

Estrès i resposta immuno-endocrina en peixos.

Caracterització del receptor glucocorticoide en l'orada (*Sparus aurata*) i el seu paper en la resposta inflamatòria.

Laura Acerete Rodríguez

Maig 2006

Estrès i resposta immuno-endocrina en peixos.

Caracterització del receptor glucocorticoide en l'orada (*Sparus aurata*) i el seu paper en la resposta inflamatòria.

Memòria de la tesi doctoral per optar al títol de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona, en el programa de doctorat d'Immunologia.

El present treball s'ha realitzat al Grup d'Immunofisiologia i Aqüicultura del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Lluís Tort i del Dr. Simon Mackenzie.

Bellaterra, maig 2006.

Laura Acerete Rodríguez

Dr. Lluís Tort Bardolet

Dr. Simon MacKenzie

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado”.

Albert Szent-Györgi (1893-1986)
Bioquímico húngar-nortamericano

ÍNDEX

INDEX

1. Abreviatures	7
2. Introducció	13
2.1. Espècies d'estudi	15
2.2. Resposta a l'estrès.....	18
2.3. Hormones corticoesteroides	22
2.3.1. Cortisol: funcions principals.....	23
2.3.2. Receptors d'hormones corticosteroides.....	25
2.3.2.1. Senyalització del GR	27
2.4. Resposta inflamatòria.	28
2.5. Comunicació neuro- immuno- endocrina	32
3. Objectius	37
3.1. Antecedents	39
3.2. Hipòtesis.....	39
3.3. Objectius.	40
4. CAPÍTOL I: Clonatge del receptor glucocorticoide (GR) en l'orada (<i>Sparus aurata</i>)	41
4.1. Introducció.....	43
4.2. Experiment 1. Caracterització del receptor glucocorticoide (GR) de cortisol en diferents teixits en l'orada (<i>Sparus aurata</i>). Clonatge del GR d'orada (primera part).	46
4.2.1. Materials i mètodes.....	46
4.2.1.1. Animals experimentals. Disseny de l'experiment.....	46
4.2.1.2. Obtenció de mostres.	46
4.2.1.3. Tècniques analítiques.	47
4.2.1.3. A) Extracció de RNA.....	47
4.2.1.3. B) Reacció de RT-PCR.	47
4.2.1.3. C) Seqüenciació.	48
4.2.1.3. D) Rastreig de la llibreria (<i>Screening</i>).	49
4.2.2. Resultats.....	51
4.2.3. Discussió.	55
4.3. Experiment 2: Clonatge del receptor glucocorticoide (GR) d'orada (<i>Sparus aurata</i>) (segona part).	57
4.3.1. Materials i mètodes.	57
4.3.1.1. Animals experimentals. Disseny de l'experiment.....	57
4.3.1.2. Obtenció de mostres.	58
4.3.1.3. Tècniques analítiques.	58
4.3.1.3.A) Extracció de RNA.....	58
4.3.1.3. B) Reaccions de RT-PCR.....	58

4.3.1.3. C) Seqüenciació.....	62
4.3.1.3. D) Northern blot anàlisi.....	63
4.3.2. Resultats.....	64
4.3.3. Discussió.....	68
5. CAPÍTOL II: Respostes funcionals del receptor glucocorticoide (GR) a l'orada (<i>Sparus aurata</i>). Implicació en la resposta inflamatòria.....	71
5.1. Introducció.....	73
5.1.1. Respostes dels gens immunes.....	73
5.1.2. Resposta hepàtica.....	75
5.2. Experiment 1: Expressió diferencial del receptor glucocorticoide i altres gens immunes a l'orada (<i>Sparus aurata</i>) després d'una infecció aguda amb LPS.....	77
5.2.1. Materials i mètodes.....	77
5.2.1.1 Animals experimentals.....	77
5.2.1.2. Disseny de l'experiment.....	77
5.2.1.2.1. apartat a) Efectes de la injecció de LPS en la resposta corticosteroidea de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	77
5.2.1.2.2. apartat b) Expressió del receptor glucocorticoide de cortisol sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	78
apartat c) Expressió de gens immunes sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	78
5.2.1.3. Obtenció de mostres.....	78
5.2.1.4. Tècniques analítiques.....	79
5.2.1.4.1. Radioimmunoanàlisi (apartat a).....	79
5.2.1.4.2. Extracció de RNA (apartats b i c).....	79
5.2.1.4.3. Reaccions de RT-PCR.....	79
Expressió del receptor glucocorticoide de cortisol (apartat b).....	79
Expressió d'altres gens immunes (apartat c).....	81
5.2.1.5. Anàlisi estadística.....	82
5.2.2. Resultats.....	83
5.2.2.1. Apartat a) Efectes de la injecció de LPS en la resposta corticosteroidea de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	83
5.2.2.2. Apartat b) Expressió del receptor de cortisol sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	83
5.2.2.3. Apartat c) Expressió de diferents gens immunes sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	85
5.2.3. Discussió.....	91
5.2.3.1. Apartat a) Efectes de la injecció de LPS en la resposta corticosteroidea de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	91

5.2.3.2. Apartat b) Expressió del receptor glucocorticoide de cortisol sota els efectes de la injecció de LPS en l'orada (<i>Sparus aurata</i>)	94
5.2.3.2. Apartat c) Expressió de gens immunes sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (<i>Sparus aurata</i>)	96
5.3. Experiment 2: Expressió diferencial del receptor glucocorticoide i altres gens immunes en un cultiu primari d'hepatòcits d'orada (<i>Sparus aurata</i>).....	99
5.3.1. Materials i mètodes	99
5.3.1.1. Animals experimentals.	99
5.3.1.2. Cultiu d'hepatòcits.....	100
5.3.1.3. Disseny experimental.....	101
5.3.1.4. Tècniques analítiques.....	101
5.3.1.4. A) Extracció de RNA.....	101
5.3.1.4. B) Reaccions de RT-PCR.....	102
5.3.1.5. Anàlisi estadística.....	103
5.3.2. Resultats.....	104
5.3.3. Discussió.....	107
6. CAPÍTOL III: Respostes fisiològiques en la perca europea (<i>Perca fluviatilis</i>, L) sotmesa a estrès per transport i manipulació	109
6.1. Introducció.....	111
6.2. Materials i mètodes.....	113
6.2.1. Animals experimentals. Disseny de l'experiment.....	113
6.2.2. Obtenció de mostres.....	114
6.2.3. Tècniques analítiques.....	114
6.2.4. Anàlisi estadística.....	115
6.3. Resultats.....	116
6.3.1. Efecte del transport	116
6.3.2. Efecte de la manipulació	118
6.4. Discussió	120
7. Discussió general i conclusions	123
8. Bibliografia.....	133
9. Annexos	151
10. Agraïments.....	165

1. ABREVIATURES

1. ABREVIATURES.

aa: aminoàcid

ACTH: Hormona adrenocorticotropa (*adrenocorticotropin hormone*)

acv: vena cardinal anterior (*anterior cardinal vein*)

α -MSH: Hormona estimuladora de melanòcits alfa (*alpha melanocyte stimulating hormone*)

ANOVA: Anàlisi de variança

β -Endorfina : beta endorfina

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BTM: maquinària basal de transcripció (*basal transcription machine*)

CAs: Catecolamines

CatD: Catepsina D

CBP: proteïna d'unió a CREB (*CREB-binding protein*)

ConA: Concanavalina A

cpm: centelleigs per minut

CREB: *cAMP response element binding factor*

CRH: Hormona alliberadora de corticotropines (*corticotropin releasing hormone*)

cv: vena caudal (*caudal vein*)

DBD: Domini d'unió al DNA (*DNA binding domain*)

dC: Conductes de Cuvier (*ducts of Cuvier*)

DMS: Diferència menys significativa

DNA: Àcid desoxiribonucleic

cDNA: DNA còpia

dNTP: desoxinucleòtid trifosfat

dTT: ditiotreitòl

Família S/T/R: Família de receptors d'esteroides-tiroides-retinoides (*steroid / thyroid / retinoid*)

FAO: Organització (de les Nacions Unides) per a l'agricultura i l'alimentació (*Food and Agriculture organisation, of the United Nations*)

GC: Glucocorticoides

GR: Receptor glucocorticoide (*glucocorticoid receptor*)

GRE: Elements de resposta als glucocorticoides (*glucocorticoids response elements*)

HAT: histones acetiltransferases (*histone acetyltransferases*)

Hb: hemoglobina

HBD: Domini d'unió a la hormona (*Hormone binding domain*)

Hc: hematòcrit

HDAC: histone deacetilases (*histone deacetylases*)

HK: ronyó anterior (*head kidney*)

HPA: Hipotalàmic-Pituitàrio-Adrenal

HPI: Hipotalàmic-Pituitàrio-Interrenal

HSD2: 11 β -hidroxiesteroid dehidrogenasa tipus II (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II*)

Hsp: proteïna de shock tèrmic (*Heat shock protein*)

IgM: Immunoglobulina M

IL1 β : interleuquina-1 beta

IL6: interleuquina-6

iNOS: sintasa d'òxid nítric induïble

i.p.: Intraperitoneal

IFN: interferó tipus I

IRF1: factor 1 regulador de IFN γ

k: ronyó (*kidney*)

kDa: kilodaltons

LBP: Proteïna d'unió al LPS (*LPS binding protein*)

Len: longitud (*length*)

LPS: Lipopolisacàrid de *Escherichia coli*

MCH: hemoglobina corpuscular mitjana

MCHC: concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana

MCV: Volum corpuscular mitjà

MR: Receptor mineralocorticoide (*mineralocorticoid receptor*)

mRNA: RNA missatger

NF κ B: Factor nuclear kappa B (*nuclear factor κ B*)

NK : cèl·lules citocides naturals (*natural killer*)

NLS: senyal de localització nuclear (*nuclear localization signal*)

nt: nucleòtid

pb: parells de bases

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

pcv: vena cardinal posterior (*posterior cardinal vein*)

pfu: unitats formadores de placa

pk: ronyó posterior (*posterior kidney*)

PMA: forbol miristat acetat (*phorbol myristate acetate*)

POMC: pro-opiomelanocortina

PPAR γ : receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (*peroxisome proliferator-activated gamma*)

RBC: eritròcits (*red blood cells*)

R.I.A.: Radioimmunoanàlisi

RNA: Àcid ribonucleic

RNA pol II: RNA polimerasa II

r.p.m: revolucions per minut

RT-PCR: retrotranscriptació acoplada a la reacció en cadena de la polimerasa

Seq: seqüència

SEM: Error estàndard de la mitjana (*standard error mean*)

SI: Sistema immune

SNC: Sistema nerviós central

STAT: transductors de senyal i activadors de la transcripció (*signal transducers and activators of transcription*)

TLR-4: Receptor 4 de tipus Toll (*Toll-Like receptor-4*)

TNF α : Factor de necrosi tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

TRH: Hormona alliberadora de tirotropines (*Thyrotropin-releasing hormone*)

tRNA: RNA de transferència

txn: transcripció

2. INTRODUCCIÓ

2. INTRODUCCIÓ.

L'**aqüicultura** inclou totes les activitats encaminades a la producció, desenvolupament i comercialització d'organismes aquàtics, en particular peixos, mol·luscs, crustacis i plantes, ja sigui en aigües dolces o salades. Actualment, és el sistema de producció alimentària de creixement més ràpid en tot el món i està molt consolidada en la nostra vida quotidiana.

Les raons principals que han afavorit l'augment de l'activitat aqüícola en els darrers anys són diverses: perquè han disminuït considerablement els recursos naturals per diverses causes (com l'increment de la pesca o la pol·lució), per l'augment de la població mundial o també perquè ha augmentat el consum de peix per càpita.

En l'aqüicultura, és essencial controlar periòdicament els diferents paràmetres de la qualitat de l'aigua com els nivells d'oxigen, el pH, l'amoni, la temperatura, la salinitat, la contaminació química natural (nitrits, nitrats) o la pol·lució exterior (metalls pesats, pesticides...). El control d'aquests paràmetres dificulta, però no evita, que els animals pateixin alteracions a nivell immune (Tort i col. 2003) o malalties causades per infeccions bacterianes. D'altra banda, l'activitat aqüícola, sobretot en condicions de cultiu intensiu, implica la intervenció humana per a millorar i augmentar la producció. En aquestes condicions de cultiu els peixos estan exposats contínuament a pràctiques de manteniment com la manipulació, el transport o el confinament. Aquestes actuacions suposen respostes estressants que poden disminuir la capacitat de l'animal per créixer o reproduir-se de manera eficient (Davis i col. 2002).

Tenint en compte tot això, és important entendre les respostes dels peixos als factors estressants relacionats amb l'aqüicultura per a poder avaluar el seu estat general de salut, detectar ràpidament les malalties i, en darrer terme, millorar la producció.

2.1. ESPÈCIES D'ESTUDI.

Les espècies de peixos més utilitzades en els estudis científics han estat majoritàriament salmònids (col·loquialment truites i salmons) i les seves respostes fisiològiques a diferents factors estressants es coneixen des de fa temps, per tant, les condicions de cultiu d'aquestes espècies estan bastant controlades.

L'aqüicultura marina a Espanya s'ha anat desenvolupant en els darrers 30 anys essent l'orada (*Sparus aurata*) i el llobarro (*Dicentrarchus labrax*) les espècies més cultivades. Concretament, la resposta bàsica de l'orada a diferents situacions estressants

importants en l'aqüicultura és prou coneguda (Rotllant i col. 2001) i, per això, hem escollit aquesta espècie per a desenvolupar la major part del nostre treball.

➤ L'orada (*Sparus aurata*) (figura 1) pertany a la família Esparidae, que és una de les famílies de peixos més ben representada al litoral català (uns 9 gèneres i unes 20 espècies) i també més ben conegudes perquè inclou espècies d'una gran importància pesquera. Aquesta família és d'importància rellevant a la pesca comercial, no només per la qualitat de la carn, sinó també per l'abundor i la diversitat de les espècies que inclou (de Sostoa i col. 1990).

És una de les espècies més importants en el litoral Mediterrani, també és freqüent a l'Adriàtic, i a l'Atlàntic des de les Illes Britàniques fins al Senegal (Cabo Verde), incloses les Illes Açores i les Illes Canàries.

Aquesta espècie hermafrodita proteràndrica té hàbits costaners i sedentaris i es mouen entre els 2-250 metres de profunditat. Són carnívors i consumeixen preferentment mol·luscs, crustacis i peixos però accessòriament també poden comportar-se com a herbívors.



Figura 1: Orada (*Sparus aurata*). Família Esparidae. Ordre Perciformes. Classe Actinopteri.

És una de l'espècies piscícoles més cultivades a Espanya, ja que la producció global actualment està en unes 90.000 Tones (Tm) l'any (segons la FAO, *Food and Agriculture Organisation*), de les quals aproximadament 13.000 Tm es comercialitzen a Espanya. L'engreix de l'orada es realitza principalment a instal·lacions flotants a mar obert, tot i que les fases de reproducció i preengreix es fan generalment a terra en instal·lacions intensives. Un dels problemes més importants, i encara no resolts, en condicions de cultiu intensiu que pateix aquesta espècie en particular, o si més no, el més conegut, és la malaltia de l'hivern (*winter syndrome*) provocada pel bacteri gramnegatiu *Pseudomonas anguilliseptica* juntament amb el descens de les temperatures durant l'època hivernal (Blanco i col. 2004; Tort i col. 1998a) ocasionant anualment grans pèrdues econòmiques.

➤ Altres espècies, com la perca europea (*Perca fluviatilis*) (figura 2), han rebut menys atenció tot i ser candidats potencials per a l'aqüicultura en diferents països europeus. Després del lluç, és el peix d'aigua freda més important al Mediterrani; gastronòmicament parlant és molt apreciada perquè la seva carn és excel·lent. Pertany a la família Percidae que comprèn 60 espècies, natives de l'hemisferi Nord. Està originàriament confinada a aigües temperades de l'hemisferi Nord, a Europa (molt freqüent a Suècia), al nord d'Àsia, Sibèria i Nord Amèrica (de Sostoa i col. 1990). Ha estat introduïda i es troba localment abundant a Austràlia, est i sud-est de Tasmània, Nova Zelanda i sud d'Àfrica.

Viu a tot tipus de llacs i rius d'aigües fredes, tranquil·les i lentes (10-22°C) i necessita un bon nivell d'oxigen. És un peix extremadament agressiu, s'alimenta d'invertebrats i plancton durant l'època juvenil i els adults són predadors de crustacis, cucs, mol·luscs, larves d'insectes i peixos més petits.

Va ser introduïda a Espanya recentment (cap al 1995) i la seva producció global anual està actualment en unes 200 Tm (segons la FAO). La seva aqüicultura està en fase molt inicial a les nostres piscifactories i encara presenta alguns problemes en diferents fases del seu desenvolupament en condicions artificials (FAO).



Figura 2: Perca europea (*Perca fluviatilis*). Família Percidae. Ordre Perciformes. Classe Actinopterigi.

2.2. RESPOSTA A L'ESTRÈS.

Els **peixos**, donades les condicions de l'ambient en el que viuen, estan sotmesos a molts factors estressants diferents, per tant, responen a l'estrès per diferents vies per tal de poder mantenir l'homeòstasi (Barton 2002; Mommsen i col. 1999; Wendelaar 1997; Wedemeyer i col. 1990).

Així, en primer lloc, les respostes fisiològiques dels peixos a factors ambientals estressants es poden classificar, segons els diferents nivells d'organització biològica, en diferents tipus (figura 3):

a) Respostes primàries: és la resposta a nivell neuroendocrí, que inclou l'alliberació de catecolamines (per part de les cèl·lules cromafins del ronyó anterior, majoritàriament) i l'alliberació de cortisol (per part de les cèl·lules interrenals del ronyó anterior). Després de la percepció de l'estrès, aquestes hormones se sintetitzen i s'alliberen al flux sanguini on activen les vies fisiològiques corresponents per tal de restablir l'equilibri intern.

b) Respostes secundàries: són alteracions a nivell sanguini i tissular, conseqüència de les respostes primàries. Per exemple, es donen canvis en els nivells de glucosa sanguínia (hiperglucèmia), comença la diuresi seguida de pèrdua d'electròlits sanguinis i existeix disfunció omoreguladora. Als teixits varien els nivells del glicogen hepàtic i la vitamina C interrenal, es dona hemorragia del timus o, fins i tot, s'hipertrofia el teixit interrenal.

c) Respostes terciàries: es refereixen a aspectes a nivell individual o de la població. Per exemple, es donen disminucions en el creixement, disminueix la resistència a determinades malalties, l'èxit reproductiu i la supervivència.

Aquesta classificació en realitat és més flexible, ja que tenint en compte la magnitud i la durada de l'estrès, la resposta es pot englobar en més d'un compartiment.

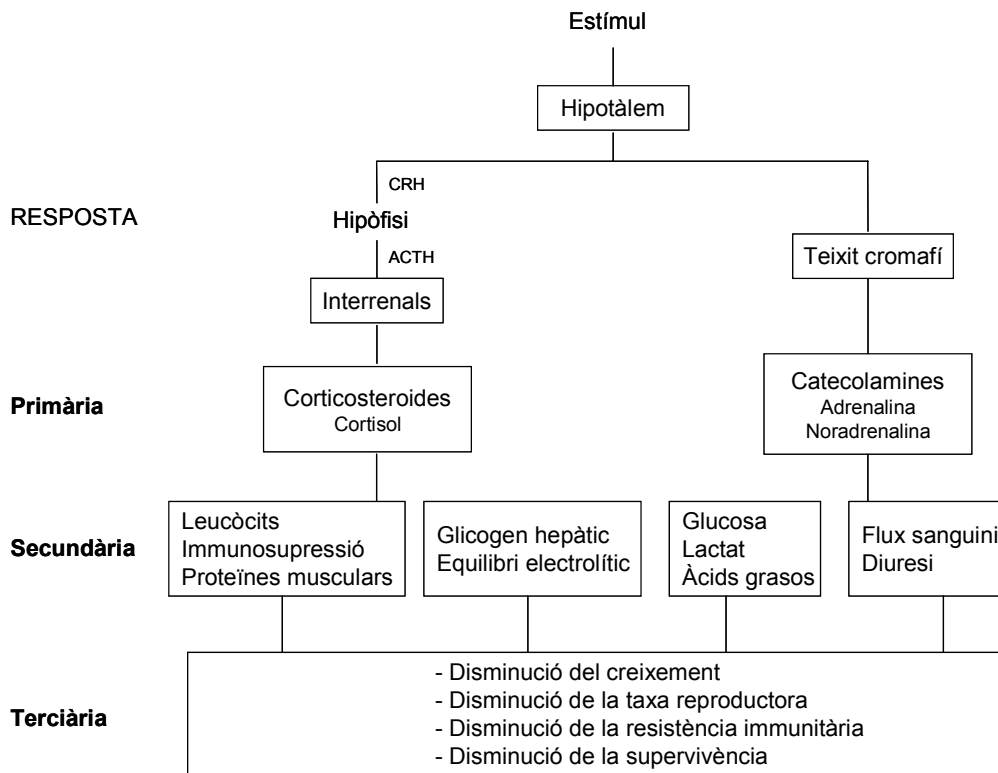


Figura 3: Fenòmens fisiològics ocasionats en resposta a un estímul estressant en els vertebrats des del punt de vista de nivells d'organització biològica: resposta primària, secundària o terciària (adaptat de Barton 2002 i de Tort i col. 1998b).

A nivell neuroendocrí, la resposta a l'estrès en peixos és similar a la resposta dels vertebrats superiors. Així, aquesta resposta en peixos també està integrada bàsicament al sistema nerviós, específicament en dos centres reguladors principals (figura 4) (Barton 2002; Wendelaar 1997):

- L'eix hipotalàmic-simpàtic-cromafí és equivalent al sistema simpàtic-adrenomedular en vertebrats superiors. Les cèl·lules cromafins produeixen principalment catecolamines (adrenalina i noradrenalina) com a resultat de l'activació de les fibres simpàtiques. Les catecolamines s'alliberen a la circulació en resposta a una situació d'estrès que requereixi transport elevat d'oxigen i mobilització de fonts extres d'energia. Per tant, poden actuar sobre la respiració, el sistema cardiovascular, el balanç hidromineral, la reproducció, la funció immune, la capacitat de transportar oxigen i la mobilització de substrats energètics (Wendelaar 1997).

▪ L'eix hipotalàmic-pituitàrio-interrenal (HPI) és equivalent a l'eix hipotalàmic-pituitàrio-adrenal, HPA, en vertebrats superiors (figura 4). Aquest circuit neuroendocrí s'activa davant d'una situació estressant de qualsevol tipus. L'estímul estressant desencadena una cascada hormonal que produeix, en primer lloc, hormona alliberadora de corticotropines (CRH) sintetitzada per l'hipotàlem. Aquesta hormona viatja fins la glàndula pituitària, també anomenada hipòfisi anterior, on les cèl·lules corticotropes sintetitzen i secreten hormona adrenocorticotropa (ACTH), producte derivat de la pro-opiomelanocortina (POMC). Finalment, l'ACTH estimula a les cèl·lules interrenals del ronyó anterior per a l'alliberació de cortisol (hidrocortisona) (apartat 2.3) com a hormona fisiològica majoritària encarregada d'activar la resposta secundària a l'estrès en peixos (Mommssen i col. 1999). El circuit es tanca amb el control, per retroalimentació negativa, que exerceix el cortisol plasmàtic sobre l'hipotàlem, per disminuir la formació de CRH, i sobre la glàndula pituitària, per disminuir la síntesi d'ACTH.

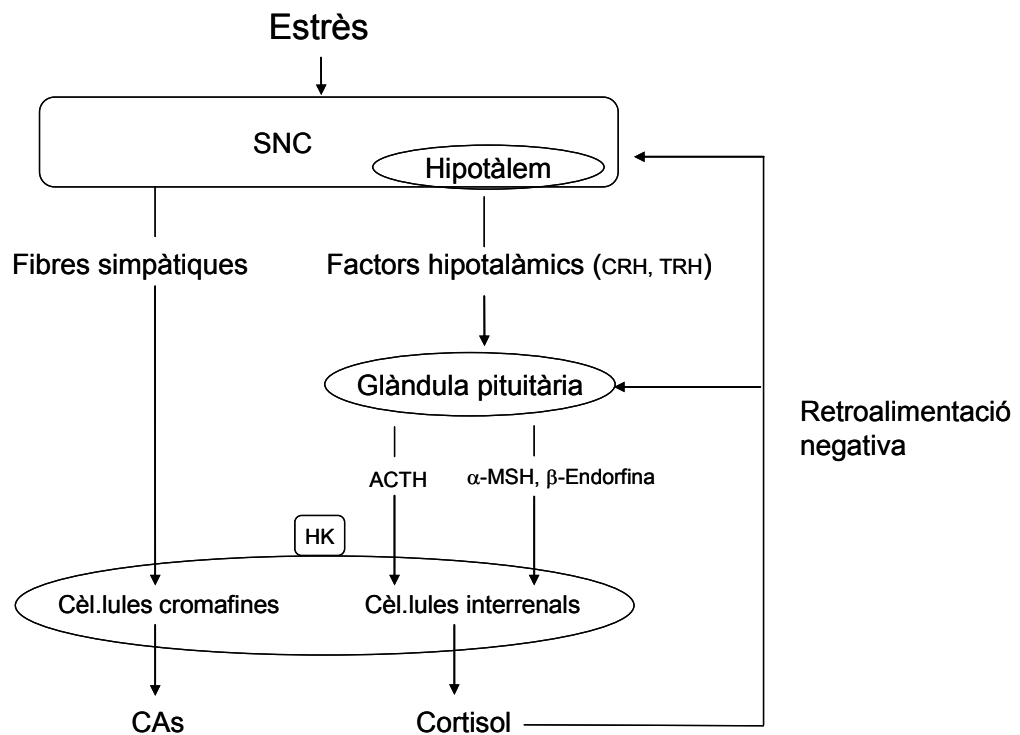


Figura 4: Representació esquemàtica dels principals elements neuroendocrins implicats en la resposta a l'estrès en peixos. Estan representats els dos eixos reguladors principals, l'eix hipotàmic-simpàtic-cromafí (productor de catecolamines, CAs, adrenalina majoritàriament) i l'eix hipotalàmic-pituitàrio-interrenal (HPI, productor de cortisol majoritàriament) (adaptat de Wendelaar 1997).

Malgrat que en els vertebrats els òrgans i les molècules implicades en la secreció de corticosteroides són essencialment els mateixos, podem trobar diferències a diferents nivells. Anatòmicament els peixos teleostis no posseeixen una glàndula adrenal aïllada, com en el cas dels mamífers (figura 5A) i les cèl·lules cromafins i les cèl·lules interrenals estan distribuïdes al ronyó, majoritàriament al ronyó anterior, també anomenat pronefros o ronyó cefàlic, donada la seva localització. Concretament el sistema renal en els Perciformes (ordre en el que s'inclouen les espècies del nostre estudi, l'orada i la perca) té forma de Y (figura 5B). Les cèl·lules cromafins estan distribuïdes al ronyó anterior, a les parets del conducte de Cuvier, a les parets dorsals de les venes cardinals anteriors i a les parets de les venes postcardinals, tot i que, també poden trobar-se agrupacions d'aquest tipus cel·lular a la part posterior del ronyó. Les cèl·lules interrenals o esteroidogèniques, en canvi, estan distribuïdes únicament al ronyó anterior, principalment dins de les parets de les venes cardinals posteriors i al voltant de la confluència entre els conductes de Cuvier i les venes cardinals, generalment en contacte amb les cèl·lules cromafins (Grassi Milano i col. 1997).

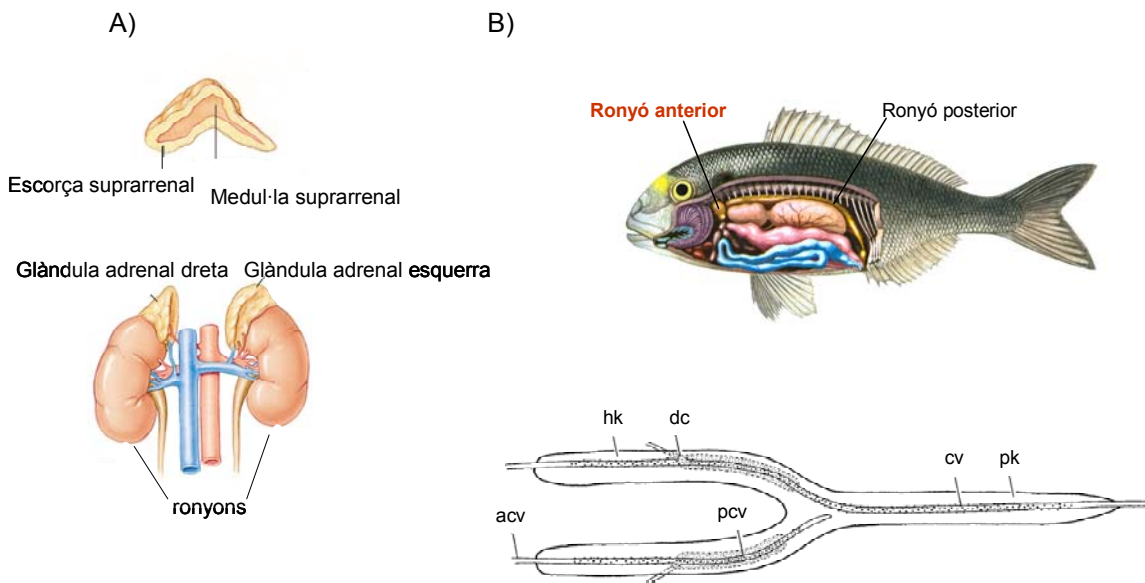


Figura 5: A) Dibuix esquemàtic del sistema renal dels mamífers. Estan representades les glàndules suprarenals en els pols superiors d'ambdós ronyons i les parts principals de la glàndula adrenal pròpiament dita: escorça suprarenal (productora d'hormones corticosteroides) i medul·la suprarenal (productora de catecolamines). B) Dibuix esquemàtic de la localització dels diferents òrgans dels peixos destacant el ronyó (anterior i posterior). Detall del ronyó anterior de l'ordre Perciformes. Estan representats els teixits adrenocortical i adrenomedular, i les principals venes renals. Les regions puntejades localitzades en el centre corresponen a les cèl·lules cromafins mentre les regions puntejades distribuïdes per tot el ronyó anterior són les cèl·lules esteroidogèniques. acv: vena cardinal anterior (*anterior cardinal vein*); dc: conductes de Cuvier (*ducts of Cuvier*); cv: vena caudal (*caudal vein*); hk: ronyó anterior (*head kidney*); k: ronyó (*kidney*); pcv: vena cardinal posterior (*posterior cardinal vein*); pk: ronyó posterior (*posterior kidney*) (Grassi Milano i col. 1997).

2.3. HORMONES CORTICOESTEROIDEES.

A més de les diferències anatòmiques esmentades prèviament entre mamífers i peixos (figura 5), també es troben diferències en relació a les hormones corticosteroidees que secreten.

