001. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia: Invited review: Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 90, 1986-1994.

Q

Qin, G. y Meng, Z., 2005. Effect of sulfur dioxide inhalation on CYP1A1 and CYP1A2 in rat liver and lung. *Toxicology Letters* 160, 34-42.

R

Ram, P.A. y Waxman, D.J., 1999. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 35553-35561.

Rand-Weaver, M., Noso, T., Muramoto, K. y Kawauchi, H., 1991. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry* 30, 1509-1515.

Rand-Weaver, M. y Kawauchi, H., 1993. Growth hormone, prolactin and somatolactin: a structural overview. En: Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (eds.), *Molecular biology frontiers*, Vol. 2. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 39-56.

Raven, P.A., Uh, M., Sakhrani, D., Beckman, B.R., Cooper, K., Pinter, J., Leder, E.H., Silverstein, J. y Devlin, R.H., 2008. Endocrine effects of growth hormone overexpression in transgenic coho salmon. *General and Comparative Endocrinology* 159, 26-37.

Ridderstråle, M., Degerman, E. y Tornqvist, H., 1995. Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 3471-3474.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. y Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245, 154-160.

Rogatsky, I., Zarembek, K.A. y Yamamoto, K.R., 2001. Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *Embo Journal* 20, 6071-6083.

Ross, R.J.M., Esposito, N., Shen, X.Y., Von Laue, S., Chew, S.L., Dobson, P.R.M., Postel-Vinay, M.C. y Finidori, J., 1997. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol Endocrinol* 11, 265-273.

Rotllant, J., Balm, P.H.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E. y Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology* 121, 333-342.

Rotllant, J., Balm, P.H.M., Ruane, N.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E. y Tort, L., 2000. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and α -melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *General and Comparative Endocrinology* 119, 152-163.

Rotwein, P., 1991. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors*. 5, 3-18.

Rui, L. y Carter-Su, C., 1999. Identification of SH2-B β as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 7172-7177.

S

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Prunet, P. y Pérez-Sánchez, J., 2009. Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement. Differential stress response of growth hormone receptors. Comp. Biochem. Physiol. A in press.

Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Láiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. y Soengas, J.L., 2005. Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative Experimental Biology 303A, 761-775.

Sargent, J., Henderson, R. y Tocher, D.R., 2002. The lipids. Academic Press, New York, NY.

Sargent, J. y Tacon, A., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. Proc. Nutr. Soc. 58, 377-383.

Seidel, B., Glasow, A., Schutt, M., Kiess, W., Wu, Z., Strasburger, C.J. y Kratzsch, J., 2003. Association between the GH receptor/exon 3 genotype and the level of exon 3-positive GH-binding protein in human serum. Eur J Endocrinol. 148, 317-324.

Shimizu, M., Swanson, P., Fukada, H., Hara, A. y Dickhoff, W.W., 2000. Comparison of extraction methods and assay validation for salmon insulin-like growth factor-I using commercially available components. General and Comparative Endocrinology 119, 26-36.

Shved, N., Berishvili, G., Häusermann, E., D'Cotta, H., Baroiller, J.F. y Eppler, E., 2009. Challenge with 17 α -ethinylestradiol

(EE2) during early development persistently impairs growth, differentiation, and local expression of IGF-I and IGF-II in immune organs of tilapia. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 524-530.

Sidhu, K.S., 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 38, 336-344.

Silverstein, J.T., Wolters, W.R., Shimizu, M. y Dickhoff, W.W., 2000. Bovine growth hormone treatment of channel catfish: strain and temperature effects on growth, plasma IGF-I levels, feed intake and efficiency and body composition. *Aquaculture* 190, 77-88.

Sitjà-Bobadilla, A., Diamant, A., Palenzuela, O. y varez-Pellitero, P., 2007. Effect of host factors and experimental conditions on the horizontal transmission of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) to gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., and European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* 30, 243-250.

Smale, S.T. y Kadonaga, J.T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449-479.

Smale, S.T., 1997. Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1351, 73-88.

Small, B.C., Murdock, C.A., Waldbieser, G.C. y Peterson, B.C., 2006. Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31, 340-356.

Sobrier, M.L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Amselem, S. y Goossens, M., 1993. Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor. *FEBS Letters* 319, 16-20.

Sotiropoulos, A., Goujon, L., Simonin, G., Kelly, P.A., Postel-Vinay, M.C. y Finidori, J., 1993. Evidence for generation of the

growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinology* 132, 1863-1865.

Southard, J.N., Barrett, B.A., Bikbulatova, L., Ilkbahar, Y., Wu, K. y Talamantes, F., 1995. Growth hormone (GH) receptor and GH-binding protein messenger ribonucleic acids with alternative 5'-untranslated regions are differentially expressed in mouse liver and placenta. *Endocrinology* 136, 2913-2921.

T

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.

Tang, Y., Lin, C.M., Chen, T.T., Kawauchi, H., Dunham, R.A. y Powers, D.A., 1993. Structure of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Mol Mar. Biol Biotechnol.* 2, 198-206.

Taylor, J.S., Van de Peer, Y. y Meyer, A., 2001. Genome duplication, divergent resolution and speciation. *Trends Genet.* 17, 299-301.

Terova, G., Rimoldi, S., Chini, V., Gornati, R., Bernardini, G. y Saroglia, M., 2007. Cloning and expression analysis of insulin-like growth factor I and II in liver and muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during long-term fasting and refeeding. *Journal of Fish Biology* 70, 219-233.

Thomas, M.J., 1998. The molecular basis of growth hormone action. *Growth Hormone & IGF Research* 8, 3-11.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876-4882.

Trinder, P., 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 22, 158-161.

Tse, D.L.Y., Tse, M.C.L., Chan, C.B., Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R. y Cheng, C.H.K., 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim. Biophys. Acta* 1625, 64-76.

Tsujimoto, K., Ono, T., Sato, M., Nishida, T., Oguma, T. y Tadakuma, T., 2005. Regulation of the expression of caspase-9 by the transcription factor activator protein-4 in glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 27638-27644.

Tuggle, C.K. y Trenkle, A., 1996. Control of growth hormone synthesis. *Domestic Animal Endocrinology* 13, 1-33.

U

Uchida, K., Moriyama, S., Breves, J.P., Fox, B.K., Pierce, A.L., Borski, R.J., Hirano, T. y Gordon Grau, E., 2009. cDNA cloning and isolation of somatolactin in Mozambique tilapia and effects of seawater acclimation, confinement stress, and fasting on its pituitary expression. *General and Comparative Endocrinology* 161, 162-170.

Urbanek, M., Russell, J.E., Cooke, N.E. y Liebhaber, S.A., 1993. Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 19025-19032.

V

van den Eijnden, M.J.M., Lahaye, L.L. y Strous, G.J., 2006. Disulfide bonds determine growth hormone receptor folding, dimerisation and ligand binding. *J Cell Sci* 119, 3078-3086.

van der Oost, R., Beyer, J. y Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk

assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.

Van Weerd, J.H. y Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 107-112.

Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P. y Pérez-Sánchez, J., 2004. Production and characterization of recombinantly derived peptides and antibodies for accurate determinations of somatotactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp Endocrinol* 139, 266-277.

Very, N.M., Kittilson, J.D., Norbeck, L.A. y Sheridan, M.A., 2005. Isolation, characterization, and distribution of two cDNAs encoding for growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 140, 615-628.

Volff, J.N., 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94, 280-294.

Vong, Q.P., Chan, K.M. y Cheng, C.H., 2003. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. *J. Endocrinol.* 178, 513-521.

W

Wagner, A., 2001. Birth and death of duplicated genes in completely sequenced eukaryotes. *Trends Genet.* 17, 237-239.

Wallis, M., 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones. *Journal of Molecular Evolution* 38, 619-627.

Wallis, M., 1996. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: A pattern of near-stasis interrupted by sustained

bursts of rapid change. *Journal of Molecular Evolution* 43, 93-100.

Wallis, M., 2000. Episodic evolution of protein hormones: molecular evolution of pituitary prolactin. *Journal of Molecular Evolution* 50, 465-473.

Wang, X., Darus, C.J., Xu, B.C. y Kopchick, J.J., 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. *Mol Endocrinol* 10, 1249-1260.

Wargelius, A., Fjellidal, P.G., Benedet, S., Hansen, T., Björnsson, B.T. y Nordgarden, U., 2005. A peak in gh-receptor expression is associated with growth activation in Atlantic salmon vertebrae, while upregulation of igf-I receptor expression is related to increased bone density. *Gen. comp. endocrinol.* 142, 163-168.

Wei, Y., Rhani, Z. y Goodyer, C.G., 2006. Characterization of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid variants in human adipocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1901-1908.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.

Wilkinson, R.J., Porter, M., Woolcott, H., Longland, R. y Carragher, J.F., 2006. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145, 214-224.

Wood, A.W., Duan, C. y Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. En: Jeon, K.W. (ed.), *International Review of Cytology*, Vol. 243. Academic Press poner volumen 243 en vez de edn, New York, pp. 215-285.

Wright, K.L., Moore, T.L., Vilen, B.J., Brown, A.M. y Jenny, P.-Y., 1995. Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene expression is up-regulated by cooperative interactions of Sp1 and NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 270, 20978-20986.

X

Xu, Q., Springer, L., Merchant, J.L. y Jiang, H., 2006. Identification of zinc finger binding protein 89 (ZBP-89) as a transcriptional activator for a major bovine growth hormone receptor promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* 251, 88-95.

Y

Yada, T., 2007. Growth hormone and fish immune system. *General and Comparative Endocrinology* 152, 353-358.

Yada, T. y Nakanishi, T., 2002. Interaction between endocrine and immune systems in fish. En: Kwang, W.J. (ed.), *International Review of Cytology A Survey of Cell Biology*, Academic Press, pp. 35-92.

Yakar, S., Le Roith, D. y Brodt, P., 2005. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 407-420.

Yang, D., Elner, S.G., Bian, Z.-M., Till, G.O., Petty, H.R. y Elner, V.M., 2007. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Experimental Eye Research* 85, 462-472.

Z

Zhang, Y., Jiang, J., Kopchick, J.J. y Frank, S.J., 1999. Disulfide Linkage of Growth Hormone (GH) Receptors (GHR) Reflects GH-induced GHR Dimerization. Association of JAK2 with the GHR is enhanced by receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* 274, 33072-33084.

Zhou, R., Cheng, H. y Tiersch, T.R., 2002. Differential genome duplication and fish diversity. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 11, 331-337.

Zhou, Y., He, L. y Kopchick, J.J., 1994. An exon encoding the mouse growth hormone binding protein (mGHBP) carboxy

terminus is located between exon 7 and 8 of the mouse growth hormone receptor gene. *Receptor*. 4, 223-227.

Zhu, T., Goh, E.L.K., Graichen, R., Ling, L. y Lobie, P.E., 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal*. 13, 599-616.

Zhu, Y., Stiller, J.W., Shaner, M.P., Baldini, A., Scemama, J.L. y Capehart, A.A., 2004. Cloning of somatolactin alpha and beta cDNAs in zebrafish and phylogenetic analysis of two distinct somatolactin subtypes in fish. *J Endocrinol* 182, 509-518.

Zou, L., Burmeister, L.A. y Sperling, M.A., 1997. Isolation of a liver-specific promoter for human growth hormone receptor gene. *Endocrinology* 138, 1771-1774.

9. Anexo: artículos publicados



Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

Alfonso Saera-Vila, Josep-Alvar Calduch-Giner, Jaume Pérez-Sánchez*

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, CSIC, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

Received 17 September 2004; revised 17 September 2004; accepted 11 November 2004

Available online 11 January 2005

Abstract

Nucleotide sequences encoding for functional growth hormone receptors (GHR) are now available in salmonids (coho and masu salmon) and other fish orders. Several authors have hypothesized a divergent evolution of salmonid GHRs, but the recent finding that a trout cDNA is related to non-salmonid (GHR type I) rather than to salmonid GHRs (GHR type II) points out a possible duplication of actively transcribed GHR genes. To address this issue, we search by RT-PCR for GHR type II in trout, gilthead sea bream, European sea bass, and turbot. Both in trout and gilthead sea bream, a cDNA sequence with all the characteristic features of masu and coho salmon GHRs (GHR type II) was found. Similarly, in European sea bass, a cDNA encoding for the intracellular domain of GHR type II was reported. No positive results were found in turbot, but searches in genome databases of fugu and zebrafish identified DNA sequences with a significant similarity to fish GHR type I and II, which are more related each other than to GHRs of tetrapods. Gene organization is, however, highly conserved through the evolution of vertebrates, and eight exons homologous to exons 2 and 4–10 of mammals were found in fish GHRs. Transcriptional regulation of GHR type I and II was also addressed by means of real-time PCR assays in gilthead sea bream. In liver and adipose tissue, GHR type I was the most abundant transcript, but the expression of GHR type I and II was practically equal in skeletal muscle. Both in liver and adipose tissue, the two GHRs were down-regulated by fasting. In skeletal muscle, the expression of GHR type I remained unaltered in fasted fish, whereas a 2- to 3-fold increase was found for GHR type II. All this provides suitable evidence for a tissue-specific regulation of fish GHRs, but further research is needed to determine whether these duplicated genes are evolved in a new or redundant fashion.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Growth hormone receptor; Gene duplication; Genomic organization; Transcriptional regulation; Rainbow trout; Gilthead sea bream; European sea bass; Turbot

1. Introduction

Growth hormone (GH) plays a central role as a pluripotent endocrine regulator of physiological functions in fish and higher vertebrates, working through specific cell membrane receptors (GHR) that trigger a phosphorylation cascade for signaling and gene expression events

(Behncken and Waters, 1999; Zhu et al., 2001). The nucleotide sequence of GHR is now available for mammals, birds, reptiles, and *Xenopus*, being included this receptor in the Class I cytokine receptor superfamily, a group of single membrane-spanning receptors which comprises among others prolactin, leptin, granulocyte colony stimulating factor, erythropoietin, and thrombopoietin receptors (Kopchick and Andry, 2000). Since the initial cloning and sequence of turbot (*Scophthalmus maximus*) (Calduch-Giner et al., 2001) and goldfish (*Carassius auratus*) GHRs (Lee et al., 2001), other fish GHRs

* Corresponding author. Fax: +964 319509.

E-mail address: jperez@iats.csic.es (J. Pérez-Sánchez).

have been characterized in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Calduch-Giner et al., 2003), black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) (Tse et al., 2003), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, GenBank NCBI Accession No. AB058418), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Accession No. AY283778), southern catfish (*Silurus meridionalis*, Accession No. AY336104), masu salmon (*Oncorhynchus masou*, Accession No. AB071216), and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Accession Nos. AF403539 and AF403540).

Genomic organization of turbot and gilthead sea bream GHRs has also been elucidated (Pérez-Sánchez et al., 2002), and it reveals a high conservation of exon–intron junctions through the evolution of vertebrate species despite the occurrence of an exclusive fish intron (10/10A) at the C-terminus. This intron is not alternatively spliced in black sea bream, and this fish shares a longer GHR isoform with a 31 amino acid insertion that does not alter the open reading frame. Transcripts encoding for truncated membrane-anchored forms have been reported in turbot (Calduch-Giner et al., 2001) and Japanese flounder (Accession No. AB110989). In these flatfish, the truncated GHR comprises extracellular and transmembrane domains, the first 28 amino acids of the intracellular domain and a divergence sequence of 21–26 amino acids before a stop codon is reached, which is the result of the lack of the alternative splicing of intron 9/10 (Pérez-Sánchez et al., 2002).

Amino acid alignment of full-length GHRs reveals a relative high degree of identity (35–40%) among tetrapods and non-salmonid fish with a strict conservation of the FGEFS ligand-binding domain, extracellular cysteine residues, Box 1 and Box 2 domains, and cytoplasmic tyrosine residues. Nevertheless, amino acid identity among GHRs of tetrapods and salmonids (masu and coho salmon) decreases up to 27–34% with a lack of three conserved cytoplasmic tyrosine residues (Y1, Y3, and Y6) and two extracellular cysteines (C5, C6) involved in a short disulphide link (Fuh et al., 1990). Several authors have postulated a divergent evolution of salmonid GHRs. However, recently, we have cloned and sequenced a nutritionally regulated GHR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which is related to GHRs of non-salmonid fish (GHR type I) rather than to GHRs of salmonids (GHR type II) (Gómez-Requeni et al., 2004a). In this scenario, we have postulated that more than one GHR gene is maintained by selection through the radiation of teleosts, and the aim of this work was to search for GHR type II in fish species with a transcribed GHR type I: rainbow trout, turbot, and two perciform fish of the Sparidae (gilthead sea bream) and Moronidae (European sea bass, *Dicentrarchus labrax*) family. The study was completed by searches for sequence similarity to fish GHR type I and II in genome databases of human, *Xenopus*, zebrafish (*Danio rerio*), and fugu (*Takifugu rubripes*). Additionally, in gilthead sea bream, geno-

mic organization and tissue-specific regulation of GHR type II was addressed in comparison to data found for GHR type I.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Juvenile fish of trout, gilthead sea bream, European sea bass, and turbot were fed with fish meal-based diets and grown up under natural photoperiod and temperature conditions. Sampled fish were killed by decapitation under anesthesia (3-aminobenzoic acid ethyl ester, 100 mg/L), and tissue samples were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

2.2. RNA extraction

Total RNA from liver, adipose tissue, and skeletal muscle (white muscle) were extracted by the acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987). Polyadenylated RNA was isolated from total RNA with Poly-A-Tracts (Promega, Madison, WI). Quantity and purity of isolated RNA were determined by absorbance measures at 260 and 280 nm, and its integrity was tested by electrophoresis in formaldehyde-agarose gels.

2.3. Cloning and sequence of GHRs

After DNase I treatment, $2\ \mu\text{g}$ of total RNA was reverse transcribed with 200 U Superscript II (Life Technologies, Gaithersburg, MD), using oligo(dT)₁₇ as anchor primer. Reactions without reverse transcriptase were included as negative controls. The resulting product was treated with RNase H (2 units) prior to PCR amplification. Degenerated primers (GHR-1, GHR-2, GHR-3, and GHR-4) were designed on the basis of available sequences of masu and coho salmon GHR type II. GHR-1 (forward, 5'-ACCARCAGCRWTWACA ACTTGCT-3') is located few nucleotides upstream the translation start; GHR-2 (forward, 5'-GGACYTGAG GCCAGASYTGATC-3') is located in Box 2; GHR-3 (reverse, 5'-TCACCACYAGNAGCTGRAACTCYT T-3') is located 360 nucleotides upstream the stop codon; and GHR-4 (reverse, 5'-GCAATAGCATAGTC YCTACACCT-3') is located few nucleotides downstream the stop codon. PCR amplification was made with $2\ \mu\text{l}$ of liver RT reactions in a total volume of $50\ \mu\text{l}$ and 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies). Thirty-five cycles were carried out with denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 60 s, and extension at 72°C for 90 s. The combination of assayed primers was GHR-1/GHR-3, GHR-2/GHR-3, and GHR-2/GHR-4. Amplified cDNAs were gel-extracted

(QIAquick, Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced by the deoxy chain termination method (ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing kit, Perkin-Elmer, Wellesley, MA).

In gilthead sea bream, rapid amplification of the 3' end was performed with 2 µg of total liver RNA, DNase treated and reverse transcribed with oligo(dT)₃₀ coupled to an anchor sequence (Clontech, Palo Alto, CA). Amplification was done with a specific forward primer (GHR-5: 5'-CGACCCTGAAGCATCGCCTTTCCATCC-3'), and a reverse primer that corresponds to the anchor sequence. This PCR consisted of 30 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 62°C, and 3 min at 72°C. A nested PCR (35 cycles of 45 s at 94°C, 60 s at 60°C, and 90 s at 72°C) was then performed with the forward primer GHR-6 (5'-GAAGTGTCGTGCCAGACCGCCAGCGAG-3') and 1 µl of the first reaction. PCR products were purified and sequenced as above.

Rapid amplification of the 5' end of gilthead sea bream GHR type II was made according to manufacturer's instructions (Life Technologies). Reverse transcription of 200 ng of gilthead sea bream liver mRNA was performed with a specific reverse primer (GHR-7: 5'-GAACTCCTTCTTTGCTTTC-3'). After RNase H treatment, cDNA was purified (GlassMAX Spin Cartridge column filtration), and treated with terminal deoxynucleotidyl transferase and dCTP (60 min at 4°C) to add an oligo(dC) tail at the 5' end. A PCR amplification of 35 cycles was performed (1 min at 94°C, 2 min at 57°C, and 3 min at 72°C) with an universal primer containing a poly(dG) sequence, and a specific oligonucleotide (GHR-8: 5'-GCTTGGCTCGCTGGCGGTCTGGCAC-3') as a reverse primer. All PCR products were purified and sequenced as above.

2.4. Sequence alignment and phylogenetic analysis

Proteins encoded by sequenced cDNAs were tested for the presence of signal peptidase cleavage sites at the PSORT Prediction Server (<http://psort.nibb.ac.jp/>). Putative transmembrane regions were predicted with HMMTOP v 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop>) (Tusnády and Simon, 2001). Potential N-linked glycosylation sites were determined with the Gene Runner v 3.02 software (Hastings Software, Hastings, NY). Protein sequence alignments were made by means of ClustalX software (Thompson et al., 1994). Phylogenetic comparison of protein sequences was carried out with MEGA 2.1 software (Kumar et al., 2001).

2.5. Genomic organization

Blood was extracted from caudal vessels, and genomic DNA was isolated with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany). Isolated DNA was quantified by absorbance measures

Table 1

Forward (f) and reverse (r) primers for PCR mapping (exon–intron organization) of gilthead sea bream GHR type II

Primer		cDNA position
gGHR-1f	5'-GACCGAGTGTCTCCTCACTACAGCATC	240–264
gGHR-2r	5'-TGGACCTCATACTGTAGCGTTCATCC	536–512
gGHR-3f	5'-GACCTGACCTGGACAACACTGAATG	412–436
gGHR-4r	5'-GGGATGTGGACGAATATGGAGTCG	707–684
gGHR-5f	5'-TTTGGACTTAAACACAACGTCATCACC	604–631
gGHR-6r	5'-AACATCAGGATGGCCACTAAACACAAG	782–756
gGHR-7f	5'-CGAGTTTCCCGGTGGTGGCTC	719–739
gGHR-8r	5'-TGGGTCCCGGAACAGGAGG	844–826
gGHR-9f	5'-CTTTTGCTCTGTTCGCGG	820–839
gGHR-10r	5'-GAGTGCAGTTGGAGGACAGGGA	1057–1036
gGHR-11f	5'-AAGCTGAGAGAGTTGACATCCATCTTGG	883–910
gGHR-12r	5'-GGTCTGGCAGCACACTTCCTTGG	1197–1176
gGHR-13f	5'-CGACCCTGAAGCATCGCCTTTC	1125–1146
gGHR-14r	5'-CTGACATTCAGCGCTCAACAGG	1860–1839

at 260 and 280 nm, and its integrity was tested by agarose gel electrophoresis. PCR primers to assess genomic organization of GHR type II were first designed (Table 1) on the basis of the known intron/exon junctions of gilthead sea bream and turbot GHR type I (Pérez-Sánchez et al., 2002). PCR amplification was performed with 100 ng of genomic DNA (35 cycles, 1 min at 94°C, 2 min at 55–57°C, and 3 min at 72°C), and the resulting fragments were purified and sequenced as above.

Upstream the exon 5, no specific PCR products were obtained, and four GenomeWalker libraries were constructed by means of the Universal GenomeWalker kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Briefly, 2.5 µg of genomic DNA was digested with *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, or *StuI*. The digested DNA was extracted, precipitated, and synthetic GenomeWalker adaptors were ligated to the genomic DNA fragments using T4 DNA ligase. Based on the cDNA sequence, two nested antisense primers were designed for each upstream genome walk. With two additional nested primers for adaptor sequences, PCRs were performed for 35 cycles (30 s at 94°C, 30 s at 57°C, and 5 min at 72°C). The amplified fragments were purified and sequenced as above.

For comparative purposes, genome databases of human, *Xenopus*, fugu, and zebrafish were searched at <http://www.ensembl.org> for sequence similarity to fish GHR type I and II.

2.6. Real-time PCRs

Measurements of GHR type I and II were made in liver, adipose tissue, and skeletal muscle of gilthead sea bream by means of real-time PCR (SYBR Green I), using β-actin as housekeeping gene. Primers for GHR type I and β-actin were made as described elsewhere (Calduch-Giner et al., 2003). Specific primers of GHR type II (forward: 5'-GAGTGAACCCGGCCTGACAG-3'; reverse: 5'-GCGGTGGTATCTGATTCATGG

T-3') amplified a specific 75 bp amplicon between 1503 and 1577 nt positions (intracellular domain).

Total RNA (2 µg) was extracted, treated with DNase I, and reverse transcribed with oligo(dT) as above. PCR amplification and analysis were performed on an iCycler IQ Real-time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). The final volume of PCRs was 25 µl, using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and specific primers at a final concentration of 0.3–0.9 µM. The real-time PCR protocol consisted of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Standard curves were generated by amplification of serial dilutions of known quantities of recombinant plasmids for each gene of interest. The dynamic range of standard curves spanned five orders of magnitude, and the amount of product in a particular sample was determined by interpolation of the cycle threshold value. Reactions were performed in triplicate, and threshold cycle numbers were averaged. For each particular gene, the efficiency of the PCR (91–98%) was the same for serial dilutions of standards and RT reactions. Agarose gel electrophoresis demonstrated a single band of expected size, and all amplified products showed a single melting peak on real-time PCR.

2.7. Physiological regulation

Forty two-year-old males of gilthead sea bream (560 g) were randomly allocated in duplicate tanks. Fish were fed to visual satiety for one month acclimation period under natural photoperiod and temperature conditions. At mid-summer, one group continued to be fed, whereas the other group of fish was fasted for two weeks with a 5% of loss of body weight. After this fasting period, tissue samples were excised from eight individuals of each group to assess GHR expression.

2.8. Statistics

Data were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Student–Newman–Keuls test ($P < 0.05$) with the statistical SPSS 11.0 program (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

3.1. Sequence analysis and phylogeny

All combinations of degenerated primers, designed on the basis of masu and coho salmon GHRs (GHR type II), generated single DNA fragments of expected size in liver, adipose tissue, and skeletal muscle of rainbow trout. Fragments were overlapping each other, and the resulting cDNA sequence comprises an open reading frame of 591 amino acids, with a putative signal peptide of 20 amino acids in length, followed by a 224 amino acid extracellular domain with five potential N-linked

glycosylation sites, five cysteine residues, and the characteristic GHR ligand-binding motif FGEFS. A hydrophobic motif of 20 amino acids in length (transmembrane domain) and a cytoplasmic region, containing eight tyrosine residues and Box 1 and Box 2 domains, were also found (Fig. 1).

No success was found in turbot with degenerated primers based on masu and coho salmon GHRs. In gilthead sea bream and European sea bass, one combination of primers (GHR-2 and GHR-3) yielded a single PCR product of 456 bp (Accession No. for European sea bass AY642116). In gilthead sea bream, this sequence was completed by means of 5' and 3' RACE assays, and the resulting PCR product codes for an open reading frame of 583 amino acids with a 17 amino acid signal peptide, five extracellular cysteine residues, three potential N-linked glycosylation sites, a 25 amino acid transmembrane domain, and a 3' UTR longer than 240 nucleotides (Fig. 2).

The alignment of deduced amino acid sequences of fish GHR type II (trout, gilthead sea bream, masu salmon, and coho salmon) is shown in Fig. 3. All sequences share the characteristic binding motif FGEFS, and cytoplasmic Box 1 and Box 2 domains, but they lack one pair of extracellular cysteines (C5, C6) and three conserved intracellular tyrosines (Y1, Y3, and Y6). One or three additional intracellular tyrosines were found in gilthead sea bream (Y6'') and salmonids (Y0, Y6', and Y6'''), respectively.

As shown in phylogenetic analysis (Fig. 4), GHR type I and II are put in two separate nodes according to the present hierarchy of fish. However, these two fish GHRs are more related each other than to GHRs of tetrapods, which are all them (GHRs of fish and higher vertebrates) put in the same cluster when prolactin receptors (PRLRs) are included as outgroup.

3.2. Genomic organization

The analyzed genomic sequence of gilthead sea bream extended more than 8 kb and covers seven different exons of GHR type II, homologous to exons 4–10 of the human GHR gene (Fig. 5). Exons 4–7 code for the extracellular domain, exon 8 codes for the transmembrane domain, and exons 9–10 code for intracellular and 3' UTR domains, with a lack of the exclusive fish intron (10/10A) of GHR type I. All intron–exon boundary sequences conform to the GT-AG rule, and surrounding nucleotides closely relate to consensus sequences found near spliced junctions.

Searches in genome databases of tetrapods had no success for GHR type II, but significant sequence similarities were found for fish GHR type I and II in the Ensembl genome databases of fugu [Prediction transcripts for GHR type I (Q90Z56 and NM 010284) and type II (SINFRUT00000144203)] and zebrafish [GHR

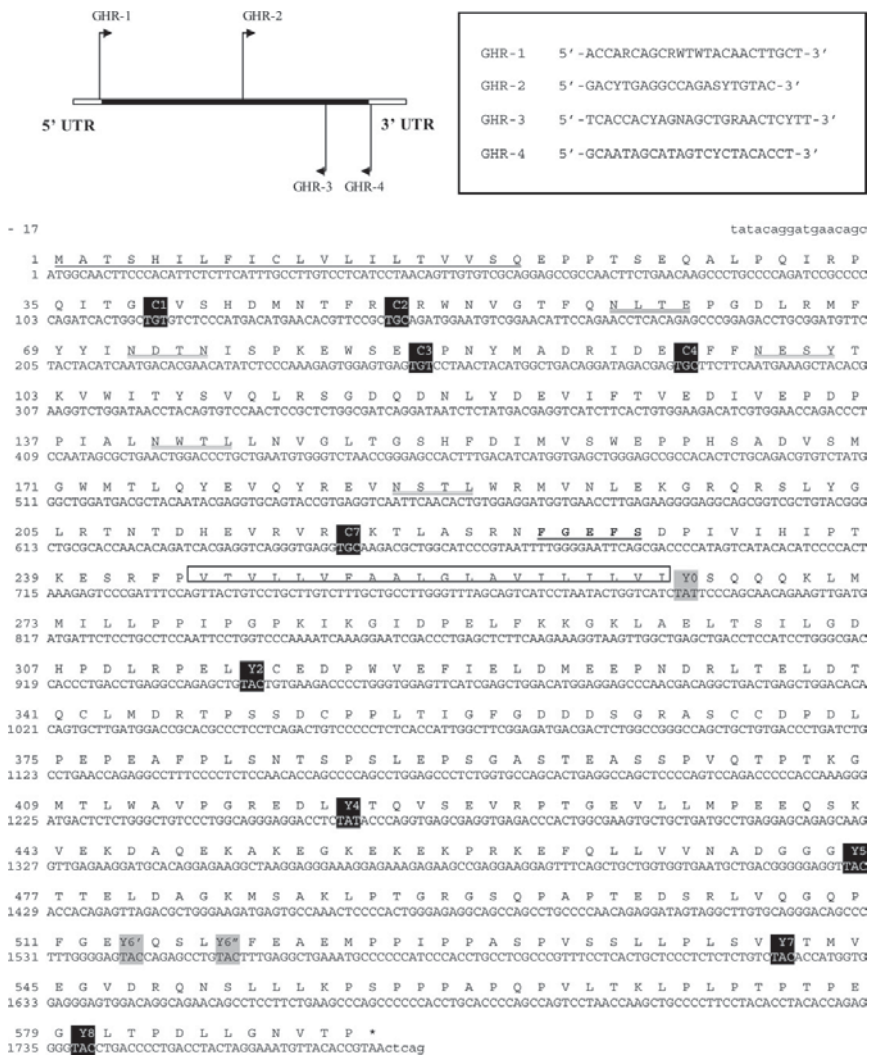


Fig. 1. Schematic representation of RT-PCR strategy for rainbow trout GHR type II. Nucleotides and deduced amino acids are positively numbered for the first base encoding the initiation methionine. Putative signal peptide is underlined. Extracellular cysteines and cytoplasmic tyrosines are boxed and numbered according to human GHR gene. Non-conserved intracellular tyrosine residues in GHR type I are boxed in gray squares. Potential N-glycosylation sites are double underlined. Transmembrane region is squared in an open rectangle. Accession number to GenBank: AY573600.

type I (ENSDART00000018886 and ENSDART00000021837) and type II (ENSDART00000002231)].

3.3. Tissue-specific regulation by fasting

As shown in Fig. 6, the expression of GHR type I in liver and adipose tissue of growing gilthead sea bream (fed fish) was 2- to 3-fold higher than that of GHR type II. By contrast, the expression of GHR type I and II was practically equal in the skeletal muscle of fed fish. Both in

liver and adipose tissue, the expression of GHR type I and II was 2- to 3-fold reduced by fasting. In skeletal muscle, fasting did not alter the expression of GHR type I whereas a 2- to 3-fold increase was found for GHR type II.

4. Discussion

The new characterized rainbow trout GHR only shares a 46% amino acid identity with the previously

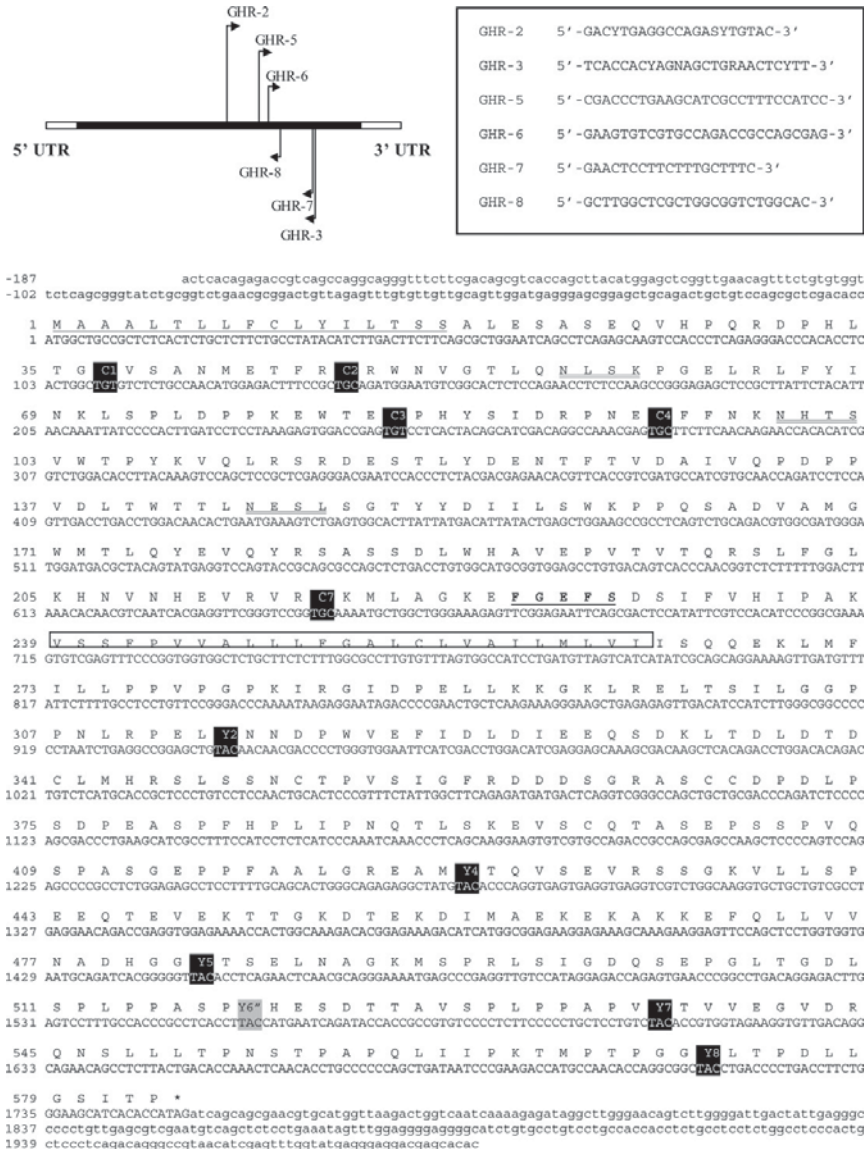


Fig. 2. Schematic representation of RT-PCR and RACE strategy for gilthead sea bream GHR type II. Nucleotides and deduced amino acids are positively numbered for the first base encoding the initiation methionine. Putative signal peptide is underlined. Extracellular cysteines and cytoplasmic tyrosines are boxed and numbered according to human GHR gene. Non-conserved intracellular tyrosine residues in GHR type I are boxed in gray squares. Potential N-glycosylation sites are double underlined. Transmembrane region is squared in an open rectangle. Accession number to GenBank: AY573601.

reported GHR of rainbow trout (GHR type I), but this identity increases up to 86–97% when comparisons are made with masu and coho salmon GHRs (GHR type II). Further, as in coho and masu salmon, rainbow trout GHR type II conserves the binding FGEFS motif, and cytoplasmic Box 1 and Box 2 domains, but it lacks one

pair of extracellular cysteines (C5, C6) and three intracellular tyrosines (Y1, Y3, and Y6) already conserved in fish GHR type I and GHRs of tetrapods. The impaired cysteine (C7) that serves to form a disulfide linkage during receptor dimerization (Zhang et al., 1999) is retained in all fish GHRs upstream instead of downstream the

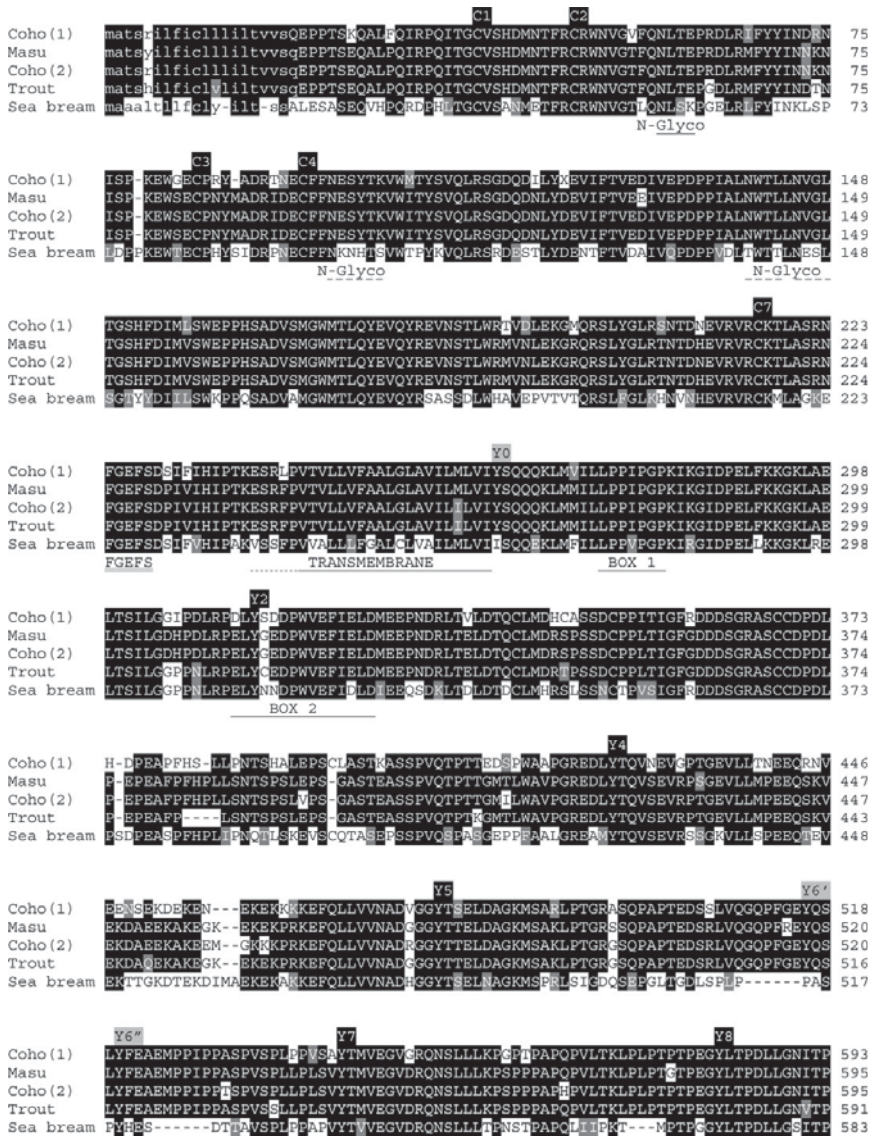


Fig. 3. Amino acid alignment of fish GHR type II (mature protein). Identical amino acids are marked in black and homologous amino acids in gray. Extracellular cysteines (C) and cytoplasmic tyrosines (Y) are numbered according to human GHR type I. Non-conserved intracellular tyrosine residues in GHR type I are boxed in gray squares. Transmembrane domain is underlined (the extra portion of gilthead sea bream transmembrane is dot underlined). Conserved N-linked glycosylation sites (N-Glycosyl), FGEFS motif, and Box 1 and Box 2 domains are indicated.

FGEFS motif. However, three extra intracellular tyrosines, two of which (Y0 and Y6') are characteristic of salmonids, are only found in fish GHR type II. In mammals, it is well known that some intracellular tyrosine residues are redundant (Hansen et al., 1997), but tyrosine phosphorylation provides docking sites for signaling molecules (Wang et al., 1996) and a different tyrosine pattern

may serve to mediate the evolution of fish GHRs in a new and/or complementary fashion, without excluding that somatolactin, a fish member of the GH and PRL family, could exert its action through dimers or heterodimers of fish GHR type II.

It is believed that duplication of genes and entire genomes are important mechanisms for enabling mor-

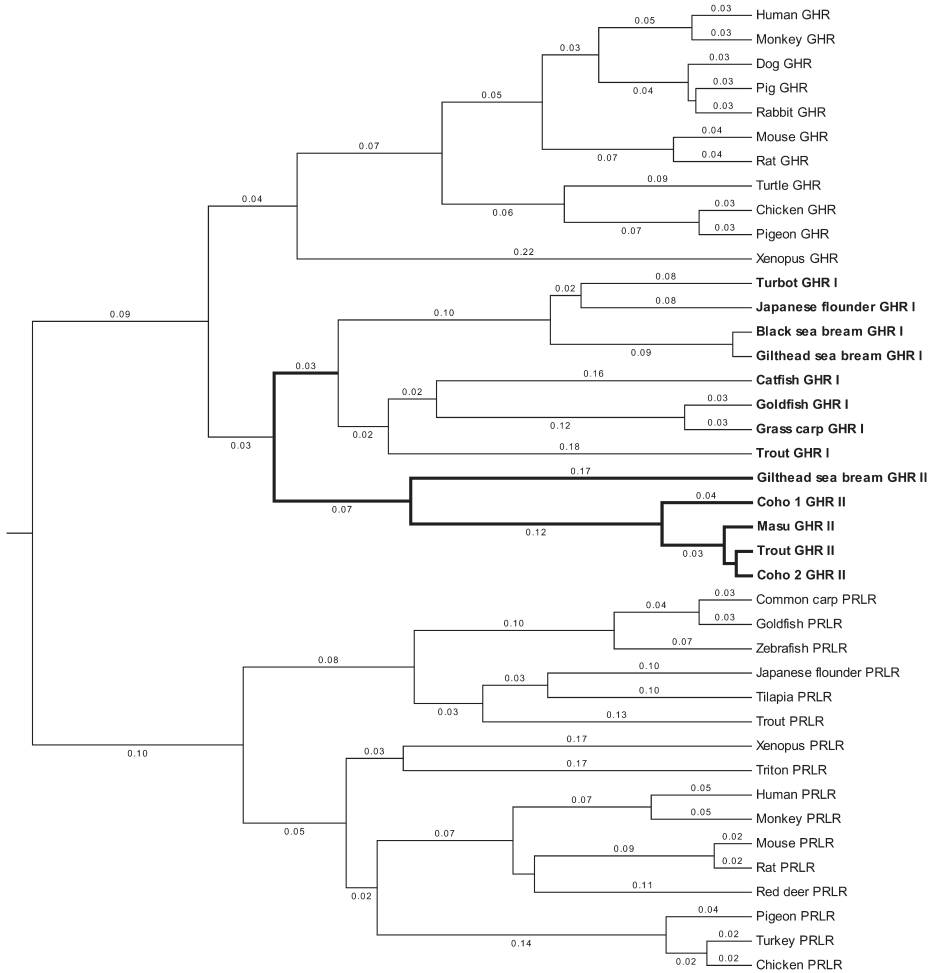


Fig. 4. Phylogenetic tree of GHRs and PRLRs made with Mega2 version 2.1 software (Kumar et al., 2001). GenBank accession numbers for GHR of tetrapods: Human (NM_000163), monkey (U84589), dog (AF133835), pig (X54429), rabbit (AF015252), mouse (NM_010284), rat (NM_017094), turtle (AF211173), chicken (M74057), pigeon (D84308), and *Xenopus* (AF193799). Accession numbers for fish GHR type I: turbot (AF352396), Japanese flounder (AB058418), black sea bream (AF502071), gilthead sea bream (AF438176), rainbow trout (AF438178), catfish (AY336104), goldfish (AF293417), and grass carp (AY283778). Accession numbers for fish GHR type II: coho 1 (AF403539), masu (AB071216), coho 2 (AF403540), trout (AY573600), and gilthead sea bream (AY573601). Accession numbers for PRLR of tetrapods and fish: human (M31661), monkey (AJ272217), red deer (X94953), mouse (NM_011169), rat (NM_012630), pigeon (U07694), turkey (L76587), chicken (D13154), triton (AB005045), *Xenopus* (AB030443), common carp (AY044448), goldfish (AF144012), zebrafish (AY375318), trout (AF229197), flounder (AB047922), and tilapia (L34783).

phological and functional innovation in evolution. Thus, polyploidy has long been recognized in fish, and different genome duplications from two to six rounds have been proposed for different fish lineages (Zhou et al., 2002). Salmonids, catostomids, and some species of cyprinids are considered recent tetraploids, but phylogenetic analysis indicates a high rate of evolution for both GHR type I and II, which suggests that duplication and radiation of fish GHRs took place on an early ancestor of fish lineages. According to this, sequence similarity to GHR

type I and II is found in genome databases of fugu and zebrafish. Indeed, nucleotide sequences coding for the intracellular GHR type II of European sea bass and gilthead sea bream are related to salmonid GHR type II (48–49% amino acid identity) rather than to specific GHR type I (30–28% amino acid identity). Furthermore, when the partial sequence of gilthead sea bream GHR type II was completed by means of 5' RACE, the extracellular domain lacks one pair of cysteines (C5 and C6) and shows three potential N-glycosylation sites that are

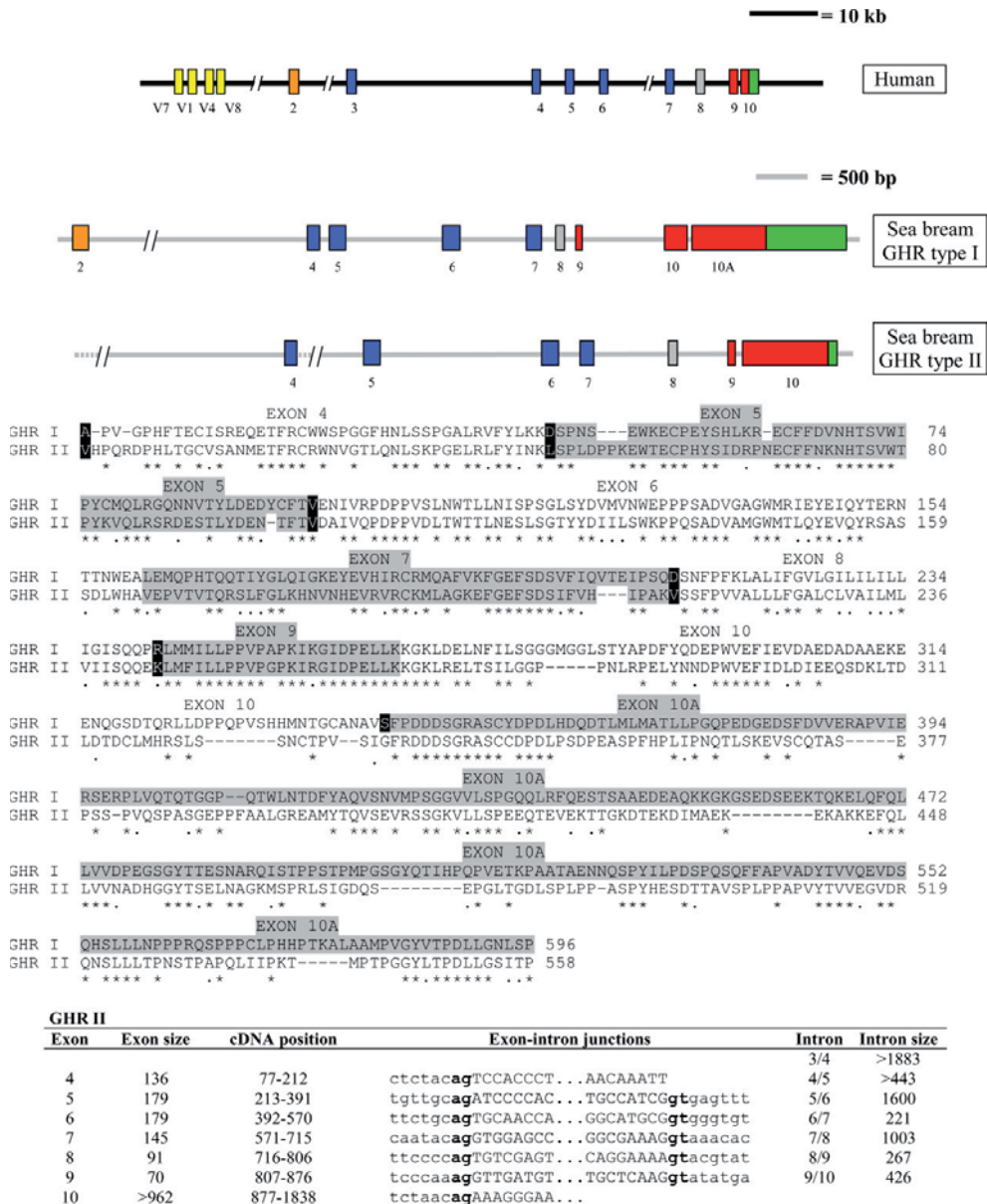


Fig. 5. Diagrammatic representation of gene organization: human GHR (Accession No. AH002706), gilthead sea bream GHR type I (Accession Nos. AY69980 and AY69981), gilthead sea bream GHR type II (Accession Nos. AY69982–AY69985). Amino acid alignment and alternate exons of GHR type I and II are shown by changing background color. Amino acid residue overlap is shown by a black background. Identical (*) and homologous (.) amino acids are noted on the consensus sequence.

also retained in the consensus sequence of salmonid GHR type II. Thus, corollary data inferring from sequence analyses reveal a relative high degree of amino acid identity (60%) and similarity (68–71%) for GHR

type II (entire mature protein) of gilthead sea bream and salmonids. These inferred values are similar to those found for GH and GHR type I (trout vs gilthead sea bream), which is in accordance with the principle of

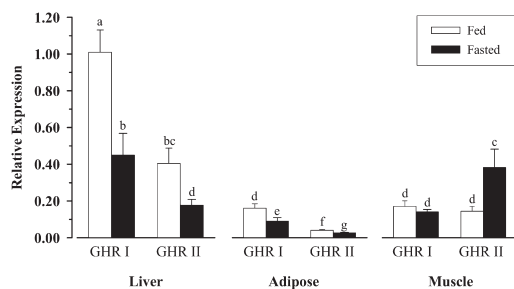


Fig. 6. Expression of GHR type I and type II in liver, adipose tissue, and skeletal muscle of fed and fasted gilthead sea bream. Data are represented as means \pm SEM ($n = 6$). Means with different letters indicate that they are significantly different ($P < 0.05$).

co-evolution and functionality for the ligand and its receptor(s).