En **mamífers**, l'escorça suprarrenal (o corticoadrenal) de la glàndula suprarrenal produeix diferents hormones corticals o corticosteroidees, sintetitzades a partir del colesterol (Guyton 2002, annex 1). Les principals hormones corticosteroidees en mamífers són:

- glucocorticoides: cortisol, corticosterona, cortisona, prednisona, metilprednisona i dexametasona. Participen, directa o indirectament, en diferents vies metabòliques (carbohidrats, proteïnes i lípids), en la reproducció, en el creixement, tenen efectes renals, gàstrics i vasculars, són immunosupressors i antiinflamatoris i regulen la resistència a l'estrès.
- mineralocorticoides: aldosterona, principalment. Regulen, principalment, el balanç mineral controlant la retenció de sodi al ronyó i la secreció de potassi.
- esteroides sexuals: andrògens, estrògens i progestàgens. Estan produïts en petites quantitats per l'escorça suprarrenal. Actuen sobre el desenvolupament, el creixement, el manteniment i la regulació del sistema reproductor.

En **peixos** teleostis, les principals hormones corticosteroidees són:

- glucocorticoides: el principal glucocorticoide és el **cortisol** (hidrocortisona) (Mommsen i col. 1999) (figura 6). Com hem vist anteriorment, la secreció de cortisol en peixos ve regulada per l'eix HPI (figura 4). Davant un estímul estressant l'eix HPI s'activa i desencadena una cascada hormonal produïnt en darrer terme cortisol com a hormona fisiològica encarregada d'activar la resposta a l'estrès. Per aquest motiu, és un dels indicadors més utilitzats com a mesura d'estrès (Tort i col. 2003; Barton 2002; Mommsen 1999).

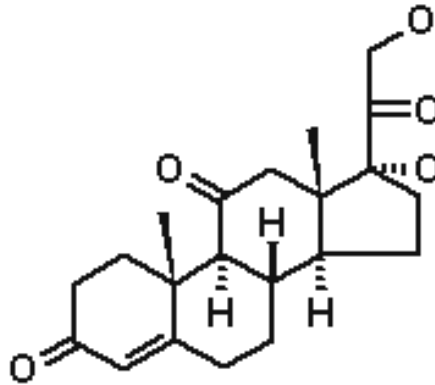


Figura 6: Molècula de cortisol.

- Mineralocorticoides: Actualment no hi ha evidències que els peixos sintetitzin aldosterona, mineralocorticoide predominant en mamífers; per tant, les funcions mineralocorticoidees també són assumides pel cortisol, participant en la regulació osmòtica i iònica (Mommssen i col. 1999; McDonald i Milligan 1997; Wendelaar Bonga 1997).
- Els esteroides sexuals: principalment andrògens i estrògens. Intervenien en les etapes inicials del desenvolupament de l'òcit, especialment a la vitelogènesi, en el desenvolupament gonadal i en la inducció de l'ovulació. En conjunt, són responsables del dimorfisme sexual i de l'estructura corporal dels òrgans reproductors.

2.3.1. Cortisol: funcions principals.

El cortisol és el principal corticosteroide en peixos teleostis amb múltiples funcions, majoritàriament glucocorticosteroidees. Se li atribueixen funcions reguladores participant en diferents compartiments fisiològics. Comparant-les amb els mamífers, destaquem les següents:

- a) Efectes sobre el metabolisme dels carbohidrats: En els mamífers, el cortisol estimula la gluconeogènesi a nivell hepàtic i provoca una disminució moderada de la utilització de glucosa per les cèl·lules de l'organisme. En els peixos teleostis, s'ha estudiat l'efecte del cortisol en relació als nivells de glicogen hepàtic i de glucosa plasmàtica i s'ha vist que tots dos varien substancialment segons l'espècie, l'estat de desenvolupament i l'estat metabòlic de l'animal. No obstant, encara que no es donin canvis en la glucosa plasmàtica, en general podem dir que el tractament amb cortisol augmenta la

gluconeogènesi hepàtica perquè augmenten les activitats dels enzims gluconeogènics (Mommsen i col. 1999).

b) Efectes sobre el metabolisme de les proteïnes: Un dels principals efectes metabòlics del cortisol en mamífers és la disminució del contingut proteic a totes les cèl·lules excepte a les hepàtiques i al plasma. D'altra banda, el cortisol disminueix el transport d'aminoàcids cap a les cèl·lules musculars. Exerceix acció proteolítica especialment en el múscul blanc dels peixos i possiblement en el fetge (Mommsen i col. 1999). De tota manera, és difícil demostrar-ho experimentalment perquè aquesta acció està influenciada per la inanició, la hiposmoregulació, l'exercici o la maduració sexual. A més, el cortisol retarda el creixement tissular i inhibeix la proliferació cel·lular. L'augment de l'activitat proteolítica perifèrica implica modificacions en el metabolisme dels aminoàcids. S'ha vist que el tractament amb cortisol tendeix a augmentar els aminoàcids plasmàtics influint en la glucogènesi, la gluconeogènesi i possiblement la síntesi proteica (Mommsen i col. 1999).

c) Efectes sobre el metabolisme dels lípids: En mamífers, fomenta la mobilització d'àcids grassos des del teixit adipòs la qual cosa augmenta la concentració d'àcids lliures al plasma augmentant així la seva utilització per a obtenir energia. La idea més extesa sobre la regulació del metabolisme lipídic en peixos per part del cortisol li atorga una acció lipolítica hepàtica i perifèrica que desencadena un augment en els àcids grassos plasmàtics no esterificats (Mommsen i col. 1999).

d) Resposta a l'estrès: L'estrès produeix un augment immediat en la secreció de cortisol per l'escorça suprarenal dels mamífers. En els peixos, l'estrès comporta l'activació de l'eix HPI i també secreta cortisol immediatament per les cèl·lules interrenals del ronyó anterior (apartat 2.2). Per aquest motiu, l'augment de cortisol plasmàtic és un dels paràmetres més acceptats i utilitzats com a resposta a l'estrès (Tort i col. 2003; Barton 2002; Mommsen 1999).

e) Efectes antiinflamatoris i sistema immune: En els mamífers, després d'una inflamació, l'administració de cortisol bloqueja o anul·la alguns dels efectes desencadenats per la lesió. Actua com a regulador de la inflamació a diferents nivells: disminueix la permeabilitat dels capilars, disminueix la migració de leucòcits i la fagocitosis de les cèl·lules lesionades i disminueix la proliferació limfocitària (principalment limfòcits T). Els glucocorticoides limiten, d'aquesta manera, l'extensió de la inflamació. Paral·lelament, la resposta a l'estrès va acompanyada d'una disminució dels eosinòfils, limfòcits, basòfils i monòcits, d'un augment dels eritròcits, neutròfils i plaquetes i d'una disminució del teixit limfoide i, per tant, de la producció de cèl·lules T i dels anticossos (Guyton 2002; Turnbull i Rivier 1999; McEwen i col. 1997). El cortisol actua com a antiinflamatori bloquejant la producció de les citoquines proinflamatòries induïdes pel LPS (Haddad i col. 2002; Weyts i col. 1999). En peixos, els efectes del cortisol sobre el sistema immune són molt menys

coneguts. Malgrat això, s'ha vist que després d'un estrès es produeix una disminució en la proliferació de limfòcits T i en el nombre de cèl·lules B circulants, mentre els granulòcits neutrofílics es mantenen constants o augmenten (Engelsma i col. 2002; Wojtaszek i col. 2002; Harris i Bird 2000). El cortisol disminueix l'activitat de les cèl·lules B de produir anticossos circulants (la IgM és l'anticòs majoritari produït pels peixos). El cortisol també indueix apoptosi en els limfòcits B en peixos (Engelsma i col. 2002) i té efectes depressius sobre determinades cèl·lules del sistema immune amb funcions com la fagocitosi i la proliferació limfocitària (Wojtaszek i col. 2002; Harris i Bird 2000).

f) Altres funcions en peixos: El cortisol suprimeix les funcions reproductores (Davis i col. 2002). Regula l'adaptació dels peixos a l'aigua marina ja que activa la diferenciació de les cèl·lules branquials del clorur reguladores de l'equilibri iònic i estimula l'activitat dels enzims ATPasa de sodi/potassi (activitat Na^+/K^+ ATPàsica) de les brànquies (McDonald i Milligan 1997). També assumeix funcions mineralocorticoidees, participant en la regulació osmòtica i iònica (McDonald i Milligan 1997; Wendelaar Bonga 1997).

2.3.2. Receptors d'hormones corticosteroidees.

En mamífers, les hormones corticosteroidees actuen a través de dos receptors intracel·lulars específics: el receptor de tipus I o receptor mineralocorticoide (MR) i el receptor de tipus II o receptor glucocorticoide (GR). Ambdós receptors són membres d'una superfamília de receptors nuclears que actuen com a factors de transcripció activats directament per la unió de molècules hidrofòbiques, com ara les hormones lipofíliques, per exemple, el cortisol. En aquest grup també estan inclosos els receptors d'andrògens, d'estrògens, de progesterona, d'hormones tiroidees, de vitamina A i D i de retinoides (Evans 1988). Els receptors d'aquesta família comparteixen una estructura canònica formada per diferents dominis funcionals (Kumar i Thompson 1999) (figura 7):

- El domini A/B, és la regió amino-terminal, és important en modular l'activitat transcripcional i és bastant variable entre espècies.

- El domini d'unió al DNA (DBD, *DNA binding domain*) conté dos anells de Zinc per a la unió al DNA i de dimerització amb el receptor. És una regió altament conservada entre espècies.

- El domini D on tenen lloc els canvis conformacionals durant la unió a la hormona.

- El domini d'unió a la hormona (HBD, *hormone binding domain*), regió també molt conservada entre espècies.

- El domini F en posició carboxi-terminal però no sempre està present, hi ha diferències entre espècies.

Tots els receptors de la família S/T/R comparteixen una elevada homologia en la seqüència en els dominis DBD i HBD i actuen com a factors de transcripció dependents del lligand.

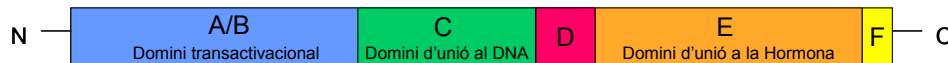


Figura 7: Representació esquemàtica de l'estructura dels receptors de la família S/T/R amb els diferents dominis funcionals des de l'extrem amino-terminal (N) fins a l'extrem carboxi-terminal (C) (adaptat de Evans 1988).

En mamífers, el cortisol es pot unir i induir l'activitat transcripcional dels dos receptors corticosteroides (Guyton 2002). El MR s'activa per l'aldosterona, principal hormona mineralocorticoide, però té 10 vegades més afinitat pel cortisol que el GR. Això és així perquè el cortisol també proporciona una quantitat significativa d'activitat mineralocorticoide ja que, tot i que la seva activitat mineralocorticoide és menor que la de l'aldosterona, la seva secreció és molt més elevada (Fuller i col. 2000). Els dos receptors comparteixen afinitat pel lligand i, a més, s'uneixen als mateixos elements de resposta al glucocorticoide (GRE). Malgrat aquestes coincidències, cadascun regula processos cel·lulars diferents. Els efectes específics de l'aldosterona estan regulats per mecanismes moleculars i cel·lulars específics per evitar que el MR estigués ocupat constantment pel cortisol:

- el MR s'expressa només a cèl·lules específiques (ronyó, colon, tracte respiratori, glàndules salivars, queratinòcits o neurones hipocampals) mentre l'expressió del GR és pràcticament ubíqua,
- en algunes cèl·lules s'ha vist que el MR està coexpressat amb l'enzim 11 β hidroxiesteroid dehidrogenasa tipus II (HSD2) que converteix una part dels glucocorticoides en derivats inactius,
- el complex MR-cortisol és menys estable que els complexos MR-aldosterona i GR-cortisol i
- hi ha diferències en l'activitat transcripcional dels homo i heterodímers del MR i del GR.

A més d'aquest model clàssic d'acció, els esteroides poden actuar ràpidament per mecanismes "no genòmics" a través de receptors de membrana putatius en el sistema nerviós central i en teixits perifèrics i alterar diferents processos fisiològics. Cada vegada però, hi ha més evidències de l'existència d'aquests receptors i se sap que depenen mecanismes de senyalització lligats a proteïnes G (Tasker i col. 2005; Borski 2000).

En peixos, el cortisol assumeix tant les accions glucocorticoidees com les mineralocorticoidees perquè no sintetitzen aldosterona. Fins fa poc no hi havia constància de l'existència d'un receptor mineralocorticoide i es creia que les accions del cortisol es duien a terme per un únic receptor glucocorticoide. Experiments recents han demostrat que algunes espècies expressen els dos receptors (MR i GR) en alguns tipus cel·lulars i que tots dos actuen com a receptors de cortisol (Greenwood i col. 2003; Sloman i col. 2001; Colombe i col. 2000). Per tant, les funcions assumides pel cortisol dependran del receptor corticosteroide al qual s'uneixi. No obstant, no es coneixen els mecanismes implicats en la selecció del cortisol per un dels dos receptors en peixos perquè per exemple, l'enzim HSD2 no s'ha identificat a peixos. En conjunt, les funcions fisiològiques del MR no estan clares ni tampoc els mecanismes implicats en la resposta mineralocorticoidea (Sloman i col. 2001; Colombe i col. 2000).

En relació al receptor glucocorticoide, en dues espècies de peixos s'ha trobat més d'un GR (Bury i col. 2003; Greenwood i col 2003; Ducouret i col. 1995), probablement com a conseqüència de la duplicació gènica o genòmica (Robinson-Rechavi i col. 2001; Meyer i Scharf 1999). No obstant, no s'han identificat encara les característiques funcionals específiques de cadascun d'aquests receptors glucocorticoides.

2.3.2.1.Senyalització del GR.

Després d'una situació estressant, les concentracions plasmàtiques de cortisol augmenten dramàticament (apartat 2.2 i figura 4). Posteriorment, el cortisol travessa directament la membrana plasmàtica, per les característiques hidrofòbiques de la molècula, i un cop al citoplasma s'uneix al receptor glucocorticoide (GR).

Fins aquest moment, el receptor estava inactiu formant un complex amb altres proteïnes, principalment la hsp90 (*heat shock protein 90*) i la hsp70 (*heat shock protein 70*) combinades amb altres caperones que estableixen el complex com la p60, la p23 (o el molibdat) i immunofilines (FKBP52 o CyP40). En aquest estat, els dominis funcionals del receptor, és a dir, el domini d'unió al DNA i d'unió a la hormona del receptor (DBD i HBD, respectivament), estaven ocupats concretament per un dímer de proteïnes format principalment per la hsp90 (Basu i col. 2003; Dittmar i Pratt 1997; Scherrer i col. 1990). La unió del lligand amb el receptor dissocia aquest complex oligomèric deixant lliures els anells de Zinc del DBD i permetent la formació d'una subunitat hormona-receptor lliure. El receptor activat forma un homodímer i es transloca al nucli a través d'un nucleopor. Aquesta translocació requereix, a més, la presència del senyal de localització nuclear i el posterior reconeixement per proteïnes d'unió en el nucleopor (Mommensen i col. 1999). Després, els receptors actuen com a factors de transcripció dependents del lligand en complexos proteics

que s'uneixen cooperativament a seqüències específiques del DNA o elements de resposta al glucocorticoide (GRE) que són seqüències palindròmiques imperfectes de 15 nucleòtids (GGTACAnnnTGTTCT). Aquesta unió permet l'activació transcripcional de diferents gens implicats en la resposta biològica (figura 8).

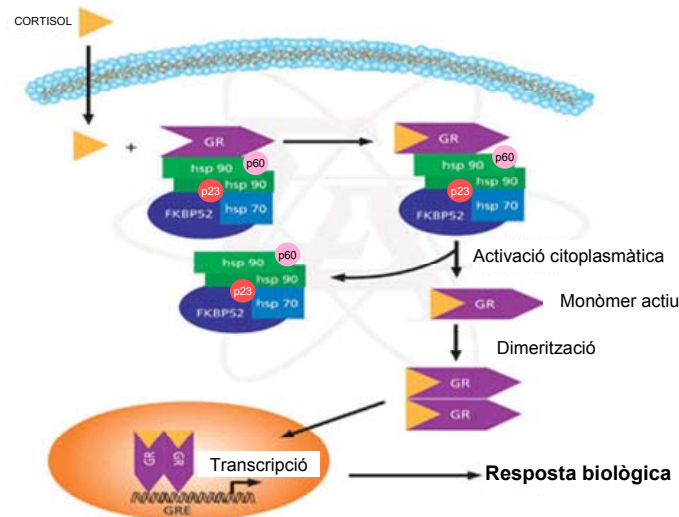


Figura 8: Activació del receptor de glucocorticoides (GR) pel cortisol i activació transcripcional de gens implicats en el control de la resposta biològica.

En peixos, de moment s'han analitzat els canvis de les proteïnes hsp90 i hsp70 (Basu i col. 2003; Vijayan i col. 2003; Basu i col. 2001) i, donat que estan molt conservades, és possible que el GR també estigui formant un complex amb diferents proteïnes en peixos.

2.4. RESPOSTA INFLAMATÒRIA.

La resposta inflamatòria comporta un conjunt de reaccions cel·lulars i moleculars de l'organisme com a resposta a un determinat dany tissular i cel·lular. La resposta inflamatòria pot estar induïda per factors endògens o exògens. Els factors exògens inclouen lesió, exposició a toxines i invasió de virus o bacteris (Abbas 2001).

En peixos, la immunitat innata constitueix la primera i més desenvolupada línia de defensa contra les infeccions bacterianes (Tort i col. 2003). Els bacteris extracel·lulars produeixen toxines que poden ser endotoxines (components de la membra cel·lular) o exotoxines (secretades activament pels bacteris) amb diferents efectes patològics.

L'endotoxina dels bacteris gramnegatius, també anomenada lipopolisacàrid (LPS), és un component de la paret cel·lular i està formada tant per components lipídics com per carbohidrats (polisacàrids) (Raetz i Whitfield 2002). Està considerada una macromolècula biològicament molt activa que s'allibera dels bacteris que estan morint i estimula nombroses respostes immunitàries. La resposta de l'organisme a les alteracions de l'homeòstasi causades pel LPS es coneix com a resposta de fase aguda (Bértok 1998).

En mamífers, les principals respostes funcionals del LPS són estimular la producció de citoquines per part dels macròfags i les seves activitats microbicides, així com activar la inflamació local i general induint l'expressió de molècules d'adhesió leucocitària a l'endoteli (Abbas 2001).

La detecció del LPS per part dels macròfags en mamífers està regulada principalment per tres components: una proteïna plasmàtica d'unió al LPS, la LBP (proteïna d'unió al LPS, *LPS-binding protein*), el receptor de superfície CD14 i la proteïna receptora 4 de tipus Toll, unitat receptora de transducció de senyal, TLR-4 (*Toll like receptor-4*) (figura 9). El LPS circulant està inicialment unit a la LBP, la qual facilita el seu transport al CD14 de la superfície del macròfag, quedant així la LBP lliure. Posteriorment, el CD14 transfereix el LPS a les unitats de tipus Toll associades a proteïnes accessòries, com la MD2. Aquesta proteïna s'associa amb el LPS i desencadena l'homodimerització i activació del TLR-4 seguit del reclutament de molècules adaptadores intracel·lulars que activen factors de transcripció, principalment el AP-1 i el NF- κ B (factor nuclear kappa B, *nuclear factor κ B*).

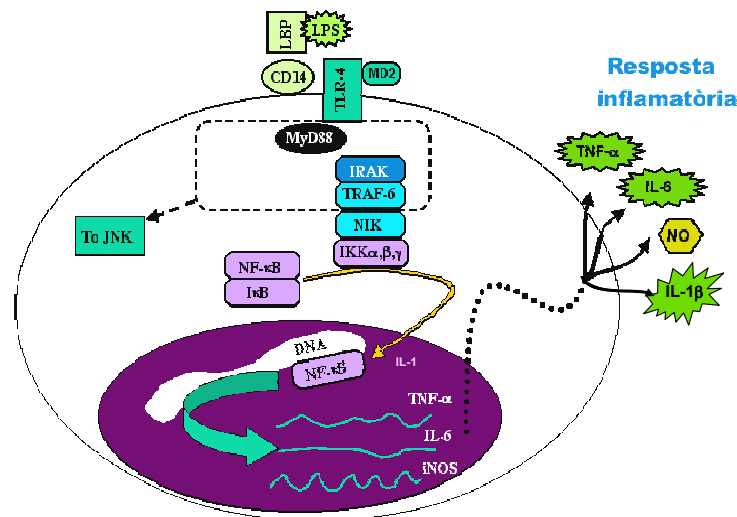


Figura 9: Via de transducció de senyal en mamífers per la qual l'estímul estressant, el lipopolisacàrid (LPS), activa el factor de transcripció NF- κ B (*nuclear factor κ B*) induint la transcripció de citoquines proinflamàtiques com el TNF α (*tumor necrosis factor α*), la IL-1 β (interleuquina 1 beta), la iNOS (sintasa d'òxid nítric induïble) i la IL-6 (interleuquina 6).

En mamífers, els gens activats per aquest darrer factor de transcripció codifiquen citoquines proinflamàtories, enzims de l'esclat respiratori (*respiratory burst*) i molècules d'adhesió en malalties inflamàtories (Abbas 2001). En concret, les principals citoquines proinflamàtories alliberades pels macròfags i monòcits dels diferents teixits activats després d'una estimulació per LPS són: el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$, *tumor necrosis factor α*), la interleuquina 1 beta ($IL1\beta$), la sintasa d'òxid nítric induïble (iNOS) i la interleuquina 6 (IL6) (Beishuizen i Thijs 2003; Lang i col. 2003).

Les diferències més destacables en la resposta biològica al LPS entre els peixos i els mamífers es deuen principalment a diferències en el reconeixement del LPS a través del receptor. Tot i que la proteïna receptora 4 de tipus Toll (*Toll like receptor 4*, TLR4) està present en peixos sembla que les molècules necessàries pel reconeixement del LPS en mamífers no estan presents en peixos o estan representant funcions diferents (Iliev i col. 2005).

En conjunt, aquestes citoquines estimulen la reacció cel·lular de la inflamació que consisteix en el reclutament de leucòcits als llocs d'infecció i la seva activació per eliminar l'agent infecciós. Amb tot això, els macròfags es consideren les cèl·lules efectores dominants de les fases tardanes de la immunitat innata perquè poden respondre ràpidament als microorganismes estimulants la resposta inflamatòria.

- El **$TNF\alpha$** (factor de necrosis tumoral alfa) o caquexina és una citoquina proinflamatòria secretada principalment per fagòcits mononuclears activats però també pot ser secretada per cèl·lules T estimulades per antígens, per les cèl·lules NK (*natural killer*) o pels mastòcits. És el principal mediador de la resposta inflamatòria aguda enfront bacteris gramnegatius i altres microorganismes infecciosos, estimulants el reclutament de neutròfils i monòcits als llocs de la infecció i activant aquestes cèl·lules per a destruir els microorganismes. Juga un paper essencial en la invasió de patògens però també participa en l'apoptosi, el metabolisme lipídic i en la regulació immunològica (Abbas 2001).

En peixos se sap que el LPS induïx l'expressió de $TNF\alpha$ en macròfags diferenciats i monòcits (MacKenzie i col. 2003) i en leucòcits primaris aïllats (Hirono i col. 2001; Laing i col. 2001) A l'orada, no augmenta l'expressió de $TNF\alpha$ en macròfags estimulats amb LPS (García-Castillo i col. 2002).

- La **$IL1\beta$** (interleuquina 1 beta) és una citoquina proinflamatòria amb efectes biològics com ara la inducció de les molècules d'adhesió a la cèl·lula endotelial, l'estimulació de la producció de quimoquines per les cèl·lules endotelials i els macròfags, l'estimulació de la síntesi de reactants de fase aguda pel fetge i la febre. És sintetitzada per monòcits i macròfags activats i juga un paper important en la resposta inflamatòria innata, i al igual que el $TNF\alpha$, actua com a medidora de la inflamació local, així com en la maduració i

proliferació dels principals tipus de cèl·lules immunes. És freqüent trobar una actuació sinèrgica de la IL1 β i el TNF α . D'altra banda, la IL1 β pot exercir efectes endocrins sobre l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (HPA) i té propietats pleiotròpiques, és a dir, amb efectes diferents sobre tipus cel·lulars diversos (Bird i col. 2002; Haddad i col. 2002; Abbas 2001).

S'ha demostrat que s'indueix l'expressió de la IL1 β en peixos per una injecció bacteriana o amb LPS (Pelegrín i col. 2004; Engelsma i col. 2002; Pelegrín i col. 2001; Zou i col. 2000; Zou i col. 1999a; Zou i col. 1999b).

- A més, els macròfags generen radicals lliures amb el sistema de la sintasa d'òxid nítric induïble, **iNOS**. Aquest enzim citosòlic s'indueix en resposta al LPS. La conversió d'oxigen molecular en radicals lliures és un altre mecanisme microbicida dels macròfags (Abbas 2001). En el turbot, *Scophthalmus maximus*, el LPS estimula la producció de NO en leucòcits de ronyó anterior (Tafalla i Novoa 2000).

- La **IL6** (interleuquina 6) és una citoquina secundària en la resposta inflamatòria amb propietats proinflamatòries i alhora antiinflamatòries. La sintetitzen fagòcits mononuclears, les cèl·lules endotelials vasculares, els fibroblasts, les cèl·lules T activades i altres cèl·lules en resposta a microorganismes i a altres citoquines, principalment el TNF α i la IL1 β . L'expressió de la IL6 està sobrerregulada per la IL1 β i el TNF α i, de retruc, la IL6 per la seva banda inhibeix la producció i la secreció de IL1 β i el TNF α (Engelsma i col. 2002). Participa en la immunitat innata, estimula la síntesi de proteïnes de fase aguda pels hepatòcits, contribuint als efectes sistèmics de la inflamació. Malgrat tot, actualment, encara no s'ha clonat la IL6 en peixos teleostis.

D'altra banda, l'activació dels TLR4 pel LPS comporta l'activació de gens immunes, com les citoquines proinflamatòries, però també gens implicats en la resposta antiviral, incloent l'interferó tipus I (IFN) i gens induïbles per IFN (Abbas 2001). En general, els IFN de tipus I regulen la resposta immunitària innata de manera precoç enfront les infeccions virals. Però també augmenten la secreció de TNF α pels macròfags activats pel LPS i activen els macròfags perquè destrueixin els microorganismes fagocitats actuant de forma sinèrgica amb el TNF α a nivell d'endoteli. El IFN activa altres factors de transcripció, STAT 1 (transductors de senyal i activadors de la transcripció, *signal transducers and activators of transcription*) i IRF-1 (factor 1 regulador de IFN γ) que actuen de forma conjunta amb els factors de transcripció activats pel LPS, AP-1 i NF κ B. El IFN produeix un estat antiviral en les cèl·lules del voltant les quals produeixen proteïnes induïdes per IFN que actuen com a mediadors intracel·lulars, on s'inclou la **proteïna Mx**. La proteïna Mx pertany doncs, a un grup de proteïnes antivirals que són induïdes per IFN i estan implicades en la defensa antiviral.

- El receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (**PPAR γ**) és un altre receptor de la família de receptors hormonals nuclears, que actua com a factor de transcripció multigènic implicat en múltiples processos biològics, principalment relacionats amb la regulació metabòlica (Evans 1988). De manera general, actua positivament sobre el metabolisme de lipoproteïnes i l'oxidació d'àcids grassos però hi ha evidències que suggereixen que actua com agent antiinflamatori perquè regula negativament l'expressió de gens proinflamatoris (Belvisi i col. 2006).

Per últim cal destacar que la inflamació produeix canvis generals en l'organisme que potencien la capacitat del sistema immunitari d'eliminar la infecció.

- La **Catepsina D** (catD) és una proteasa lisosomal ubiqua, membre de la família de proteases anomenada aspartil-proteases que es pot trobar tant a lisosomes com al complex de Golgi de les cèl·lules i la seva funció principal és la degradació de proteïnes. La seva producció s'incrementa en càncer d'úter i fetge. Particularment, en el càncer de mama la concentració de catD citosòlica és un marcador de pronòstic independent d'altres paràmetres (Kokkonen i col. 2004).

L'anàlisi per microanàlisi (*microarray*) de macròfags de truita irisada estimulats durant 12 hores amb LPS va demostrar que aquesta proteasa està relacionada d'alguna manera amb la funció immune (Goetz i col. 2004a).

2.5. COMUNICACIÓ NEURO- IMMUNO- ENDOCRINA.

En els vertebrats superiors, la resposta a l'estrès és possible gràcies a la interacció multidireccional entre els sistemes nerviós, immune i endocrí (Beishuizen i Thijs 2003). Les interaccions entre els sistemes immune i endocrí es realitzen a través d'una complicada xarxa de comunicacions paracrines bidireccionals encarregades de mantenir l'homeòstasi fisiològica. Aquesta comunicació es pot donar gràcies a la capacitat de les cèl·lules d'un dels sistemes de respondre a les senyals que provenen de l'altre sistema degut a l'existència de receptors específics de senyals endocrines a les cèl·lules immunes i viceversa (Haddad i col. 2002; Turnbull i Rivier 1999; McEwen i col. 1997).

Els peixos teleostis responen a l'estrès per diferents vies per a poder mantenir l'homeòstasi o equilibri del medi intern (Wedemeyer i col. 1990). Les comunicacions immuno-endocrines en peixos estan igualment centrades en la modulació dels processos inflamatoris i immunològics a través d'hormones i en l'expressió de receptors hormonals en cèl·lules del sistema immune (Engelsma i col. 2002; Harris i Bird 2000; Weyts i col. 1999; Wendelaar Bonga 1997).

La comunicació immuno-endocrina, per tant, juga un paper important en el manteniment de l'equilibri fisiològic sota una elevada varietat de condicions estressants, inclosa l'endotoxèmia (Beishuizen i Thijs 2003). Està generalment acceptat que les citoquines humorals i hipotalàmiques produïdes en resposta al LPS activen l'eix hipotalàmico-pituitàrio-adrenal (HPA) i, per tant, l'alliberació de cortisol. Aquestes citoquines proinflamàtores són molècules efectores del sistema immune que actuen com a missatgers químics que envien senyals al sistema endocrí per a estimular l'eix HPA (Turnbull i Rivier 1999). En mamífers, aquesta activació es dona a nivell hipotalàmic, principalment activant l'alliberació d'hormona alliberadora de corticotropines (CRH) (Dadoun i col. 1998; McEwen i col. 1997).

En peixos, el LPS també estimula l'eix HPI *in vivo* (Holland i col. 2002; Balm 1997) i augmenta la producció de cortisol (figura 10), probablement per augmentar la producció de les hormones hipotalàmiques i hipofisàries (CRH i ACTH). Tot i que, en peixos, segurament l'activació de l'eix HPI pel LPS també es dona mitjançant la producció de citoquines proinflamàtores, encara no es coneixen els mecanismes implicats en aquesta activació.