Analysis of genomic DNA sequences provides additional support for the duplication and radiation of duplicated GHR genes in the fish genome of most fish species. Thus, seven exons homologous to exons 4–10 of the human GHR gene have been identified herein in the gilthead sea bream GHR type II. Similarly, seven exons homologous to exon 2 and exons 4–9 of human GHR gene have been reported in gilthead sea bream and turbot GHR type I (see Pérez-Sánchez et al., 2002). In this case, however, an exclusive fish intron (10/10A) not alternatively spliced in black sea bream has been found within exon 10 of flatfish and sparidae fish. At the early stage of divergent evolution, when the function of duplicated genes is redundant, the silencing or loss of one of the gene copies can easily occur, but our RT-PCR approach shows that at least in trout, European sea bass, and gilthead sea bream two GHR genes are actively transcribed. In turbot, the lack of success for the PCR amplification of GHR type II might reflect changes in DNA sequence. However, in this and perhaps other flatfish species, we cannot exclude that the appearance of truncated variants of GHR type I (Calduch-Giner et al., 2001; Pérez-Sánchez et al., 2002) might allow the silencing or genomic loss of GHR type II.

Binding studies with transfected cells and recombinantly derived GHRs indicate that GH specifically binds to fish GHR type I (Lee et al., 2001; Tse et al., 2003) and II (Fukuda et al., 2004). However, changes on the extracellular GHR domain, including a different pattern of N-glycosylation and disulphide bonds, can be perceived as a different physical interaction of the ligand with its receptor. This is consistent with the observation that a genetic polymorphism of human GHR, coding for the lack of exon 3 (few amino acids at the N-terminus), enhances the transduction of GH signaling, which is of relevance in pharmacogenetics (Dos Santos et al., 2004; Orlovskii et al., 2004). According to this, duplicated fish GHRs represent

a new and perhaps complex step on the regulation of fish somatotrophic axis. As a first item to address this issue, we analyzed in the present study the tissue-specific regulation of gilthead sea bream GHRs. Interestingly, in liver and adipose tissue, GHR type I was more actively transcribed than GHR type II, which agrees with the idea that GHR type I is the retained form through the evolution of all vertebrate species. Additionally, both in liver and adipose tissue, we found that GHR type I and II were down-regulated in a similar manner by fasting. In a previous gilthead sea bream study, we reported that the reduction of feed intake and weight gain with the total replacement of fish meal by plant protein sources also induced a marked liver GH-desensitization, evidenced by a reduced hepatic expression of GHR type I and IGF-I in concurrence with the decrease of circulating IGF-I levels (Gómez-Requeni et al., 2004b). In the same fish, we also found a down-regulation of GHR type I in the adipose tissue (unpublished results). By contrast, in trout, the impaired growth performance of fish fed plant protein diets did not alter the liver expression of IGFs and GHR type I, but up-regulated GHR type I in the adipose tissue (Gómez-Requeni et al., 2004a). The physiological relevance of this finding remains to be resolved, but this increased transcription should promote the lypolytic action of GH (non-mediated by IGFs) in a fish species with a clear hypsomatotropism (<2 ng/ml) regardless of nutritional state, age, and season (Pérez-Sánchez and Le Bail, 1999). It appears, therefore, that the transcriptional regulation of GHRs is highly variable among species and tissues, which may be also different for chronic and acute effects of elevated GH-titers as it has been reported in mammals for full-length and truncated GHRs (Iida et al., 2004).

Regarding GHRs in the skeletal muscle of gilthead sea bream, it is noticeable the different regulation of GHR type I and II in fasted fish, with a significant up-regulation of GHR type II which can serve for the fine tuning of muscle growth and metabolism. To date, the information relative to regulation of GHRs in the skeletal muscle of higher vertebrate species is relatively scarce. However, catabolic states characterized by the increase of plasma GH-titers are usually accompanied by the increased expression of GHRs in skeletal muscle (Combes et al., 1997; Katsumata et al., 2000). In humans, exogenous GH treatment also increases the expression of full-length GHR but down-regulates truncated GHRs, which might suppress the GH signaling in a dominant-negative manner (Casse et al., 2003). In addition, there is now evidence for the up-regulation of full-length GHRs in atrophying muscle fibers of rat, which may be part of an attempt to repair a damaged muscle tissue (Fisker et al., 2001). If so, there is not an easy pattern for the transcriptional regulation of muscle GHRs, and further studies are needed to further understand the regulation of GHRs under ontogeny and different physiological and nutritional conditions. How-

ever, it is reasonable to imagine that GH exerts its biological action much efficiently by a balanced transcriptional regulation of truncated and/or duplicated GHR genes, which might suppress and/or enhance GH signaling under defect or chronic GH excess (undernutrition status). Afterwards, all this represents an exciting area of research to establish whether fish GHRs are evolved in a new and/or redundant fashion of relevance for the search of new candidate genes in growth breeding programmes.

Acknowledgments

This research was funded by a project from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2002-00551). J.A.C.-G. was recipient of a “Ramón y Cajal” research contract (2003) from the Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- Behncken, S.N., Waters, M.J., 1999. Molecular recognition events involved in the activation of the growth hormone receptor by growth hormone. *J. Mol. Recognit.* 12, 355–362.
- Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269–3273.
- Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp. Biochem. Physiol. B* 136, 1–13.
- Casse, A.L., Desplanches, D., Mayet-Sormay, M.H., Raccurt, M., Jegou, S., Morel, G., 2003. Growth hormone receptor expression in atrophying muscle fibers of rats. *Endocrinology* 144, 3692–3697.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Combes, S., Louveau, I., Bonneau, M., 1997. Moderate feed restriction affects skeletal muscle and liver growth hormone receptors differently in pigs. *J. Nutr.* 127, 1944–1949.
- Dos Santos, C., Essiou, L., Teinturier, C., Tauber, M., Goffin, V., Bougnères, P., 2004. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nat. Genet.* 36, 720–724.
- Fisker, S., Kristensen, K., Rosenfalck, A.M., Bønlokke, S., Ebdrup, L., Richelsen, B., Hilsted, J., Christiansen, J.S., Jørgensen, J.O.L., 2001. Gene expression of a truncated and the full-length growth hormone (GH) receptor in subcutaneous fat and skeletal muscle in GH-deficient adults: impact of GH treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 792–796.
- Fuh, G., Mulkerrin, M.G., McFarland, N., Brochier, M., Bourell, J.H., Light, D.R., Wells, J.A., 1990. The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domains. *J. Biol. Chem.* 265, 3111–3115.
- Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A.L., Adachi, J., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 2004. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 61–71.
- Gómez-Requeni, P., Calduch-Giner, J.A., Vega-Rubín de Celis, S., Médale, F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2004a. Regulation of somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 287, 566–573.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martín, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004b. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493–510.
- Hansen, J.A., Hansen, L.H., Wang, X., Kopchick, J.J., Gouilleux, F., Groner, B., Nielsen, J.H., Moldrup, A., Galsgaard, E.D., Billestrup, N., 1997. The role of GH receptor tyrosine phosphorylation in Stat5 activation. *J. Mol. Endocrinol.* 18, 213–221.
- Iida, K., Del Rincon, J.P., Kim, D.S., Itoh, E., Coschigano, K.T., Kopchick, J.J., Thorner, M.O., 2004. Regulation of full-length and truncated growth hormone (GH) receptor by GH in tissues of *lit/lit* or bovine GH transgenic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, 566–573.
- Katsumata, M., Cattaneo, D., White, P., Burton, K.A., Dauncey, M.J., 2000. Growth hormone receptor gene expression in porcine skeletal and cardiac muscles is selectively regulated by postnatal undernutrition. *J. Nutr.* 130, 2482–2488.
- Kopchick, J.J., Andry, J.M., 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol. Gen. Metab.* 71, 293–314.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software.
- Lee, L.T., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L., Cheng, C.H., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 270, 121–129.
- Orlovskii, I.V., Sverlova, P.S., Rubtsov, P.M., 2004. Fine structure, expression and polymorphism of the human growth hormone receptor gene. *Mol. Biol.* 38, 24–33.
- Pérez-Sánchez, J., Le Bail, P.-Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117–128.
- Pérez-Sánchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., Valdivia, M.M., 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 243–258 Special Issue, E.M. Plisetzkaya (Ed.), *Fish Growth and Metabolism. Experimental, Nutritional and Hormonal Regulation*, published in 2004.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Tse, D.L.Y., Tse, M.C.L., Chan, C.B., Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R., Cheng, C.H.K., 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim. Biophys. Acta* 1625, 64–76.
- Tusnády, G.E., Simon, I., 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849–850.
- Wang, X., Darus, C.J., Xu, B.C., Kopchick, J.J., 1996. Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. *Mol. Endocrinol.* 10, 1249–1260.
- Zhang, Y., Jiang, J., Kopchick, J.J., Frank, S.J., 1999. Disulfide linkage of growth hormone (GH) receptors (GHR) reflects GH-induced GHR dimerization. *J. Biol. Chem.* 274, 33072–33084.
- Zhou, R., Cheng, H., Tiersch, T.R., 2002. Differential genome duplication and fish diversity. *Rev. Fish Biol. Fish.* 11, 331–337.
- Zhu, T., Goh, E.L.K., Graichen, R., Ling, L., Lobie, P.E., 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal.* 13, 599–616.

Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region

Alfonso Saera-Vila, Josep Alvar Calduch-Giner and Jaume Pérez-Sánchez

Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (CSIC), Fish Nutrition and Growth Endocrinology, Ribera de Cabanes, 12595 Castellón, Spain

(Requests for offprints should be addressed to J Pérez-Sánchez; Email: jperez@iats.csic.es)

Abstract

The tissue-specific expression of IGFs and GH receptors (GHRs) was analyzed in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) as an attempt to understand the functional partitioning of duplicated GHRs on the regulation of fish growth by season and aging. Gene transcripts were measured in liver, muscle, and adipose tissue by means of quantitative real-time PCR assays. In juvenile fish, concurrent increases in circulating levels of GH and IGF-I and hepatic mRNA levels of IGF-I and GHR-I were evidenced with the summer growth spurt. Conversely, muscle and adipose tissue expression of GHR-I and IGF-II were significantly upregulated by overwintering. The aging decrease of growth rates was accompanied by a reduced activity of the liver GH/IGF axis, and parallel increases in muscle IGF expression would be dictated at the local tissue level by the enhanced expression of GHR-I. Extra-hepatic expression of

IGFs and GHR-II did not correlate seasonally in juvenile fish, and nonsignificant effects of aging were found on the summer expression of GHR-II in any analyzed tissue. One transcription start site was identified by RLM-RACE in GHR-I and GHR-II. Sequence analyses indicated that both genes have TATA-less promoters containing consensus initiator sequences and downstream promoter elements surrounding the transcription start site. Conserved CCAAT-boxes and GC-rich regions were retrieved in the GHR-I promoter, whereas stress- and redox-sequence elements (cAMP-responsive element-binding protein, activator proteins; AP-1, and AP-4) were characteristic features of GHR-II. All this supports the functional partitioning of fish GHRs regardless of fish species differences.

Journal of Endocrinology (2007) **194**, 361–372

Introduction

Biological actions of growth hormone (GH) are initiated by binding to specific receptors (GH receptors; GHRs) localized on the cell surface membrane of central and peripheral target tissues. These GHRs belong to the hematopoietic receptor superfamily, which includes among others receptors for prolactin (PRL), leptin, erythropoietin, granulocyte-stimulating factor, and interleukins (Kelly *et al.* 1991, Kopchick & Andry 2000). Common characteristics are a single transmembrane domain, one or two pairs of positionally conserved cysteines, two regions of homology to the type III module of fibronectin, a WSXWS motif that is conserved as YXXFS in the mammalian GHR, and proline-rich Box 1 and Box 2 that are important for signal transduction (Kopchick & Andry 2000). As a characteristic feature, expression of GHRs takes place at varying tissue levels, and the use of alternate promoters plays a major role in orchestrating a tissue-specific pattern. Heterogeneity in the 5'-untranslated region is in fact a well-documented phenomenon, and at least eight GHR mRNA variants splicing just upstream of the translation start site in exon 2 are reported for the human GHRs

(Goodyer *et al.* 2001, Orlovskii *et al.* 2004, Wei *et al.* 2006).

Fish GHRs were first cloned and sequenced in turbot (*Scophthalmus maximus*; Calduch-Giner *et al.* 2001) and goldfish (*Carassius auratus*; Lee *et al.* 2001). Later on the GHR cDNA sequences of many species including gilthead sea bream (*Sparus aurata*; Calduch-Giner *et al.* 2003), black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*; Tse *et al.* 2003), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*; Nakao *et al.* 2004), common carp (*Cyprinus carpio*; GenBank accession number AY691176), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*; AY283778), channel catfish (*Ictalurus punctatus*; DQ103502), Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*; Kajimura *et al.* 2004), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*; AF403539, AF403540), masu salmon (*Oncorhynchus masou*; Fukada *et al.* 2004), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Very *et al.* 2005), Atlantic salmon (*Salmo salar*; Benedet *et al.* 2005), and Japanese eel (*Anguilla japonica*; Ozaki *et al.* 2006) have been reported. Most of these GHRs share several common features, and amino acid alignments reveal a relative high degree of identity (35–40%) among GHRs of tetrapods and non-salmonid fish. Nevertheless, amino acid identity among GHRs of tetrapods and salmonids decreases up to 27–34% with a lack of three conserved cytoplasmatic tyrosine residues and two

extracellular cysteines involved in a short disulphide link. Initially, fish GHRs were clustered in two clades: the first one corresponded to GHRs thus far described in non-salmonid fish (GHR type I) and the other clade encompassed most GHR sequences described in salmonid fish (GHR type II). This observation led to the suggestion that two different lineages of GHRs are present in teleost evolution. This assumption has now changed by the finding of two genomic contigs with a strict conservation of intron–exon junctions in fugu (*Fugu rubripes*), zebrafish (*Danio rerio*), and the Mediterranean gilthead sea bream (Saera-Vila *et al.* 2005). In the same study, the coexistence of duplicated *GHR* genes was experimentally supported in rainbow trout and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Likewise, Jiao *et al.* (2006) cloned and sequenced the GHR-II in black sea bream, Southern catfish (*Silurus meridionalis*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), providing further evidence for the coexistence of two *GHR* genes in a single fish species.

It is believed that duplication of genes and entire genomes are important mechanisms for morphological and functional innovation in evolution. At this standpoint, polyploidy has long been recognized in fish (Zhou *et al.* 2001, Volff 2005), and duplication and divergence of fish GHRs would take place on an early ancestor of fish lineage. Salmonids are, however, considered recent tetraploids, and two isoforms of GHR-II are differentially expressed in rainbow trout (Very *et al.* 2005, Gabillard *et al.* 2006). Truncated variants of GHR-I have been characterized in turbot (Calduch-Giner *et al.* 2001) and Japanese flounder (Nakao *et al.* 2004), and this fact might allow the silencing and/or apparent genomic loss of GHR-II in the flatfish lineage (Saera-Vila *et al.* 2005). These truncated variants of fish GHRs comprise extracellular and transmembrane domains, the first 28 amino acid residues of the intracellular domain and a divergence sequence of 21–26 amino acid residues, which is the result of the lack of the alternative splicing of intron 9/10 (see Pérez-Sánchez *et al.* 2002).

Cloned GHR-I and GHR-II have shown to be functional in goldfish (Lee *et al.* 2001), black sea bream (Tse *et al.* 2003, Jiao *et al.* 2006), and Atlantic salmon (Benedet *et al.* 2005). In these studies, mammalian CHO-K1 were transfected with GHR cDNA and GH exposure triggers a strong proliferation response, which can also be induced by PRL at supraphysiological doses. Binding studies in masu salmon evidenced that GH and somatolactin (SL) may functionally interact through GHR-I (Fukada *et al.* 2005). Experimental evidence also indicates that the expression of GHR-II is modulated by water temperature in rainbow trout (Gabillard *et al.* 2006), whereas GHR-I and GHR-II are differentially regulated by cortisol and testosterone in black sea bream (Jiao *et al.* 2006). Previous studies in gilthead sea bream also revealed that duplicated GHRs are differentially regulated by fasting (Saera-Vila *et al.* 2005), although the relative contribution of each gene in the regulation of fish growth still remains unclear. Thus, the major goal of the present study was to analyze the tissue-specific expression of gilthead sea bream GHRs and insulin-like growth factors (IGFs) in relation with changes in growth (season and age models).

Additionally, transcription start sites and GHR-flanking regions were mapped as a first attempt to characterize GHR promoters in fish.

Materials and Methods

Fish rearing and sampling

Juvenile fish of 20–25 g initial body weight (8 months old) were reared until marketable size in triplicate 2500 l tanks at the indoor experimental facilities of Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Photoperiod and water temperature followed natural changes, and fish were fed with a commercial fish meal-based diet (Proaqua, Palencia, Spain) containing 47% protein and 21% lipid. Feed was adjusted to maximize growth rates and feed conversion efficiency through the entire productive cycle as described elsewhere (Mingarro *et al.* 2002). Specific growth rates (SGRs) were calculated monthly ($SGR = (\ln \text{ final wt} - \ln \text{ initial wt}) \times 100 / \text{days}$). At critical step windows over the course of year (October, January, May, and July), overnight fasted fish were randomly selected (five fish per tank) and killed by a blow on the head under anesthesia (3-aminobenzoic acid ethyl ester, 100 mg/l). Blood was taken from caudal vessels with heparinized syringes, and the resulting plasma samples (3000 g for 20 min at 4 °C) were stored at –30 °C until hormone assays. Liver, mesenteric adipose tissue, and dorsal skeletal muscle (white muscle) were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until RNA extraction and analysis.

Gilthead sea bream is a protandrous fish and 1-year-old (immature males), 2-year-old (mature males), and 3-year-old (mature females) fish were reared in triplicate groups as a second experimental set in 2500 l tanks. Fish were fed with fish meal-based diets under standardized conditions, and randomly selected fish (5 fish per tank and 15 fish per group of age) were taken for blood and tissue collection during the summer growth spurt (July).

Hormone assays

Plasma GH levels were determined by a homologous gilthead sea bream RIA as reported elsewhere (Martínez-Barberá *et al.* 1995). The sensitivity and midrange (ED50) of the assay were 0.15 and 1.8 ng/ml respectively.

Circulating levels of IGF-I were measured by means of a generic fish IGF-I RIA validated for Mediterranean perciform fish (Vega-Rubín de Celis *et al.* 2004a). The assay is based on the use of red sea bream (*Pagrus major*) IGF-I (GroPep, Adelaide, Australia) as tracer and standard, and anti-barramundi (*Lates calcarifer*) IGF-I serum (GroPep; 1:8000) as a first antibody. The sensitivity and midrange of the assay were 0.05 and 0.7–0.8 ng/ml respectively.

RNA/DNA extraction

Total RNA was extracted by the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski & Sacchi 1987). Genomic DNA was isolated from blood with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Quantity and purity of RNA and DNA samples were determined by absorbance measures at 260 and 280 nm respectively. The integrity of isolated nucleic acids was tested by electrophoresis in agarose gels.

Gene expression

Transcripts of GHRs, IGFs, and β -actin were quantified in liver, adipose tissue, and muscle by means of real-time quantitative PCR assays. Briefly, after DNase I treatment, 2 μ g total RNA were reverse transcribed with 200 U Superscript II (Invitrogen: Life Technologies) using oligo (dT)₁₇ as anchor primer. Specific primers for GHR-I, GHR-II, IGF-I, and β -actin amplification were made as described elsewhere (Calduch-Giner *et al.* 2003, Saera-Vila *et al.* 2005). Primers for IGF-II (forward: TGGGATCGTAGAGGAGTGTGTG; reverse: CTGTAGA-GAGGTGGCCGACA) were designed to amplify a 109 bp amplicon, comprised between 392 and 500 nt positions (Duguay *et al.* 1996).

The iCycler iQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc.) was used for sample cDNA quantification. Each reaction contained a SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) and specific primers at a final concentration of 0.9 μ M. The PCR protocol was 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. Standard curves were generated by amplification of serial dilutions of known quantities of recombinant plasmids. For target and reference genes, the efficiency of PCR amplification was 94–96% for serial dilutions of standards and RT reactions. Specificity of reaction was verified by the analysis of melting curves and by electrophoresis and sequencing of PCR amplified products. Reactions were performed in triplicate and fluorescence data were analyzed by interpolation of the cycle threshold (Ct) value. Each transcript level was normalized to β -actin using the delta-delta method (Livak & Schmittgen 2001). Tissue-specific levels of β -actin mRNA did not vary with experimental variables.

Transcription start site

Mapping of the transcription start site was made with the RLM-RACE kit (Ambion, Austin, TX, USA) with minor modifications. Briefly, 1 μ g total RNA was dephosphorylated with calf intestinal phosphatase at 37 °C for 1 h. The mRNA cap structure was removed, and the purified mRNA was ligated with T4 ligase to an adapter oligonucleotide sequence. The ligation product was reverse transcribed with random decamers and Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase. PCR amplification was performed with an external primer and specific reverse primers for GHR-I

(CCTGGACTCCACCAACATCGGAATG; 362–338 nt position, GeneBank AF438176) and GHR-II (CGAGCG-GAGCTGGACTTTGTAAAG; 526–504 nt position, GeneBank AY573601). The nested PCR was conducted with a 5'RACE inner primer and specific reverse primers for GHR-I (GGAAACCAGGAGAAGGAGCAGGAGATTG; 228–201 nt position) and GHR-II (GGCTTGAGAGGTTCTGGAGAGTG, 366–343 nt position). Conditions for PCR amplification were 2 min at 94 °C followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C with a final extension of 15 min at 72 °C. The amplified PCR products were gel extracted (QIAquick gel extraction, Qiagen) and sequenced by the deoxy chain termination method (ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing kit, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA).

Analysis of GHR-flanking region

Genomic DNA was used for the construction of Genome Walker libraries by means of the Universal GenomeWalker kit (BD Biosciences, Bedford, UK). Briefly, 2.5 μ g aliquots of genomic DNA were digested with DraI, EcoRV, and PvuII respectively. Digested DNAs were extracted, precipitated, and synthetic adapters were ligated to genomic DNA fragments using T4 DNA ligase. Two reverse primers surrounding the transcription start site of GHR-I (TGGTACGAAGTCTC-GAGGTGGTG and TTTCACAACCTGGTCATCTGATGGC) and GHR-II (TGAGAACCACACAG AAAC TGTTCAACC and CTCCATGTAAGCTGGTGACGCTG) were designed to be used with adapter primers in primary and secondary PCRs (35 cycles for 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C, and 300 s at 72 °C). PCR-amplified fragments were purified and sequenced as described earlier.

Bioinformatics analyses of regulatory elements were performed with the MatInspector software (<http://www.genomatix.de>). A preliminary analysis was made with a core similarity of 0.75 and an optimized matrix similarity value to allow the recovery of a comprehensive list of candidate factors. To discard false positives, MatInspector was rerun with a core similarity threshold and a matrix similarity value of 1 and 0.90 respectively.

Statistical analysis

Data were analyzed by Student's *t*-test and one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($P < 0.05$). Correlation analyses were made by Pearson product moment correlations.

Results

Seasonal trial

In juvenile fish, circulating levels of GH and IGF-I varied together ($r = 0.68$, $P < 0.001$), following seasonal changes in

growth rates and environmental cues. Thus, the growth spurt of summer occurred in coincidence with the highest circulating concentration of GH and IGF-I (Fig. 1).

Hepatic transcripts of GHR-I increased with the rise of growth rates and the maximum gene expression was attained in July (Fig. 2A). By contrast, in adipose tissue (Fig. 2B) and muscle (Fig. 2C), the highest amount of GHR-I transcripts was found in January. The liver transcriptional profile of GHR-II paralleled that reported for GHR-I ($r=0.711$, $P<0.001$; Fig. 2D). However, a different tissue regulation was found in peripheral tissues, and adipose tissue transcripts of GHR-II peaked in July (Fig. 2E), whereas muscle expression remained high from January to July (Fig. 2F).

In liver, the highest amount of IGF-I mRNA levels was attained in July (Fig. 3A), and a close positive correlation was found with circulating levels of IGF-I over season ($r=0.77$, $P<0.001$). Hepatic transcripts of IGF-I were also positively correlated with hepatic mRNA levels of GHR-I ($r=0.703$, $P<0.05$) and GHR-II ($r=0.804$, $P<0.001$). Muscle and adipose tissue expression of IGF-I was 20- to 100-fold lower than in liver, and nonsignificant changes over the course of season were detected in these extra-hepatic tissues (Fig. 3B and C).

Seasonal changes in hepatic *IGF-II* gene expression were not found in juvenile fish (Fig. 3D). Extra-hepatic expression of IGF-II remained relatively high, and a maximum for IGF-II transcripts was found in January (Fig. 3E and F). Thus, a positive correlation between IGF-II and GHR-I transcripts was reported in adipose tissue ($r=0.528$, $P<0.05$) and muscle ($r=0.479$, $P<0.05$).

Age trial

In summer, growth rates and circulating levels of GH and IGF-I decreased progressively and significantly with advancing age in 1-, 2- and 3-year-old fish (Fig. 4). Older fish also showed a decreased hepatic expression of GHR-I (Fig. 5A), whereas the amount of these transcripts did not vary significantly in adipose tissue (Fig. 5B). By contrast, muscle expression of GHR-I was significantly increased in older fish (Fig. 5C). Significant age-related changes in the expression of GHR-II were not found in any examined tissue (Fig. 5D–F).

The age-related changes in IGF-I and IGF-II transcripts followed similar trends (Fig. 6). However, the range of individual variation was higher for IGF-II, and nonsignificant changes in IGF-II expression were detected in any analyzed tissue. By contrast, hepatic expression of IGF-I decreased significantly in older fish (Fig. 6A). This trend was opposite to that found in skeletal muscle (Fig. 6C), and a positive correlation between GHR-I and IGF-I transcripts was reported in liver ($r=0.682$, $P<0.05$) and muscle ($r=0.626$, $P<0.05$).

Alternative splicing and sequence analysis

Two bands of 500 and 400 bp were obtained by RLM-RACE of GHR-I and GHR-II respectively. The reliability of this

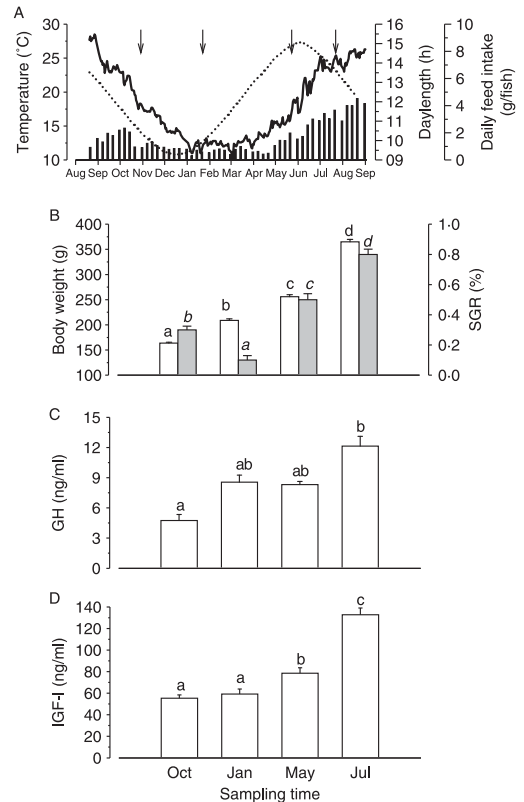


Figure 1 Seasonal changes in water temperature (continuous line), daylength (dotted line), and daily feed intake of growing juvenile fish (bars); arrows indicate sampling times for blood and tissue collection (A). Body weight (white bars) and specific growth rates (gray bars) at sampling times (B). Plasma levels of GH (C) and IGF-I (D). Growth parameters are the average values (mean \pm S.E.M.) of triplicates tanks. Hormone data are the mean of ten fish. Different letters above each bar indicate statistically significant differences between sampling times ($P<0.05$, Student–Newman–Keuls).

finding was checked by PCR, and the results allow us to determinate two transcription start sites (one for each gene) delimiting the 5'-flanking region of exon 1. This exon codes entirely for the 5'-UTR sequence, which was verified by the screening of Genome Walker libraries of GHR-I (Fig. 7A) and GHR-II (Fig. 7B). Exon 1 of GHR-I was located 9 kb upstream of exon 2 as further demonstrated by long PCRs with intact genomic DNA and specific primers surrounding flanking regions of exon 1 (forward primer, GCTCTCACGCTGGCCATCAGATGAC) and exon 2 (reverse primer, GGCTGTCAAGATTCCTACACAGG-TAG). A similar strategy was used for GHR-II but no positive results were obtained, which suggests a long intron 1 that may be difficult to amplify by PCR.

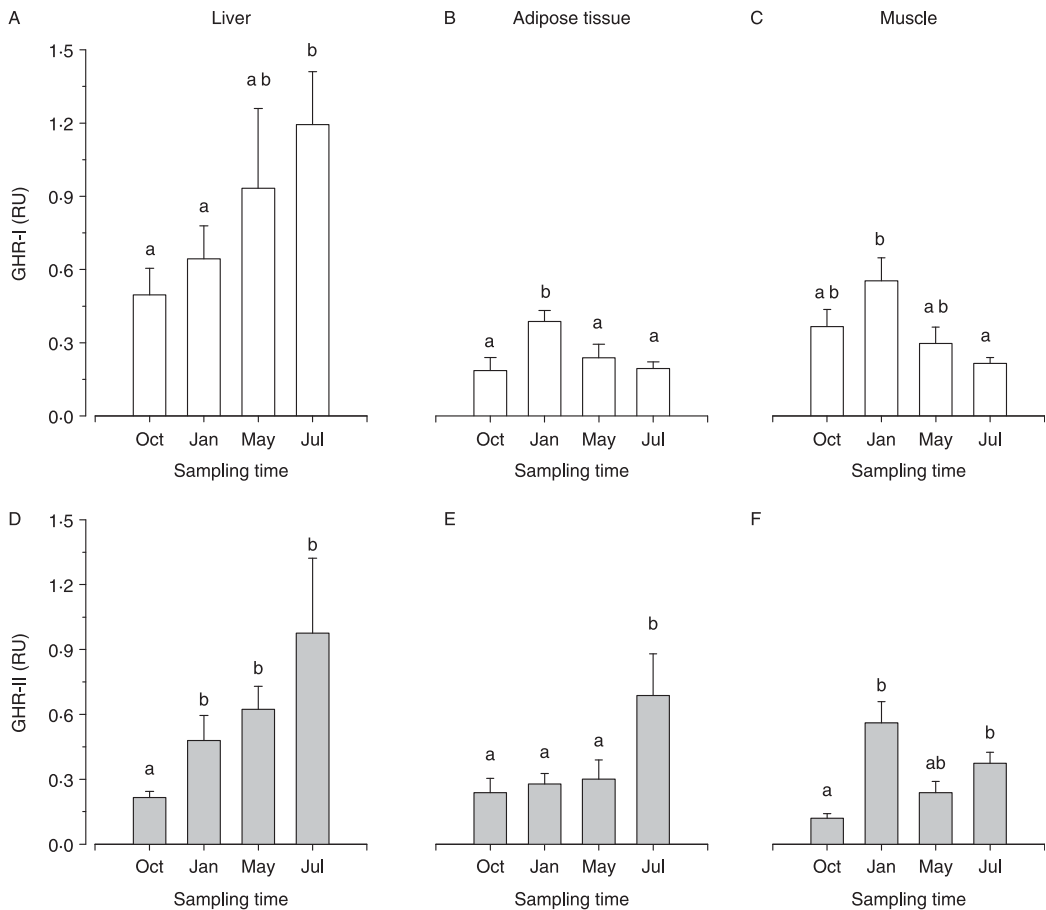


Figure 2 Seasonal changes in the tissue-specific expression (relative units) of GHR-I and GHR-II. For each gene, the highest expression among tissues was used as reference value in the normalization procedure. Data are the mean \pm S.E.M. ($n=6$). For each tissue, different letters above each bar indicate statistically significant differences between sampling times ($P < 0.05$, Student–Newman–Keuls).

Sequence analysis of the 5'-flanking region of GHR-I (1589 pb; GeneBank accession number AH014067) and GHR-II (1262 pb; AH014068) did not reveal a consensus TATA-box surrounding the transcription start site. However, regulatory elements similar to the consensus for the initiator element (Inr) were retrieved in the promoter region of both genes. Also, sequences similar to downstream promoter element (DPE) were found at positions +38 (GHR-I) and +29 (GHR-II). CCAAT-boxes and GC-rich sequences were only retrieved in the proximal-flanking region of GHR-I (see Fig. 7A). Binding sites for cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and activator proteins (AP-1 and AP-4) were exclusively found in the GHR-II-flanking region (see Fig. 7B).

Discussion

The use of alternate promoters orchestrates in mammals a tissue-specific pattern of GHR expression (Goodyer *et al.* 2001, Orlovskii *et al.* 2004). This schema is apparently simplified in fish, and only one transcription start site was evidenced herein in gilthead sea bream GHRs. However, genome duplication offers a second level of regulation, and two functional *GHR* genes (with additional isoforms in salmonids) have been conserved in several lineages of modern bony fish. These two GHRs span more than 20 kb in gilthead sea bream, and share a strict conservation of exon–intron junctions (see Pérez-Sánchez *et al.* 2002, Saera-Vila *et al.* 2005). In the present study, the gene organization was completed at the 5'-flanking region, and 1.5–1.2 kb just

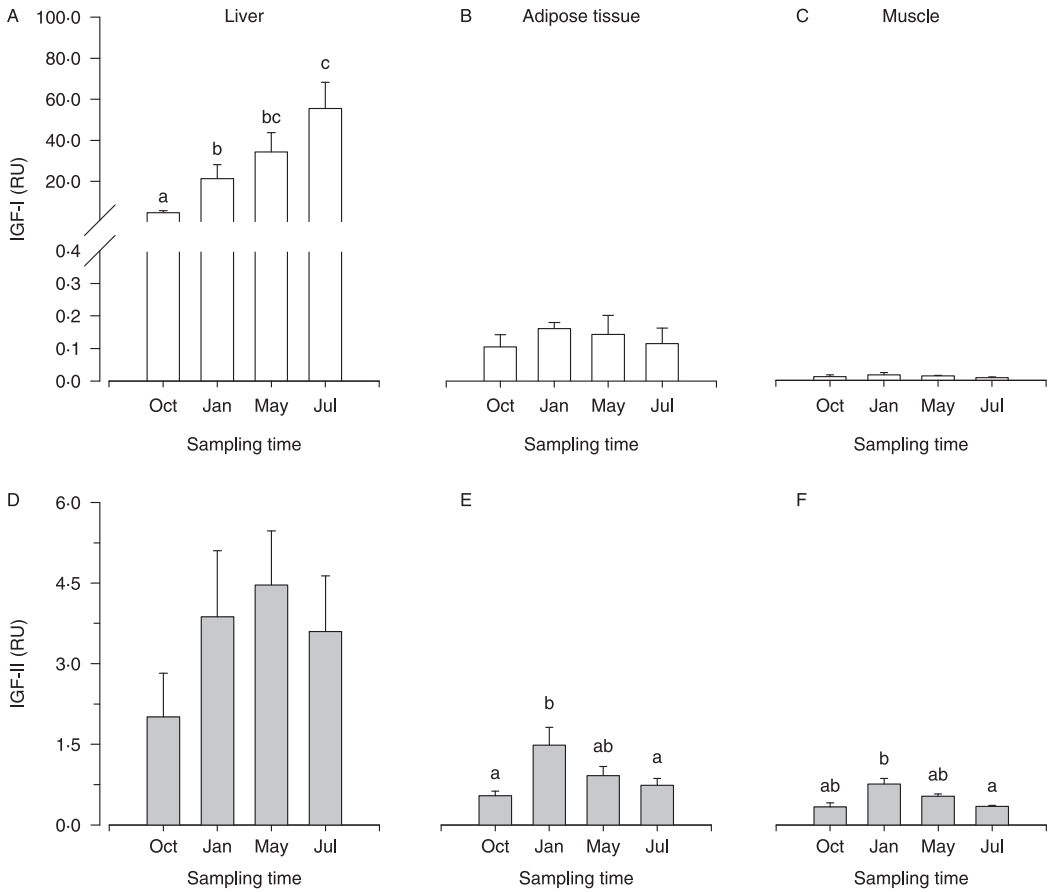


Figure 3 Seasonal changes in the tissue-specific expression (relative units) of IGF-I and IGF-II. For each gene, the highest expression among tissues was used as reference value in the normalization procedure. Data are the mean \pm S.E.M ($n=6$). For each tissue, different letters above each bar indicate statistically significant differences between sampling times ($P<0.05$, Student–Newman–Keuls).

upstream of the transcription start site were sequenced in GHR-I and GHR-II respectively. This represents a first attempt to characterize the promoter region of fish GHRs, which may serve to better understand the complex regulatory processes driving the tissue-specific expression of IGFs in different growth and living conditions.

Both in mammals and fish, the liver is the most important target tissue of GH and the primary source of systemic IGF-I (endocrine form). Thus, plasma levels of IGF-I are a good indicator of growth rates in European sea bass (Vega-Rubín de Celis *et al.* 2004a) and channel catfish (Silverstein *et al.* 2000, Li *et al.* 2006). Circulating levels of IGF-I are positively correlated with growth rates and dietary protein levels in barramundi and Atlantic salmon (Dyer *et al.* 2004). In salmonids, the regulation of circulating IGF-I is well documented on the basis of seasonal and nutritional cues

(Dickhoff *et al.* 1997, Larsen *et al.* 2001, Nordgarden *et al.* 2005). In gilthead sea bream, circulating levels of IGF-I are higher than those reported in salmonids and also correlate with growth shifts, derived from changes in season (Mingarro *et al.* 2002) and nutritional condition (Gómez-Requeni *et al.* 2003, 2004, Benedito-Palos *et al.* 2007). In the present study, this notion was further supported by concurrent changes in growth rates, circulating levels of GH and IGF-I, and hepatic mRNA levels of IGF-I and GHR-I. Hence, systemic increases of IGF-I would be mostly mediated in season and aging by the hepatic transcriptional activation of GHR-I. Moreover, hepatic mRNA levels of GHR-II did not vary with aging, and GHR-II emerges in older fish as a ubiquitous gene that apparently did not mediate the age-related decrease in growth rates and hepatic IGF expression. Alternatively, GHR-II may be involved in tissue repair and survival, which

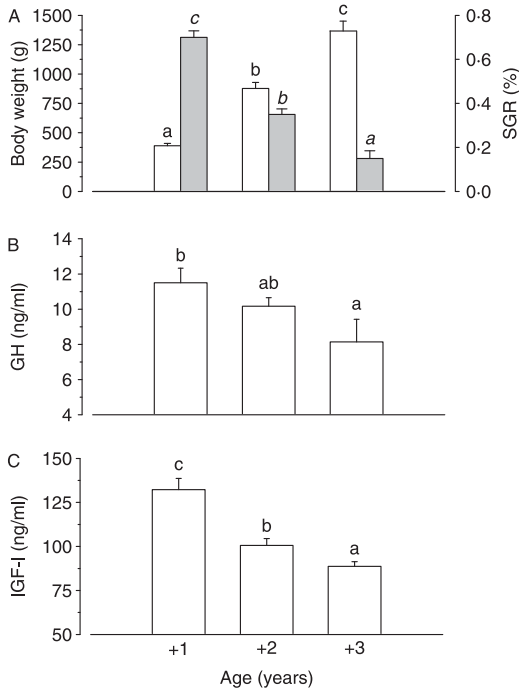


Figure 4 Summer age-related changes in body weight (white bars) and specific growth rates (gray bars) (A). Plasma levels of GH (B) and IGF-I (C). Growth parameters are the average values (mean \pm S.E.M.) of triplicates tanks. Hormone data are the mean of ten fish. Different letters above each bar indicate statistically significant differences between sampling times ($P < 0.05$, Student–Newman–Keuls).

would explain the reported upregulated expression of muscle GHR-II by fasting (Saera-Vila *et al.* 2005). Muscle disuse atrophy was also associated in rats to the enhanced expression of GHRs, although this attempt of muscle repair requires intact insulin and IGF-I receptor signaling (Casse *et al.* 2003, Kim *et al.* 2005).

Hepatic IGF-I is not crucial for postnatal growth in mice, and liver IGF-I knockouts show normal growth due to the compensatory action of autocrine/paracrine IGF-I (see Le Roith *et al.* 2001a,b). Postnatally elevated levels of IGF-II fail to rescue the dwarfism of IGF-I-deficient mice (Moerth *et al.* 2007), although species-specific differences appear to be important in IGF-II expression and function. Thus, transcripts of IGF-II decrease quickly during the postnatal development of mice and rats (Rotwein 1991), but substantial amounts are found later in life in humans and in a wide range of fish species, including common carp (Vong *et al.* 2003), rainbow trout (Chauvigné *et al.* 2003), Nile tilapia (Caelters *et al.* 2004), channel catfish (Peterson *et al.* 2004), and gilthead sea bream (Duguay *et al.* 1996). Of note, a relative high expression of IGF-II is retained in extra-hepatic tissues of

most fish species, and compensatory increases of muscle IGF-II have been documented in fast-growing juveniles of gilthead sea bream when they were fed practical diets with increased amounts of feed-borne contaminants (Benedito-Palos *et al.* 2007). The muscle expression of GHR-I was not significantly altered by this dietary intervention, which agrees with the common notion that autocrine/paracrine IGF effects are mostly GH independent (Wood *et al.* 2005). However, in the present study, correlation analyses suggested that the increased muscle expression of IGF-II by overwintering would be mediated by the upregulated expression of GHR-I. Parallel increases of IGFs and GHR-I mRNA levels also occurred in the muscle tissue of older fish during the summer growth spurt. Hence, this locally enhanced expression of GHR-I may be considered adaptive to face up a reduced activity of the liver GH/IGF-I axis. However, the relative contribution of fish GHRs on growth and IGF regulation probably depends not only on fish lineage, but also on each particular age, nutritional, and environmental condition. Jiao *et al.* (2006) showed that duplicated *GHR* genes are differentially regulated by cortisol in black sea bream, a closely related sparid fish. In this regard, the evolutionary scenario for most paralog genes is consistent with the partitioning of ancestral functions after degenerative mutations in different regulatory and/or structural sequences (sub-functionalization model; see Volff 2005). The microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is perhaps one of the most illustrative examples, mammals and birds having a unique *MITF* gene which generates different isoforms through the use of alternate promoters. By contrast, fish have two different *MITF* genes that are present in species as divergent as zebrafish, pufferfish, and platyfish.

The sub-functionalization model might also be applied to GHRs, which evolved in gilthead sea bream as duplicated genes with a single transcription start site. By contrast, GHRs of higher vertebrates have multiple untranslated exons that are alternatively spliced to a common acceptor site. These spliced transcripts are modulated by different regulatory elements, having liver-specific GHRs, a TATA-box surrounding the transcription start site (Goodyer *et al.* 2001). Other conserved and ubiquitous mammalian GHR variants have TATA-less promoters, and the transcription initiation is determined in the bovine P1 promoter by Inr substitutes (Jiang *et al.* 2000). Sequences similar to consensus Inr were also found herein, which indicate that transcription initiation of GHRs can be dictated in fish and higher vertebrates by Inr-like sequences that were initially sub-estimated in metazoan genomes (Gross & Oelgeschläger 2006). Moreover, many core promoters contain downstream elements, and consensus sequences for the DPE appear to be essential for the activity of most Inr promoters (Smale 1997, Smale & Kadonaga 2003). This may be the case of the two gilthead sea bream GHRs, which have retained Inr and DPEs surrounding the transcription start site.

Typically, TATA-less promoters have CCAAT-boxes in the forward or reverse orientation between -60 and -100 of the

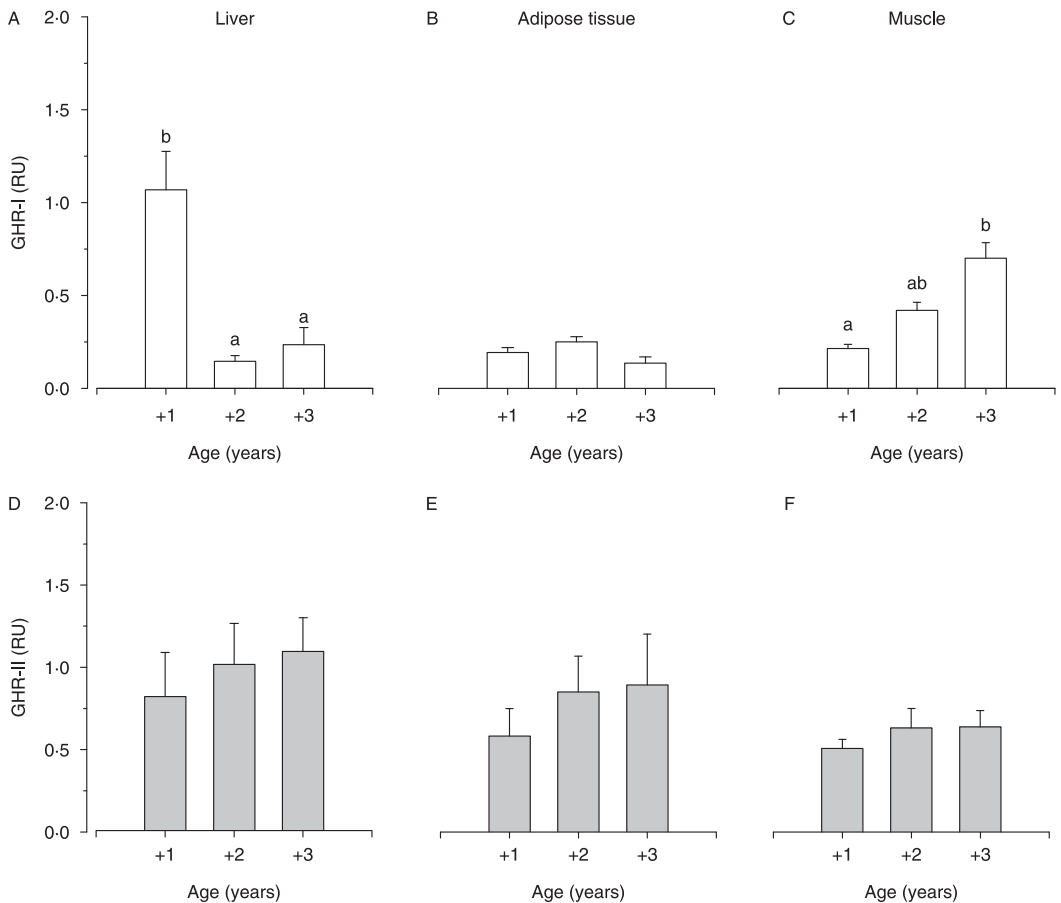


Figure 5 Summer age-related changes in the tissue-specific expression (relative units) of GHR-I and GHR-II. For each gene, the highest expression among tissues was used as reference value in the normalization procedure. Data are the mean \pm S.E.M ($n = 6-7$). For each graph, different letters above each bar indicate statistically significant differences between sampling times ($P < 0.05$, Student–Newman–Keuls).

major start site (Mantovani 1999). Consensus GC-boxes are also common elements in TATA-less promoters, and functional CCAAT-boxes and Sp1-binding sites have been identified in human V2, bovine 1B, ovine 1B, mouse L2, and rat GHR2 promoters (see Goodyer *et al.* 2001). Functional binding sites for the ubiquitous ZBP-89 have also been reported in the bovine GHR1A promoter (Xu *et al.* 2006). In this study, a conserved CCAAT-box and a GC-rich region (identified as a ZBP-89/Sp1-binding site) were retrieved in the GHR-I-flanking region of gilthead sea bream. Hence, structural, transcriptional, and regulatory features suggest that GHR-I of sparid fish evolved as a true orthologous gene of mammalian GHRs. Nevertheless, the regulation of duplicated fish GHRs is a complicated and intriguing process, and we cannot exclude some overlapping and functional

redundancy of fish GHRs. Thus, ongoing studies indicate that the reduction of hepatic IGF expression during crowding stress might be dictated by GHR-II rather than GHR-I (unpublished results). Supporting this, CREB and AP-1 recognition sites were found in the GHR-II-flanking region of gilthead sea bream. The regulation of CREB (Hai & Hartman 2001) and AP-1 (Prabhakar 2001, Kim *et al.* 2002) have been extensively studied in mammals, and serve as models of stress- and redox-sensitive transcription factors. Of note, AP-4 is a closely related transcription factor that is rapidly downregulated by glucocorticoids (Tsujimoto *et al.* 2005), and various AP-4 sequence elements were retrieved in the proximal 5'-flanking region of gilthead sea bream GHR-II, although its functional relevance remains still to be demonstrated.

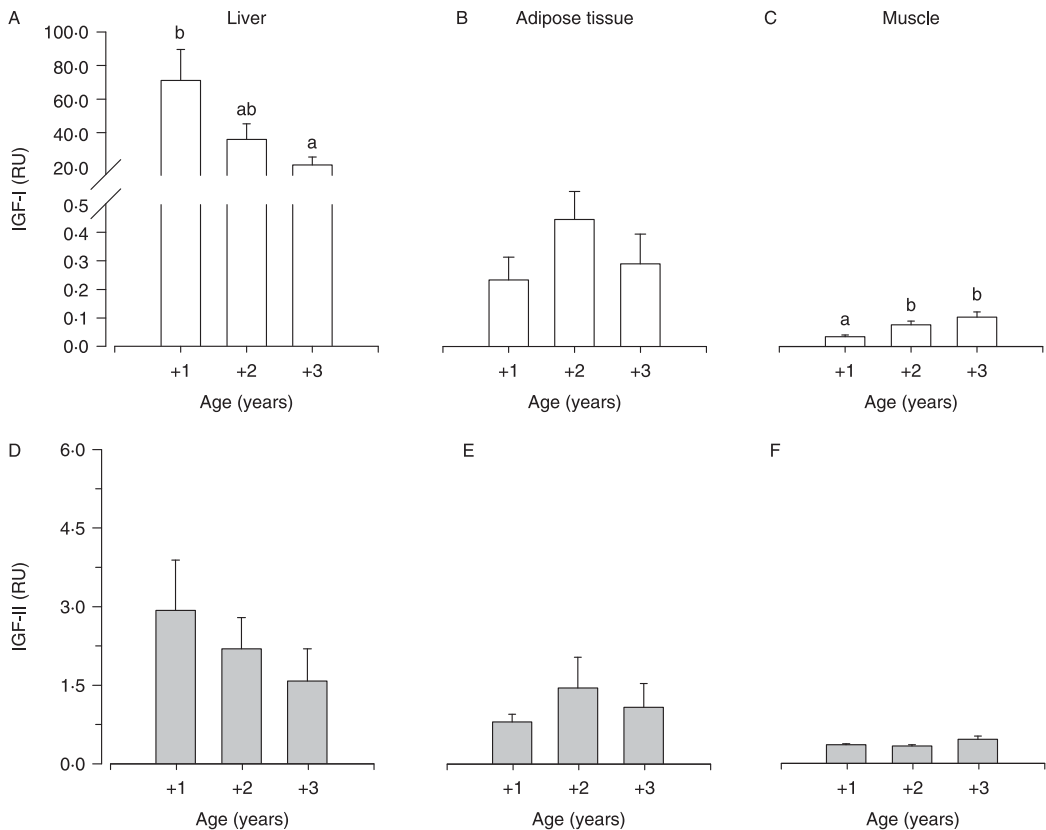


Figure 6 Summer age-related changes in the tissue-specific expression (relative units) of IGF-I and IGF-II. For each gene, the highest expression among tissues was used as reference value in the normalization procedure. Data are the mean \pm S.E.M. ($n=6-7$). For each tissue, different letters above each bar indicate statistically significant differences between sampling times ($P<0.05$, Student–Newman–Keuls).