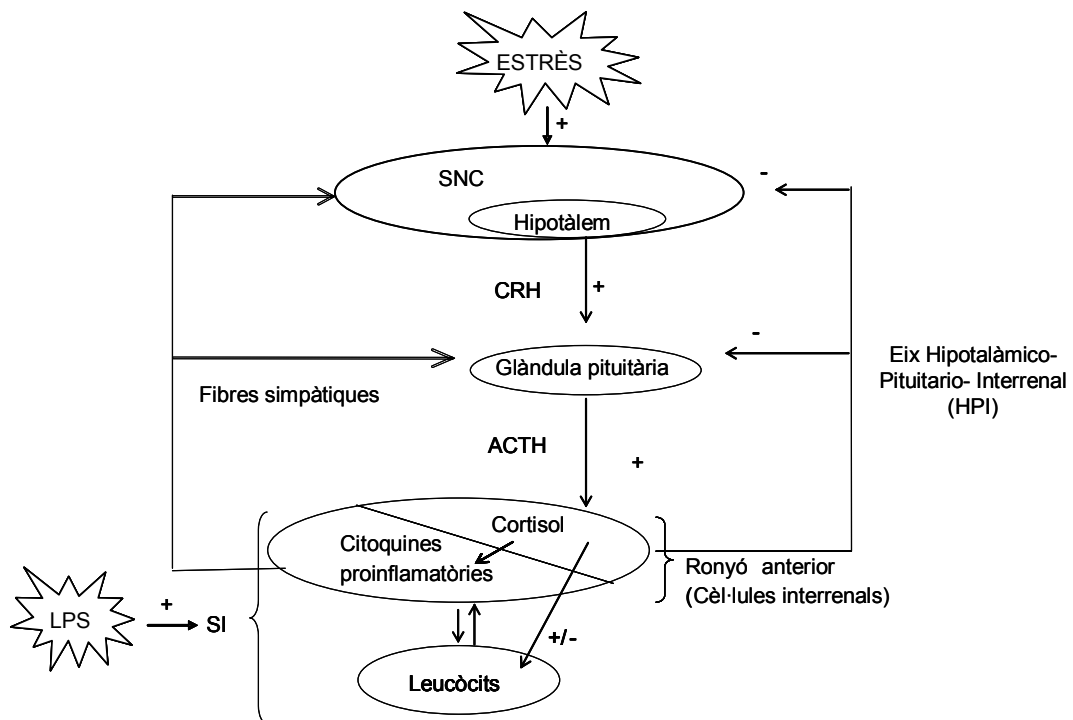


Figura 10: Representació esquemàtica de l'eix hipotalàmico-pituitàrio-interrenal (HPI) i les vies de comunicació amb el sistema immune (SI) en peixos teleostis després d'un estímul per LPS (adaptat de Weyts i col. 1999).

Finalment, en mamífers els glucocorticoïdes adrenals secretats per l'eix HPA actuen de reguladors de la resposta inflamatòria ja que, per retroalimentació negativa, inhibeixen la producció de citokines induïdes pel LPS (Haddad i col. 2002). Així, es controla la inflamació i s'evita que l'alliberació contínua de citokines produeixi un xoc sèptic. Aquesta regulació es dona a través del receptor de cortisol (GR) que, un cop activat, antagonitza els efectes del factor de transcripció NF κ B. En els darrers anys s'han estudiat molt les interaccions entre aquests dos factors de transcripció però encara no està clar el mecanisme específic d'aquesta interacció (Almawi i Melemedjian 2002). El model més acceptat, implica les interaccions proteïna-proteïna entre ambdós factors, interaccions independents de l'element de resposta al glucocorticoide (GRE), que atenuen la seva capacitat d'induir la transcripció dels gens implicats en la resposta inflamatòria (Beishuizen i Thijs 2003; Engelsma i col. 2002; Adcock i Caramori 2001). Existeix, per tant, una competició entre els factors proinflamatori i antiinflamatori per les molècules coactivadores implicades en la transcripció (figura 11). El GR, per tant, regula negativament l'activació dels gens implicats en la resposta inflamatòria desencadenada per una estimulació amb LPS.

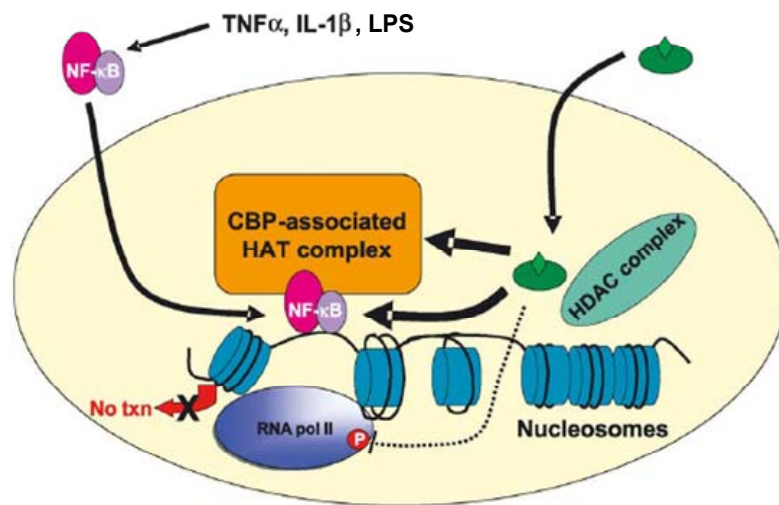


Figura 11: Interaccions, a nivell molecular, entre el receptor glucocorticoide (GR) i el factor de transcripció NF κ B. El GR activat es transloca al nucli i antagonitza els efectes del NF κ B reduint la transcripció dels gens implicats en la resposta inflamatòria (Hayashi i col 2004).

En peixos, tot i que se sap que el LPS estimula l'eix HPI *in vivo* (Holland i col. 2002; Balm 1997), encara no es coneixen els mecanismes implicats en aquesta resposta. Possiblement aquesta activació també es dona a través de citokines proinflamatòries induïdes pel LPS i, en conseqüència, el cortisol actua com a antiinflamatori exercint acció

directa sobre aquestes citoquines, bloquejant la seva producció (Haddad i col. 2002; Weyts i col. 1999). D'altra banda, les diferències en la resposta biològica al LPS entre els peixos i els mamífers es deuen a diferències en el reconeixement del LPS a través del receptor (Iliev i col. 2005). Els estudis fets en peixos s'han centrat més en estudiar aquestes diferències i, en canvi, no s'han estudiat les interaccions entre els sistemes immune i l'endocrí. En concret, en peixos no s'ha estudiat la relació entre la via de transducció de senyals NF κ B i el receptor glucocorticoide (GR).

La organització anatòmica dels peixos ofereix la possibilitat d'interaccions paracrines directes entre el sistema immune i l'endocrí mentre en altres animals aquests sistemes estan més clarament diferenciats en òrgans separats (Weyts i col. 1999). Així, la producció de glucocorticoides i catecolamines i les principals funcions hematopoiètiques es duen a terme en el ronyó anterior o pronefros, que concentra precisament l'acció dels sistemes de regulació nerviós, endocrí i immune. Donada la seva inervació simpàtica podria estar implicat també en el control neural. Per tot això, els peixos proporcionen un bon model per a estudiar les interaccions immuno-endocrines i, des d'un punt de vista evolutiu, completar el que ja es coneix en mamífers.

3. OBJECTIUS

3. OBJECTIUS.

3.1. Antecedents.

Els peixos en condicions de cultiu intensiu estan sotmesos a molts factors estressants i han de respondre per diferents vies fisiològiques per a poder mantenir l'equilibri intern. La resposta primària a l'estrès implica l'alliberació de cortisol, principal glucocorticoide en peixos teleostis. Aquesta hormona actua a través de receptors intracel·lulars específics, el receptor mineralocorticoide (MR) i el receptor glucocorticoide (GR). En el moment de començar el treball de recerca, no hi havia constància de l'existència d'un receptor mineralocorticoide en peixos i, com que tampoc sintetitzen aldosterona, es creia que les funcions glucocorticoidees i mineralocorticoidees, que assumeix el cortisol, es duien a terme a través del receptor glucocorticoide. D'altra banda, s'ha demostrat que diferents espècies de peixos teleostis expressen almenys un receptor glucocorticoide de cortisol.

Des del punt de vista de la investigació bàsica, es volia estudiar el receptor glucocorticoide també a la perca europea (*Perca fluviatilis*) i en l'orada (*Sparus aurata*), però degut a les dificultats d'obtenir perques, es va centrar el treball de caracterització del receptor glucocorticoide en l'orada.

De fet, des d'un punt de vista aplicat, aquest treball s'englobava inicialment en el marc de projectes d'aqüicultura orientats a estudiar els efectes de l'estrès en diferents espècies de peixos. En particular, en el Projecte EUREKA titulat "Aplicación del control térmico a la reproducción y producción de la *Perca fluviatilis*" (ACRAPEP). Aquest projecte intentava estudiar i controlar la reproducció de la perca europea (*P.fluviatilis*) a la piscifactoria Garona Verda (Les, Lleida), en termes d'alimentació i patologia, principalment. Malgrat els coneixements actuals sobre la perca europea, era important encara resoldre alguns punts importants en el desenvolupament d'aquesta espècie perquè el seu cultiu fos rendible. En aquesta línia, era important conèixer i controlar aspectes relacionats amb els efectes de l'estrès. Igualment calia conèixer la resposta concreta d'aquesta espècie a diferents factors estressants habituals en el seu cultiu per poder actuar en conseqüència.

3.2. Hipòtesis.

La nostra hipòtesi de partida fou que l'orada (*S.aurata*) també expressaria com a mínim un receptor glucocorticoide (GR). Tot i que, en peixos en general, hi ha molta informació sobre els efectes de factors externs estressants en la resposta d'alliberació de cortisol, els processos moleculars i cel·lulars que regulen aquesta secreció encara no es coneixen del tot. El GR seria, per tant, un element important per a aquests estudis.

D'igual manera, són poc coneguts els mecanismes implicats en la comunicació entre els sistemes immune i endocrí quan el peix està exposat a una situació estressant o en les primeres fases d'una infecció. Per aquest motiu, la nostra hipòtesi fou que hi ha una comunicació efectiva entre els sistemes immune i endocrí i per a determinar-la vam desenvolupar diferents models experimentals d'injecció de LPS. El coneixement d'aquests mecanismes permetria explicar les bases de la immunodepressió en peixos, la qual desencadena a llarg termini diferents malalties que disminueixen la producció en l'aqüicultura.

Finalment, pensàvem que, perquè la resposta inflamatòria fos efectiva, calien interaccions paracrines entre les cèl·lules per a mantenir l'homeòstasi. Per portar a terme aquesta hipòtesi vam desenvolupar un model experimental *in vitro*, el cultiu primari d'hepatòcits d'orada. En mamífers es coneix que aquest tipus cel·lular participa en la resposta inflamatòria i nosaltres preteníem estudiar la seva implicació en la resposta immune en peixos.

3.3. Objectius.

Tenint en compte totes aquestes consideracions, els principals objectius que ens proposàvem aconseguir amb el nostre estudi eren:

- 1) Caracteritzar el receptor glucocorticoide de cortisol (GR) en l'orada (*Sparus aurata*).
- 2) Determinar els principals teixits on s'expressa majoritàriament el GR en l'orada (*S. aurata*).
- 3) Determinar la resposta endocrina d'alliberament de cortisol en l'orada (*S. aurata*), com a producte endocrí final de l'eix hormonal de l'estrès, després d'una infecció immune.
- 4) Determinar les interaccions entre el sistema immune (gens immunes) i l'endocrí (GR) després d'una infecció immune.
- 5) Avaluat la resposta immune i endocrina d'un cultiu cel·lular a una situació estressant endocrina i immune, respectivament.
- 6) Establir la resposta fisiològica a diferents factors estressants i el patró de recuperació de la perca europea (*Perca fluviatilis*).

4. CAPÍTOL I:

**Clonatge del receptor glucocorticoide (GR) en l'orada
(*Sparus aurata*).**

4.1. INTRODUCCIÓ.

En mamífers, les hormones corticoesteroides actuen principalment a través de dos receptors intracel·lulars específics: el receptor de tipus I o mineralocorticoide (MR) i el receptor de tipus II o glucocorticoide (GR) (Evans 1988). Tots dos són membres d'una superfamília de receptors nuclears que actuen com a factors de transcripció dependents del lligand i comparteixen una estructura proteica formada per diferents dominis funcionals (Kumar i Thompson 2005; Schoneveld i col. 2004; Smoak i Cidlowski 2004; DeRijk i col. 2002) (figura I.1):

- El domini amino terminal (domini A/B) és la regió de transactivació. Inclou el domini d'activació AF-1, important en la modulació de l'activitat transcripcional i en l'associació del receptor amb altres factors de transcripció (Kumar i Thompson 2003). Aquest domini és bastant variable entre els receptors nuclears.

- El domini central (domini C) d'unió al DNA, DBD (*DNA binding domain*), està molt conservat entre els receptors nuclears. Aquesta regió conté dos anells de Zinc (*clusters* o agrupacions de cisteïnes que coordinen la retenció de dos àtoms de Zinc a la proteïna), un per unir-se al DNA, i l'altre per dimeritzar amb un altre receptor. Aquests anells permeten l'estabilització de l'ensamblatge tridimensional de les hèlixs i les regions interhelicals, responsables de les interaccions entre la proteïna i els elements de resposta al glucocorticoide (GRE), així com de part de l'homodimerització.

- El domini carboxi terminal (domini E) d'unió a la hormona, HBD (*hormone binding domain*), on també s'uneixen proteïnes de shock tèrmic (*heat shock proteins, hsp*). Aquest domini conté senyals de localització nuclear, així com un domini amb funció d'activació dependent del lligand, AF-2 (Kumar i Thompson 1999). Aquesta regió també està molt conservada entre els receptors nuclears.

Entre els dos dominis funcionals principals (DBD o C i HBD o E), hi ha una regió que fa de frontissa (domini D) i és on tenen lloc els canvis conformacionals durant la unió al lligand.

En general, tots els receptors d'aquesta família comparteixen una elevada homologia en la seqüència en els dominis d'unió al DNA i d'unió a la hormona.

En humans, es van clonar dues isoformes del receptor glucocorticoide: GR α i GR β (Hollenberg i col. 1985). Les dues formes del GR humà (hGR) es generen per processament ("*splicing*") alternatiu d'un únic gen, format per 9 exons. La isoforma GR α consisteix en 777 aminoàcids (aa) (figura I.1) i presenta activitat transcripcional, mentre la isoforma GR β està formada només per 742 aa i no és capaç d'activar la transcripció, de fet, la seva funció està en discussió (DeRijk i col. 2002).

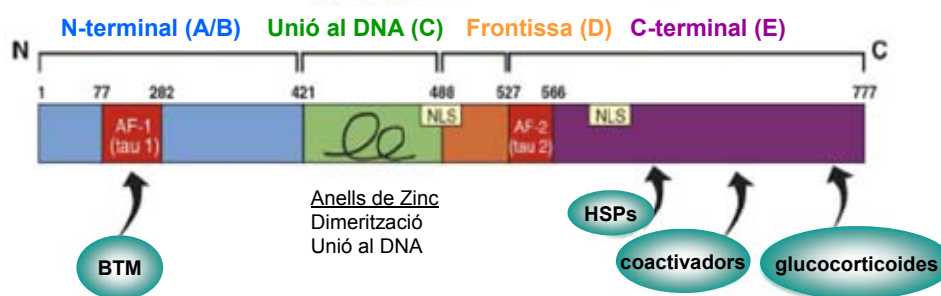


Figura I.1: Organització estructural de la proteïna GR α humana (formada per 777aa). L'extrem amino-terminal (N) conté el domini d'activació (AF-1) i la maquinària basal de transcripció (BTM). Estan representats els anells de zinc en el domini d'unió al DNA. L'extrem carboxi-terminal (C) conté el domini d'unió a la hormona on s'uneixen proteïnes de shock tèrmic (hsp), glucocorticoides i coactivadors; conté també senyals de localització nuclear (NLS) així com el domini amb funció d'activació depenent del lligand (adaptat de Smoak i Cidlowski 2004).

En general, l'estructura del receptor de cortisol en peixos és similar a la dels mamífers. Malgrat tot, en algunes espècies, s'han trobat 9 aminoàcids addicionals (WRARQNTDG) entre els dos anells de Zinc del domini d'unió al DNA. Concretament s'han trobat al llobarro, *Dicentrarchus labrax* (Terova i col. 2005), al fals halibut de Japó, *Paralichthys olivaceus* (Tokuda 1998, nombre d'accés [AB013444](#)), a la tilàpia, *Haplochromis burtoni*, al GR2b (Greenwood i col. 2003) i a la truita irisada, *Oncorhynchus mykiss*, al GR1 (Bury i col. 2003; Ducouret i col. 1995) i al GR2, on només se'n troben 5 aa (Ducouret i col. 1995) (taula I.1). S'ha comprovat que, en la truita irisada (*O. mykiss*), aquests 9 aa addicionals al DBD del GR1 són deguts a la presència d'un exó addicional i serveixen per a afavorir la unió del receptor als elements de resposta al glucocorticoide (GRE) (Lethimonier i col. 2002).

Un mecanisme important per a l'evolució dels organismes (Venkatesh 2003) és la duplicació de determinats gens (Robinson-Rechavi i col. 2001) o del genoma sencer (Meyer i Scharf 1999). Els receptors nuclears són uns bons candidats per a estudiar aquesta hipòtesi perquè estan molt conservats al llarg de l'evolució, la qual cosa facilita la seva amplificació en espècies molt diferents, estan distribuïts per tot el genoma i permeten la construcció de filogènies consistents (Robinson-Rechavi i col. 2001). En el cas del receptor glucocorticoide de cortisol, s'ha trobat duplicat a dues espècies de peixos teleostis (Greenwood i col 2003; Bury i col. 2003; Ducouret i col. 1995) (taula I.1).

En peixos, fins fa poc, no hi havia constància de l'existència d'un receptor mineralocorticoide i es creia que les accions del cortisol es duïen a terme per un únic receptor glucocorticoide. Experiments recents han demostrat que algunes espècies expressen els dos receptors (MR i GR) i que tots dos actuen com a receptors de cortisol (Sturm i col. 2005; Greenwood i col. 2003; Sloman i col. 2001; Colombe i col. 2000). Cal recordar que el cortisol, en peixos, assumeix també les funcions mineralocorticoidees, perquè no sintetitzen aldosterona. Per tant, amb aquestes consideracions, les funcions assumides pel cortisol depenen del receptor corticosteroide al qual

s'uneixi. Les diferents espècies de peixos on s'ha estudiat el MR són la truita irisada, *Oncorhynchus mykiss* (Sturm i col. 2005; Sloman i col. 2001, Colombe i col. 2000) i la tilàpia, *Haplochromis burtoni* (Greenwood i col. 2003).

S'ha obtingut la seqüència sencera del GR al peix zebra, *Danio rerio* (Ozawa 2006, nombre d'accés [AB218424](#)), al llobarro, *Dicentrarchus labrax* (Terova i col. 2005), la tilàpia, *H. burtoni* (Greenwood i col. 2003), la truita irisada, *O. mykiss* (Bury i col. 2003; Ducouret i col. 1995), el fals halibut del Japó, *Paralichthys olivaceus* (Tokuda 1998, [AB013444](#)), el peix gat dels canals, *Pimephales promelas* (Filby 2005, [AY533141](#)), la truita comú, *Salmo trutta* (Terova 2005, [AY863149](#)).

La mida dels receptors de cortisol (GR i MR) en parells de bases (pb) varia en funció de l'espècie (taula I.1):

ESPÈCIE	RECEPTOR	MIDA (pb)	REFERÈNCIA
<i>Danio rerio</i> (peix zebra)	GR	2262 pb	AB218424 (Ozawa 2006)
<i>Dicentrarchus labrax</i> (llobarro)	GR	2457 pb	Terova i col. (2005)
		2591 pb	AY619996 (Vizzini 2004)
<i>Haplochromis burtoni</i> (tilàpia)	GR1	2620 bp	Greenwood i col. (2003)
	GR2 a	3894 pb	
	GR2b	3921 pb	
	MR	3285 bp	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truita irisada)	GR1	6707 pb	Bury i col. (2003)
	GR2	2756 pb	Ducouret i col. (1995)
	MR (A)	3670 pb	Sturm i col. (2005)
	MR (B)	3573 pb	
<i>Paralichthys olivaceus</i> (fals halibut del Japó)	GR	3391 pb	AB013444 (Tokuda 1998)
<i>Pimephales promelas</i> (el peix gat dels canals)	GR	2571pb	AY533141 (Filby 2005)
<i>Salmo trutta</i> (truita comú)	GR	2265pb	AY863149 (Terova 2005)

Taula I.1: Mida dels dos tipus de receptors de cortisol (GR i MR) en parells de bases (pb) clonats en diferents espècies de peixos: el peix zebra (*Danio rerio*), el llobarro (*Dicentrarchus labrax*), la tilàpia (*Haplochromis burtonis*), la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*), el fals halibut del Japó (*Paralichthys olivaceus*), el peix gat dels canals (*Pimephales promelas*) i la truita comú (*Salmo trutta*).

Tenint en compte aquestes consideracions, en aquest treball en concret volíem caracteritzar el receptor glucocorticoide de cortisol en l'orada (*Sparus aurata*) i comparar les seves característiques estructurals respecte altres receptors de cortisol en peixos. Per altra banda també volíem determinar els teixits on s'expressa majoritàriament.

4.2. EXPERIMENT 1. Caracterització del receptor glucocorticoide (GR) de cortisol en diferents teixits en l'orada (*Sparus aurata*). Clonatge del GR d'orada (primera part).

4.2.1. MATERIALS I MÈTODES.

4.2.1.1. Animals experimentals. Disseny de l'experiment.

Vam obtenir aproximadament 50 orades sexualment immadures (*Sparus aurata*) de $152,10 \pm 14,49$ g de pes corporal de la piscifactoria Granja Marina del Masnou (Masnou, Barcelona). Un cop transportades a les instal·lacions de la Universitat Autònoma de Barcelona es van estabular en quatre tancs quadrats de fibra de vidre de 300 L de capacitat total per tenir-los a una densitat basal de 8 kg/m^3 . Aquests tancs disposen de sistema tancat de circulació d'aigua que manté un flux constant a 3000 L/h i estan equipats amb filtres físics i biològics independents per a neutralitzar els residus amoniacals generats per l'animal. Els tancs estan parcialment coberts amb xarxes fosques i sota un fotoperíode constant de 12 h L: 12 h D (començant a les 7 h). El període d'aclimatació va ser de dues setmanes.

Per fer l'experiment, es van distribuir 40 peixos en dos tancs quadrats de fibra de vidre de 300 L de capacitat total (20 peixos/tanc) i es van deixar aclimatar durant 15 dies més.

Durant el període d'aclimatació i durant l'experiment els nivells d'amoni es van mantenir entre valors de 0,037 a 0,105 mg/L, els nivells de nitrit entre 0,035 i 0,205 mg/L i el rang de pH entre 7,29 i 8,08. La temperatura de l'aigua va oscil·lar entre 15-19 °C i la salinitat entre el 39-47‰. Els peixos s'alimentaven cada dos dies amb una dieta comercial (INVE Technologies NV, Baasrode, Bèlgica) aproximadament a una dosi de manteniment de 0,5% del pes corporal/dia, fins a les 24 h prèvies al començament dels experiments perquè els períodes de menja podrien interferir en les nostres mesures.

4.2.1.2. Obtenció de mostres.

Passat el temps d'aclimatació experimental vam utilitzar cinc peixos en total (n=5) per extreure l'RNA total de diferents teixits: cor, fetge, melsa, intestí, gònades, teixit adipòs, brànquies, cervell, ronyó anterior (pronefros), ronyó posterior i múscul.

Els peixos es van sacrificar per concusió craneal abans de fer la dissecció per extreure tots els teixits abans esmentats. Els teixits es congelaren immediatament en nitrogen líquid i s'emmagatzemaren a -80°C fins el moment de l'extracció de RNA.

4.2.1.3. Tècniques analítiques.

4.2.1.3. A) Extracció de RNA.

Les extraccions de RNA total dels diferents teixits es van fer, de manera independent, utilitzant un mètode de purificació estandaritzat per la casa comercial (Molecular Center Research, M.C.R.). El protocol consistia en homogeneïtzar els teixits en 1 ml de tri-reagent (M.C.R.) per cada 100 mg de teixit. Després, la fase d'extracció es va fer amb cloroform (Sigma), es va precipitar amb isopropanol (Sigma) i es rentà el precipitat amb etanol (Scharlau) al 75%. Les mostres es van dissoldre amb aigua tractada amb DEPC i la concentració es va mesurar i calcular per espectrofotometria (Biomate™ 3 Series Spectrophotometers, Thermo Spectronic).

Per comprovar l'estat dels RNAs, es van fer electroforesis en gels d'agarosa a l'1% en tampó MOPS i amb el marcador de pes molecular (0,24-9,5 Kb RNA ladder, Invitrogen).

4.2.1.3. B) Reacció de RT-PCR.

Vam utilitzar 5 µg de RNA de cadascun dels teixits anteriorment descrits per retrotranscriure'ls a cDNA segons el protocol de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) a una concentració estoc d'enzim de 200 U/µL, en un volum final de reacció de 20 µl.

Els productes de la retrotranscripció es van amplificar per la reacció en cadena de la polimerasa, PCR (Minicycler MJ Research) a partir de 2 µl de cDNA de cada teixit. Cada reacció de RT-PCR contenia a més del cDNA, 1 µl de cada encebador (10 µM, Bonsai technologies, figura I.1-1 i taula I.1-1), 2 µl de clorur de magnesi (Cl₂Mg, 50 mM, Biotools), 1 µl de dNTPs (10 mM, Biotools), 0,5 µl de dTT (1M, Invitrogen) i 2 unitats/µl de Taq DNA polimerasa (Biotools) amb 5µl del tampó específic per aquest enzim i la reacció es va ajustar a un volum final de 50 µl amb aigua tractada amb DEPC. Les condicions de la reacció de RT-PCR van ser:

35 cicles	{	<p>5 minuts a 95°C (desnaturalització)</p> <p>30 segons a 95°C (desnaturalització)</p> <p>30 segons a 55°C (temperatura d'aparellament dels encebadors)</p> <p>1 minut a 72°C (extensió)</p> <p>5 minuts a 72°C (extensió final)</p>
-----------	---	--

Totes les reaccions tenien un control negatiu (aigua tractada amb DEPC) i un control positiu (β-actina). Els encebadors utilitzats per aquesta amplificació són encebadors degenerats dissenyats a partir del domini d'unió a l'hormona (HBD) del receptor glucocorticoide (GR) utilitzats en altres espècies de peixos, concretament de la tilàpia, *Haplochromis burtoni* (Greenwood i col. 2003), la tilàpia de Moçambic, *Oreochromis mossambicus* (Tagawa i col. 1997) i la truita irisada, *Oncorhynchus mykiss* (Ducouret i col. 1995) (figura I.1-1 i taula I.1-1):

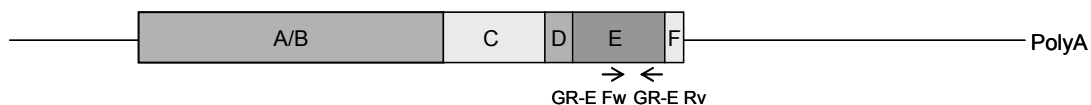


Figura I.1-1: Posició dels encebadors degenerats dissenyats a partir del domini d'unió a l'hormona (E) del receptor glucocorticoide (GR) utilitzats per a amplificar per RT-PCR el GR de la tilàpia (*Haplochromis burtoni*), la tilàpia de Moçambic (*Oreochromis mossambicus*) i la truita arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Fw: forward; Rv: reverse.

Encebadors	Composició de nucleòtids	T ^a
GR-E Fw	5' - AGTGCTCCTGGCTGTTYCTNATG- 3'	62,4°C
GR-E Rv	5' - TTTCGGTAATTGGTTGCTGATGAT- 3'	57,6°C

Taula I.1-1: Composició nucleotídica i temperatures d'aparellament específiques de cadascun dels encebadors utilitzats per a l'amplificació per RT-PCR per tal de caracteritzar el receptor glucocorticoide (GR) en l'orada (*Sparus aurata*). Fw: forward; Rv: reverse.

Els diferents productes de la reacció de RT-PCR es van fer córrer en un gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE tenyit amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 µg/ml (Sigma) i amb el marcador de DNA de 100 pb (Ready-LoadTM, Invitrogen).

4.2.1.3. C) Seqüenciació.

Les bandes de melsa, ronyó anterior, cor i fetge aconseguides en aquesta amplificació es van tallar del gel d'agarosa i es van purificar els DNAs fent servir un *kit* comercial (Perfectprep[®] Gel Cleanup kit, Eppendorf). Posteriorment, vam clonar independentment els fragments en un vector plasmídic, pGEM-T Easy (Promega), transformant cèl·lules competents de *Escherichia coli* de la soca DH5α (Invitrogen). Després es va purificar el DNA plasmídic alliberant-lo de les cèl·lules hostes de *E. coli* (Nucleospin[®] Plasmad Quickpure, Macherey-Nagel) i els inserts de DNA es van enviar a seqüenciar (Sistemas Genómicos, València) utilitzant els encebadors universals T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') i SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'). Els fragments seqüenciats es van analitzar amb un programa informàtic (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) per trobar homologia amb altres seqüències gèniques conegudes i comprovar la identitat dels fragments clonats. Els posteriors alineaments es van crear amb el programa informàtic *Clustalw* (1,82) *Multiple Sequence Alignment* a través del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

4.2.1.3. D) Rastreig de la llibreria (Screening).

El fragment de la reacció de RT-PCR de ronyó anterior d'aquesta amplificació es va utilitzar com a sonda per a rastrejar una llibreria de glàndula pituitària de la mateixa espècie, *S. aurata*, a la Universidade do Algarve (Faro, Portugal). Es va fer segons el protocol d'un *kit* comercial "cDNA synthesis kit, Zap-cDNA® synthesis kit, and Zap-cDNA® Gigapack III Gold cloning kit" (Stratagene):

D. 1. Preparació de les cèl·lules: A partir d'una colònia aïllada d'una placa de *E. coli* de la soca XL-1B-MRF' resistent a tetraciclina vam fer un cultiu tota la nit (*overnight*, o.n) de cèl·lules en 10 ml de tampó LB a 37°C amb agitació. El dia següent vam centrifugar el cultiu a 3000 r.p.m durant 5 minuts i es va resuspendre el sediment amb el mateix volum de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mM.

D. 2. Dilució de la genoteca i plaqueig: Vam diluir el banc de glàndula pituitària 10^{-3} vegades en el tampó SM per tenir 50.000 pfu/placa. Es van barrejar 20 μl de la llibreria diluïda amb 600 μl de les cèl·lules preparades en $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mM i ho vam incubar 15 minuts a 37°C per permetre que el fag penetrés a les cèl·lules. Paral·lelament es van preparar 10 ml/placa de top agar en tubs falcons de 15 ml a un bany de 49°C i es van col·locar les plaques quadrades de NZY agar a l'estufa de 37°C per evitar que es formessin grumolls en el moment de plaquejar. Passat el temps d'incubació es van barrejar les cèl·lules i els fags amb el top agar i es va plaquejar. Es van deixar créixer durant 7-8 hores a l'estufa de 37°C cap per avall i després es van mantenir a 4°C fins el dia següent.