Experimental evidence shows that SL rather than GH binds to GHR-I of masu salmon (Fukada *et al.* 2005). Orthologous medaka genes could also mediate SL signaling (Fukamachi *et al.* 2005), but the switch and diversification of GHR functions are highly probable among fish lineages. Thus, the binding capabilities of GHRs have been characterized in Japanese eel, and the recombinant eel GHR-I binds specifically to GH and does not cross-react with eel SL (Ozaki *et al.* 2006). In the same context, GHR-II is apparently lost or silenced in turbot, and GHR-I and truncated isoforms emerge as the unique functional GHR in the flatfish lineage (see Saera-Vila *et al.* 2005). Regardless of this, each ligand/receptor interaction can result in unique signaling outcomes as was reported in mammals for insulin receptor and insulin/IGF ligands (Denley *et al.* 2005). Thus, recombinant SL does not exert a growth-promoting action in gilthead sea bream, but has a lipolytic action similar to that found with GH preparations, which was evidenced by

changes in the respiratory quotient and activities of lipolytic enzymes (Vega-Rubín de Celis *et al.* 2003). Additionally, differences in binding affinities and ligand abilities may contribute to make a hypothetical scenario in which GH and SL work through a same receptor. Combined data on plasma GH and SL levels have not been included in this article, although previous studies clearly proved in gilthead sea bream a specific seasonal pattern for each GH/PRL family member (Mingarro *et al.* 2002, Pérez-Sánchez *et al.* 2002). Furthermore, opposite trends for circulating GH and SL have been reported with advancing age and changes in nutritional condition, arising from shifts in ration size, dietary composition, and secretagog effects of arginine (Company *et al.* 2001, Vega-Rubín de Celis *et al.* 2004b).

In summary, coexpression analyses suggest a key role of GHR-I in the tissue-specific regulation of IGFs in a non-salmonid fish of economical relevance for the Mediterranean aquaculture. Some functional redundancy of GHR-I and

GHR-II cannot be excluded, emerging GHR-II as a stress- and redox-sensitive genes. This notion is supported by sequence analysis of the 5'-flanking region, although functional studies remain to be implemented to document the physiological relevance of consensus-binding sites in the core promoter of fish GHRs. Additionally, detailed studies merit to be conducted to explore and better understand the growth plasticity and functional diversification of IGFs and GHRs among fish lineages.

Acknowledgements

This work was supported by Spanish projects (AGL2002-00551 and AGL2004-06319) from the Ministerio de Educación y Ciencia to Jaume Pérez-Sánchez. Alfonso Saera-Vila was the recipient of a Spanish PhD fellowship from the Diputación Provincial de Castellón. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

Benedet S, Johansson V, Sweeney G, Galay-Burgos M & Björnsson B 2005 Cloning of two Atlantic salmon growth hormone receptor isoforms and *in vitro* ligand-binding response. *Fish Physiology and Biochemistry* **31** 315–329.

Benedito-Palos L, Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Kaushik S & Pérez-Sánchez J 2007 Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* In Press.

Caelers A, Berishvili G, Meli ML, Eppler E & Reinecke M 2004 Establishment of a real-time RT-PCR for the determination of absolute amounts of *IGF-I* and *IGF-II* gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia. *General and Comparative Endocrinology* **137** 196–204.

Calduch-Giner JA, Duval H, Chesnel F, Boeuf G, Pérez-Sánchez J & Boujard D 2001 Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* **142** 3269–3273.

Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Boujard D & Pérez-Sánchez J 2003 Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* **136** 1–13.

Casse AH, Desplanches D, Mayet-Sornay MH, Raccurt M, Jegou S & Morel G 2003 Growth hormone receptor expression in atrophying muscle fibers of rats. *Endocrinology* **144** 3692–3697.

Chauvigné F, Gabillard JC, Weil C & Rescan PY 2003 Effect of refeeding on IGF-I, IGF-II, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology* **132** 209–215.

Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156–159.

Company R, Astola A, Pendón C, Valdivia MM & Pérez-Sánchez J 2001 Somatotropic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology and Toxicology* **132** 435–445.

Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC & Forbes BE 2005 Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **16** 421–439.

Dickhoff WW, Beckman BR, Larsen DA, Duan C & Moriyama S 1997 The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry* **17** 231–236.

Duguay SJ, Lai-Zhang J, Steiner DF, Funkenstein B & Chan SJ 1996 Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNAs in *Sparus aurata*. *Journal of Molecular Endocrinology* **16** 123–132.

Dyer AR, Barlow CG, Bransden MP, Carter CG, Glencross BD, Richardson N, Thomas PM, Williams KC & Carragher JF 2004 Correlation of plasma IGF-I concentrations and growth rate in aquacultured finfish: a tool for assessing the potential of new diets. *Aquaculture* **236** 583–592.

Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P & Dickhoff WW 2004 Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *General and Comparative Endocrinology* **139** 61–71.

Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P & Dickhoff WW 2005 Identification of the salmon somatolactin receptor, a new member of the cytokine receptor family. *Endocrinology* **146** 2354–2361.

Fukamachi S, Yada T & Mitani H 2005 Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptors. *Genetics* **171** 1875–1883.

Gabillard J-C, Yao K, Vandeputte M, Gutiérrez J & Le Bail P-Y 2006 Differential expression of two GH receptor mRNAs following temperature change in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology* **190** 29–37.

Gómez-Requeni P, Mingarro M, Kirchner S, Calduch-Giner JA, Médale F, Corraze G, Panserat S, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik SJ *et al.* 2003 Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **220** 749–767.

Gómez-Requeni P, Mingarro M, Calduch-Giner JA, Médale F, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik S & Pérez-Sánchez J 2004 Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **232** 493–510.

Goodyer CG, Zogopoulos G, Schwartzbauer G, Zheng H, Hendy GN & Menon RK 2001 Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5'-flanking region. *Endocrinology* **142** 1923–1934.

Gross P & Oelgeschläger T 2006 Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochemical Society Symposium* **225**–236.

Hai T & Hartman MG 2001 The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273** 1–11.

Jiang H, Okamura CS, Boyd CK & Lucy MC 2000 Identification of Sp1 as the transcription factor for the alternative promoter P2 of the bovine growth hormone receptor gene. *Journal of Molecular Endocrinology* **24** 203–214.

Jiao B, Huang X, Chan CB, Zhang L, Wang D & Cheng CHK 2006 The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology* **36** 23–40.

Kajimura S, Kawaguchi N, Kaneko T, Kawazoe I, Hirano T, Vistacion N, Grau EG & Aida K 2004 Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. *Journal of Endocrinology* **181** 65–76.

Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC & Edery M 1991 The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Reviews* **12** 235–251.

Kim HJ, Jung KJ, Yu BP, Cho CG, Choi JS & Chung HY 2002 Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. *Mechanisms of Ageing and Development* **123** 1589–1595.

Kim H, Barton E, Muja N, Yakar S, Pennisi P & LeRoith D 2005 Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function *in vivo*. *Endocrinology* **146** 1772–1779.

Kopchick JJ & Andry JM 2000 Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Molecular Genetics and Metabolism* **71** 293–314.

Larsen DA, Beckman BR & Dickhoff WW 2001 The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and

- endocrine physiology (insulin, insulin-like growth factor-I, and thyroxine) of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* **123** 308–323.
- Lee LTO, Nong G, Chan YH, Tse DLY & Cheng CHK 2001 Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* **270** 121–129.
- Li MH, Peterson BC, Janes CL & Robinson EH 2006 Comparison of diets containing various fish meal levels on growth performance, body composition, and insulin-like growth factor-I of juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus* of different strains. *Aquaculture* **253** 628–635.
- Livak KJ & Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25** 402–408.
- Mantovani R 1999 The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF- κ B. *Gene* **239** 15–27.
- Martínez-Barberá JP, Pendón C, Martí-Palanca H, Calduch-Giner JA, Rodríguez RB, Valdivia MM & Pérez-Sánchez J 1995 The use of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **110** 335–340.
- Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Astola A, Pendón C, Martínez Valdivia M & Pérez-Sánchez J 2002 Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatotactin paradigm. *General and Comparative Endocrinology* **128** 102–111.
- Moerth C, Schneider MR, Renner-Mueller I, Blutke A, Emlinger MW, Erben RG, Camacho-Hübner C, Hoefflich A & Wolf E 2007 Postnatally elevated levels of insulin-like growth factor (IGF)-II fail to rescue the dwarfism of IGF-I-deficient mice except kidney weight. *Endocrinology* **148** 441–451.
- Nakao N, Higashimoto Y, Ohkubo T, Yoshizato H, Nakai N, Nakashima K & Tanaka M 2004 Characterization of structure and expression of the growth hormone receptor gene of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Endocrinology* **182** 157–164.
- Nordgarden U, Hansen T, Hemre GI, Sundby A & Björnsson BT 2005 Endocrine growth regulation of adult Atlantic salmon in seawater: the effects of light regime on plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I, and insulin levels. *Aquaculture* **250** 862–871.
- Orlovskii IV, Sverdllova PS & Rubtsov PM 2004 Fine structure, expression, and polymorphism of the human growth hormone receptor gene. *Molecular Biology* **38** 24–33.
- Ozaki Y, Fukada H, Kazeto Y, Adachi S, Hara A & Yamauchi K 2006 Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* **143** 422–431.
- Pérez-Sánchez J, Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P, Saera-Vila A, Astola A & Valdivia MM 2002 Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiology and Biochemistry* **27** 243–258.
- Peterson BC, Waldbieser GC & Bilodeau L 2004 IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology* **139** 317–323.
- Prabhakar NR 2001 Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia: invited review: oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology* **90** 1986–1994.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL & Butler A 2001a The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews* **22** 53–74.
- Le Roith D, Scavo L & Butler A 2001b What is the role of circulating IGF-1? *Trends in Endocrinology and Metabolism* **12** 48–52.
- Rotwein P 1991 Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* **5** 3–18.
- Saera-Vila A, Calduch-Giner JA & Pérez-Sánchez J 2005 Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* **142** 193–203.
- Silverstein JT, Wolters WR, Shimizu M & Dickhoff WW 2000 Bovine growth hormone treatment of channel catfish: strain and temperature effects on growth, plasma IGF-I levels, feed intake and efficiency and body composition. *Aquaculture* **190** 77–88.
- Smale ST 1997 Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1351** 73–88.
- Smale ST & Kadonaga JT 2003 The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry* **72** 449–479.
- Tse DLY, Tse MCL, Chan CB, Deng L, Zhang WM, Lin HR & Cheng CHK 2003 Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1625** 64–76.
- Tsujimoto K, Ono T, Sato M, Nishida T, Oguma T & Tadakuma T 2005 Regulation of the expression of caspase-9 by the transcription factor activator protein-4 in glucocorticoid-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **280** 27638–27644.
- Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P, Calduch-Giner JA, Médale F & Pérez-Sánchez J 2003 Expression and characterization of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatotactin: assessment of *in vivo* metabolic effects. *Marine Biotechnology* **5** 92–101.
- Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P & Pérez-Sánchez J 2004a Production and characterization of recombinantly derived peptides and antibodies for accurate determinations of somatotactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* **139** 266–277.
- Vega-Rubín de Celis S, Rojas P, Gómez-Requeni P, Albalat A, Gutiérrez J, Médale F, Kaushik SJ, Navarro I & Pérez-Sánchez J 2004b Nutritional assessment of somatotactin function in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): concurrent changes in somatotrophic axis and pancreatic hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology* **138** 533–542.
- Very NM, Kittilson JD, Norbeck LA & Sheridan MA 2005 Isolation, characterization, and distribution of two cDNAs encoding for growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* **140** 615–628.
- Volf JN 2005 Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* **94** 280–294.
- Vong QP, Chan KM & Cheng CH 2003 Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. *Journal of Endocrinology* **178** 513–521.
- Wei Y, Rhani Z & Goodyer CG 2006 Characterization of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid variants in human adipocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91** 1901–1908.
- Wood AW, Duan C & Bern HA 2005 Insulin-like growth factor signaling in fish. In *International Review of Cytology*, Ed K W Joan vol 243. New York: Academic Press, pp 215–285.
- Xu Q, Springer L, Merchant JL & Jiang H 2006 Identification of zinc finger binding protein 89 (ZBP-89) as a transcriptional activator for a major bovine growth hormone receptor promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology* **251** 88–95.
- Zhou R, Cheng H & Tiersch TR 2001 Differential genome duplication and fish diversity. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **11** 331–337.

Received in final form 18 May 2007
 Accepted 21 May 2007
 Made available online as an Accepted Preprint
 21 May 2007



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi



Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.

Ariadna Sitjà-Bobadilla^{a,*}, Josep Calduch-Giner^b, Alfonso Saera-Vila^b,
Oswaldo Palenzuela^a, Pilar Álvarez-Pellitero^a, Jaume Pérez-Sánchez^b

^a Fish Pathology Group, Department of Marine Species Biology, Culture and Pathology, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Torre de la Sal, s/n. 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

^b Fish Nutrition and Growth Endocrinology Group, Department of Marine Species Biology, Culture and Pathology, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Castellón, Spain

Received 31 October 2007; revised 25 January 2008; accepted 29 January 2008

Available online 8 February 2008

KEYWORDS

Host–parasite interaction;
Innate immunity;
Cytokines;
GH receptors, IGF-I;
Mortalin;
Anti-oxidant enzymes;
Gene expression

Abstract The myxosporean parasite *Enteromyxum leei* invades the intestine of gilthead sea bream producing a slow-progressing disease, which may end in the death of fish. The present work aimed to better know the host immune response and the underlying molecular mechanisms, which may help to understand why some individuals seem to be refractory to the disease. Three main aspects involved in fish health and welfare (immune, growth and redox status) were studied in fish exposed to *E. leei*-contaminated effluent, in comparison with control animals (not exposed to the disease). After chronic exposure (113 days), prevalence of infection was 67.8%. Among exposed fish, parasitized and non-parasitized fish exhibited clear differences in some of the measured innate immune factors (respiratory burst, serum peroxidases, lysozyme and complement), and in the expression of immune, antioxidant and GH-related genes. The respiratory burst of parasitized fish was significantly higher, and serum peroxidases and lysozyme were significantly decreased both in parasitized and non-parasitized fish. The gene expression of GHR-I, GHR-II, IGF-I and IGF-II was measured in head kidney (HK) samples, and that of interleukin (IL)-1 β , tumour necrosis factor (TNF)- α , α -2M, GR, GPx-1 and GRP-75 was measured in intestine and HK samples, by rtqPCR. Parasitized fish exhibited a down-regulation of IL-1 β , TNF- α and GPx-1 in the intestine, and GHR-I and IGF-I were also down regulated in HK. α -2M and GRP-75 were over-expressed in the intestine of parasitized

* Corresponding author. Tel.: +34 964 319500; fax: +34 964 319509.
E-mail address: ariadna@iats.csic.es (A. Sitjà-Bobadilla).

animals. Non-parasitized fish had increased transcripts of GHR-I and IGF-I with respect to control animals, which could furnish their immunocytes with an advantage to combat the parasite. The expression of GHR-II and IGF-II was not altered by the parasite challenge.
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is the main aquacultured species in the Mediterranean area, with more than 90,000 Mt produced in 2005 [1]. However, the massive establishment of sea cages has increased the incidence of transmissible parasites [2,3] and some of them, such as the myxosporean *Enteromyxum leei* [4], have emerged as serious risks to production [5]. The Myxozoan phylum includes more than 2180 species and most of them are fish parasites [6]. Research in this group of multicellular organisms is held back by the lack of *in vitro* cultures and the difficulty to set up experimental transmission models. However, *E. leei* is an excellent model to study host–parasite interactions because the parasite is fish-to-fish transmitted either orally, by cohabitation with infected animals, or by contact with waters coming from infected tanks [7].

In gilthead sea bream, this enteromyxosis progresses slowly under laboratory conditions [8] in comparison with other more susceptible hosts, such as sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) [9]. Infected fish may become emaciated and finally die with a cachectic syndrome, and no treatments or prophylactic control measures are available. Therefore, characterization of the fish immune system and its regulation is crucial for the development of vaccines and other prevention strategies based on selection of disease-resistant strains. Some aspects of the humoral and cellular immune responses against this myxosporean have been studied in gilthead sea bream [10,11] and sharpnose sea bream [9,12], but no information is available on the molecular mechanisms involved in such immune defence, the host–parasite interaction, or the parasite invasion mechanisms. Field and experimental data suggest that some gilthead sea bream stocks are partially resistant to the disease [8,13]. Thus, it is of interest to know the differences in the immune response between those fish which seem to be resistant to the parasite and those which get infected. Both innate and adaptive immune effectors against parasites exist in teleosts [14–16]. A functional parallelism between fish and mammalian systems, including the gut associated lymphoid tissue (GALT), is increasingly confirmed by recent findings [17–18]. Innate and adaptive immune responses have also been studied for a few myxosporoses [10,11,19–23].

Immune-neuroendocrine interactions in fish, as in mammals, have become evident in recent decades [24,25]. Growth hormone (GH) is among such endocrine factors modulating the fish immune system. In gilthead sea bream, GH [26] and insulin-like growth factor I (IGF-I) [27] receptors have been detected in different immunocytes, GH expression has been reported in the head kidney (the equivalent to mammalian bone marrow) [28], and phagocyte activating action of GH and IGF-I has also been documented [29]. However, the immune-related systems of fish are

not clearly understood at the molecular level, and their involvement in fish defence against parasites is just starting to be studied.

Another important aspect of fish health depends on the maintenance of cellular homeostasis and integrity by the redox system and heat-shock proteins (HSPs). Mammalian HSPs are known to perform protein-stabilizing functions and to play a role in different immunological aspects [30]. Diseases, including parasitosis, can induce the expression of HSPs both in mammals and fish [31,32]. GRP-75 (also known as mortalin) is a member of the HSP70-family of chaperons involved in regulating glucose responses, antigen processing and cell mortality in mammalian models [33], and its implication in haematopoiesis has been demonstrated in fish [34]. The redox system in fish has almost the same enzymatic routes as in mammals and the regulation of glutathione peroxidases (GPx) and reductases (GR) has recently been reviewed [35]. Interestingly, the signalling events involved in the phosphorylation cascades induced by interleukin (IL)-1 β and tumour necrosis factor (TNF)- α are also subject to redox regulation [36].

Therefore, the aim of this work was to explore different features related to fish health and welfare (immune, growth and redox status), and their involvement in the defence against an important parasitic disease. Previous studies have examined the *in vivo* expression profiles of genes encoding fish cytokines under diverse disease conditions, but none has tried to relate those profiles with other immune factors and immune, redox and GH-related genes in fish exposed to a parasite challenge. Thus, the probable differences between fish which become infected and those which do not after a long-term parasite challenge were studied in terms of gene expression profile and innate immunity. For such purposes, naïve gilthead sea bream were exposed to *E. leei*-contaminated effluent until the infection was clearly established in some animals, and others remained still uninfected. A single end-point sampling was chosen in order to obtain data from a high number of infected fish in a situation of chronic infection, in an effort to mimic the pattern usually found under culture conditions.

Materials and methods

Experimental design and sampling procedure

Naïve gilthead sea bream were obtained from a commercial fish farm with no previous records of enteromyxosis. Upon arrival, they were checked for the absence of the parasite (see below) and acclimated to the experimental conditions two weeks before the beginning of the experiment. Fish ($n = 132$; average weight 134 g) were divided into two groups, control (CTRL) and recipient (R). Each group was

split in two replicate 200-L fibre-glass tanks. A first sampling (day 0) of 6 fish from each group was conducted. Then, R fish were exposed to *E. leei*-contaminated effluent as previously described [8]. Briefly, R tanks were set to receive exclusively the effluent water from another tank containing 24 fish coming from an infected stock (donors = D; average weight 127.3 g; prevalence of infection 54%), resulting in a D/R ratio = 0.8. CTRL fish were kept under the same conditions of water flow and oxygen concentration, but without receiving *E. leei*-contaminated water.

Over the course of the study, day length followed natural changes and water was heated in order to keep temperature always above 18 °C (range: 18–23 °C, with a maximum day-to-day variation of 1 °C). Sea water (37.5‰ salinity) was pumped from ashore (open system), 5 µm-filtered and UV irradiated. Water flow was 10 L min⁻¹, and oxygen content of outlet water remained higher than 85% saturation. All fish were fed daily a commercial dry pellet diet at about 1% of body weight. Disease signs and daily mortalities were recorded throughout the experiment.

After the sampling before exposure to the parasite (day 0), the progression of the infection was monitored by sampling both CTRL and R fish at 27, 50, 90 and 113 days post exposure (p.e.). At each sampling, an equal number of fish from each replicate was randomly sized and weighed (see Fig. 1 for the total number of fish sampled at each sampling point). At day 90 p.e., fish from both CTRL and R groups were non-lethally sampled for PCR (see below). At the remaining samplings (27, 50 and 113 p.e.), fish were killed by over-exposure to anaesthetic (3-aminobenzoic acid ethyl ester, 100 mg L⁻¹). One piece of the posterior intestine was fixed in 10% buffered formalin for diagnosis of the disease in histological sections, and another piece was processed for PCR detection of the parasite (see below). In addition, only at the last sampling (113 days p.e.), blood and tissue samples were taken for immunological and gene-expression analyses. One blood aliquot was

immediately used to measure the respiratory burst activity. The remaining blood was allowed to clot overnight at 4 °C, centrifuged at 3000 × g for 20 min at 4 °C, and serum aliquots were stored at -80 °C until used in immune assays. Head kidney (HK) and posterior intestine were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until RNA extraction and analysis. Immunological data were obtained from all fish sampled at this time and gene expression analyses were calculated for 8 CTRL and 16 R fish (see below).

Parasite diagnosis

Parasite diagnosis was performed by histology and/or PCR. For histological examination, fixed intestinal portions were embedded in Technovit resin (Kulzer, Heraeus, Germany), 1 µm-sectioned and stained with toluidine blue. For PCR, two types of samples were taken. Non-lethal (NL) sampling was performed by probing the rectum with a cotton swab, and lethal (L) samples consisted of small tissue portions taken from the posterior intestine. Sampling and PCR diagnoses were carried out as described in [37], with primers specific for *E. leei* rDNA. This procedure has been validated against a gold standard (histological observation of the whole digestive tract), resulting in a high sensitivity (0.96) and specificity (1) (O. Palenzuela, unpublished data). NL-PCR was applied to evaluate the parasitic status of D fish, R fish upon arrival to the experimental facilities, and also of R fish at 90 days p.e. to adjust the timing of the last sampling and to ensure enough infected fish for comparative analyses. The prevalence of infection at each sampling point was calculated considering any positive fish detected by PCR and/or histology. The intensity of infection was evaluated in the histological sections and scored as high, medium or low according to the number of parasitic stages per observation field at 120×: low = scattered stages in some fields, medium = more than 10 stages in

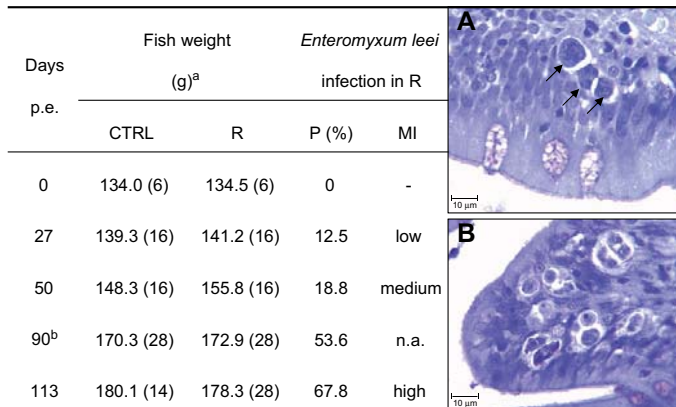


Figure 1 Fish weight, mean prevalence (P) and mean intensity (MI) of infection of control (CTRL) and recipient (R) gilthead sea bream exposed to *Enteromyxum leei*. Panels A and B show histological sections of intestines of parasitized R fish at 27 and 113 days post-exposure (p.e.), respectively. Arrows point to parasite stages. ^aThe number in parentheses indicates the number of sampled fish. ^bMI was calculated only from data obtained from histological diagnose, thus it cannot be calculated (n.a.) at 90 days p.e., when fish were diagnosed only by NL-PCR.

all fields; high = more than 30 stages in all fields. The mean intensity of infection was calculated only for fish found to be parasitized by histology.

Immunological assays

Induction of the respiratory burst (RB) activity in blood leucocytes was measured directly from heparinized blood, following the method described in [38], with some modifications. Briefly, 100 μ l of diluted blood (1:25) in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, pH 7.4) were dispensed in white flat-bottomed 96-well plates and incubated with 100 μ l of a freshly prepared luminol suspension (2 mM luminol in 0.2 M borate buffer pH 9.0, with 2 μ g ml⁻¹ PMA) for 1 h at 24–25 °C. Luminol-amplified chemiluminescence was measured every 3 min with a plate luminescence reader for generation of kinetic curves. Each sample was run in duplicate and read against a blank in which no blood was added. The integral luminescence in relative light units (RLU) was calculated.

Total serum peroxidases (PO), which include myeloperoxidase, were chosen as a measure of the oxidizing capacity of the plasma. They were measured following the procedure described in [39]. Briefly, 15 μ l of serum were mixed in flat-bottomed well plates with 135 μ l of HBSS-plus (HBSS, without Ca²⁺ and Mg²⁺, 0.1% NaCl and antimycotic/antibiotic mixture) and 50 μ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB). After 2 min of incubation, the reaction was stopped with 25 μ l of 1 N H₂SO₄, and the optical density was read at 450 nm. Wells in which no serum was added were run as blanks.

Serum lysozyme (LY) was measured by a turbidimetric assay adapted to 96-well microplates, as previously described [39]. The lytic capacity of the serum by the alternative complement pathway (ACP) was determined using sheep red blood cells (SRBC) as targets, as in [39], with the only exception of using 2.85 \times 10⁸ SRBC ml⁻¹. The dilution corresponding to 50% haemolysis/ml was expressed as ACH₅₀.

RNA extraction and RT procedure

RNA was extracted from samples of posterior intestine and HK using the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, HK and intestine tissues were homogenized at a ratio of 25 mg ml⁻¹ with a guanidine-detergent lysis reagent. The reaction mixture was treated with proteinase K, and RNA purification was achieved by passing the tissue lysate (0.5 ml) through a purification tray containing an application-specific membrane. Wash solutions containing DNase were applied, and total RNA was eluted into a 96-well PCR plate. The RNA yield was 40–50 μ g with absorbance measures (A_{260/280}) of 1.9–2.1. Reverse transcription (RT) with random decamers was performed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For this purpose, 500 ng total RNA were reverse transcribed in a final volume of 100 μ l. RT reactions were incubated for 10 min at 25 °C and 2 h at 37 °C. Control reactions were run without reverse transcriptase and were used as negative controls in PCR assays.

Quantitative PCR

The expression of genes related to growth (GH receptor I (GHR-I), GH receptor II (GHR-II), IGF-I and IGF-II), was measured in HK samples, and those related to immune response (IL-1 β , TNF- α , α -2-macroglobulin (α -2M)), and antioxidant defences (glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase-1 (GPx-1) and mortalin (GRP-75)) were measured in both intestine and HK samples. Transcript measurements were made by real-time quantitative PCR (rtqPCR) using an iCycler IQ Real-time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as previously described [40]. RT reactions were conveniently diluted (1:7.5; 1:75; 1:375), and 7.5 μ l were used for PCR reactions in 25- μ l volume. Each PCR-well contained a SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) with specific primers at a final concentration of 0.3–0.9 μ M (see Table 1). β -Actin was used as housekeeping gene and the efficiency of PCR reactions for target and reference genes varied between 88% and 95%, respectively. The dynamic range of standard curves spanned five orders of magnitude, and the amount of product in a particular sample was determined by interpolation of the cycle threshold (C_t) value. The specificity of reaction was verified by analysis of melting curves and by electrophoresis and sequencing of PCR amplified products. Reactions were performed in triplicate and fluorescence data acquired during the extension phase were normalized to β -actin by the delta-delta method [41], using data in CTRL fish as reference values. No changes in β -actin expression were found in response to the parasite challenge.

Statistical analysis

Differences in immune and gene expression data between CTRL, non-infected R and infected R fish were analysed by One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test or by Dunn's method. The significance level was set at $P < 0.05$. When the tests of normality or equal variance failed, a Kruskal–Wallis one-way ANOVA on Ranks followed by Dunn's method was applied instead. All the statistical analyses were performed using Sigma Stat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Progression of the infection

Fig. 1 shows the progressive increase in the prevalence and the mean intensity of infection by *Enteromyxum leei* in R fish. At the last sampling (113 days p.e.), R fish reached a 67.8% prevalence with a high mean intensity of infection. CTRL fish were non-parasitized. Data on immune factors and gene expression were analysed according to the parasitic status at this time point, and fish were classified in three categories: CTRL ($n = 14$), non-parasitized R ($n = 9$) and parasitized R ($n = 19$) fish.

At the first samplings, most parasite stages were primary cells, sometimes harbouring secondary cells, located in the basal part of the gut epithelium (Fig. 1A), and no cellular reaction was detected. By contrast, at the last sampling, most fish with high intensity of infection harboured sporoblasts and/or mature spores, located within the epithelium

Table 1 Gilthead sea bream primer sequences used for real-time PCR

Gene	Accession no.		Primer sequence	Position
IL-1 β	AJ277166	F	GCG ACC TAC CTG CCA CCT ACA CC	499–521
		R	TCG TCC ACC GCC TCC AGA TGC	629–609
TNF- α	AJ413189	F	CAG GCG TCG TTC AGA GTC TC	1069–1088
		R	CTG TGG CTG AGA GGT GTG TG	1145–1126
α -2M	AY358020	F	GCC AAA CTC GGT GCC TCT CCT ACT GC	676–701
		R	CTG CCC TGT GAG CCA TCT GAC AAT CGG	750–724
GPx-1	DQ524992	F	GAA GGT GGA TGT GAA TGG AAA AGA TG	34–59
		R	CTG ACG GGA CTC CAA ATG ATG G	162–141
GR	AJ937873	F	TGT TCA GCC ACC CAC CCA TCG G	927–948
		R	GCG TGA TAC ATC GGA GTG AAT GAA GTC TTG	1041–1012
GRP-75	DQ524993	F	TCC GGT GTG GAT CTG ACC AAA GAC	358–381
		R	TGT TTA GGC CCA GAA GCA TCC ATG	500–477
GHR-I	AF438176	F	ACC TGT CAG CCA CCA CAT GA	1275–1294
		R	TCG TCG AGA TCT GGG TCG TA	1373–1354
GHR-II	AY573601	F	GAG TGA ACC CGG CCT GAC AG	1690–1709
		R	GCG GTG GTA TCT GAT TCA TGG T	1764–1743
IGF-I	AY996779	F	TGT CTA GCG CTC TTT CCT TTC A	112–133
		R	AGA GGG TGT GGC TAC AGG AGA TAC	195–172
IGF-II	AY996778	F	TGG GAT CGT AGA GGA GTG TTG T	406–427
		R	CTG TAG AGA GGT GGC CGA CA	514–495
β -actin	X89920	F	TCC TGC GGA ATC CAT GAG A	811–829
		R	GAC GTC GCA CTT CAT GAT GCT	861–841

(Fig. 1B). At 113 days p.e., the observation of the histological sections of most infected fish revealed a clear damage to the intestinal architecture. Parasitic stages occupied extensive areas of the epithelium, with partly dislodged enterocytes displaying hypertrophied nuclei and eosinophilic granular cell infiltration in the mucosa and submucosa of the intestine. Rodlet cells were also abundant.

There were no significant differences in body weight between CTRL and R fish during the experimental period (Fig. 1), or at the last sampling between the three fish categories (data not shown). Infected fish did not exhibit the emaciated syndrome, typical of the terminal stage of this enteromyxosis, which usually appears after more than 3 months of exposure. At the last sampling point, the condition factor [(weight length⁻³) \times 100] of non-parasitized R fish was significantly higher (2.525 ± 0.048) than that of CTRL (2.438 ± 0.040) fish. No CTRL or R fish died during the trial.

Immunological factors

For the three fish categories, mean values were calculated for each of the four immunological factors measured. Parasitized fish exhibited the highest RB values, being significantly higher than those of non-parasitized R ones (Fig. 2A). By contrast, serum PO (Fig. 2B) and LY (Fig. 2C) were significantly lower in all fish exposed to the infection, regardless of their parasitic status. ACP was somewhat higher in R parasitized fish but the high individual variability made impossible any statistical significance (Fig. 2D).

Gene expression

The relative expression of the studied genes in parasitized and non-parasitized R fish (both exposed to the infection)

was analysed with respect to CTRL animals (not exposed to the infection), and differences among both types of R fish were also analysed. The data on the expression of immune and anti-oxidant related genes in the HK of parasitized R and non-parasitized R fish are shown in Fig. 3A and B, respectively. Relative to CTRL fish, no significant changes were found in the HK of non-parasitized R fish. The expression of GPx-1 in parasitized R fish was significantly down-regulated relative to CTRL and non-parasitized R fish. Fig. 4 shows the expression profile of the same genes in the intestine. In this tissue, parasitized-R fish exhibited a significant up-regulation of GRP-75 and α -2M, whereas TNF- α , GPx-1 and IL-1 β were significantly down-regulated with respect to CTRL fish, and the two latter genes also with respect to non-parasitized R fish (Fig. 4A). Of note, no significant differences were observed in non-parasitized R fish vs. CTRL ones (Fig. 4B). Concerning the expression of GH-related genes in HK, IGF-I and GHR-I were significantly down-regulated in parasitized R fish (Fig. 5A), whereas both genes were up-regulated in non-parasitized R fish (Fig. 5B). No significant differences were observed in the expression of GHR-II and IGF-II among the three fish categories.

Discussion

After 113 days of exposure to parasite-containing effluent, two categories of R fish were obtained: non-parasitized (exposed, but not infected) and parasitized (exposed and infected by *E. leei*) fish, which were compared with CTRL animals (not exposed to the parasite). This exposure time (113 days) was chosen to ensure a high prevalence of infection. Data gathered in previous experiments over several years have shown that *E. leei* experimental infection by

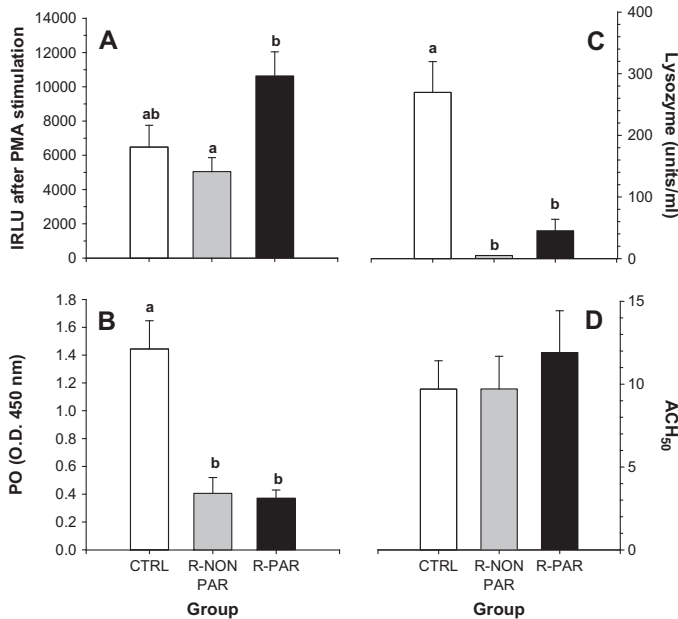


Figure 2 Mean \pm SEM of the respiratory burst (expressed as the integral of relative light units, IRLU) of blood leucocytes (A), serum lysozyme (B), serum peroxidases (C), and serum complement activity of alternative pathway (D) of control (CTRL), non-parasitized recipient (R-NON PAR) and parasitized recipient (R-PAR) gilthead sea bream after 113 days of exposure to *Enteromyxum leei*. Different letters indicate statistically significant differences at $P < 0.05$.

exposure to water effluent is quite effective and consistent [8], and therefore the infective pressure during the current experiment was high enough to ensure a homogeneous and continuous contact of the parasite with all R fish. Thus, in order to understand why some exposed R fish were not parasitized, the differences in the immune response between these fish categories, several cellular and humoral innate factors were measured, and the expression of several immune relevant genes was determined by rtqPCR in an immune-competent organ (HK) and at the site of the infection (intestine).

The RB of blood leucocytes was the only immune factor significantly increased in parasitized R fish, with respect to non-parasitized ones. This immune factor was also significantly increased in sharpsnout sea bream parasitized by *E. leei* at 20 days p.e. [22] and in turbot parasitized by the related species *E. scopthalmi* [23]. The increase observed in the current study could be due to an increase in the number of cells involved in the RB (probably mobilized from HK to combat the parasite at the intestine), or to an enhanced activity of such cells. This mobilization would be in accordance with the decrease in the percentage of HK acidophilic leucocytes at 107 days p.e. reported in gilthead sea bream exposed to *E. leei* by cohabitation [11].

Recognition molecules, like PO, LY and complement can partake in direct fish pathogen elimination [16,42]. In previous studies of *E. leei*-exposed fish, serum PO was elevated in sharpsnout sea bream from 5 to 55 days p.e. [12] and in gilthead sea bream at 10 days p.e. [10], though a depletion

was noticed later on, from 22 to 108 days p.e. [10]. There are no data on how *E. leei* infection affects LY activity. In sharpsnout sea bream, no LY could be detected in either infected or healthy animals [9] and inconsistent patterns have been reported in sparids infected by myxosporeans or in other fish affected by other enteromyxosis [9,23,43]. In the present study, both serum PO and LY were significantly depleted in exposed fish. Taking all this together, it appears that in gilthead sea bream, PO could be initially increased in response to the parasite exposure, but quickly consumed to fight it, and values do not recover even in non-parasitized R fish.

α -2M is a versatile anti-protease capable of trapping and functionally silencing all classes of microbial and parasite proteases [44], which is expressed in gilthead sea bream early in the fish development in liver and muscle [45]. The association of α -2M with resistance to the fish hemoflagellate *Cryptobia salmositica* [46] has been demonstrated. Supporting this, we found herein that α -2M was up-regulated in the intestine (but not significantly in HK) of parasitized gilthead sea bream, which suggests a role in counteracting the putative action of parasite proteases at the local level. Proteases are in fact involved in the pathogenicity of parasites [47], and their presence in several myxosporeans has been documented [48,49]. Thus, it is hypothesized that proteases are also involved in *E. leei* host invasion, as the parasite breaches the epithelium and locates through enterocytes. Furthermore, the modulation of circulating and expression levels of antiproteases by fish

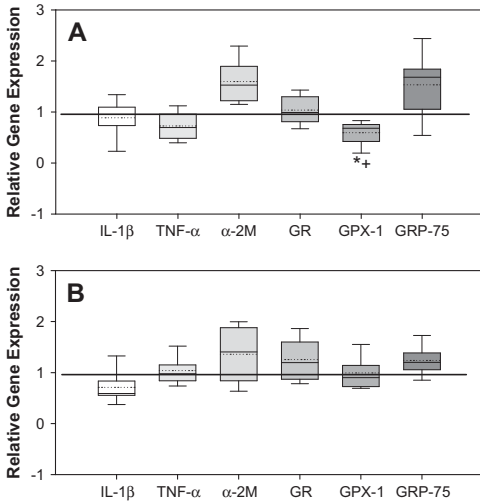


Figure 3 Box–whisker plots representing the relative gene expression of inflammatory cytokines, anti-proteases, and antioxidant enzymes and chaperones in the head kidney of parasitized (A) and non-parasitized (B) R gilthead sea bream after 113 days of exposure to *Enteromyxum leei*. Data in control fish were used as arbitrary reference values in the normalization procedure (values >1 or <1 indicate increase or decrease with respect to reference values). Continuous line inside the box is the median; non-continuous line inside the box is the mean. Each value is the result of triplicate determinations in 8 animals. Statistically significant differences ($P < 0.05$) with respect to control group are indicated (*). In plot A, statistically significant differences ($P < 0.05$) between parasitized and non-parasitized animals are also indicated (+).

parasitic infections has recently been reported. Increased serum total antiproteases and serum α -2M were found in *E. leei*-parasitized sharpsnout sea bream [12] and *E. scophthalmi*-parasitized turbot [23], respectively. Similarly, α -2M was significantly over-transcribed in grass carp parasitized by the copepod *Sinergasilus major* [50] and in carp intraperitoneally injected with *Trypanoplasma borreli* [51]. Additionally, the increased expression of α -2M may also be in response to host proteases released from injured tissues.

IL-1 β and TNF- α are pro-inflammatory cytokines mainly produced and released by activated leucocytes [52], which have been cloned and sequenced in gilthead sea bream [53,54]. In the present work, the expression of both cytokines remained unaltered in non-parasitized R fish, but in parasitized R fish it was significantly down-regulated by the infection at the intestine. In a preliminary study [10], TNF- α was also significantly down-regulated in the HK of *E. leei*-exposed gilthead sea bream starting on day 38 p.e., and IL-1 β expression was increased at the first stages (10 days) after exposure. Most studies on the effect of a parasitic infection in fish have focused on short-term infection models and have detected over-transcription of both cytokines after challenge with *Myxosporea* [55], *Monogenea*

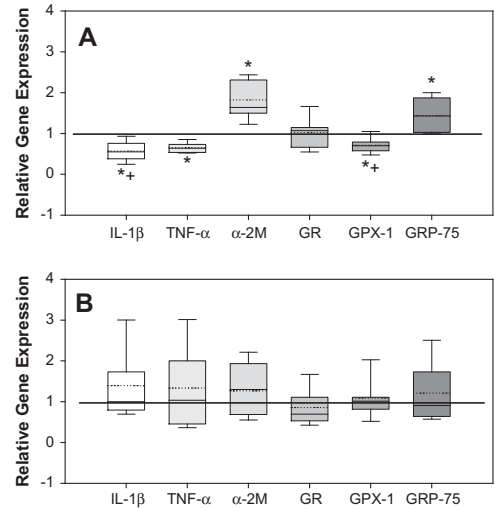


Figure 4 Box–whisker plots representing the relative gene expression of inflammatory cytokines, antiproteases, and antioxidant enzymes and chaperones in the intestine of parasitized (A) and non-parasitized (B) R gilthead sea bream after 113 days of exposure to *Enteromyxum leei*. See legend to Fig. 3 for explanation of symbols and data handling.

[56,57], Copepoda [58] and Protozoa [51,59,60–62], with a subsequent return to normal levels.

There is scarce information on suppressed cytokine expression in piscine-parasite models, but this phenomenon is well documented in parasite murine models [63,64]. Several mechanisms could be involved in the down-regulation of pro-inflammatory cytokines with the progress of parasite infection. First, α -2M may inhibit the synthesis of certain cytokines following cell activation (see [65]), and thus the concurrent increased α -2M transcription in parasitized R fish could be responsible for the parallel down-regulation of IL-1 β and TNF- α . Second, parasitized R fish (after 113 days of exposure to *E. leei*) might just be switching to an anti-inflammatory phase to avoid excessive tissue injury provoked by reactive oxidative species (ROS) generated by activated leucocytes during a prolonged pro-inflammatory phase [66].

Glutathione peroxidases are part of the enzymatic antioxidant defence of fish, and their activity and/or expression can be modulated by natural and anthropogenic factors. Thus, the observed reduction in the transcription of GPx-1, both in the intestine and the HK of parasitized R gilthead sea bream, could render them in a state of oxidative stress if the production of ROS is maintained high (see [67]). However, if the observed high blood RB is considered as the delayed effect of the initial pro-inflammatory phase, the down-regulation of GPx-1 could be regarded as another indicator of the switching to an anti-inflammatory phase. The effect of parasites in piscine GPx-1 is mostly unknown, but mammals infected by some protozoans exhibited reduced erythrocyte GPx-1 [68].

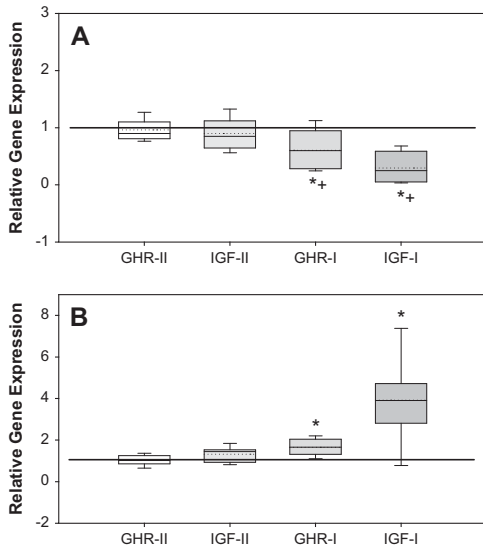


Figure 5 Box-whisker plots representing the relative gene expression of GHRs and IGFs in the head kidney of parasitized (A) and non-parasitized (B) R gilthead sea bream after 113 days of exposure to *Enteromyxum leei*. See legend to Fig. 3 for explanation of symbols and data handling.

GRP-75 was also differentially expressed in parasitized R gilthead sea bream, with a clear over-transcription in intestine. In mammals, GRP-75 is an essential protein that has been implicated in multiple functions [69]. Collective data have provided evidence that a relationship exists between other HSPs and disease in fish [32,70,71]. In general, an over-expression of HSPs is known to have deleterious consequences [72], and particularly that of mortalin is known to contribute to human carcinogenesis [73]. The biological meaning of the observed up-regulation can only be hypothesized, since there is almost no information on the particular regulation of GRP-75 in fish [74]. It is known that GRP-75-defective mutant zebrafish suffers a serious blood developmental defect resulting in ineffective haematopoiesis [34]. Thus, it is conceivable that the over-expression of GRP-75 in the intestine of parasitized R gilthead sea bream may represent some adaptive response to restore cellular homeostasis, in the intestinal tissue destroyed by parasite invasion and the host immune reactive products. This hypothesis would be in accordance with recent evidence of the importance of HSPs to adapt to pathogenic conditions in the digestive tract (reviewed in [75]). In any case, further transcriptional and functional analyses are needed to understand cell and tissue GRP-75 function and regulation in fish.

This is the first work to address the interaction of neuroendocrine and immune systems with a gene-expression approach during a long-term parasite challenge. The expression of GH-related genes in parasitized fish exhibited an opposite regulation to that of non-parasitized animals. The concurrent down-regulation of IGF-I and GHR-I

observed in the HK of parasitized R fish has not been reported before in piscine models, and it could be considered a case of impaired GH function in immune-related organs. In humans and rodents an important complication of sepsis, trauma and chronic inflammatory diseases is the hepatic GH resistance, characterized by normal GH secretion with impaired production of hepatic target genes including IGF-I [76], and some of the mechanisms involved have been elucidated [77]. However, the means by which these genes were down-regulated in *E. leei* parasitized fish remains to be established. On the other hand, the up-regulated expression of GHR-I and IGF-I in the HK of non-parasitized R fish could indicate a higher capacity to effectively combat parasites. Supporting this, specific binding sites for GH were characterized in gilthead sea bream HK neutrophils and macrophages [26], and experimental evidence indicates that GH usually acts in fish as an immunostimulant [78], though the underlying molecular mechanisms are poorly understood. Of note, in the present study, the HK expression of GHR-II and IGF-II was not altered in both parasitized and non-parasitized R fish. This is in accordance with the recent notion that GHR-I and II have evolved as duplicated GHR subtypes having different patterns of tissue distribution, post-receptor signalling and hormonal transcriptional regulation [79,80].

In conclusion, although some immune parameters were affected in the same direction by all the fish exposed to the parasite (LY, PO), those fish which became parasitized exhibited a clearly different gene-expression profile than those which did not, particularly at the site of infection (intestine). This on-site regulation indicates the magnitude of the host-parasite interaction and the involvement of intestinal cells in the host defence. Further studies are needed to analyse in depth the differential expression of the studied genes, and a microarray approach is currently underway to find other genes that may be differently expressed in R fish which become parasitized and in those which do not.

Acknowledgments

This work was partially funded by the UE-VI FP project: "Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance marker assisted selection in fish and shellfish" (AQUAFIRST, contract no. SSP98-CT-2004-513692). The authors are grateful to M.A. González and M.C. Ballester for excellent technical assistance.

References

- [1] APROMAR. La acuicultura marina de peces en España, www.apromar.es/informes.asp; 2006.
- [2] Sitjà-Bobadilla A. Parasites in Mediterranean aquacultured fish: Current impact and future research directions. In: Mas-Coma S, editor. Multidisciplinary for parasites, vectors and parasitic diseases. Bologna, Italy: Medimond; 2004. p. 301–11.
- [3] Nowak BF. Parasitic diseases in marine cage culture - An example of experimental evolution of parasites? *Int J Parasitol* 2007;37:581–8.
- [4] Palenzuela O, Redondo MJ, Alvarez-Pellitero P. Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen nov., sp. nov. (Myxozoa), an

- intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 2002;124:369–79.
- [5] Palenzuela O. Myxozoan infections in Mediterranean mariculture. *Parasitologia* 2006;48:27–9.
- [6] Lom J, Dyková I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 2006;53:1–36.
- [7] Diamant A. Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. *Dis Aquat Organ* 1997;30:99–105.
- [8] Sitjà-Bobadilla A, Diamant A, Palenzuela O, Alvarez-Pellitero P. Host factors and experimental conditions on the horizontal transmission of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J Fish Dis* 2007;30:243–50.
- [9] Golomazou E, Athanassopoulou F, Karagouni E, Tsagozis P, Tsantilas H, Vagianou S. Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dyková, 1994 in sharpnose seabream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters. *Aquaculture* 2006;260:44–53.
- [10] Cuesta A, Muñoz P, Rodríguez A, Salinas I, Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P, et al. Innate defence against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Parasitology* 2006;132:1–10.
- [11] Cuesta A, Salinas I, Rodríguez A, Muñoz P, Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P, et al. Cell-mediated cytotoxicity is the main immune mechanism involved in the cellular defence of gilthead sea bream (Teleostei: Sparidae) against *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Parasite Immunol* 2006;28:657–65.
- [12] Muñoz P, Cuesta A, Athanassopoulou F, Golomazou H, Crespo S, Padrós F, et al. Sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) humoral immune response against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 2007;28:657–65.
- [13] Jublanc E, Toubiana M, Sri Widada J, Le Breton A, LeFebvre G, Sauvegrain C, et al. Observation of a survival case following infestation by *Enteromyxum leei* (Myxozoa Myxosporea), a pathogenic myxosporidian of the digestive duct of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in pisciculture. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53(Suppl.):S20.
- [14] Woo PTK. Immunological responses of fishes to parasitic organisms. *Annu Rev Fish Dis* 1992;2:339–66.
- [15] Secombes CJ, Chappell LH. Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. *Annu Rev Fish Dis* 1996;6:167–77.
- [16] Jones SRM. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Dev Comp Immunol* 2001;25:841–52.
- [17] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:137–51.
- [18] Plouffe DA, Hanington PC, Walsh JG, Wilson EC, Belosevic M. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 2005;12:266–77.
- [19] Furuta T, Ogawa K, Wakabayashi H. Humoral immune response of carp *Cyprinus carpio* to *Myxobolus artus* (Myxozoa: Myxobolidae) infection. *J Fish Biol* 1993;43:441–50.
- [20] Muñoz P, Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P. Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parasitology* 2000;120:465–77.
- [21] Chlmonczyk S, Monge D, de Kinkelin P. Proliferative kidney disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *J Fish Dis* 2002;25:217–26.
- [22] Alvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol Int*; in press doi:10.1016/j.parint.2007.09.004.
- [23] Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Bermúdez R, Palenzuela O, Ferreiro I, Riazza A, et al. Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporea: Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 2006;21:485–500.
- [24] Engelsma MY, Huising MO, Van Muiswinkel WB, Flick G, Kwang J, Savelkoul HFJ, et al. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:467–79.
- [25] Yada T, Nakanishi T. Interaction between endocrine and immune systems in fish. *Int Rev Cytol* 2002;220:35–92.
- [26] Calduch-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P, Pérez-Sánchez J. Evidence for a direct action of GH on hematopoietic-cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Endocrinol* 1995;146:459–67.
- [27] Funkenstein B, Almuly R, Chan SJ. Localization of IGF-I and IGF-I receptor mRNA in *Sparus aurata* larvae. *Gen Comp Endocrinol* 1997;107:291–303.
- [28] Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J. Expression of growth hormone gene in the head kidney of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Exp Zool* 1999;283:326–30.
- [29] Calduch-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P, Pérez-Sánchez J. Growth hormone as a phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell Tissue Res* 1997;287:535–40.
- [30] Proházska Z, Füst G. Immunological aspects of heat-shock proteins - the optimum stress of life. *Mol Immunol* 2004;41:29–44.
- [31] Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett* 2003;6:1025–37.
- [32] Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 2002;295:173–83.
- [33] Wadhwa R, Taira K, Kaul SC. An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperone* 2002;7:309–16.
- [34] Craven SE, French D, Ye W, de Sauvage F, Rosenthal A. Loss of *Hspa9b* in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;105:3528–34.
- [35] Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fish* 2005;15:75–88.
- [36] Tewes F, Böhl G-F, Brigelius-Flohé R. Thiol modulation inhibits the interleukin (IL)-1-mediated activation of an IL-1 receptor-associated protein kinase and NF-kappa B. *Eur J Immunol* 1997;27:3015–21.
- [37] Palenzuela O, Bartholomew JL. Molecular tools for the diagnosis of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa). In: Cunningham CO, editor. *Molecular diagnosis of salmonid diseases*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2002. p. 285–98.
- [38] Nikoskelainen S, Verho S, Airas K, Lilius EM. Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium (*Aeromonas salmonicida*) can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. *Dev Comp Immunol* 2005;29:525–37.
- [39] Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, Médale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 2005;249:387–400.
- [40] Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Boujard D, Pérez-Sánchez J. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream, (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp Biochem Physiol* 2003;136B:1–13.