D. 3. "Lifts": Es van preparar dues membranes de nitrocel·lulosa per placa. Es va col·locar la membrana a la placa, s'orientà (fent unes marques) i s'exposà durant dos minuts. Es va retirar la membrana i es va fer un bany de desnaturalització durant 5 minuts, seguit d'un bany de neutralització 5 minuts i d'un bany amb 6xSSC durant 5 minuts més. A la mateixa placa es col·locà després una segona membrana en la mateixa orientació que la primera i s'exposà durant 4 minuts abans de fer els banys. Després, les membranes es col·locaren sobre paper Whatmann i es van deixar assecar durant 2 hores al forn a 80°C. Vam afegir 1 μl de la sonda que utilitzaríem com un control positiu i 1 μl d'aigua DEPC com a control negatiu en membranes de nitrocel·lulosa que es deixaren assecar al forn directament sense passar per les solucions dels banys.

D.4. Preparació de la sonda, hibridació i exposició: Les membranes es van embolicar en unes xarxes i es van col·locar dins les botelles d'hibridació amb solució d'hibridació durant 1 h. Quan havien passat 30 minuts vam preparar la sonda radioactiva. La sonda es va generar a partir del fragment de ronyó anterior, corresponent al domini d'unió a la hormona aconseguit amb la reacció de RT-PCR. El vam fer monocatenari i el vam barrejar amb un preparat (kit Rediprime Tm II) que té tots els dNTP excepte el C que està marcat radioactivament amb ^{32}P . Es va afegir la sonda a la solució d'hibridació juntament amb tRNA que bloqueja les unions inespecífiques. Després es deixà hibridant tota la nit a 54°C al forn d'hibridació.

D. 5. Rentats i exposició: El dia següent es van fer els rentats per arrossegar el DNA que no estava hibridat amb la sonda. Per fer-los, es va anar disminuint cada vegada la concentració de sals de les solucions de rentat: 2xSSC/1%SDS 30 minuts, 1xSSC/1%SDS 30 minuts i 0,1xSSC/1%SDS 30 minuts. Posteriorment, vam col·locar les membranes dins un plàstic i vam posar la bossa amb les membranes dins una cassette amb una pel·lícula (a la cambra fosca). Es van deixar exposar a -80°C durant 2 dies. Va ser necessari fer un rastreig secundari agafant com a llibreria els nuclis (*cores*) que ens havia donat positiu en el primer rastreig. Es va fer servir el mateix protocol citat anteriorment per fer el rastreig secundari amb la única diferència que calia afegir cloroform per a desfer el nucli. Passat el temps d'exposició es va revelar la pel·lícula i vam comprovar els positius que es trobaven a les dues membranes. Després es podien localitzar a la placa perquè estaven marcades les orientacions.

D. 6. Seqüenciació (del rastreig): Els nuclis (*cores*) es van escindir de la placa seguint el protocol d'escisió del *kit* comercial "cDNA synthesis kit, Zap-cDNA® synthesis kit, and Zap-cDNA® Gigapack III Gold cloning kit" (Stratagene). Després es van dur a seqüenciar per *primer walking* amb els encebadors universals T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') i T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') (Macrogen Inc.,Seul, Corea del Sur).

4.2.2. RESULTATS.

S'estudià l'expressió del receptor glucocorticoide de cortisol (GR) de l'orada (*Sparus aurata*) en animals controls en diferents teixits: cor, fetge, melsa, pronefros (ronyó anterior), intestí, gònades, teixit adipòs, brànquia, cervell, ronyó (posterior) i múscul. La reacció de RT-PCR ens va donar un producte de 500 pb, comparat amb el marcador de pes molecular en tots els teixits analitzats (figura I.1-2).

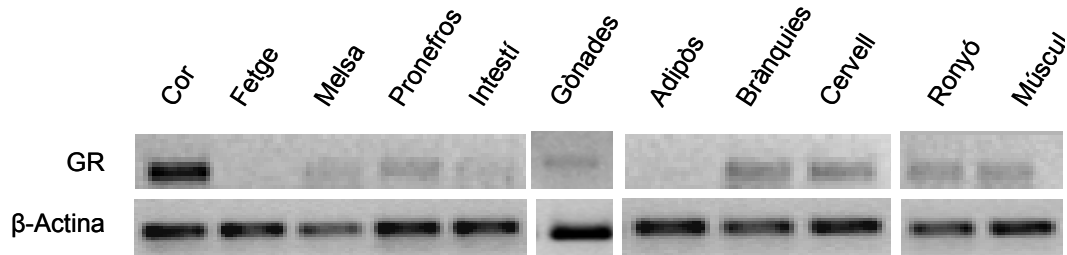


Figura I.1-2: Resultat de la reacció de RT-PCR realitzada en diferents teixits: cor, fetge, melsa, pronefros (ronyó anterior), intestí, gònades, teixit adipòs, brànquies, cervell, ronyó (posterior) i múscul en animals controls (n=5). Per cada teixit es mostra el receptor glucocorticoide de cortisol (GR) i el control positiu amb β-Actina.

La quantificació relativa dels nivells d'expressió del GR ponderada respecte el control positiu de β-actina mostra diferències entre teixits i suggereix que l'ordre, de major a menor, d'expressió del GR és: cor, cervell, múscul, brànquies, ronyó posterior, melsa, pronefros (HK), gònades, intestí i fetge (figura I.1-3).

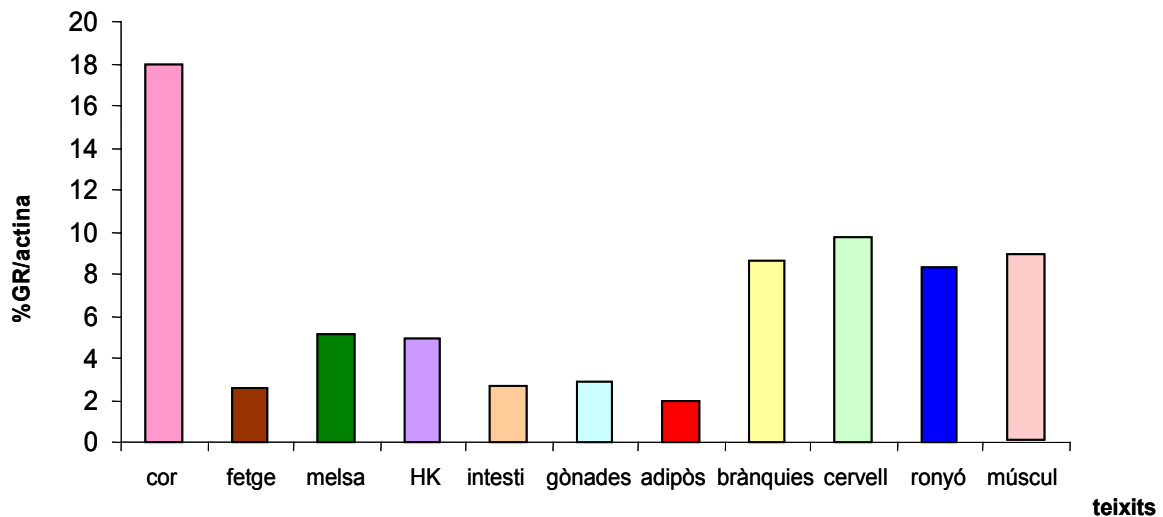


Figura I.1-3: Quantificació relativa per densitometria del GR respecte el seu control amb β-actina en els diferents teixits analitzats (cor, fetge, melsa, HK (*head kidney*, pronefros), intestí, gònades, teixit adipòs, brànquies, cervell, ronyó (posterior) i múscul en animals controls (n=5).

Es van seqüenciar les bandes de melsa, pronefros (HK, *head kidney*), cor i fetge d'aquest experiment i les vam analitzar amb un programa informàtic (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), posteriorment. Amb aquest anàlisi vam trobar que, efectivament, les nostres seqüències corresponien a un receptor de cortisol i mostraven elevada homologia ($\geq 81\%$) amb el receptor glucocorticoide (GR) de peixos però també mostraven homologia ($\geq 84\%$) amb el receptor mineralocorticoide (MR) de les espècies en les que s'ha estudiat. Malgrat aquestes elevades homologies amb ambdós receptors, si es comparava només el fragment d'orada amb el mateix fragment dels receptors de cortisol, l'homologia era més elevada amb el GR (dades no mostrades). Per tant, a partir d'ara anomenarem el receptor de cortisol d'orada com a receptor glucocorticoide (GR).

Fent alineaments d'aquestes seqüències entre sí vam comprovar que no hi havia especificitat de teixits perquè entre elles compartien una elevada similitud, $\geq 98\%$ en la seqüència nucleotídica (annex 2). Traduint les seqüències a proteïna, la similitud en la seqüència d'aminoàcids també era molt elevada, de $\geq 96\%$ (figura I.1-4 i annex 3).

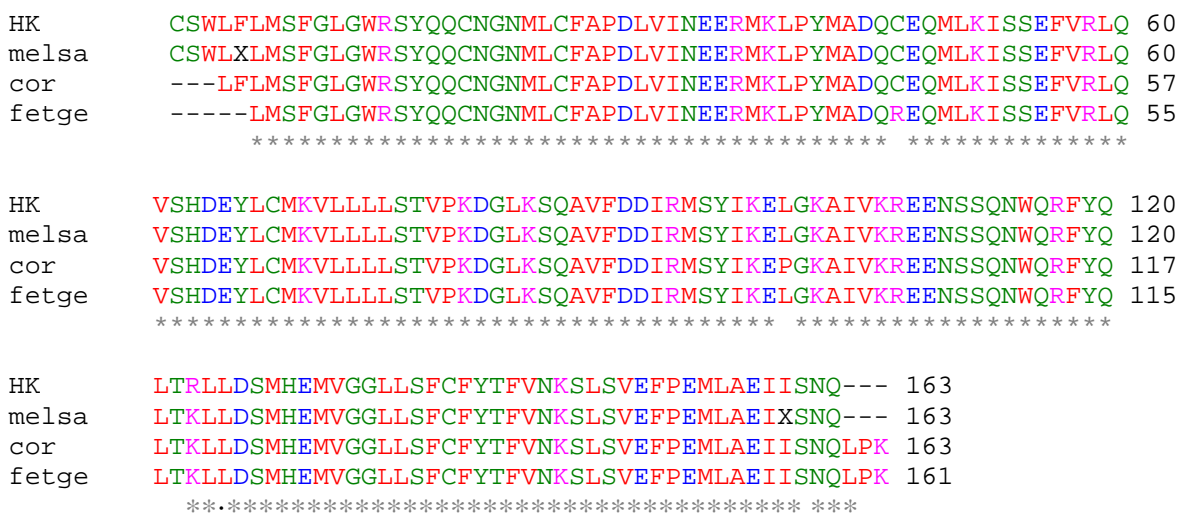


Figura I.1-4: Alineament entre les seqüències d'aminoàcids de melsa, ronyó anterior (HK), cor i fetge d'orada. Els nombres indiquen la longitud dels fragments seqüenciats i els asteriscos la similitud exacta entre ambdues seqüències.

Vam agafar únicament el fragment ronyó anterior (HK) d'orada (*Sparus aurata*) per fer alineaments amb el GR d'algunes espècies tant de peixos com de mamífers. Així doncs, per fer l'alineament es van escollir les seqüències de *Oncorhynchus mykiss* (truita irisada, [AAR87479](#)), *Haplochromis burtoni* (tilàpia, [AAM27887](#)), *Dicentrarchus labrax* (llobarro, [AAS48459](#)), *Saimiri sciureus* (mico, [AAK01303](#)), *Homo sapiens* (home, [U01351](#)), *Mus musculus* (ratolí, [XM_356093](#)), *Rattus norvegicus* (rata, [NM_013131](#)) (figura I.1-5).

Vam trobar que la nostra seqüència correspon precisament al domini d'unió a la hormona (HBD) del GR (figures I.1-5 i I.1-6) i mostrava elevada homologia amb la mateixa regió de GR de les espècies amb les que es va comparar (taula I.1-2).

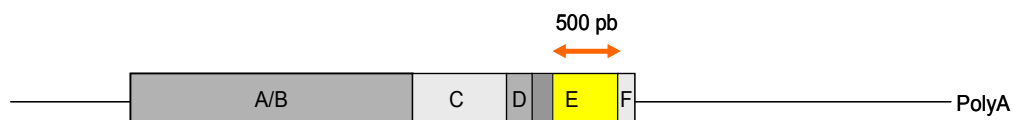


Figura I.1-6.: Representació esquemàtica del fragment de ronyó anterior d'orada (*Sparus aurata*) amplificat per RT-PCR corresponent al domini d'unió a la hormona (E) del receptor glucocorticoide (GR).

Espècie vs <i>Sparus aurata</i>	Score (%)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96,32
<i>Haplochromis burtoni</i>	94,48
<i>Dicentrarchus labrax</i>	87,73
<i>Saimiri sciureus</i>	74,23
<i>Homo sapiens</i>	74,23
<i>Mus musculus</i>	60,74
<i>Rattus norvegicus</i>	60,12

Taula I.1-2: Percentatge d'homologia entre el nostre fragment de receptor de glucocorticoides (GR) de ronyó anterior (HK) d'orada (*Sparus aurata*) i la seqüència del GR de *Oncorhynchus mykiss* (truita irisada), *Haplochromis burtoni* (tilàpia), *Dicentrarchus labrax* (llobarro), *Saimiri sciureus* (mico), *Homo sapiens* (home), *Mus musculus* (ratolí), *Rattus norvegicus* (rata).

El rastreig de la llibreria de cDNA de glàndula pituitària d'orada va donar resultats positius després de dues rondes consecutives. Es van localitzar i seqüenciar 10 d'aquests clons i vam comprovar que tots corresponien a la mateixa seqüència. La seqüenciació d'un d'aquests clons (clon 1) ens va donar dos fragments de GR no solapants de 717 i 886 pb respectivament, que sumaven 1603 pb. El segon fragment contenia la cua de poliadenilació (figures I.1-7 i annex 4):

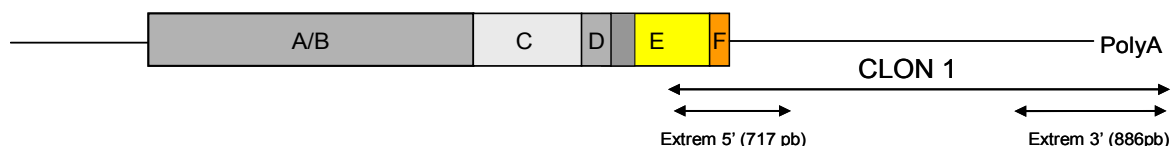


Figura I.1-7: Representació esquemàtica de la posició dels fragments seqüenciats del clon de receptor glucocorticoide (GR) d'orada (*Sparus aurata*) obtingut amb el rastreig de la llibreria de cDNA de glàndula pituitària d'orada (*Sparus aurata*).

4.2.3. DISCUSSIÓ.

Donat que els peixos no sintetitzen aldosterona, principal mineralocorticoide en mamífers, el cortisol és el principal corticosteroide. Per tant, assumeix i desencadena tant les respostes glucocorticoidees com les respostes mineralocorticoidees.

En el moment de començar l'estudi es creia que, en teleostis, les diferents accions del cortisol es duien a terme per un únic receptor de tipus II o glucocorticoide (GR). Estudis recents han demostrat que, almenys dues espècies de peixos, expressen també el receptor de tipus I o mineralocorticoide (MR) (Sturm i col. 2005; Greenwood i col. 2003; Sloman i col. 2001; Colombe i col. 2000) i que ambdós receptors competeixen per la unió amb el cortisol. De tota manera, els estudis amb el MR són molt preliminars perquè, malgrat s'ha identificat la seva existència, es desconeixen encara els mecanismes implicats en les funcions que desenvolupa. Per aquest motiu, juntament amb el fet que, fins el moment, no s'havia intentat clonar el receptor de cortisol en l'orada (*Sparus aurata*), vam centrar el nostre estudi en clonar el GR en aquesta espècie i determinar la seva expressió en diferents teixits. La reacció de RT-PCR ens va donar un producte en tots els teixits analitzats i es va identificar com a receptor de cortisol analitzant-los amb els receptors glucocorticoide i mineralocorticoide d'altres espècies de peixos (Sturm i col. 2005; Terova i col. 2005; Bury i col. 2003; Greenwood i col. 2003; Ducouret i col. 1995; Tokuda nº accés [AB013444](#)). Com hem assenyalat prèviament, fins el moment, només s'havia determinat l'existència del MR a la truita irisada (*O. mykiss*) (Sturm i col. 2005) i a la tilàpia (*H. burtoni*) (Greenwood i col. 2003) i com que, a més, els nostres fragments mostraven major homologia amb el GR, vam suposar que el receptor de cortisol que nosaltres havíem trobat corresponia, més probablement, al receptor glucocorticoide d'orada.

Tot i que es va trobar el GR expressat a tots els teixits, la quantificació relativa dels nivells d'expressió del GR ponderada respecte el control positiu mostrava diferències d'expressió entre teixits. És interessant el fet de trobar nivells d'expressió del GR més elevats en òrgans claus pels teleostis: el cor i el múscul (importants per afrontar una situació d'alarma o estrès), el cervell (organitzador de respostes homeostàtiques), el ronyó posterior (òrgan amb funcions de filtració, osmoregulació i excreció) o la brànquia (regulador respiratori i osmòtic, i barrera externa enfront patògens externs).

Aquestes diferències en l'expressió del GR en funció del teixit que nosaltres vam trobar en aquest estudi concorden amb estudis previs. Així, la tilàpia (*H. burtoni*), que expressa més d'un receptor, mostra una distribució diferencial de cadascun dels diferents receptors en funció del teixit (Greenwood i col. 2003). Per exemple, el MR és dominant a cervell; a la majoria de teixits el GR2 està més expressat que el GR1, amb valors més elevats a cor, fetge i melsa; en canvi, a ronyó anterior l'expressió és baixa per tots tres receptors, mentre que a les brànquies s'expressen d'una manera equitativa. A la tilàpia de Moçambic (*Oreochromis mossambicus*) (Tagawa i col. 1997)

l'expressió del GR1 és elevada a les cèl·lules sanguínies, a les brànquies i a la melsa, moderada a cervell, cor i múscul i dèbil a fetge.

La finalitat d'aquest experiment amb el receptor glucocorticoide de cortisol de l'orada (*S. aurata*) era, en primer lloc, caracteritzar-lo, i després, identificar si estava present o no en els diferents teixits de l'orada. En definitiva, preteníem donar una informació més aviat qualitativa, més que comparar quantitativament els nivells d'expressió del receptor respecte el gen control. No obstant, seria interessant estudiar la resposta en l'expressió del GR en diferents teixits en diferents situacions estressants per a descobrir on està actuant la hormona un cop alliberada i quins són els principals teixits implicats en relació a l'estrès aplicat.

El fragment de GR d'orada (*S. aurata*) que hem aconseguit amb aquest experiment correspon al domini d'unió a la hormona (HBD o E), regió molt conservada entre els receptors nuclears. Aquesta homologia es manté entre espècies molt separades evolutivament, ja que entre el GR d'orada i l'humà, per exemple, trobem un 74,23% d'homologia en les seqüències d'aminoàcids (taula I.1-2). L'homologia en aquesta regió augmenta quan la comparem amb espècies de peixos, 87,73% amb el llobarro (*D. labrax*), 94,59% amb la tilàpia (*H. burtoni*) o 96,32% amb la truita irisada (*O. mykiss*). Aquesta primera aproximació amb el GR de l'orada ens indicava la importància evolutiva de conservar aquest domini funcional en l'estructura del receptor.

Amb el rastreig de la llibreria de glàndula pituitària d'orada vam aconseguir un clon del receptor glucocorticoide d'aproximadament 2,5 Kb, que corresponia majoritàriament a l'extrem 3'UTR. Si tenim en compte que calia sumar encara la regió codificant i que, a més, en altres espècies de teleostis, la proteïna fa entre 758 aa (2274 pb) i 818 aa (2454 pb) (GR1 d'*O. mykiss* i *D. labrax*, respectivament) (Terova 2005 [AY549305](#); Bury i col. 2003; Greenwood i col. 2003; Tokuda 1998 n° accés [AB013444](#); Tagawa i col. 1997; Ducouret i col 1995), la mida del GR de l'orada podria ser bastant gran.

Finalment, donat que teníem la cua de poliadenilació a l'extrem 3', calia dirigir la nostra investigació en aconseguir la seqüència sencera cap a l'extrem 5', fent RT-PCRs amb encebadors específics (experiment 2).

4.3. EXPERIMENT 2: Clonatge del receptor glucocorticoide (GR) d'orada (*Sparus aurata*) (segona part).

4.3.1. MATERIALS I MÈTODES.

4.3.1.1. Animals experimentals. Disseny de l'experiment.

Per realitzar l'estudi vam obtenir aproximadament 230 orades sexualment immadures (*Sparus aurata*) de $65,55 \pm 3,22$ g de pes corporal de la piscifactoria Granja Marina del Masnou (Masnou, Barcelona). Els peixos es van transportar fins les instal·lacions de la Universitat Autònoma de Barcelona on es van establir a una densitat de manteniment de 8 kg/m^3 en dos tancs circulars de fibra de vidre. Aquests tancs tenen una capacitat total de 1000 L i el sistema tancat de circulació d'aigua manté un flux constant a 3000 L/h; a més, estan equipats amb filtres físics i biològics independents que neutralitzen els residus amoniacals generats pel propi metabolisme de l'animal. Els tancs estan parcialment coberts amb xarxes fosques i sota un fotoperíode constant de 12 h L: 12 h D (començant a les 7 h). Es van mantenir en aquestes condicions d'aclimatació durant dues setmanes.

Posteriorment, es van distribuir 40 peixos en quatre tancs experimentals circulars de fibra de vidre de 600 L (10 peixos/tanc) mantenint una densitat d'aclimatació no estressant de 6 kg/m^3 durant dues setmanes més. Cada tanc estava equipat amb bombes submergibles (SP-6600, Xina) que mantenen el sistema de circulació d'aigua tancat, fent passar l'aigua a un flux constant de 2800 L/h a través d'un biofiltre que també conté bacteris nitrificants per neutralitzar els efectes tòxics dels residus amoniacals. Aquests tancs experimentals també estaven parcialment coberts amb xarxes fosques i es va mantenir el mateix fotoperíode de 12 h L: 12 h D.

Passat el temps d'adaptació, es va aplicar un estrès agut en els animals de dos tancs injectant intraperitonealment (i.p.) $400 \mu\text{l}$ d'endotoxina (LPS d'*Escherichia coli* O26:B6, Sigma) a una concentració de 8 mg/kg (condicions de reconstitució al capítol II, experiment 1). Els animals dels altres dos tancs van servir com a control, injectant també intraperitonealment, el mateix volum de solució salina estèril. Els temps de mostreig per l'extracció de mostres en aquest estudi van ser 2 i 6 hores pels animals control i 6, 12, 24 i 72 hores pels animals estressats amb LPS.

Durant el període d'aclimatació i durant l'experiment els nivells d'amoni es van mantenir entre valors de 0,001 a $0,137 \text{ mg/L}$, els nivells de nitrit entre 0,013 i $0,163 \text{ mg/L}$ i el rang de pH entre 7,62 i 7,80. El rang de la temperatura de l'aigua va oscil·lar entre $16\text{-}19 \text{ }^\circ\text{C}$ i la salinitat entre el 35-38‰. Els peixos s'alimentaven cada dos dies amb una dieta comercial (INVE Technologies NV, Baasrode, Bèlgica) aproximadament a una dosi de manteniment de 0,5% del pes corporal/dia, fins a les 24 h prèvies al començament dels experiments perquè els períodes de menja podrien interferir en les nostres mesures.

4.3.1.2. Obtenció de mostres.

Vam utilitzar quatre peixos per grup i mostreig (n=4) per extreure'ls-hi els teixits escollits: cervell, brànquies, ronyó anterior, melsa, fetge i intestí (anterior i posterior).

Els peixos es van anestesiari amb 2-fenoxietanol (Sigma) a una concentració no letal (0,75 ml/L) en el moment de fer la injecció intraperitoneal de LPS o de solució salina i es van sacrificar per concusió craneal abans de començar la dissecció dels teixits corresponents. Un cop extrets els teixits, es congelaren immediatament en nitrogen líquid i s'emmagatzemaren a -80°C fins el moment de l'extracció de RNA.

4.3.1.3. Tècniques analítiques.

4.3.1.3. A) Extracció de RNA.

Les extraccions de RNA total dels diferents teixits es van fer, de manera independent, utilitzant un mètode de purificació estandaritzat per la casa comercial (Molecular Center Research, M.C.R.). El protocol consisteix en homogeneïtzar els teixits en 1 ml de tri-reagent (M.C.R.) per cada 100 mg de teixit. Després, la fase d'extracció es va fer amb cloroform (Sigma), es va precipitar amb isopropanol (Sigma) i es rentà el precipitat amb etanol (Scharlau) al 75%. Les mostres es van dissoldre amb aigua tractada amb DEPC i la concentració es va mesurar i calcular per espectrofotometria (Biomate™ 3 Series Spectrophotometers, Thermo Spectronic).

Per comprovar l'estat dels RNAs, es van fer electroforesis en gels d'agarosa a l'1% en tampó MOPS i amb el marcador de pes molecular (0,24-9,5 Kb RNA ladder, Invitrogen).

4.3.1.3. B) Reaccions de RT-PCR.

B.1. La seqüenciació del clon rastrejat amb la llibreria de glàndula pituitària (experiment 1, apartat 4.2) ens va permetre dissenyar una parella d'encebadors específics (figura I.2-1) per a obtenir la seqüència entre els dos fragments del clon seqüenciats i aconseguir així la seqüència completa del clon rastrejat.

Per aquesta reacció de PCR vam utilitzar 5 µg de RNA de cervell d'animals estimulats per injecció intraperitoneal amb 8 mg/kg de LPS 12 hores després de la infecció i de melsa d'animals controls 6 hores després de la injecció salina, per retrotranscriure'ls a cDNA segons el protocol de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) a una concentració estoc d'enzim de 200 U/µL en un volum final de reacció de 20 µl.

Els productes de la retrotranscripció es van amplificar per RT-PCR (Minicycler MJ Research) a partir de 2 µl de cDNA del teixit. Cada reacció de PCR contenia a més del cDNA, 1 µl de cada encebador (10 µM, Bonsai technologies, figura I.2-1 i taula I.2-1), 2 µl de clorur de magnesi (Cl₂Mg,

50 mM, Biotools), 1 µl de dNTPs (10 mM, Biotools), 0,5 µl de dTT (1M, Invitrogen) i 2 unitats/µl de Taq DNA polimerasa (Biotools) amb 5µl del tampó específic per aquest enzim i la reacció es va ajustar a un volum final de 50 µl amb aigua tractada amb DEPC. Les condicions de la reacció de PCR van ser les mateixes que per l'amplificació anterior:

35 cicles {

- 5 minuts a 95°C (desnaturalització)
- 30 segons a 95°C (desnaturalització)
- 30 segons a 55°C (temperatura d'aparellament dels encebadors)
- 1 minut a 72°C (extensió)
- 5 minuts a 72°C (extensió final)



Figura I.2-1: Posició dels encebadors específics dissenyats a partir del clon rastrejat amb la llibreria de cDNA de pituitària d'orada (experiment 1, apartat 4.2), per tal de completar la seqüència del clon de receptor glucocorticoide. Fw: forward; Rv: reverse.

Totes les reaccions tenien un control negatiu (aigua tractada amb DEPC) i un control positiu (β-actina). Les temperatures d'aparellament eren específiques per a cada parella d'encebadors (taula I.2-1):

Encebadors	Composició de nucleòtids	T ^a
GR-frag Fw	5' -GTTTGTTGGCTCTGAATGTCTCG- 3'	60,6°C
GR-frag Rv	5' -GGA ACTCTAAAGATGTTGCGATAACG- 3'	61,6°C

Taula I.2-1: Composició nucleotídica i temperatures d'aparellament específiques dels encebadors utilitzats per RT-PCR per completar la seqüenciació del clon receptor glucocorticoide (GR) de l'orada (*Sparus aurata*) rastrejat amb la llibreria de cDNA de pituitària de la mateixa espècie. Fw: forward; Rv: reverse.

B.2. Posteriorment, vam dissenyar un altre encebador al domini d'unió al DNA (C) i juntament amb el primer encebador revers degenerat utilitzat a l'experiment 1 (GRE-Rv) corresponent al domini d'unió a la hormona (E), vam intentar obtenir un tros més de seqüència del GR (figures I.1-1 i I.2-2, taules I.1-1 i I.2-2). Vam utilitzar 5 µg de RNA de cervell i ronyó anterior d'animals control mostrejats 6 hores després de la injecció salina per retrotranscriure'ls a cDNA segons el protocol de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) a una concentració estoc d'enzim de 200 U/µL en un volum final de reacció de 20 µL.

Els productes de la retrotranscripció es van amplificar per RT-PCR (Minicycler MJ Research) a partir de 2 µL de cDNA del teixit. Cada reacció de PCR contenia a més del cDNA, 1 µL de cada encebador (10 µM, figura I. 2-2 i taula I.2-2), 2 µL de clorur de magnesi (Cl₂Mg, 50 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de dTT (1M) i 2 unitats/µL de Taq DNA polimerasa (Biotools) amb 5µL del tampó específic per aquest enzim i la reacció es va ajustar a un volum final de 50 µL amb aigua tractada amb DEPC. Les condicions de la reacció de PCR van ser les mateixes que per l'amplificació anterior excepte en la temperatura d'aparellament dels encebadors:

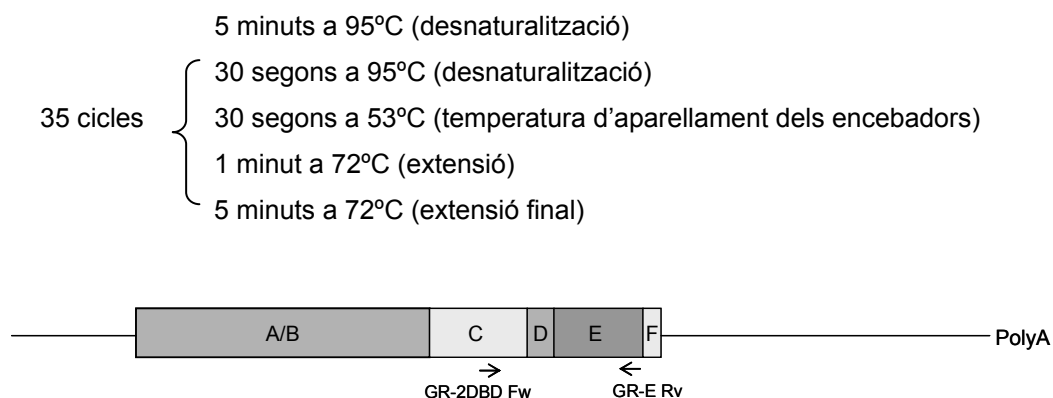


Figura I.2-2: Posició de l'encebador específic dissenyat al domini d'unió al DNA (C) i l'encebador degenerat dissenyat al domini d'unió a la hormona (E). Fw: forward; Rv: reverse.