- [41] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [42] Alexander JB, Ingram GA. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annu Rev Fish Dis* 1992;2:249–79.
- [43] Karagouni E, Athanassopoulou F, Tsagozis P, Ralli E, Moustakareas T, Lytra K, et al. The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* L. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005;18:121–32.
- [44] Armstrong PB, Quigley JP. Alpha(2)-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev Comp Immunol* 1999;23:375–90.
- [45] Funkenstein B, Rebhan Y, Dyman A, Radaelli G. α 2-Macroglobulin in the marine fish, *Sparus aurata*. *Comp Biochem Physiol* 2005;41A:440–9.
- [46] Zuo X, Woo PTK. Natural anti-proteases in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* and brook charr, *Salvelinus fontinalis* and the *in vitro* neutralization of fish alpha 2-macroglobulin by the metalloprotease from the pathogenic haemoflagellate, *Cryptobia salmositica*. *Parasitology* 1997;114:375–82.
- [47] McKerrow JH, Caffey C, Kelley B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006;1:497–536.
- [48] Martone CB, Spivak E, Busconi L, Folco EJE, Sánchez JJ. A cysteine protease from myxosporean degrades host myofibrils *in vitro*. *Comp Biochem Physiol* 1999;123B:267–72.
- [49] Dörfler C, El-Matbouli M. Isolation of a subtilisin-like serine protease gene (*MyxSubtSP*) from spores of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *Dis Aquat Organ* 2007;73:245–51.
- [50] Chang MX, Nie P, Liu GY, Song Y, Gao Q. Identification of immune genes in grass carp *Ctenopharyngodon idella* in response to infection of the parasitic copepod *Sinergasilus major*. *Parasitol Res* 2005;96:224–9.
- [51] Saeji JP, de Vries BJ, Wiegertjes GF. The immune response of carp to *Trypanoplasma borreli*: kinetics of immune gene expression and polyclonal lymphocyte activation. *Dev Comp Immunol* 2003;27:859–74.
- [52] Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ, et al. Cytokines and innate immunity of fish. *Dev Comp Immunol* 2001;25:713–23.
- [53] Pelegrin P, Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J. Production and mechanism of secretion of interleukin-1 β from the marine fish gilthead seabream. *Dev Comp Immunol* 2004;28:229–37.
- [54] García-Castillo J, Pelegrin P, Mulero V, Meseguer J. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics* 2002;54:200–7.
- [55] Holland JW, Gould CRW, Jones CS, Noble LR, Secombes CJ. The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD). *Parasitology* 2003;126: S95–102.
- [56] Lindenstrøm T, Buchmann K, Secombes CJ. *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. *Fish Shellfish Immunol* 2003;15:107–15.
- [57] Lindenstrøm T, Sigh J, Dalgaard MB, Buchmann K. Skin expression of IL-1 β in East Atlantic salmon, *Salmo salar* L., highly susceptible to *Gyrodactylus salaris* infection is enhanced compared to a low susceptibility Baltic stock. *J Fish Dis* 2006;29:123–8.
- [58] Fast MD, Ross NW, Muise DM, Johnson SC. Differential gene expression in Atlantic salmon infected with *Lepeophtheirus salmonis*. *J Aquat Anim Health* 2006;18:116–27.
- [59] Bridle AR, Morrison RN, Nowak BF. The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during amoebic gill disease (AGD). *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:346–64.
- [60] Sigh J, Lindenstrøm T, Buchmann K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol* 2004;17:75–86.
- [61] Sigh J, Lindenstrøm T, Buchmann K. The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 2004;27:409–17.
- [62] González SF, Buchmann K, Nielsen ME. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: Inflammatory responses caused by the ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;22:641–50.
- [63] Ji HX, Sun HR, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 2003;71:4278–88.
- [64] Evering T, Weiss LM. The immunology of parasite infections in immunocompromised hosts. *Parasite Immunol* 2006;28:549–65.
- [65] James K. Interactions between cytokines and α -2-macroglobulin. *Immunol Today* 1990;11:163–6.
- [66] Ashare A, Powers LS, Butler NS, Doerschug KC, Monick MM, Hunninghake GW. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L633–40.
- [67] Standiford TJ. Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists. *Curr Pharm Design* 2000;6:633–49.
- [68] Rezaei SA, Dalir-Naghadeh B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Parasitol* 2006;142:179–86.
- [69] Kaul S, Taira CK, Pereira-Smith OM, Wadhwa R. Mortalin: present and prospective. *Exp Gerontol* 2002;37:1157–64.
- [70] Dong C-W, Zhang Y-B, Zhang Q-Y, Gui J-F. Differential expression of three *Paralichthys olivaceus* Hsp40 genes in responses to virus infection and heat shock. *Fish Shellfish Immunol* 2006; 21:146–58.
- [71] Deane EE, Li J, Woo NYS. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. *Dis Aquat Organ* 2004;62:205–15.
- [72] Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999;61:243–82.
- [73] Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Custer CD, Pereira-Smith OM, Reddel RR, et al. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2006;118: 2973–80.
- [74] Bermejo-Nogales A, Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Navarro JC, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) associated to redox homeostasis. *Aquaculture* 2007;267:213–24.
- [75] Otaka M, Masaru O, Watanabe S. Role of heat shock proteins (molecular chaperons) in intestinal mucosal protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:1–5.
- [76] Ballinger AB, Camacho-Hübner C, Croft NM. Growth failure and intestinal inflammation. *QJM-Int. J. Med.* 2001;94:121–5.
- [77] Flores-Morales A, Greenhalgh CJ, Norstedt G, Rico-Bautista E. Negative regulation of growth hormone receptor signalling. *Mol Endocrinol* 2006;20:241–53.
- [78] Yada T. Growth hormone and fish immune system. *Gen Comp Endocrinol* 2007;152:353–8.
- [79] Jiao BW, Huang XG, Chan CB, Zhang L, Wang DS, Cheng CHK. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *J Mol Endocrinol* 2006;36:23–40.
- [80] Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J. Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region. *J Endocrinol* 2007;194:361–72.



Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement Differential stress response of growth hormone receptors

Alfonso Saera-Vila^a, Josep Alvar Calduch-Giner^a, Patrick Prunet^b, Jaume Pérez-Sánchez^{a,*}

^a Nutrition and Fish Growth Endocrinology, Institute of Aquaculture Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

^b INRA-Physiology, Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2009
Received in revised form 1 June 2009
Accepted 2 June 2009
Available online 12 June 2009

Keywords:

Cortisol
Glucose regulated protein 75
Tumour necrosis factor- α
Cytochrome P450 1A1

ABSTRACT

The time courses of liver GH/IGF axis and selected stress markers were analyzed in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) sampled at zero time and at fixed intervals (1.5, 3, 6, 24, 72 and 120 h) after acute confinement (120 kg/m³). Fish remained unfed throughout the course of the confinement study, and the fasting-induced increases in plasma growth hormone (GH) levels were partially masked by the GH-stress inhibitory tone. Hepatic mRNA levels of growth hormone receptor-I (GHR-I) were not significantly altered by confinement, but a persistent 2-fold decrease in GHR-II transcripts was found at 24 and 120 h. A consistent decrease in circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) was also found through most of the experimental period, and the down-regulated expression of GHR-II was positively correlated with changes in hepatic IGF-I and IGF-II transcripts. This stress-specific response was concurrent with plasma increases in cortisol and glucose levels, reflecting the cortisol peak (60–70 ng/mL), the intensity and duration of the stressor when data found in the literature were compared. Adaptive responses against oxidative damage were also found, and a rapid enhanced expression was reported in the liver tissue for mitochondrial heat-shock proteins (glucose regulated protein 75). At the same time, the down-regulated expression of proinflammatory cytokines (tumour necrosis factor- α) and detoxifying enzymes (cytochrome P450 1A1) might dictate the hepatic depletion of potential sources of reactive oxygen species. These results provide suitable evidence for a functional partitioning of hepatic GHRs under states of reduced IGF production and changing cellular environment resulting from acute confinement.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last decade, growth hormone receptors (GHRs) have been cloned and sequenced in more than forty fish species covering almost all fish lineages (Calduch-Giner et al., 2001; Lee et al., 2001; Benedet et al., 2005). Initially, these receptors were clustered in two clades encompassing GHRs of salmonid (GHR-II) and non-salmonid fish (GHR-I), although this observation led to the suggestion that both receptors are retained in the same fish through teleost radiation and evolution. This hypothesis is supported by the coexistence of duplicated GHRs in rainbow trout and several Mediterranean perciform fish, such as gilthead sea bream, common dentex and European sea bass (Saera-Vila et al., 2005; Bermejo-Nogales et al., 2007). Likewise, Jiao et al. (2006) demonstrated the occurrence of two GHRs in black sea bream, Southern catfish and Nile tilapia. More recently, duplicated GHRs have been demonstrated in Mozambique tilapia (Pierce et al., 2007), orange-spotted grouper (Li et al., 2007) and Atlantic halibut (Hildahl et al., 2007; Hildahl et al., 2008), which

indicates that duplication and divergence of fish GHRs might have taken place in an early fish ancestor.

Nevertheless, receptor specificity remains unclear and GHR-I of masu salmon binds somatolactin (SL) and growth hormone (GH), but the binding affinity is higher for SL than GH and it was then named SL receptor by Fukada et al. (2005). The orthologous medaka gene might also mediate SL signalling (Fukamachi et al., 2005), but the switch and diversification of GH/SL receptors are highly probable among modern and primitive fish lineages. Thus, GHRs of Japanese eel bind specifically to GH (Ozaki et al., 2006), whereas the GHR might be a promiscuous receptor for GH and SL in the archaic sturgeon and lungfish (Fukamachi and Meyer, 2007). This promiscuity is not unusual in the Class I cytokine receptor superfamily, although each ligand/receptor interaction may result in unique signalling outcomes (Denley et al., 2005) that may differ among fish species. Indirect evidence for this also exists in gilthead sea bream, as transcriptional studies indicate that insulin-like growth factors (IGFs) in growth (liver, skeletal muscle) and immune (head kidney) relevant tissues are positively correlated with GHR-I rather than GHR-II in parasite-challenges (Sitjà-Bobadilla et al., 2008) and different growth models (Benedito-Palos et al., 2007; Saera-Vila et al., 2007). Thus, overall data

* Corresponding author. Tel.: +34 964319500; fax: +34 964319509.
E-mail address: jperez@iats.csic.es (J. Pérez-Sánchez).

suggest that GHR-I has evolved in perciform fish, and particularly in gilthead sea bream, as a true orthologous GHR.

Computational analyses also evidence a different promoter organization of GHRs in gilthead sea bream (Saera-Vila et al., 2007). It is noteworthy that surrounding the transcription start site of GHR-II, but not in GHR-I, there are several consensus elements for redox and stress regulatory elements (activating proteins, APs, 1 and 4, and cAMP-responsive elements, CRE), which would contribute to delineate a differential and stress-specific regulation of fish GHRs. Confinement exposure is a common stressor in aquaculture practise that impacts negatively on the immune system, reproduction and growth performance (Pickering 1993; Van Weerd and Komen, 1998). Thus, this experimental condition was chosen to analyze in juvenile fish the functional partitioning of hepatic GHRs after acute stress confinement. The study includes data on GHR transcripts, hepatic IGF production and plasma levels of GH. Circulating levels of cortisol and glucose were measured as conventional stress markers to assess the reliability of stress response triggered under our experimental conditions. Since mitochondrial heat-shock proteins (glucose regulated protein 75, GRP75), proinflammatory cytokines (tumour necrosis factor- α , TNF- α) and detoxifying enzymes (cytochrome P450 1A1, CYP1A1) are also stress-sensitive markers in sparid fish (Bermejo-Nogales et al., 2007; 2008), these genes were chosen to assess how protein misfolding and potential sources of reactive oxygen species (ROS) were regulated in concert with the liver GH/IGF axis.

2. Materials and methods

2.1. Fish rearing and sampling

Juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) of 110–130 g final body weight were reared from July to December in a seawater re-circulatory system (500-L tanks) equipped with physical/biological filters, and a heat-unit system that maintained water temperature above 18–19 °C. Voluntary feed intake was near to maintenance ration at the time of the experiment (December), and it was stopped one day before confinement exposure to avoid result disturbances due to differences in feed intake between control (undisturbed fish) and stressed fish. Batches of 10 fish were transferred from 500-L tanks (9–10 kg/m³) to cylinder net baskets of 10-L volume (117–123 Kg/m³), each one suspended in 90-L tanks with a seawater flow of 10-L/min to avoid water deterioration (oxygen >5 ppm; unionised ammonia <0.02 mg/L). These fish served as zero time and stressed fish at specific sampling times (1.5, 3, 6, 24, 72 and 120 h) after confinement exposure. Additional 500-L tanks (one per each sampling time) were used as control fish donors. No mortality was registered in control and stressed fish over the course of the confinement period.

At each sampling time, eight fish from control and confinement tanks were netted into a bucket containing 0.1 g/L of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222; Sigma, Saint Louis, MO, USA). Blood was taken from caudal vessels (in less than 2 min for all fish), centrifuged at 3000 \times g for 20 min at 4 °C, and plasma samples were frozen and stored at –30 °C until hormone and metabolite analyses were performed. Prior to tissue collection, fish were killed by cervical section and the liver was extracted, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C awaiting RNA isolation. All procedures were carried out according to national (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Institute of Aquaculture Torre de la Sal Review Board) and the current EU legislation on the handling of experimental animals.

2.2. Hormone and metabolite assays

Plasma cortisol levels were assayed using an enzyme immunoassay kit (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) based on the competition between unlabelled cortisol and cortisol–horseradish

peroxidase for a fixed number of antibody-binding sites. Tetramethylbenzidine was used as a chromogen solution with sensitivity (90% of binding) of 1 ng/mL. Plasma glucose levels were measured by the glucose oxidase method (Thermo Electron, Louisville, CO, USA).

Plasma GH levels were determined by a homologous gilthead sea bream radioimmunoassay (RIA) as reported elsewhere (Martínez-Barberá et al., 1995). The sensitivity and midrange (ED₅₀) of the assay were 0.15 and 1.8 ng/mL, respectively. Plasma IGFs were extracted by acid-ethanol cryoprecipitation (Shimizu et al., 2000), and the concentration of IGF-I was measured by means of a generic fish IGF-I RIA validated for Mediterranean perciform fish (Vega-Rubín de Celis et al., 2004). The assay is based on the use of red sea bream (*Pagrus major*) IGF-I (GroPep, Adelaide, Australia) as tracer and standard, and anti-barramundi (*Lates calcarifer*) IGF-I serum (GroPep) (1:8000) as a first antibody. The sensitivity and midrange of the assay were 0.05 and 0.7–0.8 ng/mL, respectively.

2.3. RNA extraction and RT procedure

Total RNA extraction from target tissues was performed with the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, tissue samples were homogenized at a ratio of 25 mg/mL with a guanidine-detergent lysis reagent. The reaction mixture was treated with proteinase K, and RNA purification was achieved by passing the tissue lysate (0.4–0.5 mL) through a purification tray containing an application-specific membrane. Wash solutions containing DNase were applied, and total RNA was eluted into a 96-well PCR plate. The RNA yield was 30–50 μ g with absorbance measures ($A_{260/280}$) of 1.9–2.1. Reverse transcription (RT) with random decamers was performed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For this purpose, 500 ng total RNA was reverse transcribed into a final volume of 100 μ L. RT reactions were incubated for 10 min at 25 °C and 2 h at 37 °C. Negative control reactions were run without reverse transcriptase.

2.4. Real-time PCR

Measurements of hepatic transcripts (GRP75, TNF- α , CYP1A1, GHR-I, GHR-II, IGF-I and IGF-II) were taken using an iCycler IQ Real-time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described elsewhere (Bermejo-Nogales et al., 2007). Briefly, diluted RT reactions were used for PCR reactions in 25- μ L volume. Each PCR-well contained a SYBR Green Master Mix (Bio-Rad), and specific primers at a final concentration of 0.3–0.9 μ M were used to obtain amplicons of 75–169 bp in length (Table 1).

β -actin was used as the housekeeping gene, and the efficiency of PCR reactions for the target and the reference gene varied between 87% and 99%, respectively. The dynamic range of standard curves (serial dilutions of RT-PCR reactions) spanned five orders of magnitude, and the amount of product in a particular sample was determined by interpolation of the cycle threshold (Ct) value. The specificity of reaction was verified by analysis of melting curves and by electrophoresis and sequencing of PCR amplified products. Reactions were performed in triplicate and the fluorescence data acquired during the extension phase were normalized to β -actin by the delta-delta method (Livak and Schmittgen, 2001). No changes in β -actin expression were found in response to confinement exposure.

2.5. Statistical analysis

The time course of circulating levels of hormones and metabolites was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls. At each sampling time, stress-specific changes in circulating parameters and hepatic transcripts were analyzed by Student *t*-test. Pearson Product Moment correlations was used for correlation analyses of circulating GH and IGF-I, and

Table 1
Gilthead sea bream primer sequences used for real-time PCR.

Gene	Accession number	Primer sequence	Position
GRP-75	DQ524993	F TCC GGT GTG GAT CTG ACC AAA GAC	358–381
		R TGT TTA GGC CCA GAA GCA TCC ATG	500–477
TNF- α	AJ413189	F CAG GCG TCG TTC AGA GTC TC	587–606
		R CTG TGG CTG AGA GGT GTG TG	663–644
CYP1A1	AF011223	F GCA TCA ACG ACC GCT TCA ACG C	903–924
		R CCT ACA ACC TTC TCA TCC GAC ATC TGG	1071–1045
GHR-I	AF438176	F ACC TGT CAG CCA CCA CAT GA	1275–1294
		R TCG TGC AGA TCT GGG TCG TA	1373–1354
GHR-II	AY573601	F GAG TGA ACC CGC CGT GAC AG	1690–1709
		R GCG GTG GTA TCT GAT TCA TGG T	1764–1743
IGF-I	AY996779	F TGT CTA GCG CTC TTT CCT TTC A	112–133
		R AGA GGG TGT GGC TAC AGG AGA TAC	195–172
IGF-II	AY996778	F TGG GAT CGT AGA GGA GTG TTG T	406–427
		R CTG TAG AGA GGT GGC CGA CA	514–495
β -actin	X89920	F TCC TGC GGA ATC CAT GAG A	811–829
		R GAC GTC GCA CTT CAT GAT GCT	861–841

hepatic transcripts of IGFs and GHRs. SPSS for Windows Version 14.0.1 (SPSS Inc) was used as statistical software.

3. Results

3.1. Circulating and hepatic stress markers

Plasma cortisol titres (<3 ng/mL) in control fish did not change significantly over the course of the study (Fig. 1A). In stressed fish, plasma cortisol levels peaked up to 60–70 ng/mL after 1.5 h of confinement exposure with a recovery of control values at the 6 h sampling time. After 24 h of confinement exposure, plasma cortisol levels peaked again, with a recovery of control values at the last sampling time (120 h).

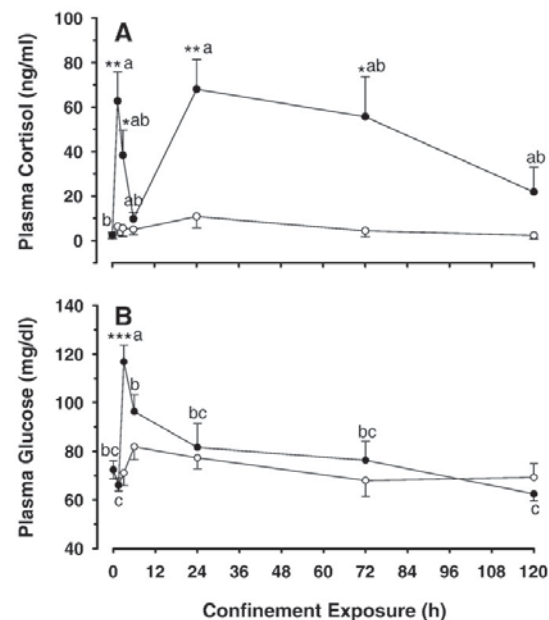


Fig. 1. Time course of plasma levels of cortisol (A) and glucose (B) in control (O) and stressed (●) fish. Data are the mean \pm SEM ($n=6-8$). Different letters indicate statistically significant changes over the course of the experiment in stressed fish (ANOVA, $P<0.05$). Statistically significant differences between stressed and control fish were analyzed at each sampling time by means of Student t -test (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

Plasma glucose levels in control fish did not vary over the course of the confinement study (Fig. 1B). In stressed fish, the plasma glucose concentration was 2-fold increased at the 3 h sampling time, with a progressive recovery of control values during the subsequent 6–120 h sampling times (Fig. 1B).

Hepatic transcripts of GRP75 were significantly up-regulated (2- or 3-fold increase) over the course of the 6–72 h sampling period, with a recovery of control values at the last sampling time (120 h) (Fig. 2A). After 6 h of confinement exposure, TNF- α (Fig. 2B) and CYP1A1 (Fig. 2C) transcripts were not significantly altered, but a 2- or 5-fold decrease was found during the subsequent 24–120 h sampling times.

3.2. Liver GH/IGF axis

All fish over the course of the confinement period remained unfed, and GH levels in control fish increased significantly with time (Fig. 3A). This fasting-induced GH rise was partially masked by confinement exposure, and plasma GH levels in stressed fish were 2-

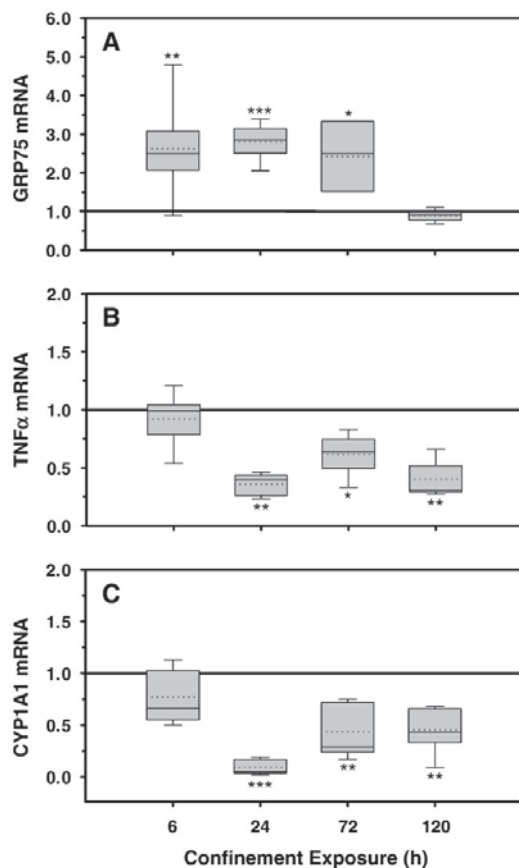


Fig. 2. Box-whisker plots representing the time course of the relative gene expression of GRP75 (A), TNF- α (B) and CYP1A1 (C) in stressed fish. Data in control fish were used as arbitrary reference values at each sampling time in the normalization procedure (values >1 or <1 indicate increase or decrease with respect to reference values). The lower boundary of the box indicates the 25th percentile and the upper boundary of the box indicates the 75th percentile. Whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Continuous line inside the box is the median; non-continuous line inside the box is the mean. Statistically significant differences with respect to the control group were analyzed by means of Student t -test (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

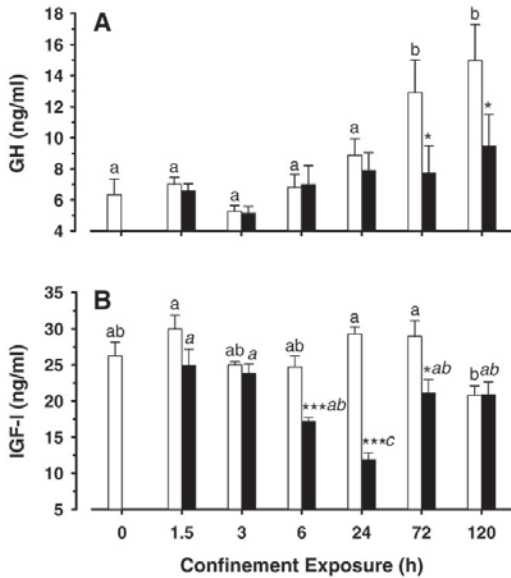


Fig. 3. Time course of plasma levels of GH (A) and IGF-I (B) of control (white) and stressed (black) gilthead sea bream. Data are the mean \pm SEM ($n=6-8$). Different letters indicate statistically significant changes over the course of the experiment in control (regular font) and stressed fish (italic font, ANOVA, $P<0.05$). Statistically significant differences between stressed and control fish were analyzed at each sampling time by means of Student *t*-test (* $P<0.05$, *** $P<0.001$).

fold lower than in control fish at the 72 and 120 h sampling times. Circulating IGF-I concentration was also lowered by confinement exposure, and stressed fish showed a significant reduction in plasma levels of IGF-I over the course of the 6–72 h period (Fig. 3B), although there was no significant correlation with GH levels. The maximum decrease (3-fold) was found at the 24 h sampling time, with a recovery of control values at the last sampling (120 h).