Totes les reaccions tenien un control negatiu (aigua tractada amb DEPC) i un control positiu (β-actina). Les temperatures d'aparellament eren específiques per a cada parella d'encebadors (figura I.2-2 i taula I.2-2).

Encebadors	Composició de nucleòtids	T ^a
GR- 2 DBD Fw	5' -GCTGCAAGGTGTTCTTCAAGAG- 3'	60,3°C
GR-E Rv	5' -TTTCGGTAATTGGTTGCTGATGAT- 3'	57,6°C

Taula I.2-2: Composició nucleotídica i temperatures d'aparellament dels encebadors utilitzats per la reacció de RT-PCR per obtenir la seqüència entre el domini d'unió al DNA (C) i el domini d'unió a la hormona (E) del receptor glucocorticoide (GR) de l'orada (*Sparus aurata*). Fw: forward; Rv: reverse.

B.3. Finalment, vam dissenyar un encebador degenerat a l'inici de la regió codificant, és a dir, a la primera Metionina, i juntament amb el primer encebador degenerat utilitzat a l'experiment 1 (GRE-Rv) vam intentar obtenir la seqüència completa del GR, si més no la regió codificant. En aquest estudi, va ser necessari fer servir posteriorment un encebador més intern (dues PCRs) (figures I.2-2 i I.2-3, taules I.2-2 i I.2-3).

En aquest cas, a partir de RNA de fetge (0,92 mg) d'animals controls vam purificar poliA (Promega) i el vam retrotranscriure a cDNA segons el protocol de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) a una concentració estoc d'enzim de 200 U/ μ L en un volum final de reacció de 20 μ L.

El producte de la retrotranscripció es va amplificar per RT-PCR (Minicycler MJ Research) a partir de 2 μ L de cDNA del teixit. Cada reacció de PCR contenia 2 μ L de cDNA, 1 μ L de cada encebador (10 μ M, figura I.2-3 i taula I.2-3, GRE-Rv), 2 μ L de clorur de magnesi (Cl_2Mg , 50 mM), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 0,5 μ L de dTT (1M) i 2 unitats/ μ L de Taq DNA polimerasa (Biotools) amb 5 μ L del tampó específic per aquest enzim i la reacció es va ajustar a un volum final de 50 μ L amb aigua tractada amb DEPC. Les condicions de la reacció de PCR van ser diferents a les anteriors en la temperatura i en el temps d'extensió:

	5 minuts a 95°C (desnaturalització)	
35 cicles	{	30 segons a 95°C (desnaturalització)
		30 segons a 52°C (temperatura d'aparellament dels encebadors)
		4 minuts a 72°C (extensió)
		5 minuts a 72°C (extensió final)

Sobre el producte d'aquesta amplificació es va fer una segona amplificació amb un encebador més intern (2DBD Rv, figura I.2-3 i taula I.2-3) i les següents condicions d'amplificació:

	5 minuts a 95°C (desnaturalització)	
35 cicles	{	30 segons a 95°C (desnaturalització)
		30 segons a 53°C (temperatura d'aparellament dels encebadors)
		3 minuts a 72°C (extensió)
		5 minuts a 72°C (extensió final)

Totes les reaccions tenien un control negatiu (aigua tractada amb DEPC) i un control positiu (β -actina). Les temperatures d'aparellament eren específiques per a cada parella d'encebadors (figura I.2-3 i taula I.2-3).

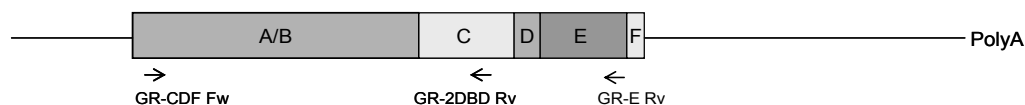


Figura I.2-3: Posició de l'encebador degenerat dissenyat a la regió codificant (A/B) i dels encebadors específics dissenyats als dominis d'unió al DNA (C) i a la hormona (E). Fw: forward; Rv: reverse.

Encebadors	Composició de nucleòtids	T ^a
GR-CDF Fw	5' -ATGGATCMRGGTGGACTGAAR- 3'	58,8 °C
GR- 2 DBD Rv	5' -CTCTTGAAGAACACCTTGCAGC- 3'	60,3°C
GR-E Rv	5' -TTTCGGTAATTGGTTGCTGATGAT- 3'	57,6°C

Taula I.2-3: Composició nucleotídica i temperatures d'aparellament específiques dels encebadors utilitzats per la reacció de RT-PCR per a obtenir la seqüència codificant sencera del GR de l'orada (*Sparus aurata*). Fw: forward; Rv: reverse.

Els productes de les diferents reaccions de RT-PCR es van fer córrer en un gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE tenyit amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 µg/ml (Sigma) i amb el marcador de DNA de 1 Kb (Ready-LoadTM, Invitrogen).

4.3.1.3. C) Seqüenciació.

Les bandes amplificades aconseguides de cervell (B.1.), de ronyó anterior (B.2.) i de fetge (B.3.) es van tallar del gel d'agarosa i es van purificar els DNAs fent servir un kit (Perfectprep[®] Gel Cleanup kit, Eppendorf). Posteriorment, vam clonar independentment els fragments en un vector plasmídic, pGEM-T Easy (Promega), transformant cèl·lules competents de *E. coli* de la soca DH5α (Invitrogen). Després es va purificar el DNA plasmídic alliberant-lo de les cèl·lules hostes de *E. coli* (Nucleospin[®] Plasmad Quickpure, Macherey-Nagel) i els inserts de DNA es van seqüenciar (Sistemas Genòmics, València) utilitzant els encebadors universals T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') i SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3').

Els fragments seqüenciats de cervell, de ronyó i de fetge es van analitzar per trobar homologia amb altres seqüències gèniques conegudes i comprovar la identitat dels fragments clonats (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Els posteriors alineaments i els arbres filogenètics es van crear amb el *Clustalw* (1,82) *Multiple Sequence Alignment* a través del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) i els arbres filogenètics amb els programes ClustalX 1,83 i *treeview* (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

4.3.1.3. D) Northern blot anàlisi.

El producte de ronyó anterior (B.2.) del receptor glucocorticoide de l'orada (sbGR) es va clonar en un vector pGEM-T Easy, com hem descrit prèviament (apartat C). Posteriorment, aquest producte es va marcar per RT-PCR amb biotina amb un *kit* comercial (detector PCR DNA biotinylation kit, KPL) per fer servir com a sonda per a l'assaig del northern.

El RNA total (10 µg) de ronyó anterior (HK, *head kidney*), cor (Ht, *heart*) i intestí (I) de l'experiment 1 es van fer córrer en un gel de formaldehid/ agarosa a l'1%, es va transferir a una membrana de niló (*nylon*, Schleicher & Schuell) tota la nit i es a fixar amb un "crosslinker". El tampó d'hibridació es va desnaturalitzar amb timus de vedella (a una concentració de 0,1 mg/ml) a 42°C durant 3 hores abans d'afegir la sonda. Vam utilitzar 35 µl de la sonda de sbGR (984 pb), o 20 µl de la sonda usada com a control positiu de sb18S (300 pb). El cDNA marcat amb biotina, es va desnaturalitzar prèviament a 95°C durant 10 minuts i la membrana es va hibridar tota la nit a 42°C. Es van fer dos rentats de 30 minuts a temperatura ambient amb 2X SSPE/0,5% SDS, dos rentats de 30 minuts a 55°C amb 0,2X SSPE/0,5% SDS i un rentat de 5 minuts a temperatura ambient amb 1X SSPE. El protocol de detecció del northern consistia en: rentar el filtre amb solució bloquejant del detector (*detector block solution*, KPL) a temperatura ambient durant 45 minuts, rentar-lo amb solució estreptavidina fosfatasa marcada (*phosphatase-labeled Streptavidin*, AP-SA, KPL) a temperatura ambient durant 30 minuts, fer 3 rentats de 5 minuts amb solució de rentat de fosfatasa (*phosphatase wash solution*, KPL) a temperatura ambient, fer dos rentats de 2 minuts amb tampó d'assaig fosfatasa (*phosphatase assay buffer*, KPL) a temperatura ambient i per últim, incubar-lo 5 minuts a temperatura ambient amb substrat quimioluminiscent CDP-Star. Finalment, vam revelar el filtre manualment.

4.3.2. RESULTATS.

La seqüenciació del clon rastrejat amb la llibreria de cDNA de glàndula pituitària d'orada ens va donar dos fragments corresponents als extrems 5' i 3' del clon (figures I.1-7 i I.1-8, experiment 1). El clon obtingut amb el rastreig de la llibreria es va comprovar que feia aproximadament 2,5 kb, per tant, sabíem que entre els fragments seqüenciats quedava un tros per seqüenciar d'aproximadament 1 kb.

L'amplificació (B.1.) ens va donar un fragment de 1061 pb que se solapava 54 pb amb l'extrem 3' del producte 5'GR-clon 1 (717 pb) i 49 pb amb l'extrem 5' del producte 3'GR-clon 1 (886 pb). Per tant, fent construcció per *contig*, la seqüència completa del clon rastrejat amb la llibreria (clon 1) feia 2561 pb, de les quals 2233 pb corresponien a l'extrem 3'-UTR (figura I.2-4, annex 5).

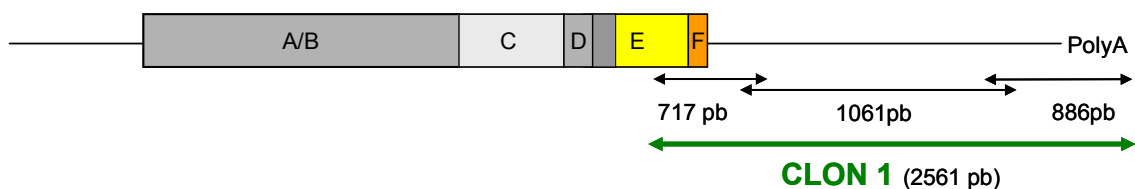


Figura I.2-4: Representació esquemàtica del clon 1 (2561 pb) obtingut amb el rastreig de la llibreria de cDNA de pituitària d'orada (*Sparus aurata*). La seqüència dels extrems del clon es van obtenir directament i el fragment entre ells per RT-PCR.

La segona amplificació d'aquest experiment (B.2.) ens va donar un fragment de 974 pb (clon 2, figura I.2-5, annex 5), que corresponen a una part del Domini d'Unió al DNA i al Domini d'Unió a la Hormona (C i E, respectivament). Aquest clon se solapava, per l'extrem carboxiterminal, amb el clon 1 (figura I.2-5):

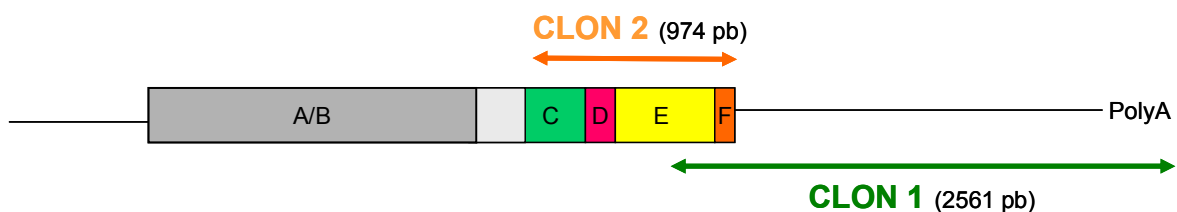


Figura I.2-5: Representació esquemàtica dels clon 2 (974 pb), obtingut per RT-PCR, i el clon 1 (2561 pb), del rastreig de la llibreria de glàndula pituitària d'orada (*Sparus aurata*). Corresponen a una part del domini d'unió al DNA (C) i al domini d'unió a la hormona (E).

La darrera amplificació (B.3) ens va donar un fragment de 1358 pb que correspon a l'inici de la regió codificant i solapava, per l'extrem carboxiterminal amb el clon 2 (figura I.2-6, annex 5).

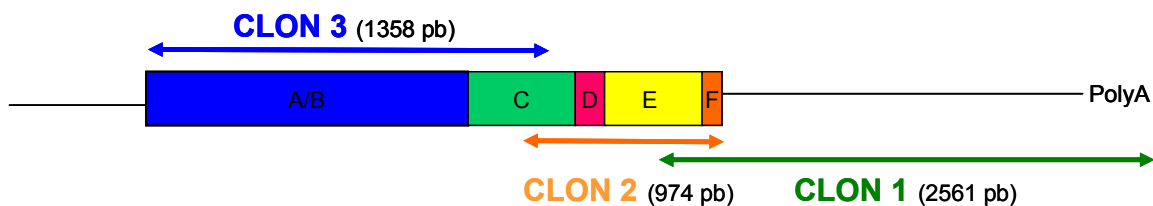


Figura I.2-6: Representació esquemàtica del clon 3 (1358 pb), obtingut per RT-PCR. També es representen els clon 2 (974 pb) i clon 1 (2561 pb) trobats amb ampliacions anteriors.

Fent construcció per *contig* dels tres clons seqüenciats, la seqüència obtinguda del receptor glucocorticoide de l'orada feia 4586 pb, des de la primera metionina fins la cua de poliA (annex 5). La regió codificant constava de 2352 pb i l'extrem 3'UTR de 2234 pb començant en el nucleòtid 2353 d'aquesta seqüència. La senyal de poliadenilació (AAUAAA) començava en el nucleòtid 4530 de la nostra seqüència d'orada i 33 nucleòtids després es trobava la cua de poliA. Es traduïa en una proteïna de 784 aa (nombre d'accés [DQ486890](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ486890), annex 6) amb un pes molecular predit de 86 kilodaltons (kDa).

Per acabar de confirmar que el receptor corticosteroide trobat en l'orada era glucocorticoide i no mineralocorticoide es va comparar amb els diferents receptors corticosteroides trobats en peixos. El receptor trobat en l'orada s'agrupava amb el grup de receptor glucocorticoide de cortisol (figura I.2-7).

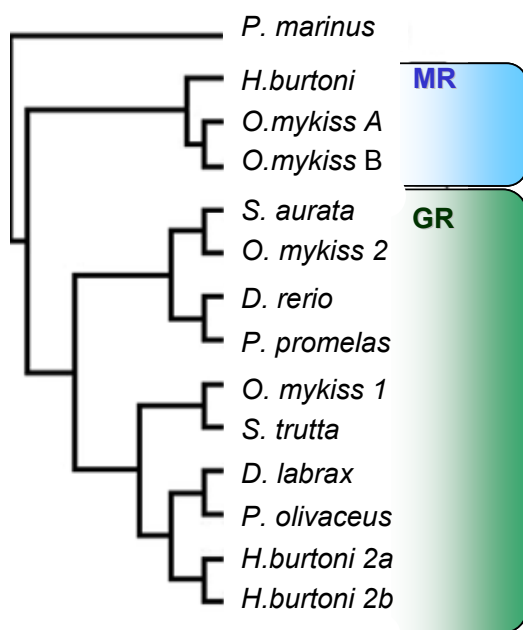


Figura I.2-7: Cladograma dels receptors de cortisol, glucocorticoide (GR) i mineralocorticoide (MR), de diferents espècies de peixos: *Petromyzon marinus* (lamprea marina), *Haplochromis burtoni* (tilàpia), *Oncorhynchus mykiss* (truita irisada), *Sparus aurata* (orada), *Danio rerio* (peix zebra), *Pimephales promelas* (peix gat dels canals), *Salmo trutta* (truita comú), *Dicentrarchus labrax* (llobarro) i *Paralichthys olivaceus* (fals halibut de Japó).

L'alineament de la seqüència d'aminoàcids (aa) de la proteïna de GR d'orada amb el mateix receptor d'altres espècies de peixos i altres vertebrats superiors mostrava elevada homologia en el domini d'unió al DNA, DBD ($\geq 92\%$, annex 7). La seqüència del GR d'orada feia 69 aa, i es podien identificar clarament els dos anells de Zinc (33 i 36 aa, respectivament). En l'orada però, no es troben els 9 aa addicionals (WRARQNTDG) entre els dos anells de Zinc del DBD trobats en quatre espècies de peixos, concretament a: llobarro, *Dicentrarchus labrax* (Terova i col. 2005), fals halibut de Japó, *Paralichthys olivaceus* (Tokuda 1998, [AB013444](#)), GR2b de tilàpia, *Haplochromis burtoni*, (Greenwood i col. 2003) i al GR1 de truita irisada, *Oncorhynchus mykiss* (Ducouret i col. 1995) ni els 5 aa extres del GR2 de *O.mykiss* (Bury i col. 2003).

L'alineament de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna de GR d'orada amb el mateix receptor d'altres espècies de peixos i altres vertebrats superiors també mostrava elevada homologia en el domini d'unió a la hormona, HBD ($\geq 89\%$ amb peixos, essent més baix amb el peix primitiu, i $\geq 69\%$ amb aus, anfibis o mamífers, annex 7). Aquesta regió en l'orada estava formada per 251 aa.

El percentatge d'homologia disminueix si ens fixàvem en la seqüència sencera, considerant també els dominis no conservats ($\geq 48\%$ amb peixos, $\geq 42\%$ amb aus, anfibis i mamífers, annex 7).

Una comparació evolutiva del GR d'orada amb el d'altres espècies de vertebrats mostrava clarament dos grups diferenciats, a partir de l'ancestre primitiu escollit, amb una branca pels peixos i un altre per la resta de vertebrats analitzats (figura I.2-8).

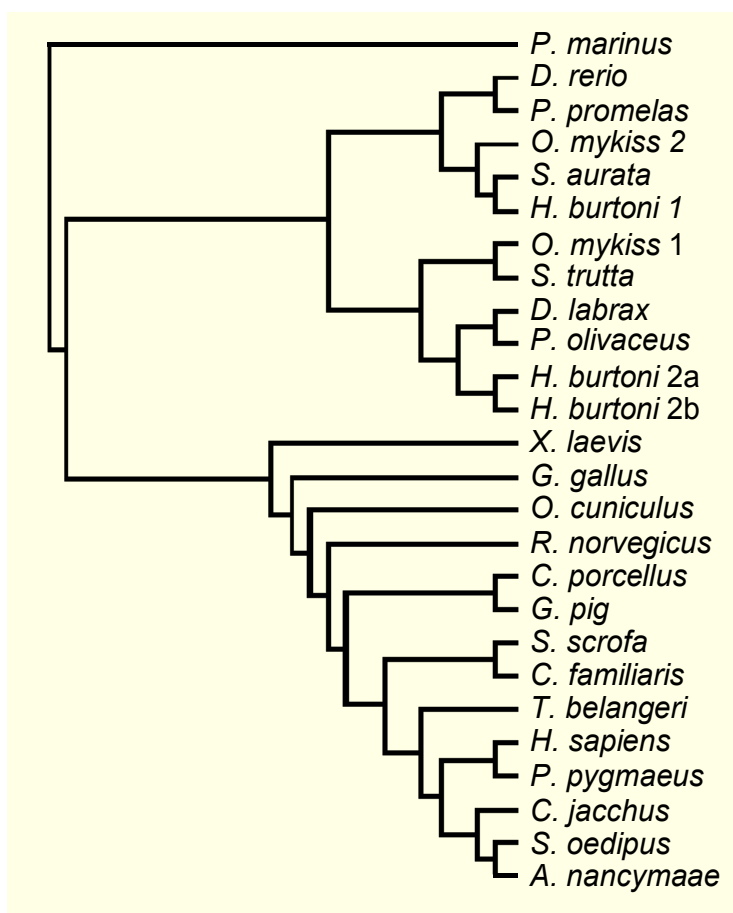


Figura I.2-8: Cladograma del receptor glucocorticoide de diferents espècies de vertebrats superiors incloent un peix primitiu com ancestre (*Petromyzon marinus*, lamprea marina): *Sparus aurata* (orada), *Oncorhynchus mykiss* (truita irisada), *Danio rerio* (peix zebra), *Pimephales promelas* (peix gat dels canals), *Salmo trutta* (truita comú), *Dicentrarchus labrax* (llobarro) i *Paralichthys olivaceus* (fals halibut de Japó), *Haplochromis burtoni* (tilàpia), *Xenopus laevis* (granota), *Gallus gallus* (gall), *Oryctolagus cuniculus* (conill), *Cavia porcellus* (conillet d'Índies), *Guinea pig* (porc), *Sus scrofa* (porc senglar), *Canis familiaris* (gos), *Tupaia belangeri* (esquirol), *Pongo pygmaeus*, *Saguinus oedipus*, *Aotus nancymaeae*, *Callithrix jacchus* (espècies de micos) *Rattus norvegicus* (rata), i *Homo sapiens* (home),

Amb la tècnica del northern blot volíem comprovar quant tros de seqüència del GR ens faltava cap a l'extrem 5'. Vam trobar una banda d'aproximadament 6,5 Kb, comparat amb el marcador de pes molecular, en els tres teixits analitzats (figura I.2-8). Per tant, si teníem seqüenciats 4586 pb, ens faltaven aproximadament 2 Kb més de l'extrem 5'-UTR del GR de l'orada.

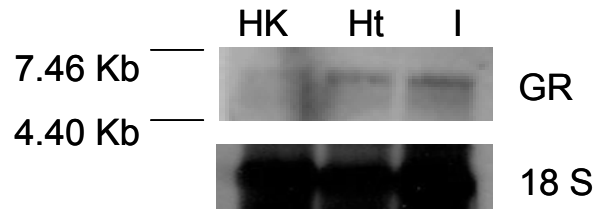


Figura I.2-8: Northern blot anàlisi de 10 µg de RNA total extret a partir de ronyó anterior (HK), cor (Ht) i intestí (I) d'orada (*Sparus aurata*). El temps d'exposició va ser de 10 minuts. La sonda pel receptor glucocorticoide de l'orada (sbGR) es va generar per RT-PCR amb encebadors específics dissenyats als dominis d'unió al DNA i d'unió a la hormona, DBD and HBD respectivament (taula I-2.2). Es va utilitzar una sonda de 18S com a control de càrrega de RNA a cada línia.

4.3.3. DISCUSSIÓ.

En el nostre laboratori, s'ha identificat per primera vegada un fragment del receptor glucocorticoide (GR) de l'orada (*Sparus aurata*) ([DQ486890](#)) i s'ha observat que es troba expressat a tots teixits analitzats, pràcticament de manera ubiqua (capítol I, experiment 1). No obstant, només una petita part del GR clonat corresponia a la regió codificant, i corresponia concretament al domini d'unió a la hormona, és a dir, al final de la proteïna. Era necessari continuar les investigacions en l'altra direcció per aconseguir la seqüència completa del GR de l'orada. Amb aquest segon treball es va obtenir la regió codificant, i en definitiva, la seqüència completa de la proteïna.

Vam comprovar prèviament que no hi havia especificitat de teixit (capítol I, experiment 1) i, amb aquest experiment, tampoc es van trobar diferències entre les seqüències del GR d'animals controls amb les seqüències d'animals en els quals s'havia aplicat una injecció de LPS (capítol I, experiment 2). Per tant, totes les seqüències que es van anar aconseguint corresponents al receptor glucocorticoide de l'orada, es van juntar per construcció per *contig* com si es tractés d'un únic clon i provinguessin del mateix teixit. En conjunt, amb diferents amplificacions, vam obtenir una seqüència del GR d'orada de 4586 pb. Aquesta regió contenia la regió codificant (2352 pb), que es traduïa en una proteïna de 784 aa, i el 3'UTR.

Els estudis fets en aquest treball amb la seqüència obtinguda confirmen que el tipus de receptor que hem trobat en l'orada és GR, com ja apuntàvem en l'experiment anterior. En els treballs fets amb el receptor mineralocorticoide de les espècies de peixos en les que s'ha trobat, és necessari fer estudis d'immunocompetència que determinen el lligand al qual s'uniria el receptor. En el cas de l'orada, no hem fet aquest tipus d'anàlisis però els diferents programes informàtics mostren clarament que es tracta d'un receptor glucocorticoide. En primer lloc, en el cladograma obtingut amb els diferents receptors de cortisol trobats en peixos, el de l'orada s'agrupa en la branca del GR i no amb la del MR, de les poques espècies en les que s'ha clonat aquest últim. En segon lloc, la comparació amb el receptor glucocorticoide d'altres espècies de vertebrats, fins i tot molt separades evolutivament, mostra que existeix una agrupació monofilètica de la proteïna en el grup de peixos. Aquests resultats no pretenien donar una informació molt elaborada des del punt de vista filogenètic, però ens ajuda a donar informació, per primera vegada, de la relació d'un receptor de cortisol en l'orada amb el d'altres espècies de vertebrats, inclosos els peixos.

Estructuralment, la seqüència del GR d'orada no tenia els 9 aa addicionals (WRARQNTDG) entre els dos anells de Zinc del domini d'unió al DNA trobats en quatre espècies de peixos: llobarro, *Dicentrarchus labrax* (Terova i col. 2005), fals halibut de Japó, *Paralichthys olivaceus* (Tokuda 1998, [AB013444](#)), GR2b de tilàpia, *Haplochromis burtoni*, (Greenwood i col. 2003) i al GR1 de truita irisada, *Oncorhynchus mykiss* (Bury i col. 2003; Ducouret i col. 1995), el GR2 de la truita irisada en té 5 (taula I.1). S'ha comprovat que, en la truita irisada (*O. mykiss*), aquests 9 aa addicionals al

DBD són deguts a la presència d'un exó addicional i serveixen per a afavorir la unió del receptor als elements de resposta al glucocorticoide (GRE) (Lethimonier i col. 2002). No obstant, donat que en la resta d'espècies no s'han trobat aquests aa addicionals, no deuen ser imprescindibles funcionalment per a que es doni la unió als GRE.

Comparant la proteïna aconseguida en l'orada amb la seqüència d'aminoàcids d'altres espècies de peixos, el GR d'orada mostrava elevada homologia concretament en els dominis més importants funcionalment, és a dir, en el domini d'unió al DNA (DBD) i en el domini d'unió a la hormona (HBD). Aquesta elevada homologia en els dominis DBD i HBD es mantenia també amb espècies de mamífers, demostrant la importància funcional de conservar aquesta estructura al llarg de l'evolució.

Des de fa uns anys, està oberta la discussió sobre el fet que els peixos teleostis hagin patit una duplicació gènica addicional, comparats amb la resta de vertebrats. Aquesta duplicació es podria haver donat en determinats gens (Robinson-Rechavi i col. 2001) o en el genoma sencer (Meyer i Schartl 1999), coincidint amb la diversificació dels peixos. En qualsevol cas però, jugaria un paper en l'evolució dels organismes (Venkatesh 2003). Pel que fa al receptor glucocorticoide de cortisol, fins el moment, probablement com a conseqüència de la duplicació gènica, s'ha trobat més d'un receptor glucocorticoide a dues espècies de peixos teleostis: la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) que té el GR1 (Bury i col. 2003) i el GR2 (Ducouret i col. 1995) i la tilàpia (*Haplochromis burtoni*) que en té tres: GR1, GR2a, GR2b (Greenwood i col. 2003). La primera espècie és tetraploide i la segona és diploide, per tant, es podria descartar que la duplicació del GR estigués relacionada amb la poliploidització. No obstant, hi ha evidències que, en organismes poliploides, el manteniment de la funcionalitat en els gens duplicats o, fins i tot, la divergència cap a noves funcions, proporcionaria avantatge en l'evolució (Meyer i Schartl 1999).

Pel que fa al GR d'orada veiem que és més semblant al GR2 de la tilàpia (*H.burtoni*) i al GR1 de truita irisada (*O. mkiss*) que a la resta de receptors glucocorticoïdes trobats en aquestes espècies. Donat que la informació sobre la duplicació gènica d'un gen no es pot estendre sistemàticament a un altre llinatge filogenètic, no ens podem aventurar a assegurar que l'orada també tindria més d'un receptor glucocorticoide. De la mateixa manera, el fet que nosaltres no haguem trobat més d'un receptor de cortisol en l'orada, donat que tampoc els vam buscar explícitament, no permet descartar per complet la possible existència d'altres receptors de cortisol en aquesta espècie.

5. CAPÍTULO II:

Respostes funcionals del receptor glucocorticoide (GR) a l'orada (*Sparus aurata*). Implicació en la resposta inflamatòria.

5.1. INTRODUCCIÓ.

La resposta a l'estrès en peixos implica l'activació de l'eix hipotalàmic-pituitàrio-interrenal (HPI). Aquest circuit neuroendocrí s'encarrega de l'alliberació de cortisol per les cèl·lules interrenals del ronyó anterior (Mommsen i col. 1999). D'altra banda, la immunitat innata constitueix la primera i més desenvolupada línia de defensa contra les infeccions bacterianes en peixos teleostis (Tort i col. 2003). Ambdós sistemes, immune i endocrí, regulen la coordinació entre les funcions i les respostes a les variacions del medi extern. La comunicació entre els dos sistemes permet el manteniment de l'homeòstasi sota diferents factors estressants incloses les infeccions bacterianes.

En els mamífers, l'exposició a l'endotoxina dels bacteris gramnegatius o LPS desencadena una resposta inflamatòria que indueix la producció de citoquines proinflamatòries, principalment el $TNF\alpha$, la $IL-1\beta$, la $IL-6$ o la $iNOS$ (figura 8). Finalment, els glucocorticoides adrenals secretats per l'eix hipotalàmic-pituitàrio-adrenal (HPA) regulen la resposta inflamatòria inhibint la producció d'aquestes citoquines proinflamatòries i evitant el xoc sèptic (Haddad i col. 2002). Aquesta regulació es dona a través del receptor de cortisol (GR) que, un cop activat, antagonitza els efectes del factor de transcripció $NF\kappa B$. Aquesta interacció atenua la transcripció dels gens implicats en la resposta inflamatòria (Beishuizen i Thijs 2003; Almawi i Melemedjian 2002; Engelsma i col. 2002; Adcock i Caramori 2001).

En peixos, s'ha demostrat que el LPS estimula l'eix HPI *in vivo* a la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) (Holland i col. 2002; Balm 1997) demostrant així aquesta relació entre els sistemes immune i l'endocrí. De tota manera, els mecanismes implicats en aquesta activació no es coneixen encara i, tampoc es coneix quin paper juga el receptor glucocorticoide en la resposta inflamatòria.

5.1.1. RESPOSTES DELS GENS IMMUNES.

En conjunt, les citoquines proinflamatòries alliberades en resposta al LPS estimulen la reacció cel·lular inflamatòria que consisteix en el reclutament de leucòcits als llocs d'infecció i la seva activació per a eliminar l'agent infecciós.

- Utilitzant models d'estimulació *in vitro* en la truita comú (*Salmo trutta*), se sap que el LPS indueix l'expressió de $TNF\alpha$ en macròfags diferenciats i monòcits (Goetz i col. 2004b; MacKenzie i col. 2003). També s'ha descrit l'augment en l'expressió del $TNF\alpha$ en leucòcits primaris aïllats estimulats amb LPS, forbol miristat acetat (*phorbol myristate acetate*, PMA), $IL-1$ recombinant de truita o, en menor grau, amb la concanavalina A (ConA) (Hirono i col. 2001; Laing i col. 2001) tot i que hi ha resultats contradictoris respecte a l'expressió en animals no estimulats. A l'orada, s'ha

vist que existeix una expressió constitutiva i ubiqua del $TNF\alpha$ però no augmenta la seva expressió en macròfags estimulats amb LPS (García-Castillo i col. 2002).

- L'expressió de la **IL1 β** es veu influenciada negativament per les baixes temperatures i l'estrès, i per tant, pel cortisol (Zou i col. 2000). El cortisol juga un paper important en la regulació del sistema immune en peixos (Weyts i col. 1999) però els efectes del cortisol sobre la producció de IL1 β no estaven establerts fins que es va descriure l'acció inhibidora del cortisol sobre la transcripció de la IL1 β en els leucòcits de ronyó anterior de truita (Zou i col. 2000). També es dona l'efecte invers, ja que la injecció intraperitoneal de IL1 β recombinant a la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) estimula l'eix hipotalàmic-pituitario-interrenal (HPI) induint la resposta d'alliberació de cortisol i augmentant significativament els seus nivells plasmàtics (Holland i col. 2002). Finalment, s'ha demostrat que el LPS pot induir l'expressió de la IL1 β *in vitro* (Pelegrín i col. 2004; Engelsma i col. 2002; Pelegrín i col. 2001; Zou i col. 1999a; Zou i col. 1999b) i *in vivo* (Zou i col. 2000).

A més de l'eix HPI l'estrès activa altres vies per tal de mantenir l'equilibri intern (Barton 2002; Mommsen i col. 1999; Wendelaar 1997; Wedemeyer i col. 1990).

- S'ha vist que la injecció intraperitoneal de LPS en el salmó de l'Atlàntic (*Salmo salar*) induïx una resposta molt dèbil de la **proteïna Mx** en el fetge, 2 -3 dies després de la injecció (Salinas i col. 2004) però no s'ha mirat la resposta d'aquest tipus d'infecció a nivell més general, és a dir, en altres teixits.

- El receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (**PPAR γ**) està implicat en múltiples processos biològics, principalment relacionats amb la regulació metabòlica. Recentment s'està demostrant un efecte inhibidor beneficiós sobre processos inflamatoris ja que regula negativament l'expressió de gens proinflamatoris (Belvisi i col. 2006).

- La **Catepsina D** (catD) sembla estar relacionada amb la funció immune perquè s'ha vist alterada en un anàlisi de microanàlisi (*microarray*) de macròfags de truita irisada estimulats durant 12 hores amb LPS (Goetz i col. 2004a).

5.1.2. RESPOSTA HEPÀTICA.

Els diversos efectes fisiològics exercits pels glucocorticoides adrenals en mamífers, es donen en tipus cel·lulars diferents. Els efectes biològics dels glucocorticoides estan mediatos a través del receptor glucocorticoide (Evans 1988). Les accions fisiològiques d'aquest receptor intracel·lular es donen en diferents tipus cel·lulars des d'hepatòcits i cèl·lules endotelials a neurones (Necela i Cidlowski 2004).

El fetge és un dels òrgans més importants per el manteniment de l'equilibri intern dels vertebrats ja que s'adapta als canvis ambientals reajustant contínuament la funció hepàtica i adaptant el metabolisme de l'animal a aquests canvis. D'entre totes les funcions que se li atribueixen, destaquem les següents (Monshouwer i Hoebe 2003; Segner 1998):

- Activitat circulatòria: filtració la sang procedent de l'intestí, per depurar-la.
- Activitat secretora i excretora: Producció de bilis.
- Activitat metabòlica de:
 - o carbohidrats: magatzem de glicogen, conversió de galactosa i fructosa en glucosa, elaboració de compostos químics.
 - o proteïnes: síntesi i secreció de proteïnes plasmàtiques (albúmina, vitelogenina), desaminació dels aminoàcids, fabricació urea.
 - o lípids: formació de la major part de les lipoproteïnes, formació de colesterol i fosfolípids, gluconeogènesi.
 - o Altres funcions metabòliques: magatzem de vitamines i ferro, eliminació o excreció de fàrmacs, hormones i altres substàncies.
- Activitat hemostàtica: formació de substàncies que intervien en el procés de coagulació (fibrinògen, protombina, factors VII, IX y X).
- Activitat protectora i detoxificadora. Els tres tipus principals de cèl·lules del fetge: les cèl·lules de *Kupffer* els hepatòcits i les cèl·lules endotelials, contribueixen a la resposta inflamatòria (Thirunavukkarasu i col. 2005; Monshouwer i Hoebe 2003; Panesar i col. 1999). Les cèl·lules de *Kupffer* són macròfags específics localitzats a les parets sinusoïdals que fagociten paràsits, virus, bacteris i altres macromolècules. Un cop activades, aquestes cèl·lules produeixen citoquines que regulen les respostes dels hepatòcits per interaccions paracrines o s'alliberen a la circulació sistèmica (Monshouwer i Hoebe 2003). El mecanisme pel qual el LPS les activa no es coneix del tot i sembla que segueix una via una mica diferent de la que segueixen els macròfags i monòcits perifèrics. En mamífers, s'han utilitzat cultius d'hepatòcits per a estudiar la resposta a l'endotoxina (Thirunavukkarasu i col. 2005; Ebisawa i col. 2004) i s'ha vist que el fetge participa en la detoxificació del LPS. D'altra banda, els hepatòcits també són capaços de respondre directament al LPS per activació de la via NFκB (Monshouwer i col. 2003; Panesar i col. 1999). Pel que fa a la implicació del GR en aquesta resposta, en les cèl·lules hepàtiques de rata, s'ha estudiat la seva interacció amb les proteïnes del factor NFκB (Widen i col. 2003).

Per les seves característiques funcionals, el fetge juga un paper important en la resposta inflamatòria i es considera que contribueix de manera important en la defensa contra els organismes invasors que entren a l'organisme.

El fetge dels peixos teleostis s'ha utilitzat per a estudiar l'efecte del cortisol en relació als nivells de glicogen hepàtic i de glucosa plasmàtica i s'ha vist que tots dos varien substancialment segons l'espècie, l'estat de desenvolupament i l'estat metabòlic de l'animal (Mommsen i col. 1999). També s'ha estudiat la resposta del receptor glucocorticoide a diferents tractaments de cortisol en cultiu primari d'hepatòcits (Sathiyaa i Vijayan 2003; Vijayan i col. 2003). No obstant, en peixos no s'havia estudiat la interacció entre el GR i els factors de transcripció específics de la resposta inflamatòria. Ni tan sols s'havia observat la resposta d'aquest receptor a un estrès immune en aquest tipus cel·lular.

Tenint en compte totes aquestes consideracions, els objectius concrets d'aquest capítol del treball eren:

- Investigar els efectes d'un estímul immune sobre el sistema endocrí, la resposta temporal i la resposta en funció de la dosi, a nivell de la resposta endocrina d'alliberament de cortisol plasmàtic.

- Analitzar la resposta del receptor glucocorticoide (GR) a un estímul immune al llarg del temps i la resposta en funció de la dosi.

- Analitzar la resposta de diferents gens immunes a un estímul immune al llarg del temps, utilitzant diferents models experimentals: *in vivo* (injecció de LPS) i *in vitro* (cultius primaris d'hepatòcits).

- Investigar la relació entre els sistemes immune i endocrí, utilitzant diferents models experimentals: *in vivo* (injecció de LPS) i *in vitro* (cultius primaris d'hepatòcits).

5.2. EXPERIMENT 1: Expressió diferencial del receptor glucocorticoide i altres gens immunes a l'orada (*Sparus aurata*) després d'una injecció aguda amb LPS.

5.2.1. MATERIALS I MÈTODES.

5.2.1.1. Animals experimentals.

Per realitzar l'estudi vam obtenir, en primer lloc, aproximadament 230 orades sexualment immadures (*Sparus aurata*) de $65,55 \pm 3,22$ g de pes corporal de la piscifactoria Granja Marina del Masnou (Masnou, Barcelona). Les condicions d'estabulació foren les mateixes que pels animals de l'experiment de clonatge del GR (capítol I, experiment 2).

En aquest cas, durant el període d'aclimatació i durant els experiments els nivells d'amoni es van mantenir entre valors de 0,001 a 0,218 mg/L, els nivells de nitrit entre 0,008 i 0,163 mg/L i el rang de pH entre 6,95 i 7,95. El rang de la temperatura de l'aigua va oscil·lar entre 16-19 °C i la salinitat entre el 35-45‰.

Els peixos s'alimentaven cada dos dies amb una dieta comercial (INVE Technologies NV, Baasrode, Bèlgica) aproximadament a una dosi de manteniment de 0,5% del pes corporal/dia, fins a les 24 h prèvies al començament dels experiments perquè els períodes de menja podrien interferir en les nostres mesures.

5.2.1.2. Disseny de l'experiment.

5.2.1.2.1. apartat a) Efectes de la injecció de LPS en la resposta corticosteroidea en l'orada (*Sparus aurata*).

Es van distribuir 140 peixos en quatre tancs circulars de fibra de vidre de 600 L de capacitat total (35 peixos/tanc). Les condicions dels tancs experimentals foren les mateixes que pels animals de l'experiment de clonatge del GR (capítol I, experiment 2).

Passat el temps total d'adaptació, vam aplicar un estrès agut per injecció intraperitoneal (i.p.) amb endotoxina (LPS) en tres dels quatre tancs, injectant independentment en cadascun dels peixos les concentracions finals de 80 µg/kg, 4 mg/kg i 8 mg/kg d'endotoxina (capítol I, experiment 2). El LPS (*Escherichia coli* 026:B6; Sigma) es va reconstituir amb solució salina estèril fins aconseguir una concentració original de 10 mg/ml. Posteriorment, es tornà a diluir en solució salina estèril per aconseguir les concentracions finals d'administració desitjades. El volum final d'injecció era de 400 µl de LPS o 400 µl de solució salina estèril en els animals control del quart tanc. Els

temps de mostreig escollits per a l'extracció de sang després de la injecció van ser: 2, 6, 12, 24, 48 i 72 hores. Vam fer servir 5 peixos per grup i mostreig (n=5).

5.2.1.2.2. apartat b) Expressió del receptor glucocorticoide de cortisol sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (*Sparus aurata*).

apartat c) Expressió de gens immunes sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (*Sparus aurata*).

Es van distribuïr 40 peixos en quatre tancs experimentals circulars de fibra de vidre de 600 L (10 peixos/tanc) i es van deixar en les condicions d'aclimatació durant dues setmanes més.

Posteriorment, es va aplicar un estrès agut en els animals de dos tancs injectant 400µl de 8 mg/kg de LPS (capítol I, experiment 2). Els animals dels altres dos tancs van servir com a control, injectant també intraperitonealment, el mateix volum de solució salina estèril. Els temps de mostreig per l'extracció de mostres en aquest estudi van ser 2 i 6 hores pels animal control i 6, 12, 24 i 72 hores pels animals estressats amb LPS.

5.2.1.3. Obtenció de mostres.

Vam utilitzar quatre peixos per grup i mostreig (n=4) per extreure'ls-hi la sang i els teixits escollits: cervell, brànquies, ronyó anterior, melsa, fetge i intestí (anterior i posterior).

Els peixos d'aquest estudi (apartats a i b) es van anestesiari amb 2-fenoxietanol (Sigma) a una concentració no letal (0,75 ml/L) en el moment de fer la injecció intraperitoneal de LPS o de solució salina, així com per a poder extreure sang de la vena caudal amb xeringues hipodèrmiques d'1 ml i agulles de 23G (apartats a i b). L'extracció de sang es va fer ràpidament, en menys de cinc minuts en total, per tal d'evitar l'increment de cortisol en sang degut a la manipulació durant el mostreig. La sang extreta de cada individu es va col·locar immediatament i per separat en eppendorfs de 1,5 ml amb heparina com anticoagulant (*Lithium heparin*, Deltalab). Després es va centrifugar a 9000 r.p.m. durant 5 minuts a temperatura ambient per recollir el plasma que es conservà a -80°C fins el moment d'analitzar el cortisol.

En els animals en els que s'havia de fer extracció de teixits (apartats b i c), abans de començar a disseccionar als animals i després de l'extracció de sang, es van sacrificar els peixos per concusió craneal. Un cop extrets els teixits, es congelaren immediatament en nitrogen líquid i s'emmagatzemaren a -80°C fins el moment de l'extracció de RNA.

5.2.1.4. Tècniques analítiques.

5.2.1.4.1. Radioimmunoanàlisi (apartat a)

Es van medir els nivells de cortisol plasmàtic per radioimmunoanàlisi (R.I.A) (Rotllant i col. 2001) amb petites modificacions: es van utilitzar 10 µl de les mostres basals i estressades, aquestes darreres diluïdes prèviament 10 vegades amb el tampó de R.I.A. (1% gelatina, 9% NaCl, 20 ml de Na₂HPO₄ 0,5 M, pH= 8,2). La recta patró oscil·lava entre 0,625 ng/ml i 80 ng/ml i es va preparar a partir de l'estoc original de cortisol de 1 mg/ml de concentració (Merck/Sigma). L'hormona marcada amb triti (1,2,6,7-H³-cortisol, 1mCi, Amersham) es va diluir en el tampó del R.I.A. i s'ajustà a 5000 cpm abans d'afegir-la a les mostres. L'anticòs utilitzat per l'anàlisi (Biolink, S.L., Costa Mesa, California) és un anticòs policlonal de conill i es va fer servir a una dilució final de 1:6000. La radioactivitat es va quantificar utilitzant un comptador gamma per centelleig (Wallac 1409).

5.2.1.4.2. Extracció de RNA (apartats b i c)

Les extraccions de RNA total dels diferents teixits es van fer, de manera independent, utilitzant un mètode de purificació estandaritzat per la casa comercial (Molecular Center Research, M.C.R.). El protocol consistia en homogeneïtzar els teixits en 1 ml de tri-reagent (M.C.R.) per cada 100 mg de teixit. Després, la fase d'extracció es va fer amb cloroform (Sigma), es va precipitar amb isopropanol (Sigma) i es rentà el precipitat amb etanol (Scharlau) al 75%. Les mostres es van dissoldre amb aigua tractada amb DEPC. La concentració es va mesurar i calcular per espectrofotometria (BiomateTM 3 Series Spectrophotometers, Thermo Spectronic). Per comprovar l'estat dels RNAs, es van fer electroforesis en gels d'agarosa a l'1% en tampó MOPS i amb el marcador de pes molecular (0,24-9,5 Kb RNA ladder, Invitrogen).

5.2.1.4.3. Reaccions de RT-PCR.

Expressió del receptor glucocorticoide de cortisol (apartat b).

Vam utilitzar 5 µg de RNA de cadascun dels teixits anteriorment descrits per retrotranscriure'ls a cDNA segons el protocol de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) a una concentració estoc d'enzim de 200 U/µL, en un volum final de reacció de 20 µl.

Els productes de la retrotranscripció es van amplificar per la reacció en cadena de la polimerasa, PCR (Minicycler MJ Research) a partir de 2 µl de cDNA de cada teixit. Cada reacció de RT-PCR contenia a més del cDNA, 1 µl de cada encebador (10 µM, Bonsai technologies, taula II.1-1), 2 µl de clorur de magnesi (Cl₂Mg, 50 mM, Biotools), 1 µl de dNTPs (10 mM, Biotools), 0,5 µl de dTT (1M, Invitrogen) i 2 unitats/µl de Taq DNA polimerasa (Biotools) amb 5µl del tampó específic per aquest enzim i la reacció es va ajustar a un volum final de 50 µl amb aigua tractada amb DEPC. Les condicions de la reacció de RT-PCR van ser:

35 cicles	{	5 minuts a 95°C (desnaturalització)
		30 segons a 95°C (desnaturalització)
		30 segons a 55°C (temperatura d'aparellament dels encebadors)
		1 minut a 72°C (extensió)
		5 minuts a 72°C (extensió final)

Totes les reaccions tenien un control negatiu (aigua tractada amb DEPC) i un control positiu (β -actina). Els encebadors utilitzats per aquesta amplificació són encebadors degenerats es van utilitzar per a caracteritzar el GR d'orada (capítol I, taula I.1-1) (taula II.1-1):

Encebadors	Composició de nucleòtids	T ^a
GR-E Fw	5'- AGTGCTCCTGGCTGTTYCTNATG- 3	62,4°C
GR-E Rv	5'- TTTTCGGTAATTGGTTGCTGATGAT-3'	57,6°C

Taula II.1-1: Composició nucleotídica i temperatures d'aparellament específiques de cadascun dels encebadors utilitzats per a l'amplificació per RT-PCR per a amplificar el receptor glucocorticoide (GR) de l'orada (*Sparus aurata*). Fw: forward; Rv: reverse.

Els diferents productes de la reacció de RT-PCR es van fer córrer en un gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE tenyit amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 μ g/ml (Sigma) i amb el marcador de DNA de 100 pb (Ready-LoadTM, Invitrogen).

Els teixits es van quantificar per densitometria amb un transil·luminador (Alphalmager 2200, Alpha Innotech) i es van comparar amb un marcador de pes molecular amb un patró de bandes de concentració coneguda (marcador de 0,087-8,57 kbp DNA Molecular Weight marker VII, Roche). El resultat densitomètric del receptor de glucocorticoides es va ponderar amb el resultat del control positiu (β -actina) per cada teixit, independentment.

Expressió d'altres gens immunes (apartat c).

Vam utilitzar 5 µg de RNA de cadascun dels teixits escollits (ronyó anterior, melsa, intestí anterior i brànquies) per retrotranscriure'ls a cDNA segons el protocol de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) a una concentració estoc d'enzim de 200 U/µL, en un volum final de reacció de 20 µl.

Els productes de la retrotranscripció es van amplificar per la reacció en cadena de la polimerasa, PCR (Minicycler MJ Research) a partir de 2 µl de cDNA de cada teixit. Cada reacció de RT-PCR contenia, a més del cDNA, 1 µl de cada encebador (20 µM, taula II.1-3), 1 µl de dNTPs (10 mM) i 1 unitats/µl de Taq DNA polimerasa (Biotools) amb 5µl del tampó específic per aquest enzim que ja conté el MgCl₂ (10X amb 2,5 mM de MgCl₂, Biotools) i la reacció es va ajustar a un volum final de 50 µl amb aigua tractada amb DEPC. Els gens immunes escollits per l'orada van ser interleuquina-1 beta (IL1β), factor de necrosis tumoral (TNFα), la proteïna Mx, la catepsina D (catD), el receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPAR-γ) i el 18S com a control positiu de la reacció. Les condicions de la reacció de RT-PCR per a cada gen concret estan indicades a la taula següent:

Cicles	Programa	IL1β	TNFα	Mx	CatD	PPARγ	18S
1	Desnaturalització	95°C 5 min	95°C 5 min	94°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min
35	Desnaturalització	95°C 45 s	95°C 45 s	97°C 30 s 94°C 40s	95°C 45 s	95°C 45 s	95°C 40 s
35	Aparellament	57°C 1 min	57°C 45 s	69,5°C 40 s	57°C 55 s	57°C 55 s	55°C 50 s
35	Extensió	72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 40 s	72°C 45 s	72°C 45 s	72°C 50 s
1	Extensió	72°C 10min	72°C 5min	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10min	72°C 10 min

Taula II.1-2: Programes d'amplificació per RT-PCR dels diferents gens immunes de l'orada (*Sparus aurata*): interleuquina 1 beta (IL1β), factor de necrosis tumoral alpha (TNFα), proteïna Mx (Mx), catepsina D (CatD), receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPAR-γ) i el 18 S com a control positiu de la reacció.

Totes les reaccions tenien un control negatiu (aigua tractada amb DEPC) i un control positiu (18S).

La composició nucleotídica dels encebadors utilitzats per a les amplificacions d'aquests gens estan representats en la següent taula:

Encebadors	Composició nucleotídica	T ^a
IL-1 β Fw	5' -ATGCCCCAGGGGCTGGGC- 3'	65,1°C
IL-1 β Rv	5' -CAGTTGCTGAAGGGAACAGAC- 3'	59,8°C
TNF α Fw	5' -TCGTTTCAGAGTCTCCTGCAG- 3'	59,4°C
TNF α Rv	5' -AAGAATTCTTAAAGTGCAAACACACCAAA- 3'	59,6°C
Mx Fw	5' -AGTCTGGAGATCGCCTCTCCTGATGTTCCG- 3'	70,9°C
Mx Rv	5' -CTCTCTCCATCAGGATCCACTTCTGTGC- 3'	69,5°C
CatD Fw	5' -TACGACGCGGAGAATGACAC- 3'	59,4°C
CatD Rv	5' -GAGGAAGGAGCAGTGAATGGA- 3'	59,8°C
PPAR- γ Fw	5' -ACTACACCTCCATCTCCTCC- 3'	59,4°C
PPAR- γ Rv	5' -TGTGACATGCCGACATTGAG- 3'	57,3°C
18S-Fw	5' -CGAGCAATAACAGGTCTGTG- 3'	57,3°C
18S-Rv	5' -GGCAGGGACTTAATCAA- 3'	50,4°C

Taula II.1-3: Composició nucleotídica i temperatures d'aparellament de cadascun dels encebadors utilitzats per a les amplificacions per RT-PCR dels diferents gens immunes de l'orada (*Sparus aurata*): interleuquina 1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alpha (TNF α), proteïna Mx (Mx), catepsina D (CatD), receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPAR- γ) i el 18 S com a control de la reacció. Fw: forward, Rv: reverse.

Els diferents productes de les tres reaccions de RT-PCR es van fer córrer en un gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE tenyit amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 μ g/ml (Sigma) i amb el marcador de DNA de 100 pb (Ready-LoadTM, Invitrogen).

5.2.1.5. Anàlisi estadística.

Les diferències entre grups en el cortisol plasmàtic es van analitzar per anàlisi de variances d'una via (ANOVA), prenent al peix com a unitat estadística i transformant les dades per fer-les homogènies mitjançant conversió logarítmica.

Les diferències particulars entre grups es van detectar utilitzant les proves *a posteriori* DMS (diferència menys significativa). Es considerarà estadísticament significatiu quan $p < 0,05$ indicat a la figura amb lletres diferents (*). Els valors (n=5) es representen com a mitjanes \pm l'error estàndard (S.E.M).

5.2.2. RESULTATS.

5.2.2.1. Apartat a) Efectes de la injecció de LPS en la resposta corticosteroidea de l'orada (*Sparus aurata*).

La figura II.1-2 mostra la resposta endocrina d'alliberació de cortisol plasmàtic al llarg del temps després d'una infecció immune aguda mitjançant la injecció intraperitoneal (i.p.) d'endotoxina (LPS) a tres concentracions diferents, estudiades independentment.

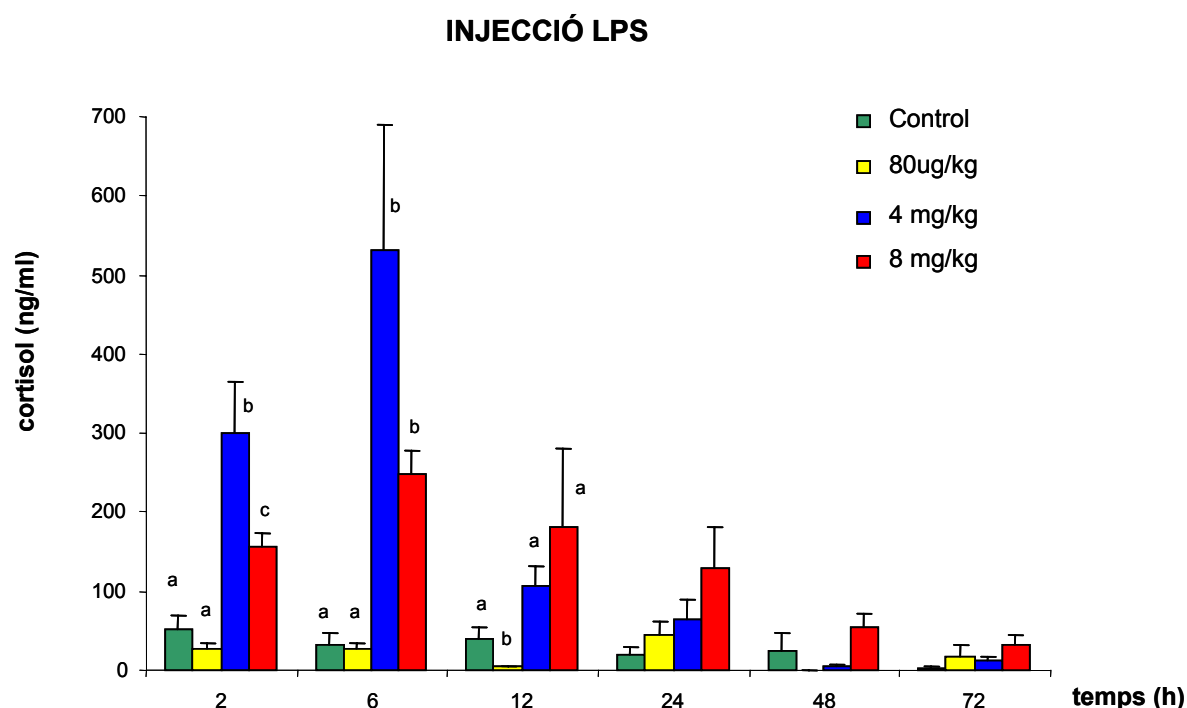


Figura II.1-2: Efectes de tres dosis diferents d'endotoxina (80 µg/kg, 4 mg/kg i 8 mg/kg, per injecció intraperitoneal (i.p.) sobre els nivells plasmàtics de cortisol (expressat en ng/ml) al llarg del temps (2, 6, 12, 24, 48 i 72 hores). Els resultats es donen com a mitjana ± SEM (n=5 en cada grup). Els grups amb diferents lletres mostren diferències significatives amb el grup control corresponent de cada temps de mostreig amb $p < 0,05$.

- Els valors de cortisol del grup control que hem trobat en el nostre experiment oscil·len entre $51,49 \pm 17,99$ ng/ml, dues hores després de la injecció salina, i $3,71 \pm 1,58$ ng/ml, 72 hores després d'aplicar el vehicle (figura II.1-2).

- Dues hores després de l'estrès vam observar un augment dels nivells de cortisol en dues de les tres dosis assajades, concretament les de 4 mg/kg i 8 mg/kg, mostrant diferències estadísticament significatives amb el grup control (figura II.1-2). L'augment en la dosi de 4 mg/kg

era 6 vegades superior als valors controls mentre la dosi de 8 mg/kg donava valors de cortisol 3 vegades més elevats que els controls.

- Sis hores després de la injecció es van trobar valors màxims de cortisol a les dosis de 4 mg/kg i 8 mg/kg ($531,08 \pm 158,52$ ng/ml i $247,91 \pm 29,12$ respectivament, figura II.1-2) mostrant diferències significatives amb el grup control. La magnitud de la resposta en aquest temps va ser 16 vegades superior al grup control en la injecció de 4 mg/kg i 7,5 vegades per la dosi de 8 mg/kg.

- Els nivells de cortisol plasmàtic de les dues dosis més elevades de LPS, 4 mg/kg i 8 mg/kg, van recuperar els valors basals a partir de les 12 hores següents a la injecció (figura II.1-2). Aquestes dues dosis van donar diferències significatives entre elles només dues hores després de la injecció però durant la resta del temps que va durar l'estudi van seguir una dinàmica de recuperació similar.

- A la concentració mínima d'endotoxina injectada, 80 µg/kg, no es van donar canvis significatius respecte el control al llarg del temps excepte 12 hores després de la injecció per LPS on es van detectar nivells significativament inferiors als controls (figura II.1-2).

- En la fase final de l'estudi, passades 24 hores de la injecció i en els mostrejos posteriors, no es van trobar diferències significatives amb el grup control en cap de les dosis d'assaig obtenint valors basals (figura II.1-2).

5.2.2.2. Apartat b) Expressió del receptor de cortisol sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (*Sparus aurata*).

Per a estudiar la regulació del receptor glucocorticoide (GR) després d'una injecció aguda de LPS vam exposar a l'animal a una única injecció intraperitoneal de 8 mg/kg de LPS. Els temps de mostreig per l'extracció de mostres van ser 2 i 6 hores pels animals controls i 6, 12, 24 i 72 hores després de la injecció, pels animals estressats. En cada mostreig es va extreure el RNA total de cervell, brànquies, ronyó anterior, melsa, fetge i intestí (anterior i posterior).

La reacció de RT-PCR ens va donar un fragment de GR de 500 pb, comparat amb el marcador de pes molecular de 100 pb, expressat a tots els teixits analitzats (figures II.1-3A-II.1-8A). La quantificació relativa del receptor de glucocorticoïdes ponderada amb el control positiu (β -actina) per cada teixit, mostra que la seva resposta temporal a una injecció immunològica varia segons el teixit (figures II.1-3B-II.1-8B):

- Vam trobar que els nivells d'expressió del GR a cervell van augmentar progressivament a partir de les 12 hores de la injecció de LPS fins el final de l'estudi, comparats amb els valors d'expressió del grup control tractats amb solució salina (figura II.1-3).