After 6 h of confinement exposure, hepatic IGF-I (Fig. 4A) and IGF-II (Fig. 4B) expression was not altered by confinement exposure, but a 2-fold decrease in both IGF transcripts was evidenced at the 24 h sampling time. Later on, the trend was towards recovery of the control values, but a significant reduction was still found at the 120 h sampling time. Regarding the hepatic expression of GHRs, we failed to demonstrate any significant change in the expression of GHR-I (Fig. 5A). In contrast, a 2-fold reduction in GHR-II transcripts was found over the course of the 24–120 h sampling times (Fig. 5B). This stress-specific response was positively correlated with changes in transcripts encoding for IGF-I ($r=0.605$, $P<0.01$) and IGF-II ($r=0.514$, $P<0.05$).

4. Discussion

Gilthead sea bream is an important aquaculture species in the Mediterranean region, and the stress response of cortisol, glucocorticoid receptors and energy metabolites has been examined in fish subjected to different stressors (Tort et al., 1996; Arends et al., 1999; Acerete et al., 2008). There is also now experimental evidence for an inhibitory effect of handling and crowding stress upon circulating GH levels (Rotllant et al., 2000, 2001), but the effects of acute and chronic stressors on hepatic IGF production and expression of duplicated fish GHRs have not been evaluated simultaneously. This study is, therefore, the first report in non-salmonid fish considering the time course of selected stress markers and key components of the liver GH/IGF axis in a changing cellular environment resulting from acute confinement.

Cortisol and glucose are currently used as primary/secondary stress biomarkers in a wide variety of fish species (Barton and Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). In the present study, cortisol titres in control fish enter into the ideal fish levels (>5 ng/mL) (Pickering and Pottinger, 1989), and the stress-associated increases in plasma cortisol and glucose levels followed the expected response in this fish species (Ortuno et al., 2001; Sangiao-Alvarellos et al., 2005). Moreover, the cortisol peak (60–70 ng/mL) did not deviate from the gilthead sea bream literature data when plasma titres were related to stocking density: (i) 15–20 ng/mL at 26–30 kg/m³ (Rotllant et al., 2000; Barton et al., 2005), (ii) 30 ng/mL at 70 kg/m³ (Sangiao-Alvarellos et al., 2005) and (iii) 178 ng/mL at 200 kg/m³ (Rotllant et al., 2001). This finding supports a close relationship between cortisol response and the intensity/duration of confinement, although we found a bimodal cortisol rise as reported elsewhere by Arends et al. (1999). These authors considered that the first cortisol peak is due to a rapid activation of the hypothalamic–pituitary–interrenal axis (HPI) leading to exhaustion and/or negative feedback regulation of this axis. The second cortisol peak might be ACTH-independent and, in our case, it was associated to a wide variety of tissue repair and remodelling processes that were mostly mediated by the stress response of the endoplasmic reticulum (Calduch-Giner et al., 2008).

The transition from normal to stressful conditions is also accompanied by a robust up-regulation of heat-shock proteins (Hsp), which damps the cytotoxicity caused by misfolded and denaturated proteins (Anckar and Sistonen, 2007). These proteins thus have housekeeping functions, which makes the mitochondrial GRP75 and its yeast homologue (SSC1p) life-essential (Craig et al., 1989; Kaul et al., 2007). Few studies have examined the role of GRP75 in fish, but it is now recognized that hepatic GRP75 is up-regulated in

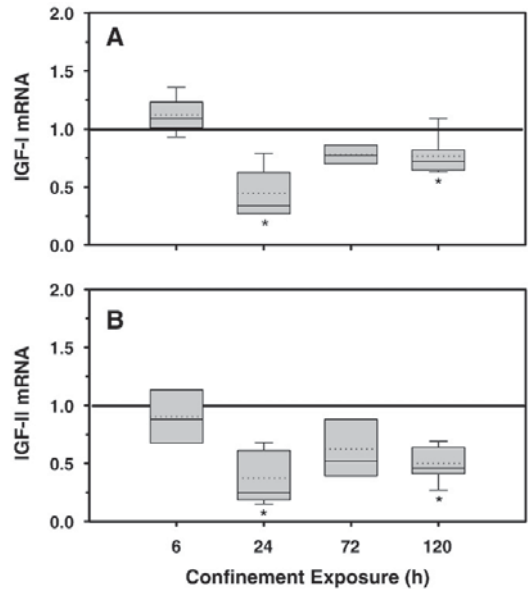


Fig. 4. Box-whisker plots representing the time course of the relative gene expression of IGF-I (A), and IGF-II (B) in stressed fish. Data in control fish were used as arbitrary reference values at each sampling time in the normalization procedure (values >1 or <1 indicate increase or decrease with respect to reference values). The lower boundary of the box indicates the 25th percentile and the upper boundary of the box indicates the 75th percentile. Whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Continuous line inside the box is the median; non-continuous line inside the box is the mean. Statistically significant differences with respect to the control group were analyzed by means of Student *t*-test (* $P<0.05$).

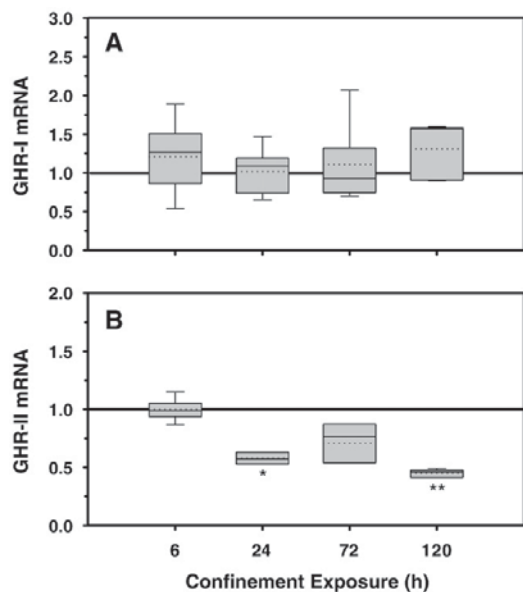


Fig. 5. Box-whisker plots representing the time course of the relative gene expression of GHR-I (A), and GHR-II (B) in stressed fish. Data in control fish were used as arbitrary reference values at each sampling time in the normalization procedure (values >1 or <1 indicate increase or decrease with respect to reference values). The lower boundary of the box indicates the 25th percentile and the upper boundary of the box indicates the 75th percentile. Whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Continuous line inside the box is the median; non-continuous line inside the box is the mean. Statistically significant differences with respect to the control group were analyzed by means of Student *t*-test (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

zebrafish toxicogenomic models (Lam et al., 2006). The up-regulated expression of hepatic GRP75 has also been demonstrated in a previous gilthead sea bream study with fish exposed for short (24 h) and long (3 weeks/pair fed study) periods of time to high (120 kg/m³) and mild (50 kg/m³) loading densities, respectively (Bermejo-Nogales et al., 2008). This enhanced expression protects mitochondria against oxidative damage, and not surprisingly the hepatic GRP75 showed in the present study a rapid and robust up-regulation, which stopped after 5 days of acute confinement exposure. This loss of responsiveness can be understood as the reestablishment of a new redox homeostasis that was encompassed by a down-regulated expression of hepatic TNF- α and CYP1A1 genes. The former is a proinflammatory cytokine that increases leukocyte and mitochondrial ROS production (Yang et al., 2007), and the experimental data support a reduced or enhanced expression of TNF- α and TNF decoy receptors in stressed rats and fish, respectively (Connor et al., 2005; Momoda et al., 2007). Likewise, hepatic CYP1A1 is a major hepatic metabolizing enzyme that transforms endogenous substrates, procarcinogens and pollutants into less- or non-toxic metabolites (van der Oost et al., 2003). These processes are, however, potential sources of ROS, and CYP1A1 expression is generally repressed by oxidative stress (Barouki and Morel, 2001).

The modulation of ROS production and antioxidant defences by the endocrine system is also a well-documented phenomenon (Haddad et al., 2002). Thus, in long-lived dwarf mice, the reduced signalling of GH and IGF-I contributes to maintain an appropriate cellular redox state (Holzenberger et al., 2003; Bartke and Brown-Borg, 2004). Conversely, animals over expressing GH combat oxidative stress less efficiently than normal and dwarf mice (Brown-Borg et al., 1999; Brown-Borg and Rakoczy, 2000). In this way, the stress-induced

reduction in plasma GH levels is not surprising. This stress response after confinement exposure has been reported in a wide variety of fish species, including gilthead sea bream (Rotllant et al., 2000; 2001), tilapia (Auperin et al., 1997), rainbow trout (Pickering et al., 1991) and Atlantic salmon (Wilkinson et al., 2006). However, the link between somatotrophic and HPI axes is not clear, since the *in vivo* cortisol and GH negative correlation disagrees with the *in vitro* GH stimulatory action of cortisol (Nishioka et al., 1985; Wendelaar Bonga, 1997; Yada et al., 2005). This apparent inconsistency is also found in mammals, and short-term glucocorticoid treatments stimulate GH secretion whereas long-term treatments exert an inhibitory action (Casanueva et al., 1990; Giustina and Wehrenberg, 1992; Miell et al., 1991). The present study was conducted under a regimen of natural photoperiod, and the shortened light-dark cycle at the time of the study produced the known winter decreases in cortisol and GH titres (Mingarro et al., 2002). This scenario of seasonal hyposomatotropism and hypocortisolism makes difficult any additional enhancement of the inhibitory GH-tonus, but the achieved results indicate that confinement exposure partially blunted the fasting-induced increase in plasma GH levels. This elevated plasma GH levels during fasting and malnutrition presumably reflects the insensitivity of liver to GH action, and thereby a reduced negative feedback effect of IGF-I on pituitary GH release (Pérez-Sánchez et al., 1992, 1995). Indeed, more recent studies in gilthead sea bream (Saera-Vila et al., 2005) and hybrid striped bass (Picha et al., 2008) indicate that this fasting state of GH resistance is mediated at long-term by a down-regulated expression of GHR-I and II.

Time series analyses of IGFs evidenced a lag-time among changes in hepatic IGF transcripts and circulating levels of protein. However, the hepatic tissue is the primary source of circulating IGF-I and its depletion by stress and nutritional disorders reflects, in this and previous gilthead sea bream studies (Gómez-Requeni et al., 2004; Benedito-Palos et al., 2007), the down-regulated expression of hepatic IGF-I. In rainbow trout and Atlantic salmon, handling and confinement also reduce circulating levels of IGF-II (Wilkinson et al., 2006). Thus far, there is no information in gilthead sea bream on the effects of aquaculture stressors on circulating levels of IGF-II. Nevertheless, the results presented here evidenced a robust down-regulation of hepatic IGF-II, which might reflect reduced circulating levels of IGF-II. Experimental evidence in catfish (Small et al., 2006), tilapia (Kajimura et al., 2003) and sunshine bass (Davis and Peterson, 2006) also indicate that confinement and cortisol treatment reduce IGF activity and sensitivity to GH. Therefore, the mechanisms by which stressful conditions inhibit growth are apparently conserved throughout evolution, but more complete information on the sequence of events that adjusts growth to each particular condition requires species-specific studies. Thus, in gilthead sea bream, the reduced hepatic IGF-I production can be compensated at the local tissue level (skeletal muscle) by the enhanced expression of IGF-II (Benedito-Palos et al., 2007; Saera-Vila et al., 2007). In support of this, growth differences between families of channel catfish have been related to differences in muscle IGF-II expression (Peterson et al., 2004).

In gilthead sea bream, local compensatory mechanisms of growth can also be mediated by GHRs, and the muscle expression of GHR-II is increased by the large dietary replacement of fish oil with vegetable oils regardless of that found for IGFs (Benedito-Palos et al., 2007). Both in gilthead sea bream (Saera-Vila et al., 2005) and hybrid striped bass (Picha et al., 2008), the muscle expression of GHR-II is also up-regulated by fasting, which may serve to repair and preserve tissue functions as reported for rat GHRs in atrophied muscle fibers (Casse et al., 2003). In the same way, we found in the present study that hepatic transcripts of GHR-II were down-regulated after acute confinement exposure, whereas no significant changes were reported for GHR-I. Since glucocorticoids inhibit the expression of GHRs in mammals (Beauloye et al., 1999; Gabrielson et al., 1995) and GHR-I exhibit a higher affinity for SL in salmonids (Fukada et al., 2005), it may be argued that GHR-II is the true orthologous of mammalian GHR

whereas GHR-I might be mostly evolved as a SL receptor. However, SL has no growth-promoting action in gilthead sea bream (Pérez-Sánchez et al., 2002; Vega-Rubín de Celis et al., 2003), and nice positive correlations between GHR-I and IGF transcripts have been reported in different experimental models of this marine fish (Benedito-Palos et al., 2007; Saera-Vila et al., 2007; Sitjà-Bobadilla et al., 2008). Moreover, GHRs of Japanese eel bind specifically to GH (Ozaki et al., 2006) and Jiao et al. (2006) did not find in black sea bream any response to SL in GHR transfected cells. If so, there is no easy pattern of transcription and function of GHRs in non-salmonid fish, although it is reasonable to imagine that GHR-II has a dual function preserving cell survival and limiting at the same time growth and hepatic IGF production under life-stress conditions.

Prior to the present study, there is no time course study addressing the differential stress regulation of GHRs in fish, although several lines of evidence support a complex cross talk between glucocorticoids and fish GHRs. Thus, cortisol injection in black sea bream enhances the expression of hepatic GHR-I without significant effects on GHR-II (Jiao et al., 2006). Pierce et al. (2005) reported an increased expression of GHR-II in primary cultures of salmon hepatocytes exposed to dexamethasone, and Small et al. (2006) demonstrated a reduced expression of GHR-II in catfish fed with cortisol for 4 weeks. More recently, Uchida et al. (2009) reported that handling and confinement exposure enhanced in tilapia the hepatic expression of GHR-II. To date there is no easy explanation for these apparent contradictory findings, although it is suspected that the glucocorticoid response is a dynamic process having both stimulatory and inhibitory effects upon the somatotrophic axis, which may reflect physiological and pharmacological responses and/or differences between short- and long-term treatments as found in mammals (Vottero et al., 2003). In particular for gilthead sea bream, we found in the present study that the stress-specific response of GHR-II was encompassed by adaptive changes in ROS production and mitochondrial chaperones. Furthermore, a previous computational study (Saera-Vila et al., 2007) recognized a subset of stress-sequence elements (CRE and APs) surrounding the transcription start site of GHR-II. These sequence elements can activate and/or inhibit the expression of target genes depending on promoter organization and cellular redox context (Abate et al., 1991; Hai and Hartman, 2001; Glahder et al., 2003). Taking all these findings together, there is now increasing evidence for a functional partitioning of GHRs in gilthead sea bream, but some overlapping and redundancy may occur, and the possibility of GHR-I/GHR-II heterodimers cannot be excluded.

In summary, stress-mediated changes in primary and secondary stress markers (cortisol, glucose, GRP75, TNF- α , CYP1A1) evidenced a robust stress response with the establishment of a new cellular homeostasis in fish exposed to acute confinement. In this changing cellular environment, the time course of the liver GH/IGF axis revealed delayed stimulatory effects of fasting on plasma GH titres, a reduced hepatic IGF production and a differential expression of the two types of gilthead sea bream GHRs. This can represent an interesting field of research for the exploration of the different stress-susceptibilities of fish species and strains to aquaculture stressors.

Acknowledgments

This work was funded by EU (contract no. SSP98-CT-2004-513692; Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance markers assisted selection in fish and shellfish, AQUAFIRST) and Spanish (Ingenio-2010 Programme; Improvement of Aquaculture Production by the use of biotechnological tools, AQUA-GENOMICS) projects. AS-V was a recipient of a Spanish PhD fellowship from the Diputación Provincial de Castellón. The authors are grateful to M.A. González for the excellent technical assistance in molecular analysis.

References

- Abate, C., Luk, D., Curran, T., 1991. Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro – interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3624–3632.
- Acerete, L., Balasch, J.C., Castellana, B., Redruelo, B., Roher, N., Canario, A.V., Planas, J.V., MacKenzie, S., Tort, L., 2008. Cloning of glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) – differential expression of GR and immune relevant genes in gilthead seabream after an immune challenge. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 148, 32–43.
- Anckar, J., Sistonen, L., 2007. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 78–88.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Muñoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.* 163, 149–157.
- Auperin, B., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Fostier, A., Prunet, P., 1997. Effect of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 35–44.
- Barouki, R., Morel, Y., 2001. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* 61, 511–516.
- Bartke, A., Brown-Borg, H., 2004. Life extension in the dwarf mouse. *Curr. Top. Dev. Biol.* 63, 189–225.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.
- Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L., Tort, L., 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquac. Res.* 36, 172–179.
- Benedet, S., Johansson, V., Sweeney, G., Galay-Burgos, M., Björnsson, B., 2005. Cloning of two Atlantic salmon growth hormone receptor isoforms and *in vitro* ligand-binding response. *Fish Physiol. Biochem.* 31, 315–329.
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldud-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2007. Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267, 199–212.
- Bermejo-Nogales, A., Saera-Vila, A., Caldud-Giner, J.A., Navarro, J.C., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 2007. Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in relation to redox homeostasis. *Aquaculture* 267, 213–224.
- Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldud-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 2008. Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/mortalin/mHsp70/BPP74/HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 149, 428–438.
- Brown-Borg, H.M., Rakoczy, S.G., 2000. Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Exp. Gerontol.* 35, 199–212.
- Brown-Borg, H., Bode, A., Bartke, A., 1999. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone levels. *Endocrine* 11, 41–48.
- Caldud-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269–3273.
- Caldud-Giner, J.A., Saera-Vila, A., Cairns, M., Davey, G., Prunet, P., Pérez-Sánchez, J., 2008. Time series analyses of sea bream (*Sparus aurata* L.) stress response after confinement exposure. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, S41–S41.
- Casanueva, F.F., Burguera, B.A.R.T., Muruais, C.O.V.A., Dieguez, C.A.R.L., 1990. Acute administration of corticoids: a new and peculiar stimulus of growth hormone secretion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 234–237.
- Connor, T.J., Brewer, C., Kelly, J.P., Harkin, A., 2005. Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production. *J. Neuroimmunol.* 159, 119–128.
- Craig, E.A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kosc-Smithers, J., Nicolet, C.M., 1989. SSCI, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3000–3008.
- Davis, K.B., Peterson, B.C., 2006. The effect of temperature, stress, and cortisol on plasma IGF-I and IGF-BPs in sunshine bass. *Gen. Comp. Endocrinol.* 149, 219–225.
- Denley, A., Cosgrove, L.J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Forbes, B.E., 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 421–439.
- Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A.L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 2005. Identification of the salmon somatolactin receptor, a new member of the cytokine receptor family. *Endocrinology* 146, 2354–2361.
- Fukamachi, S., Meyer, A., 2007. Evolution of receptors for growth hormone and somatolactin in fish and land vertebrates: lessons from the lungfish and sturgeon orthologues. *J. Mol. Evol.* 65, 359–372.
- Fukamachi, S., Yada, T., Mitani, H., 2005. Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptors. *Genetics* 171, 1875–1883.
- Giustina, A., Wehrenberg, W.B., 1992. The role of glucocorticoids in the regulation of growth hormone secretion. Mechanisms and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 3, 306–311.
- Glahder, J.A., Hansen, C.N., Vinther, J., Madsen, B.S., Norrild, B., 2003. A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA. *J. Gen. Virol.* 84, 3429–3441.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Caldud-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493–510.

- Haddad, J.J., Saadé, N.E., Safieh-Garabedian, B., 2002. Cytokines and neuro-immuno-endocrine interactions: a role for the hypothalamic–pituitary–adrenal revolving axis. *J. Neuroimmunol.* 133, 1–19.
- Hai, T., Hartman, M.G., 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1–11.
- Hildahl, J., Sweeney, G., Galay-Burgos, M., Einarsson, I.E., Björnsson, B.T., 2007. Cloning of Atlantic halibut growth hormone receptor genes and quantitative gene expression during metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 143–152.
- Hildahl, J., Power, D., Björnsson, B.T., Einarsson, I.E., 2008. Involvement of growth hormone–insulin-like growth factor I system in cranial remodeling during halibut metamorphosis as indicated by tissue- and stage-specific receptor gene expression and the presence of growth hormone receptor protein. *Cell Tissue Res.* 320, 211–225.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Géloën, A., Even, P.C., Cervera, P., Le Bouc, Y., 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182–187.
- Jiao, B., Huang, X., Chan, C.B., Zhang, L., Wang, D., Cheng, C.H.K., 2006. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 23–40.
- Kajimura, S., Hirano, T., Visitacion, N., Moriyama, S., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol.* 178, 91–99.
- Kaul, S.C., Deocar, C.C., Wadhwa, R., 2007. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp. Gerontol.* 42, 263–274.
- Lam, S.H., Winata, C.L., Tong, Y., Korzh, S., Lim, W.S., Korzh, V., Spitsbergen, J., Mathavan, S., Miller, L.D., Liu, E.T., Gong, Z., 2006. Transcriptome kinetics of arsenic-induced adaptive response in zebrafish liver. *Physiol. Genomics* 27, 351–361.
- Lee, L.T.O., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L.Y., Cheng, C.H.K., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 270, 121–129.
- Li, Y., Liu, X., Zhang, Y., Zhu, P., Lin, H., 2007. Molecular cloning, characterization and distribution of two types of growth hormone receptor in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 111–122.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25, 402–408.
- Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Caldusch-Giner, J.A., Rodríguez, R.B., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., 1995. The use of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol. A* 110, 335–340.
- Miell, J.P., Corder, R., Pralong, F.P., Gaillard, R.C., 1991. Effects of dexamethasone on GHRH, arginine and dopaminergic stimulated GH stimulation and total plasma IGF-I levels in normal male volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 675–681.
- Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Martínez Valdivia, M., Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 102–111.
- Momoda, T.S., Schwindt, A.R., Feist, G.W., Gerwick, L., Bayne, C.J., Schreck, C.B., 2007. Gene expression in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during the stress response. *Comp. Biochem. Physiol. D* 2, 303–315.
- Nishioka, R.S., Grau, E.G., Bern, H.A., 1985. In vitro release of growth hormone from the pituitary gland of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 90–94.
- Ortuno, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2001. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 187–197.
- Ozaki, Y., Fukada, H., Kazeto, Y., Adachi, S., Hara, A., Yamauchi, K., 2006. Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 143, 422–431.
- Pérez-Sánchez, J., Caldusch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., Valdivia, M.M., 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 243–258.
- Pérez-Sánchez, J., Weil, C., Le Bail, P.-Y., 1992. Effects of human insulin-like growth factor-I on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *J. Exp. Zool.* 262, 287–290.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Kaushik, S.J., 1995. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546–552.
- Picha, M.E., Turano, M.J., Tipsmark, C.K., Borski, R.J., 2008. Regulation of endocrine and paracrine sources of IGFs and GH receptor during compensatory growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *J. Endocrinol.* 199, 81–94.
- Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture* 111, 51–63.
- Pickering, A., Pottinger, T., 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 253–258.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., Carragher, J.F., Le Bail, P.Y., 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 86–93.
- Pierce, A.L., Fukada, H., Dickhoff, W.W., 2005. Metabolic hormones modulate the effect of growth hormone (GH) on insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA level in primary culture of salmon hepatocytes. *J. Endocrinol.* 184, 341–349.
- Pierce, A.L., Fox, B.K., Davis, L.K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T., Grau, E.G., 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 154, 31–40.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Ruane, N.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2000. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus–pituitary–interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and α -melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 152–163.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 333–342.
- Saera-Vila, A., Caldusch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 193–203.
- Saera-Vila, A., Caldusch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2007. Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region. *J. Endocrinol.* 194, 361–372.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Láiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2005. Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Exp. Zool. A* 303, 761–775.
- Shimizu, M., Swanson, P., Fukada, H., Hara, A., Dickhoff, W.W., 2000. Comparison of extraction methods and assay validation for salmon insulin-like growth factor-I using commercially available components. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 26–36.
- Sitjà-Bobadilla, A., Caldusch-Giner, J., Saera-Vila, A., Palenzuela, O., Álvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2008. Chronic exposure to the parasite *Enteroomyxum leei* (Myxozoa: Myxosporae) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 610–619.
- Small, B.C., Murdock, C.A., Waldbieser, G.C., Peterson, B.C., 2006. Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31, 340–356.
- Tort, L., Sunyer, J.O., Gómez, E., Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 179–188.
- Uchida, K., Moriyama, S., Breves, J.P., Fox, B.K., Pierce, A.L., Borski, R.J., Hirano, T., Gordon Grau, E., 2009. cDNA cloning and isolation of somatolactin in Mozambique tilapia and effects of seawater acclimation, confinement stress, and fasting on its pituitary expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 162–170.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Van Weerd, J.H., Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120, 107–112.
- Vega-Rubín de Celis, S., Rojas, P., Gómez-Requeni, P., Albalat, A., Gutiérrez, J., Médale, F., Kaushik, S.J., Navarro, I., Pérez-Sánchez, J., 2003. Nutritional assessment of somatolactin function in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): concurrent changes in somatotropic axis and pancreatic hormones. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 533–542.
- Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Pérez-Sánchez, J., 2004. Production and characterization of recombinantly derived peptides and antibodies for accurate determinations of somatolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 266–277.
- Vottero, A., Kimchi, S., Kratzsch, J., Chrousos, G.P., Hochberg, Z., 2003. Transcriptional and translational regulation of the splicing isoforms of the growth hormone receptor by glucocorticoids. *Horm. Metab. Res.* 35, 7–12.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Revs.* 77, 591–625.
- Wilkinson, R.J., Porter, M., Woolcott, H., Longland, R., Carragher, J.F., 2006. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A* 145, 214–224.
- Yada, T., Muto, K., Azuma, T., Hyodo, S., Schreck, C.B., 2005. Cortisol stimulates growth hormone gene expression in rainbow trout leucocytes in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 248–255.
- Yang, D., Elner, S.G., Bian, Z.-M., Till, G.O., Petty, H.R., Elner, V.M., 2007. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Exp. Eye Res.* 85, 462–472.