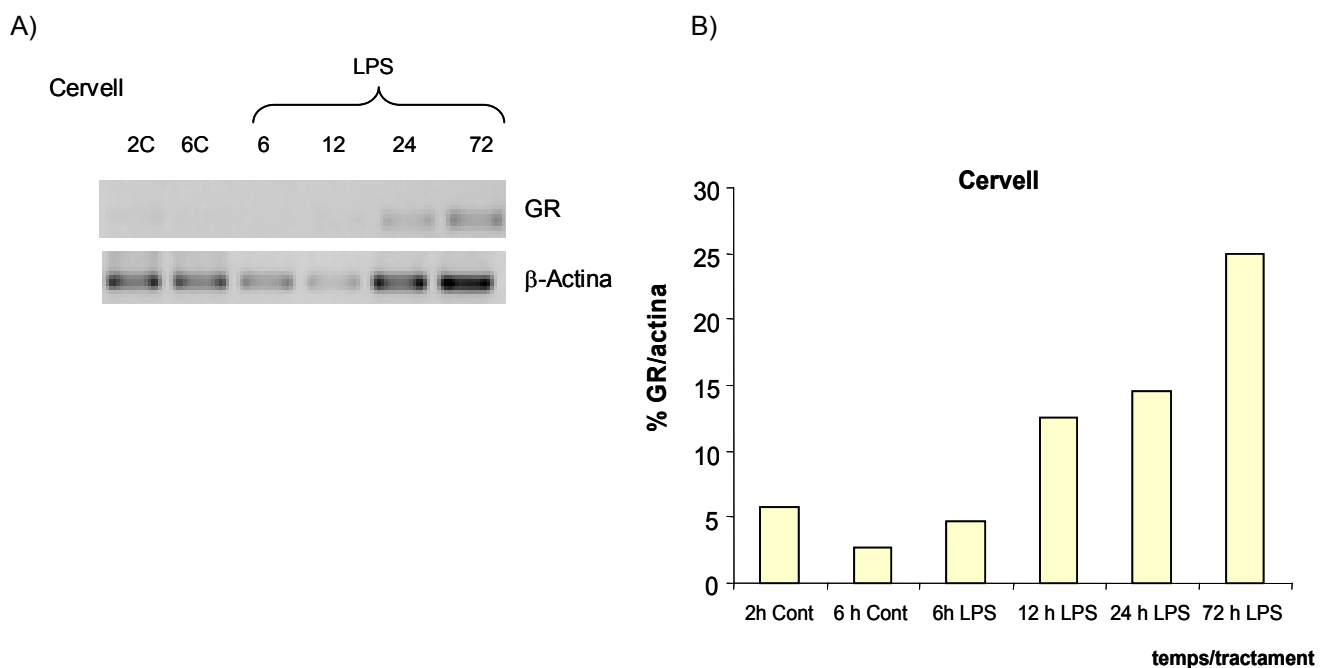


Figura II.1-3 : A) Resultat de la reacció de RT-PCR del GR de cervell al llarg del temps: 2 i 6 h pels controls i 6, 12, 24 i 72 h pels animals sotmesos a estrès agut per injecció de 8mg/kg de LPS (n=4). Es mostra l'expressió del receptor de glucocorticoide (GR) i la del control positiu amb β -Actina.

B) Quantificació relativa per densitometria de l'expressió del GR de cervell respecte la del seu control amb β -actina.

• Vam trobar que els nivells d'expressió del GR a intestí posterior van augmentar progressivament a partir de les 12 hores després de la injecció intraperitoneal fins el final de l'estudi, comparats amb els valors d'expressió del grup control (figura II.1-4).

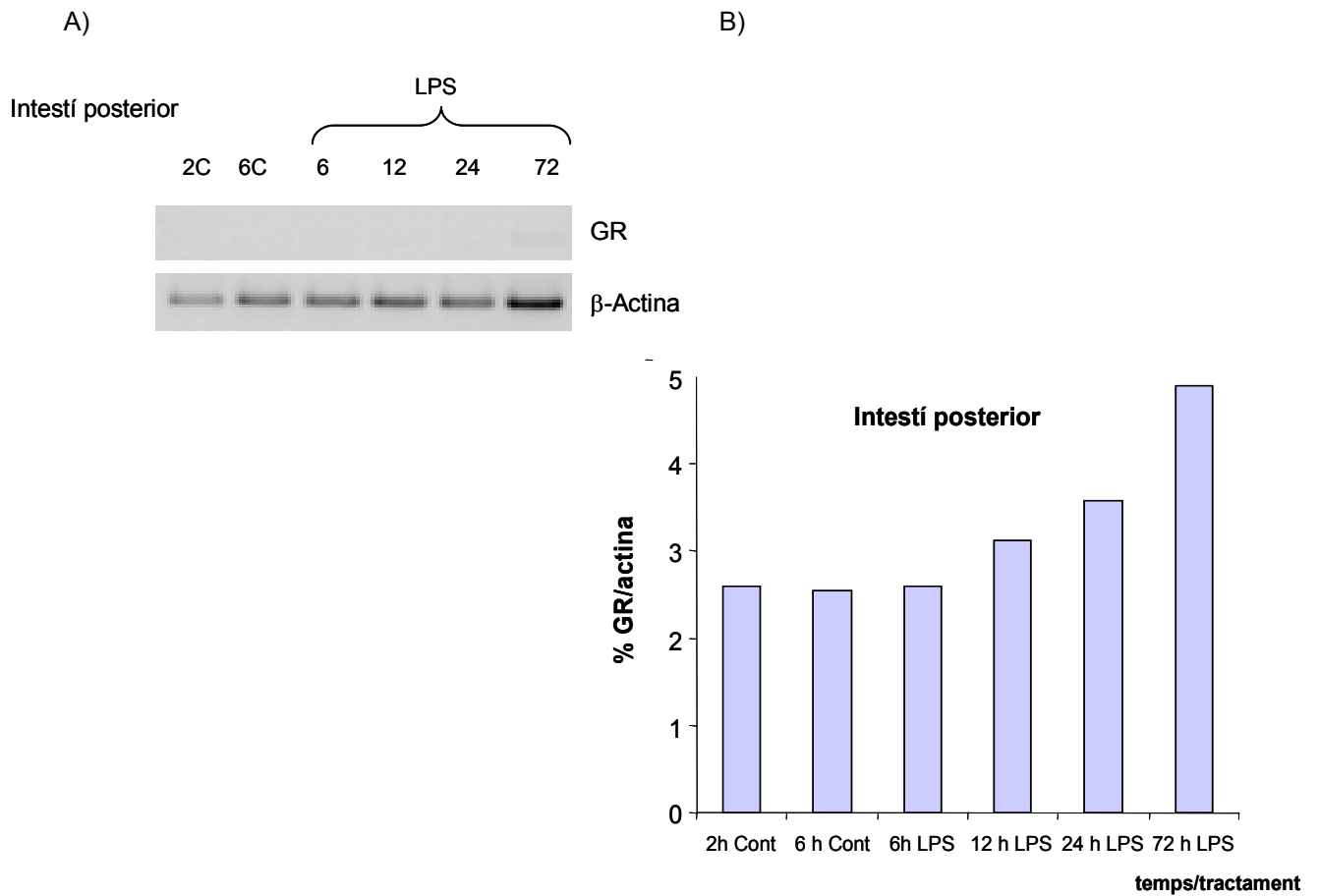


Figura II.1-4 : A) Resultat de la reacció de RT-PCR del GR d'intestí posterior al llarg del temps: 2 i 6 h pels controls i 6, 12, 24 i 72 h pels animals sotmesos a estrès agut per injecció de 8mg/kg de LPS (n=4). Es mostra l'expressió del receptor de glucocorticoide (GR) i del control positiu amb β -Actina.

B) Quantificació relativa per densitometria de l'expressió del GR de l'intestí posterior respecte la del seu control amb β -actina.

• Els nivells d'expressió del GR a la brànquia i al pronefros o ronyó anterior disminueixen 6 hores després de la injecció d'endotoxina comparat amb els controls del mateix temps i a partir d'aquest moment augmenten fins el mostreig de les 72 hores on disminueixen ràpidament (figura II.1-5).

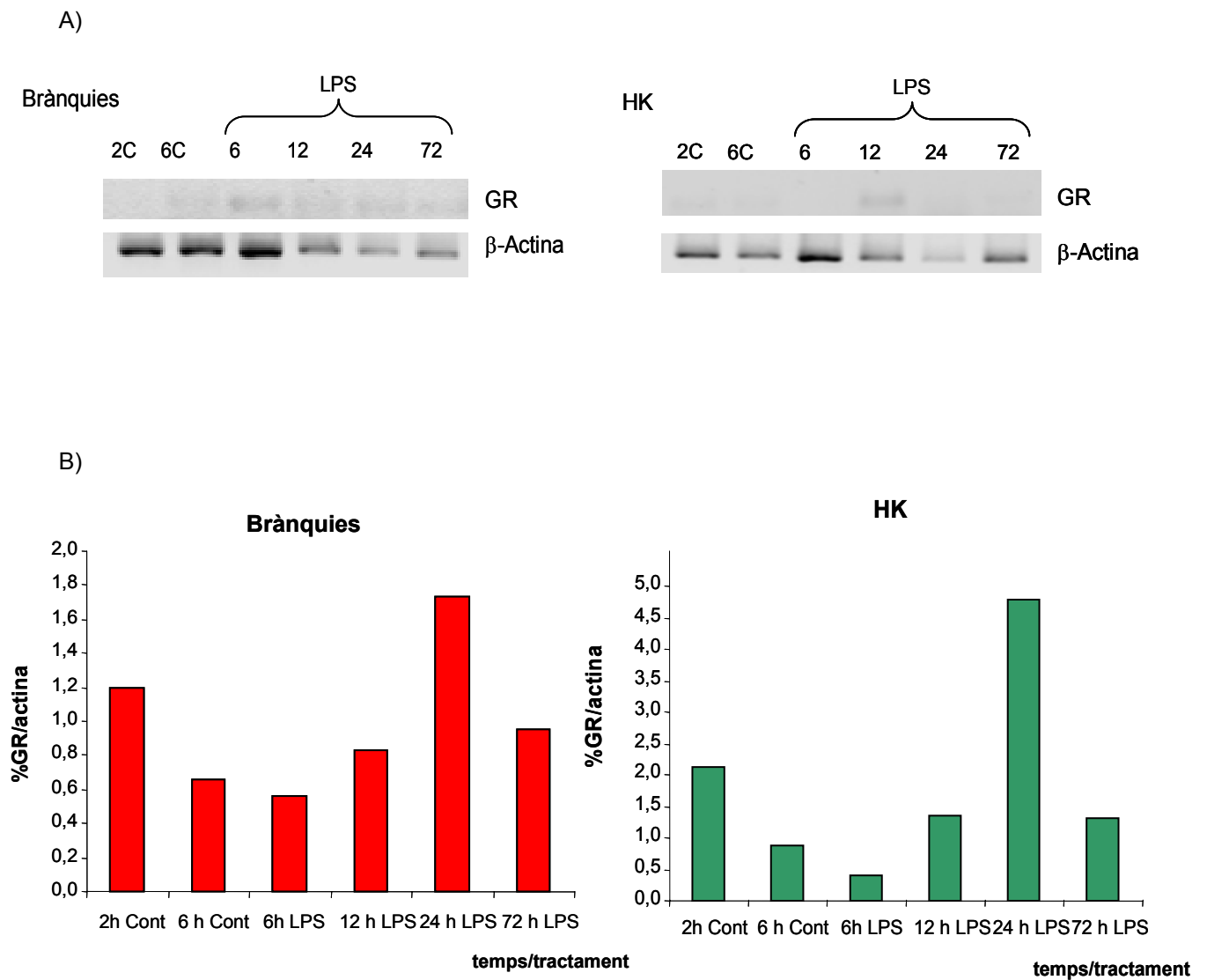


Figura II.1-5: A) Resultat de la reacció de RT-PCR del GR de les brànquies i el ronyó anterior (HK) al llarg del temps: 2 i 6 h pels controls i 6, 12, 24 i 72 h pels animals sotmesos a estrès agut per injecció de 8mg/kg de LPS (n=4). Per cada teixit es mostra l'expressió del receptor de glucocorticoide (GR) i del control positiu amb β -Actina.

B) Quantificació relativa per densitometria de l'expressió del GR de cada teixit (brànquies i ronyó anterior) respecte la del seu control amb β -actina.

- L'augment a la melsa es dona 12 hores després de l'estrès i manté els nivells elevats i més o menys constants fins al final de l'estudi (figura II.1-6).

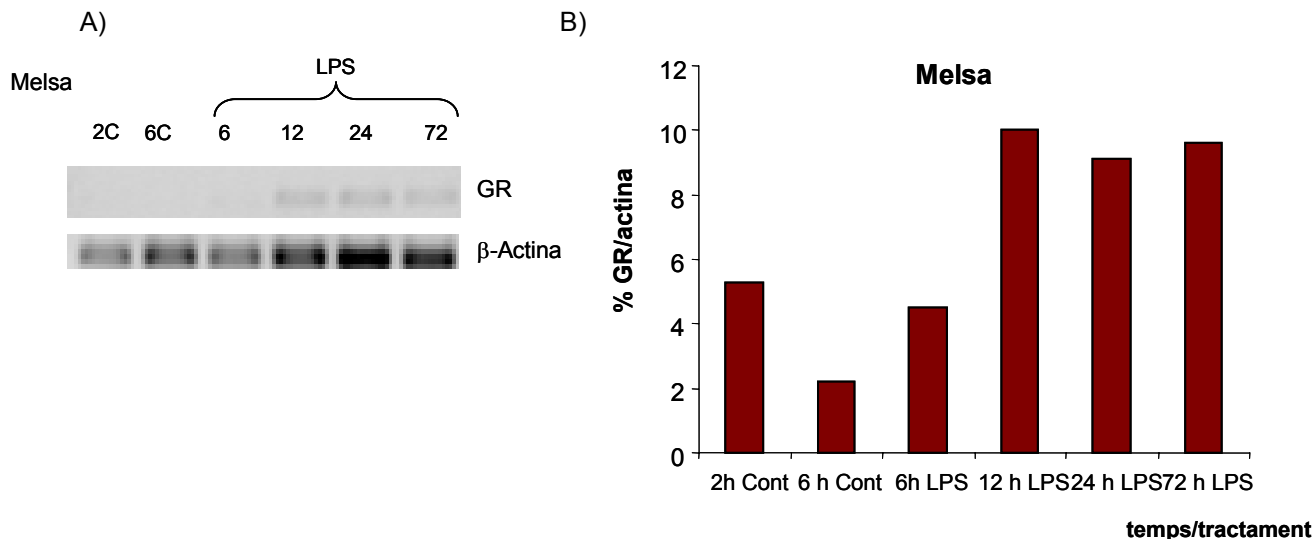


Figura II.1-6: A) Resultat de la reacció de RT-PCR del GR de la melsa al llarg del temps: 2 i 6 h pels controls i 6, 12, 24 i 72 h pels animals sotmesos a estrès agut per injecció de 8mg/kg de LPS (n=4). Es mostra l'expressió del receptor de glucocoticoide (GR) i del control positiu amb β -Actina.

B) Quantificació relativa per densitometria de l'expressió del GR de la melsa respecte la del seu control amb β -actina.

- En el fetge no hi canvis importants al llarg del temps excepte 72 hores després de la injecció on sembla disminuir la seva expressió comparat amb els nivells d'expressió del grup control (figura II.1-7).

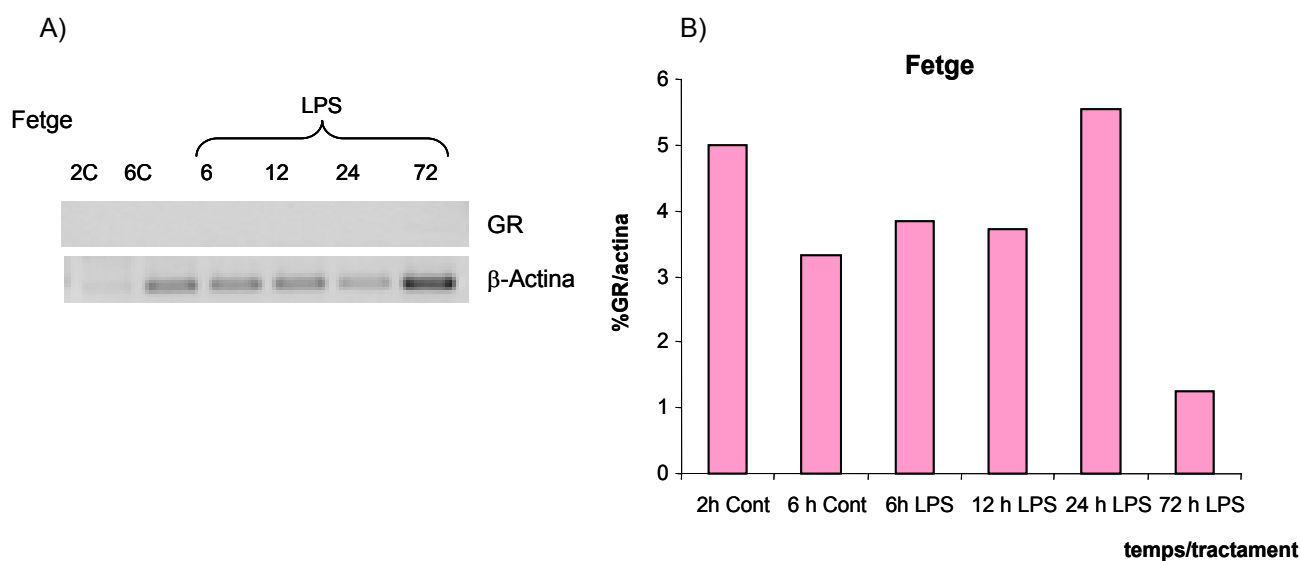


Figura II.1-7: A) Resultat de la reacció de RT-PCR del GR de fetge al llarg del temps: 2 i 6 h pels controls i 6, 12, 24 i 72 h pels animals sotmesos a estrès agut per injecció de 8mg/kg de LPS (n=4). Es mostra l'expressió del receptor de glucocoticoide (GR) i del control positiu amb β -Actina.

B) Quantificació relativa per densitometria de l'expressió del GR del fetge respecte la del seu control amb β -actina.

• A l'intestí anterior observem valors d'expressió del GR més elevats als temps de 6 i 72 hores després de la infecció respecte el control, mostrant una lleugera davallada als temps intermitjos (figura II.1-8).

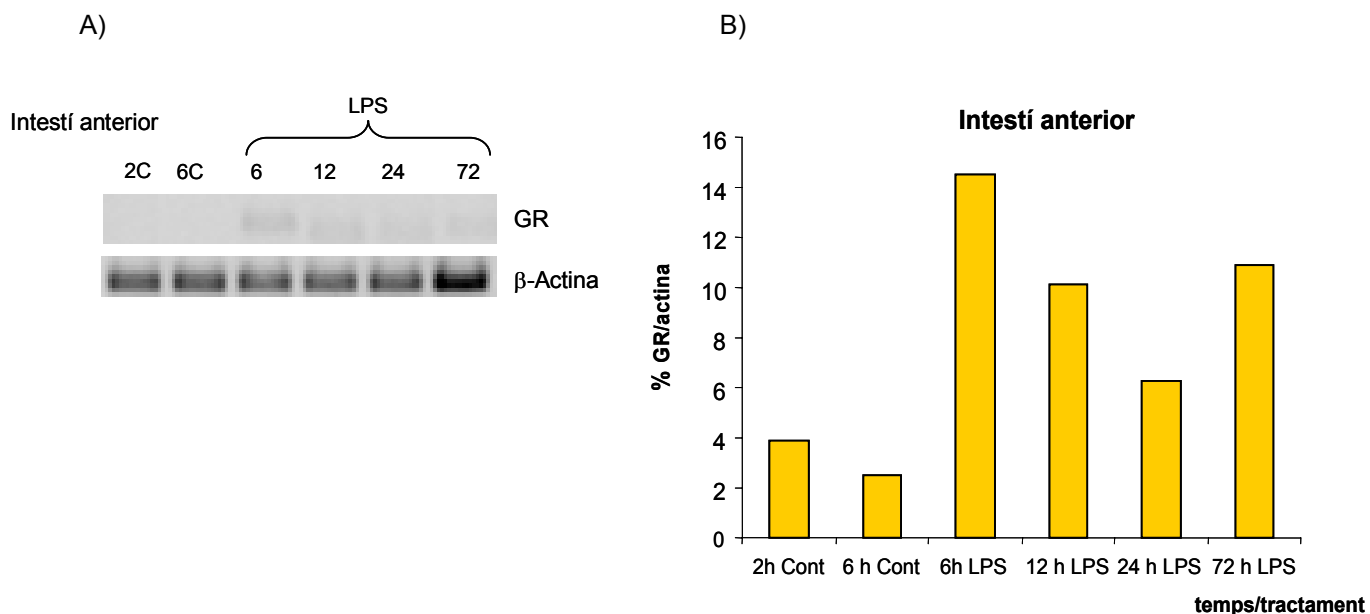


Figura II.1-8: A) Resultat de la reacció de RT-PCR del GR de l'intestí anterior al llarg del temps: 2 i 6 h pels controls i 6, 12, 24 i 72 h pels animals sotmesos a estrès agut per injecció de 8mg/kg de LPS (n=4). Es mostra l'expressió del receptor de glucocorticoide (GR) i del control positiu amb β -Actina.

B) Quantificació relativa per densitometria de l'expressió del GR d'intestí anterior respecte la del seu control amb β -actina.

5.2.2.3. Apartat c) Expressió de diferents gens immunes sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (*Sparus aurata*).

Es va estudiar la regulació al llarg del temps de diferents gens immunes després d'una injecció aguda de 8 mg/kg de LPS en diferents teixits: ronyó anterior, melsa, intestí anterior i brànquies.

Les reaccions de RT-PCR ens van donar un fragment de 320 pb pel $TNF\alpha$, 580 pb per la $IL1\beta$, 236 pb per la proteïna Mx, 348 pb per la catD, 475 pb pel $PPAR\gamma$, i 300 pb pel 18 S, comparats amb el marcador de pes molecular de 100 pb (figura II.1-9).

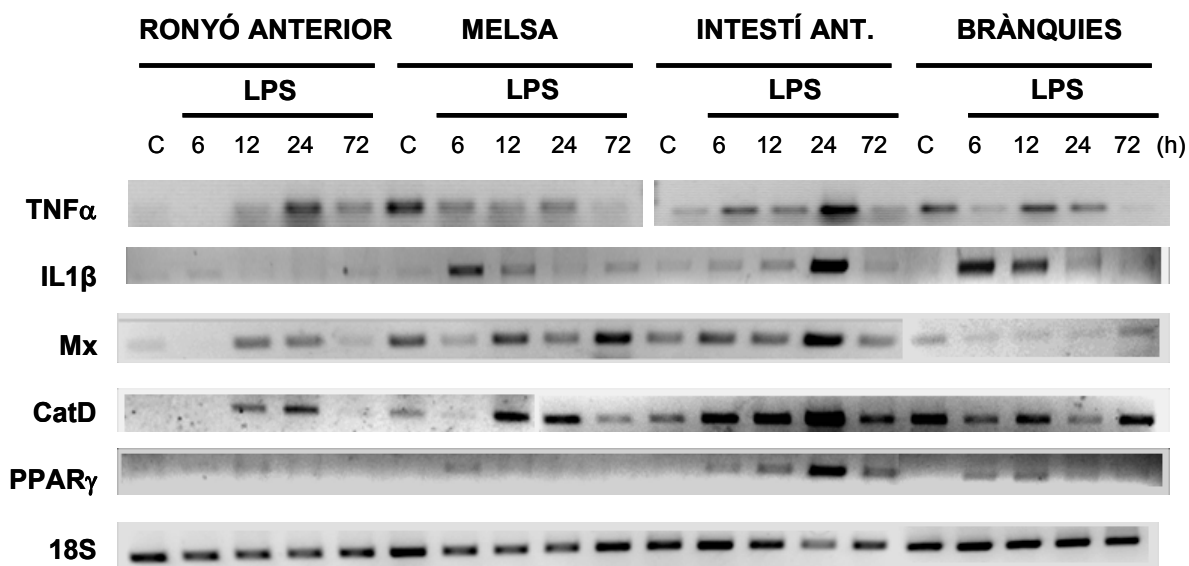


Figura II.1-9: Resultat de la reacció de RT-PCR dels diferents gens immunes en teixits seleccionats (ronyó anterior, melsa, intestí anterior i brànquies) al llarg del temps: 2 i 6 h pels controls i 6, 12, 24 i 72 h pels animals sotmesos a estrès agut per injecció de 8mg/kg de LPS (n=4). Per cada teixit es mostra l'expressió dels gens TNF α , IL1 β , Mx, catD, PPAR γ i 18S (control positiu).

- En el ronyó anterior, es va detectar un augment en l'expressió del TNF α , la catD i el Mx entre les 12 i les 24 hores després d'aplicar l'estímul estressant. En canvi, la IL1 β i el PPAR γ tenien nivells baixos d'expressió i no semblaven respondre a l'estímul estressant (figura II.1-9).
- A la melsa, es podia detectar l'expressió de IL1 β a partir de les 6 hores post-injecció mentre el TNF α semblava disminuir després de la injecció d'endotoxina. La resposta de catD era similar a la resposta trobada al ronyó anterior, és a dir, més elevada a les 12 i 24 hores post-estrès. I en canvi, la resposta de Mx en aquest cas era més constant al llarg del temps. La senyal del PPAR γ continuava essent molt tènue (figura II.1-9).
- A l'intestí anterior, vam trobar tots els gens expressats amb un pic d'expressió 24 hores després de la injecció (figura II.1-9).
- A les brànquies, vam trobar major expressió de la catD, la IL1 β i el PPAR γ sobretot a les primeres hores després de la injecció (figura II.1-9).

5.2.3. DISCUSSIÓ.

5.2.3.1. Apartat a) Efectes de la injecció de LPS en la resposta corticosteroidea de l'orada (*Sparus aurata*).

L'estudi de les interaccions entre el sistema immune i l'endocrí en peixos està bastant limitat a l'ús de citoquines recombinants i anticossos de mamífers. No obstant, degut a les diferències en la seqüència, les citoquines de mamífers no han de comportar-se necessàriament de la mateixa manera que les dels peixos pel que fa a l'activació de la resposta d'alliberació de cortisol. A falta de citoquines específiques de peixos, la injecció d'endotoxina o LPS és el model d'estrès agut més utilitzat per a imitar la resposta a un estrès immunològic (Balm 1997; Balm i col. 1995).

Tot i que la resposta *in vivo* de l'eix hipotalàmic-pituitàrio-interrenal (HPI) al tractament amb LPS està poc estudiada (Holland i col. 2002; Balm 1997; Balm i col. 1995) ens va servir de referència per a escollir les dosis i els temps de mostreig pel nostre experiment. Està demostrat des de fa temps que els peixos són relativament insensibles al tractament amb LPS (Balm i col. 1995; Berzci i col. 1966) i que les concentracions requerides *in vitro* per a l'estimulació immune són més elevades que les requerides pels mamífers (Pelegrín i col. 2004; Zou i col. 2000).

Al començament del nostre estudi amb l'orada, vam decidir aplicar intraperitonealment una dosi aproximadament 10 vegades més elevada que la dosi letal provada prèviament en ratolins (Lauzurica i col. 1999), és a dir que vam utilitzar 80 µg/kg, i també una dosi 50 vegades superior a aquesta, o sia 4 mg/kg, similar a la utilitzada prèviament amb la perca americana, *Perca flavescens*, on utilitzaven 3 mg/kg (Haukenes i Barton 2004). Finalment, vam augmentar 2 vegades més la dosi fins a 8 mg/kg.

Es van mirar els nivells de cortisol en plasma perquè és un dels paràmetres més utilitzats com a indicador de la resposta als factors estressants (Barton 2002; Ortuño i col. 2002; Barton i Iwama 1991; Pickering i Pottinger 1989). Per començar, volem fer constar que els valors de cortisol controls que hem trobat en el nostre experiment dues hores després de la injecció salina, són elevats si els comparem amb els valors basals de 2 ng/ml (Rotllant i col. 2001) o de 5,7 ng/ml (Ortuño i col. 2002) trobats també en l'orada (*Sparus aurata*) en absència d'estrès. Altres exemples d'espècies amb valors basals baixos de cortisol seria el cas del pagre (*Pagrus pagrus*) amb 6 ng/ml (Rotllant i Tort 1997), la perca americana (*Perca flavescens*) on es troben valors basals que oscil·len entre 3,4 i 8,3 ng/ml (Haukenes 2001; Barton 2002) o la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*), que mostra valors basals de 1,7 a 7,4 ng/ml (Barton 2002). No obstant, cal destacar que els valors obtinguts estarien dins el marge de concentracions esperables, donat que la determinació de cortisol es fa dues hores després d'una injecció intraperitoneal de solució salina i, per tant, després d'aplicar un estrès agut de temps curt. Els nivells de cortisol en plasma dels animals control són el resultat d'un increment inicial (normalment produït entre els 10 i els 60 minuts) i un retorn progressiu als valors basals. En el nostre experiment els valors basals de

cortisol es mantenen elevats (>20ng/ml) fins el mostreig efectuat 72 h després de la injecció (figura II.1-2).

Ens va sobtar trobar que els nivells de cortisol plasmàtic en la dosi d'assaig de 4 mg/kg de LPS fossin el doble que els trobats quan n'apliquem 8 mg/kg, tant dues hores com sis hores després de la injecció, trobant diferències estadísticament significatives entre les dues dosis únicament en el mostreig de les dues hores. Probablement aquestes diferències són degudes a variacions individuals i a la capacitat de cada animal de reaccionar a la infecció. La lectura de l'error estàndar de la mitjana (S.E.M.) ens mostra aquestes diferències individuals, de manera que, mentre alguns individus s'estaven recuperant de l'estrès, d'altres tot just començaven a respondre alliberant-ne cortisol. Així doncs, a partir de la dosi de 4 mg/kg la resposta d'alliberació de cortisol plasmàtic segueix un patró similar. De tota manera, seria interessant determinar quina seria la dosi responsable del pic d'alliberació de cortisol ja que en el nostre estudi hi ha un llindar bastant ampli entre les dosis de 80 µg/kg i 4 mg/kg.

La concentració més baixa utilitzada (80 µg/kg) no va induir canvis importants en els nivells de cortisol plasmàtic respecte el grup control durant l'experiment. Però amb les dosis de 4 mg/kg i 8 mg/kg, els valors de cortisol van augmentar immediatament dues hores després d'aplicar el LPS, retornant als nivells basals a partir de les 12 hores després de la infecció. Aquesta dinàmica de resposta d'alliberació de cortisol analitzada després d'un estrès per injecció de LPS concorda amb la típica resposta a un estrès agut (Barton 2002; Rotllant i Tort 1997).

En el nostre estudi vam trobar diferències en la magnitud de la resposta en funció del temps i de la dosi aplicada trobant, per exemple, un augment màxim de 16 vegades respecte els valors basals sis hores després d'injectar 4 mg/kg. És difícil comparar els nostres resultats amb altres estudis perquè la magnitud de la resposta varia en funció de l'estrès aplicat. En el cas concret de l'orada (*S.aurata*), l'exposició a l'aire produeix un augment de 50 vegades en les concentracions de cortisol plasmàtic (Arends i col. 1999); en canvi, pateix un augment inicial en la concentració de cortisol plasmàtic de fins a 8 vegades respecte el control quan se li aplica un estrès per confinament durant més de 24 hores (Arends i col. 1999) però només de 3 vegades després de dos dies de confinament (Tort i col. 1996).

Cal tenir en compte que la magnitud de la resposta també varia en funció de l'espècie estudiada. La resposta de la perca americana (*P.flavescens*) a un estrès agut de 30 segons d'exposició a l'aire amb xarxa és un augment de 24 vegades els nivells de cortisol i de 3,5 vegades després de manipulació o d'injecció salina (Haukenes i Barton 2004) i en el cas de la perca europea (*P.fluviatillis*) el transport augmenta 3 vegades els valors de cortisol (Acerete i col. 2004).

Els nivells de cortisol màxims en el nostre experiment es van observar sis hores després de la injecció de 4 mg/kg de LPS, la qual cosa coincideix amb la resposta de la perca americana, *P.flavescens* (Haukenes i Barton 2004) mentre que a la truita irisada, *O.mykiss*, els valors màxims es van trobar a les 8 hores aplicant una dosi més baixa (Holland i col. 2002).

Pel que fa als valors numèrics màxims de cortisol plasmàtic, la resposta també és diferent en funció del tipus d'estrès aplicat i de l'espècie estudiada. Fins i tot en el nostre estudi, vèiem que dues dosis d'un mateix estímul estressant (4 o 8 mg/kg de LPS) van donar valors màxims diferents de cortisol plasmàtic (figura II.1-2). Generalment, els augments en els nivells de cortisol plasmàtic en peixos en resposta a un estrès agut tendeixen a estar entre 30 i 300 ng/ml segons les espècies, mentre que en el nostre estudi amb l'orada, els nivells de cortisol han sobrepassat els 500 ng/ml sis hores després de l'estimulació amb LPS. És la primera vegada que es troben valors tant elevats en l'orada però no és exclusiu d'aquesta espècie. També s'han trobat valors molt alts en altres espècies, és el cas del llobarro estriat (*Morone saxatilis*), per exemple, després de fer exercici o d'un estrès per manipulació arriba a assolir valors de 400 ng/ml (Cech i col. 1996). Dues hores després d'un estrès agut per manipulació els nivells de cortisol de la perca europea (*P. fluviatilis*) augmenten fins a 121 ng/ml (Acerete i col. 2004). El transport, per exemple, indueix ràpides elevacions en el cortisol plasmàtic de 100 a 160 ng/ml en 15-30 minuts de captura a peixos juvenils de corvina ocellada (*Sciaenops ocellatus*) (Robertson i col. 1988) i provoca uns nivells màxims de cortisol de 150 ng/ml a la perca europea (*P. fluviatilis*) una setmana després del transport (Acerete i col. 2004). D'altra banda, altres espècies de peixos mostren una reactivitat més baixa: la perca americana (*P. flavescens*) després de 30 segons de manipulació amb xarxa i exposició a l'aire augmenta els nivells de cortisol fins a 85 ng/ml, o fins 30-35 ng/ml després de manipulació o d'injecció salina (Haukenes 2001). L'esturió siberià (*Acipenser baeri*) sotmès a modificacions severes en la pressió parcial d'oxigen a l'aigua durant 30 min, només arriba a valors de 30 ng/ml de cortisol plasmàtic (Maxime i col. 1995).

En conjunt, les discrepàncies que es troben en la literatura en relació a la magnitud i la intensitat de la resposta probablement es deuen a les diferències entre espècies, als mètodes aplicats per determinar l'augment dels nivells de cortisol, als mètodes de mostreig, a canvis estacionals i diaris, al fotoperíode, a condicions nutricionals o, fins i tot, a l'estat de maduració sexual de l'animal (Mommsen i col. 1999).

També les respostes del sistema immune són diferents segons si l'administració d'endotoxina es fa *in vivo* o *in vitro*. Per exemple, *in vivo* el LPS estimula l'eix HPI en peixos induint respostes inflamatòries i augmentant l'alliberació d'ACTH i cortisol (Holland i col. 2002; Balm 1997) però *in vitro* el LPS no té efectes en l'estimulació de la producció de cortisol (Balm i col. 1995).

La resposta de l'eix HPI també podria ser diferent segons el tipus d'injecció. Els nostres resultats concorden amb l'estudi de Grinevich fet en rates (Grinevich i col. 2001) on una única injecció aguda de LPS augmenta la secreció de cortisol plasmàtic. A més, la resposta de l'eix HPA a una injecció repetida de LPS en rates disminueix els nivells de cortisol (Grinevich i col. 2001) però no s'han estudiat encara aquestes respostes en peixos.

5.2.3.2. Apartat b) Expressió del receptor glucocorticoide de cortisol sota els efectes de la injecció de LPS en l'orada (*Sparus aurata*).

Al principi del nostre treball, la majoria d'estudis en relació al receptor de cortisol en peixos s'havien centrat en experiments d'immunocompetència i expressió o exclusivament en el seu clonatge (Sturm i col. 2005; Terova i col. 2005; Bury i col. 2003; Dean i col. 2003; Vijayan i col. 2003; Marsigliante i col. 2000; Weyts i col. 1998; Tagawa i col. 1997; Knoebl i col. 1996, Ducouret i col. 1995). Recentment s'ha demostrat l'existència del receptor de tipus I o mineralocorticoide (MR) (Sturm i col. 2005; Greenwood i col. 2003; Sloman i col. 2001; Colombe i col. 2000) però en el moment de començar els experiments només s'havia estudiat el receptor glucocorticoide.

S'han dissenyat prèviament diferents models experimentals per a estudiar el comportament del GR en peixos sotmesos a estrès, de manera que s'han pogut descriure diferents mecanismes. Per exemple, que l'adaptació a l'aigua marina de la tilàpia de Moçambic (*Oreochromis mossambicus*) va acompanyada d'una regulació positiva del nombre de receptors glucocorticoides intracel·lulars a les brànquies (Dean i col. 2003). O que l'estrès pot promoure l'associació entre la hsp70 (*heat shock protein 70*) i el GR (Basu i col. 2003). Fins i tot, que l'administració crònica de cortisol afecta el contingut de GR al fetge de la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) (Vijayan i col. 2003).

De tota manera, no hi havia estudis de cap tipus amb el receptor glucocorticoide en l'orada perquè no s'havia clonat. Nosaltres hem clonat el GR de l'orada (capítol I) i posteriorment hem volgut analitzar els canvis en la seva expressió en una selecció representativa de diferents teixits, després d'un estrès per injecció de LPS i la seva regulació al llarg del temps.

Som conscients de les limitacions que comporta una quantificació per densitometria com la que s'ha dut a terme en el nostre estudi perquè no és una quantificació estandaritzada com podrien ser-ho altres tècniques com la PCR a temps real o el Northern blot. De tota manera, aquesta semiquantificació ha estat utilitzada en estudis d'aquest tipus (Greenwood i col. 2003) i s'ha considerat prou vàlida fins que no han aparegut les noves tècniques moleculars. A més, en el nostre estudi, ens permet donar indicis de la tendència en l'expressió del receptor de glucocorticoides (GR) en l'orada. En concret, ens permet analitzar l'expressió d'aquest gen després d'una estimulació immunològica per injecció d'endotoxina. Així doncs, els nostres resultats mostren que el GR està expressat a tots els teixits estudiats, la qual cosa concorda amb resultats prèviament estudiats al nostre laboratorí (capítol I). Ponderant l'expressió del GR amb el control positiu de β -actina vèiem que, a més, la resposta del receptor al llarg del temps era específica de cada teixit (figures II.1-3-II.1-8):

✓ En el cervell va augmentar progressivament a partir de les 12 hores després de la injecció immune, moment en que els nivells de cortisol plasmàtic comencen a disminuir i recuperar-se després del pic d'alliberació. El cervell regula l'alliberació de cortisol a circulació sanguínia després d'un estrès immune d'aquest tipus. La resposta tardana del GR en el cervell podria estar relacionada amb la regulació negativa que el cortisol exerceix en aquest teixit a nivell hipotalàmic i

hipofisari. No obstant, en els últims anys, s'estan estudiant uns receptors de membrana al cervell que permeten l'acció ràpida dels glucocorticoides per mecanismes no genòmics (Tasker i col. 2005; Borski 2000).

✓ En l'intestí posterior, l'expressió del receptor també va augmentar progressivament a partir de les 12 hores després de la injecció immune, com en el cas del cervell i, en canvi, la resposta del receptor a l'intestí anterior va ser més ràpida. És possible que la resposta fos més ràpida a la part anterior de l'intestí perquè està més a prop del lloc d'injecció de LPS. De tota manera, l'intestí posterior també està implicat en la regulació del GR.

✓ Els nivells d'expressió en la brànquia van augmentar a les 12 i 24 hores però van disminuir posteriorment. La resposta de la brànquia va ser totalment inesperada perquè esperàvem que l'expressió del GR fos elevada ja que és un dels teixits claus en la resposta immune. Possiblement la resposta del receptor hauria estat més intensa si haguéssim aplicat un estrès osmòtic o salí o una infecció per immersió en lloc de per injecció ja que la brànquia està implicada en processos osmoregulatoris o en l'entrada dels patògens de l'aigua (Dean i col. 2003; Marsigliante i col. 2000; Tagawa i col. 1997).

✓ Al ronyó anterior, els nivells d'expressió van augmentar a les 12 i 24 hores però van disminuir posteriorment. Aquest òrgan en peixos concentra l'acció dels sistemes nerviosos, immune i endocrí perquè s'encarrega de l'alliberació de cortisol i catecolamines i, a més, té funcions hematopoiètiques.

✓ La melsa està involucrada en la resposta immune innata dels peixos (Tort i col. 2003). Era esperable doncs que respongués a la injecció 12 hores després i mantingués una resposta més constant en els nivells d'expressió.

✓ En el fetge vam trobar nivells més o menys constants del GR, a diferència de la resta de teixits, i una disminució en l'expressió 72 hores després d'aplicar l'endotoxina. Els glucocorticoides mobilitzen energia augmentant la hiperglucèmia estimulants la gluconeogènesi hepàtica. Aquests efectes necessàriament han de ser més ràpids i podrien estar relacionats amb una resposta no genòmica del cortisol (Borski 2000).

Si comparem en paral·lel els nivells del cortisol plasmàtic amb els nivells d'expressió del GR podem veure que, en general, sembla existir una correlació inversa entre tots dos, que concorda amb estudis previs (Mommsen i col. 1999; Weyts i col. 1998). En el nostre estudi els animals recuperaven els nivells de cortisol plasmàtic 12 hores després de la injecció immune i, en la majoria de teixits estudiats (cervell, melsa, pronefros, brànquies i intestí posterior), és a partir d'aquest punt on trobem l'augment en l'expressió del GR. Anteriorment no s'havia estudiat la resposta del GR a la infecció per endotoxina en peixos; el que hem trobat amb el nostre estudi és que quan la hormona no es detecta en el plasma comença l'activació del receptor a nivell cel·lular i de manera específica a cada teixit.

5.2.2.3. Apartat c) Expressió de gens immunes sota els efectes de la injecció de LPS en diferents teixits de l'orada (*Sparus aurata*).

Les comunicacions immuno-endocrines en els vertebrats són importants per a poder mantenir l'equilibri del medi intern després d'estar sotmesos a una situació estressant (Engelsma i col. 2002; Haddad i col. 2002; Harris i Bird 2000; Turnbull i Rivier 1999; Weyts i col. 1999; McEwen i col. 1997; Wendelaar Bonga 1997; Wedemeyer i col. 1990). La inflamació, en particular, desencadena una resposta generalitzada de tot l'organisme per tal de mantenir aquest equilibri homeostàtic. Ens vam fixar en diferents gens immunes, que s'estàvem utilitzant al laboratori per altres estudis i amb altres finalitats. Els vam estudiar en uns teixits concrets, alguns amb funcions principalment immunes, per a estudiar la resposta global després d'una estimulació immunològica per injecció d'endotoxina i la possible relació entre els sistemes immune i endocrí. Tot i que, en aquest estudi, al igual que en l'estudi anterior, estem limitats per la quantificació per densitometria creiem que aquests resultats donen les primeres aproximacions de les comunicacions entre ambdós sistemes després de l'estimulació immune (figura II.1-9). Aquest experiment fet a ronyó anterior, melsa, intestí anterior i brànquies confirma, per primera vegada, que aquests teixits expressen gens immunes a l'orada, els quals estan modulats per LPS.

Els glucocorticoides, un cop secretats, regulen la resposta inflamatòria inhibint, per retroalimentació negativa, la producció de citoquines induïdes pel LPS (Haddad i col. 2002), principalment la IL1 β i el TNF α . En el ronyó anterior, que justament és l'òrgan encarregat de produir cortisol en peixos, es veu molt clarament i de manera immediata aquesta regulació negativa ja que no es detecta expressió de la interleuquina 1 beta (IL1 β). La IL1 β s'ha clonat en els últims 5 anys a diferents espècies de peixos: la truita irisada, *Oncorhynchus mykiss* (Wang i col. 2004; Zou i col. 1999a), la carpa, *Cyprinus carpio* (Engelsma i col. 2001), el llobarro, *Dicentrarchus labrax* (Scapigliati i col. 2004), el gatvaire denticulat, *Scyliorhinus canicula* (AJ251201, Bird 1999), el bacallà, *Gadus morhua* (AJ535730, Rannem 2005), el carpí vermell, *Carassius auratus* (AJ249137, Bird 2005), el salmó, *Salmo salar* (AY617117, Lindenstrom 2004) i, fins i tot, l'orada, *Sparus aurata* (Pelegrín i col. 2001). Malgrat això, encara no s'han fet prou estudis funcionals amb aquesta citoquina. S'havia demostrat que una injecció bacteriana o de LPS com l'aplicada en el nostre experiment induïx l'expressió de la IL1 β en peixos (Pelegrín i col. 2004; Engelsma i col. 2002; Pelegrín i col. 2001; Zou i col. 2000; Zou i col. 1999a; Zou i col. 1999b). Concretament la resposta temporal a l'estimulació amb LPS es dona entre les 2,5 i les 4 hores en leucòcits de ronyó anterior a la truita (Zou i col. 2000). L'expressió de IL1 β a ronyó anterior en l'orada observada en el nostre treball contrasta amb aquests estudis i també amb estudis previs fets en la mateixa espècie que mostren que la IL1 β està fortament estimulada després de l'estimulació amb LPS (Pelegrín i col. 2004).

El TNF- α s'ha clonat a diferents espècies de peixos com el fals halibut del Japó, *Paralichthys olivaceus* (Hirono i col. 2001), la truita irisada, *O. mykiss* (Laing i col. 2001), la truita

de rierol, *Salvelinus fontinalis* (Bobe i Goetz 2001), la carpa, *C. carpio* (Saeij i col. 2003) i també a l'orada, *S. aurata* (García-Castillo i col. 2002). Respecte els estudis funcionals previs, s'ha vist que el LPS *in vitro*, a la truita comú (*Salmo trutta*), induïx l'expressió de TNF α a macròfags i monòcits (MacKenzie i col. 2003) i en leucòcits primaris aïllats (Hirono i col. 2001; Laing i col. 2001). En general, exceptuant els macròfags, en peixos no queda massa clar quins altres tipus cel·lulars són capaços d'expressar TNF α . La resposta del factor de necrosis tumoral (TNF α) trobada al ronyó anterior en el nostre experiment és una mica més lenta que la de la IL1 β però també disminueix la seva expressió. A salmònids s'ha vist que el TNF α està expressat de manera constitutiva a ronyó anterior i brànquies i és induït per LPS en leucòcits aïllats de ronyó anterior (Laing i col. 2001) i els resultats trobats a l'orada concorden amb el model de salmònids.

En general, l'augment de cortisol plasmàtic que nosaltres hem detectat probablement és degut a l'acció de les citoquines proinflamàtòries alliberades en resposta al LPS que estimulen l'eix HPI a nivell hipotalàmic i pituitari (Holland i col. 2002; Balm 1997) però s'hauria de fer un seguiment temporal més seguit en els primers moments després de la injecció.

Els resultats d'aquest experiment permeten dir que tots els teixits estudiats estan participant d'alguna manera en la resposta immune. La melsa, teixit involucrat en la resposta immune innata dels peixos (Tort i col. 2003), mostrava canvis en l'expressió de tots els gens immunes estudiats després d'una injecció d'endotoxina. A l'intestí anterior augmenta l'expressió de tots els gens estudiats pràcticament des de l'inici de la infecció; en aquest teixit es detecten canvis en l'expressió del PPAR γ mentre a la resta de teixits els seus nivells d'expressió són basals. Aquest resultat concorda amb estudis previs fets en el salmó atlàntic (Andersen i col. 2000) que mostra l'existència de múltiples variants de PPAR γ al fetge, però també es veu una expressió basal a la melsa, ronyó i brànquies. La resposta més generalitzada a l'intestí anterior podria estar relacionada amb la proximitat física al lloc de la injecció. La resposta a les brànquies és més ràpida en tots els gens estudiats ja que, degut al medi en el que viuen, és la via d'entrada de moltes infeccions bacterianes i requereix respondre immediatament.

A l'orada s'han clonat altres gens immunes com la proteïna Mx (Tafalla i col. 2004), la catD (Carnevali i col. 1999) o el PPAR γ (Leaver i col. 2005) però no s'havia estudiat la resposta d'aquests gens a una injecció d'endotoxina. Donada la resposta de la proteïna Mx que nosaltres hem trobat suggerim que pot tenir un paper en la defensa antibacteriana en peixos a més de la seva funció antiviral. La catepsina D també participa en el sistema immune innat perquè respon positivament a un estímul de LPS en l'orada la qual cosa concorda amb la resposta de la truita (Goetz i col. 2004a).

En general, existeix una correlació inversa entre els nivells de cortisol plasmàtic i l'expressió del GR (cervell, melsa, pronefros, brànquies i intestí posterior) (apartats a i b). Analitzant en paral·lel els nivells d'expressió del GR amb els canvis en l'expressió de les citoquines al llarg del

temps en els mateixos teixits, veiem que, a la melsa, quan hi ha un augment d'expressió del GR es dóna una disminució de l'expressió del $TNF\alpha$ i la $IL1\beta$. A la resta de teixits la resposta no és tan clara i podria ser més tardana.

Aquest estudi ha analitzat, per primera vegada, la resposta de diferents gens immunes i endocrins a l'orada després d'una injecció d'endotoxina. Arribats a aquest punt, i considerant els resultats obtinguts amb aquest experiment, vam decidir utilitzar un model experimental *in vitro*. El propòsit inial d'aquest nou experiment era establir que la resposta de l'animal a la injecció de LPS era conseqüència de la relació entre la via de transducció de senyals $NF\kappa B$ i el receptor glucocorticoide (GR), en definitiva, dels sistemes immune i endocrí.

5.3. EXPERIMENT 2: Expressió diferencial del receptor glucocorticoide i altres gens immunes en un cultiu primari d'hepatòcits d'orada (*Sparus aurata*).

5.3.1. MATERIALS I MÈTODES.

5.3.1.1. Animals experimentals.

Per realitzar l'estudi vam obtenir aproximadament 200 orades sexualment immadures (*Sparus aurata*) de $98,64 \pm 2,96$ g de pes corporal de la piscifactoria Granja Marina del Masnou (Masnou, Barcelona). Els peixos es van transportar fins les instal·lacions de la Universitat Autònoma de Barcelona on es van establir a una densitat de manteniment de 7 kg/m^3 en dos tancs circulars de fibra de vidre. Aquests tancs tenen una capacitat total de 1000 L i el sistema de circulació d'aigua tancat manté un flux constant de 3000 L/h a través d'un biofiltre que conté bacteris nitrificants per neutralitzar els efectes tòxics dels residus amoniacals generats pel propi metabolisme de l'animal. Els tancs experimentals estaven parcialment coberts amb xarxes fosques i es va mantenir un fotoperíode constant de 12 h L: 12 h D (començant a les 7 h). Es van mantenir en aquestes condicions d'aclimatació durant un mínim de dues setmanes abans de l'inici dels experiments.

Durant el període d'aclimatació i durant els experiments els nivells d'amoni es van mantenir entre valors de 0,001 a 0,086 mg/L, els nivells de nitrit entre 0,001 i 0,054 mg/L i el rang de pH entre 7,02 i 7,9. La temperatura de l'aigua es va mantenir als 16 °C i la salinitat entre el 33-35‰.

Els peixos s'alimentaven cada dos dies amb una dieta comercial (Skretting winter D4, Nutreco, Burgos) aproximadament a una dosi de manteniment de 0,5% del pes corporal/dia, fins a les 24 h prèvies al començament dels experiments perquè els períodes de menja podrien interferir en les nostres mesures.

Passat el temps mínim d'adaptació, vam agafar 3 peixos a l'atzar per a cadascun dels cultius d'hepatòcits ($n=3$ en cada experiment).

5.3.1.2. Cultiu d'hepatòcits.

L'aïllament dels hepatòcits es va fer segons el protocol de Mommsen amb petites modificacions (Mommsen i col. 1994). El protocol consistia, en primer lloc, en anestesiari l'animal amb fenoxietanol (0,75ml/L) i heparinitzar-lo per injecció intraperitoneal (10000 U/kg, *Lithium heparin*, Deltalab) per tal de facilitar la posterior sortida de la sang. Després d'uns minuts es va procedir a la dissecció ventral des de l'anús fins al peritoneu per exposar el fetge, treballant sempre en condicions estèrils.

S'exposà la vena intestinal posterior i es va introduir una cànula de 22G (0,9x 25mm) (Vasocan Braunüle, Braun) fins que es trobà una lleugera resistència (aproximadament a 5 mm del fetge), es fixà amb puntes de xeringa per evitar que es mogués. Es col·locà un tub de silicona estèril de Intrafix Primeline Classic (Braun) de 3 mm de diàmetre intern i 4 mm de diàmetre extern i es connectà a la bomba de perfusió. Es procedí a perfondre el teixit a 0,5 ml/min durant 25-30 minuts a temperatura ambient amb tampó I (136,9 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,81 mM MgSO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,33 mM Na₂ HPO₄, 10mM Hepes, 5 mM NaHCO₃, pH 7,63 i 0,355 mOsm/kg) per eliminar el màxim de cèl·lules sanguínies. Es va treure el cor al cap d'una estona d'haver començat a perfundir i es va fer un lleuger massatge per facilitar la sortida de la sang.

Després es continuà la perfusió amb tampó II, que consisteix en tampó I més 0,125 mg/ml col·lagenasa IV (*Clostridium histolyticum*, Sigma) per digerir el fetge i eliminar el col·lagen intercel·lular, durant 25-35 minuts més a temperatura ambient (fent massatge al fetge al principi del canvi de medi). Quan començaven a sortir esquerdes, es va treure el fetge vigilant de no petar la vesícula biliar i es col·locà en una placa de Petri amb 10 ml de tampó I. Posteriorment, es continuà amb la disrupció mecànica, tallant el teixit en trossos petits amb una ganiveta per facilitar la sortida de les cèl·lules. Es disgregà amb pipetes de diferents mides i es van fer passar les cèl·lules a través d'una malla estèril (100 µm), recollint-les en un tub falcon de 50 ml amb tampó I fins a un volum final de 15 ml. Centrifugàrem les cèl·lules suament durant 2 min a 1000 r.p.m. Vam descartar el sobrenedant i es va barrejar el pellet amb 15 ml de tampó II (tampó I més 2% BSA, 1,5 mM CaCl₂). Aquest rentat es repeteix fins que el *pellet* és rosat-blanquinós. Després del darrer rentat es van resuspendre les cèl·lules en medi de cultiu (DMEM, PAA Laboratories) suplementat amb 10% FCS (PAA Laboratories) i 1% antibiòtic (primocin, Invivogen). Les cèl·lules s'incubaren a 18 °C en plaques de 6 pous tractades amb poli-L-lisina (Sigma) plaquejant 2 ml/pou i permetent-les créixer en monocapa.

El recompte cel·lular era de 20x10⁶ cèl/ml i es comprovà que la viabilitat cel·lular fos > 90% pel mètode del blau de tripà (*trypan blue method*). Canviàvem el medi de cultiu cada 24-48 hores, fins el moment de fer els tractaments experimentals, és a dir, 72 hores després del cultiu.

5.3.1.3. Disseny experimental.

Les cèl·lules en cultiu van patir tres tractaments diferents:

- TNF α recombinant d'orada (rTNF α , Múrcia). La concentració inicial era de 250 ng/ μ l, es va diluir amb solució salina estèril fins aconseguir una concentració d'assaig de 0,1, 10 i 100 ng/ml, es va aplicar 2 μ l/pou.

- Cortisol (hidrocortisona). La concentració inicial era de 500 ng/ml preparada amb etanol pur. Les concentracions d'assaig van ser 5, 100 i 500 ng/ml aplicant 2 μ l/pou.

- Control: vehicle, el mateix volum (2 μ l) que a les cèl·lules tractades.

Es va recollir mostra 12 hores després de l'aplicació de l'estrès per a totes les dosis d'assaig. També es va fer un seguiment al llarg del temps, recollint mostra després de 1, 3, 6 i/o 12 hores únicament després d'aplicar les dosis 10 ng/ml de rTNF α i 500 ng/ml de cortisol.

La recollida de mostres consistia en extreure el màxim de medi de cultiu de cada pou per tal de quedar-nos únicament amb les cèl·lules adherents, i aplicar el tri-reagent (M.C.R.) directament a la placa (apartat 5.3.1.4., extracció de RNA). Per cada tractament es va recollir mostra de 3 pous i es van homogeneïtzar juntes com si es tractés d'una única mostra.

5.3.1.4. Tècniques analítiques.

5.3.1.4. A) Extracció de RNA.

Les extraccions de RNA total dels cultius es van fer, de manera independent, utilitzant un mètode de purificació estandaritzat per la casa comercial (Molecular Center Research, M.C.R.). El protocol consistia en homogeneïtzar les cèl·lules en 1 ml de tri-reagent (M.C.R.) per cada $5-10 \times 10^6$ cèl·lules en cultiu. Després, la fase d'extracció es va fer amb cloroform (Sigma), es va precipitar amb isopropanol (Sigma) i es rentà el precipitat amb etanol (Scharlau) al 75%. Les mostres es van dissoldre amb aigua tractada amb DEPC i la concentració es va mesurar i calcular per espectrofotometria (BiomateTM 3 Series Spectrophotometers, Thermo Spectronic).

Per comprovar l'estat dels RNAs, es van fer electroforesis en gels d'agarosa a l'1% en tampó MOPS i amb el marcador de pes molecular (0,24-9,5 Kb RNA ladder, Invitrogen).

5.3.1.4. B) Reaccions de RT-PCR.

Vam utilitzar 5 µg de RNA de cadascun dels tractaments del cultiu anteriorment descrits per retrotranscriure'ls a cDNA segons el protocol de la Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) a una concentració estoc d'enzim de 200 U/µL, en un volum final de reacció de 20 µl.

Els productes de la retrotranscripció es van amplificar per la reacció en cadena de la polimerasa, PCR (Minicycler MJ Research) a partir de 2 µl de cDNA de cada teixit. Cada reacció de RT-PCR contenia a més del cDNA, 1 µl de cada encebador (10 µM, Bonsai technologies, taula II.2-2), 2 µl de clorur de magnesi (Cl₂Mg, 50 mM, Biotools), 1 µl de dNTPs (10 mM, Biotools), 0,5 µl de dTT (1M, Invitrogen) i 2 unitats/µl de Taq DNA polimerasa (Biotools) amb 5µl del tampó específic per aquest enzim i la reacció es va ajustar a un volum final de 50 µl amb aigua tractada amb DEPC.

Els gens estudiats en aquest treball van ser el receptor glucocorticoide (GR), la interleuquina-1 beta (IL1β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), la catepsina D (catD), el receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPARγ) i el 18S com a control positiu de la reacció.

Les condicions de la reacció de RT-PCR per a cada gen concret estan indicades a la taula següent:

Cicles	Programa	GR	TNF-α	IL-1β
1	Desnaturalització	95°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min
35	Desnaturalització	95°C 30 s	95°C 45 s	95°C 45 s
35	Aparellament	55°C 30 s	57°C 45 s	57°C 45 s
35	Extensió	72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 1 min
1	Extensió final	72°C 5 min	72°C 5min	72°C 5min

Cicles	Programa	PPARγ	Cat-D	18S
1	Desnaturalització	95°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min
35	Desnaturalització	95°C 45 s	95°C 45 s	95°C 30 s
35	Aparellament	57°C 45 s	57°C 45 s	55°C 30 s
35	Extensió	72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 1 min
1	Extensió final	72°C 5min	72°C 5 min	72°C 10 min

Taula II.2-1: Programes d'amplificació per RT-PCR dels diferents gens de l'orada (*Sparus aurata*): receptor glucocorticoide (GR), factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), interleuquina 1 beta (IL1β), receptor de peroxisoma proliferador activat gamma (PPARγ), catepsina D (CatD), i el 18 S com a control positiu de la reacció.

Totes les reaccions tenien un control negatiu (aigua tractada amb DEPC) i un control positiu (18S).

La composició nucleotídica dels encebadors utilitzats per a les amplificacions d'aquests gens estan representats en la taula II.2-2:

Encebadors	Composició nucleotídica	T ^a
GR-E Fw	5' - AGTGCTCCTGGCTGTTYCTNATG- 3'	62,4°C
GR-E Rv	5' - TTTCGGTAATTGGTTGCTGATGAT- 3'	57,6°C
TNF α Fw	5' -TCGTTTCAGAGTCTCCTGCAG- 3'	59,4°C
TNF α Rv	5' -AAGAATTCTTAAAGTGCAAACACACCAAAA- 3'	59,6°C
IL1 β Fw	5' -ATGCCCCAGGGGCTGGGC- 3'	65,1°C
IL1 β Rv	5' -CAGTTGCTGAAGGGAACAGAC- 3'	59,8°C
PPAR γ Fw	5' -ACTACACCTCCATCTCCTCC- 3'	59,4°C
PPAR γ Rv	5' -TGTGACATGCCGACATTGAG- 3'	57,3°C
CatD Fw	5' -TACGACGCGGAGAATGACAC- 3'	59,4°C
CatD Rv	5' -GAGGAAGGAGCAGTGAATGGA- 3'	59,8°C
18S Fw	5' -CGAGCAATAACAGGTCTGTG- 3'	57,3°C
18S Rv	5' -GGCAGGGACTTAATCAA- 3'	50,4°C

Taula II.2-2: Composició nucleotídica i temperatures d'aparellament de cadascun dels encebadors utilitzats per a les amplificacions per RT-PCR dels diferents gens immunes de l'orada (*Sparus aurata*): receptor glucocorticoide (GR), factor de necrosis tumoral alpha (TNF α), interleuquina 1 beta (IL1 β), receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPAR γ), catepsina D (CatD) i el 18 S com a control positiu de la reacció. Fw: forward, Rv: reverse.

Els diferents productes de les tres reaccions de RT-PCR es van fer córrer en un gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE tenyit amb bromur d'etidi a una concentració de 0,5 μ g/ml (Sigma) i amb el marcador de DNA de 100 pb (Ready-LoadTM, Invitrogen).

5.3.1.5. Anàlisi estadística.

Les diferències entre grups en el cortisol plasmàtic es van analitzar per anàlisi de variances d'una via (ANOVA), transformant les dades per fer-les homogènies mitjançant conversió logarítmica.

Posteriorment, les diferències entre dades es van determinar per proves *a posteriori* DMS (diferència menys significativa). Es considerarà estadísticament significatiu quan $p < 0,05$. Els valors ($n=5$) es representen com a mitjanes \pm l'error estàndard (S.E.M).

5.3.2. RESULTATS.

La figura II.2-1 mostra l'evolució del cultiu primari d'hepatòcits en l'orada des de les hores immediates posteriors de l'extracció fins el moment d'aplicar els diferents tractaments. Les figures mostren com, a mida que va passant el temps, els hepatòcits es van assentant en el substrat de polilisina i formen grups estables de 2-10 cèl·lules .

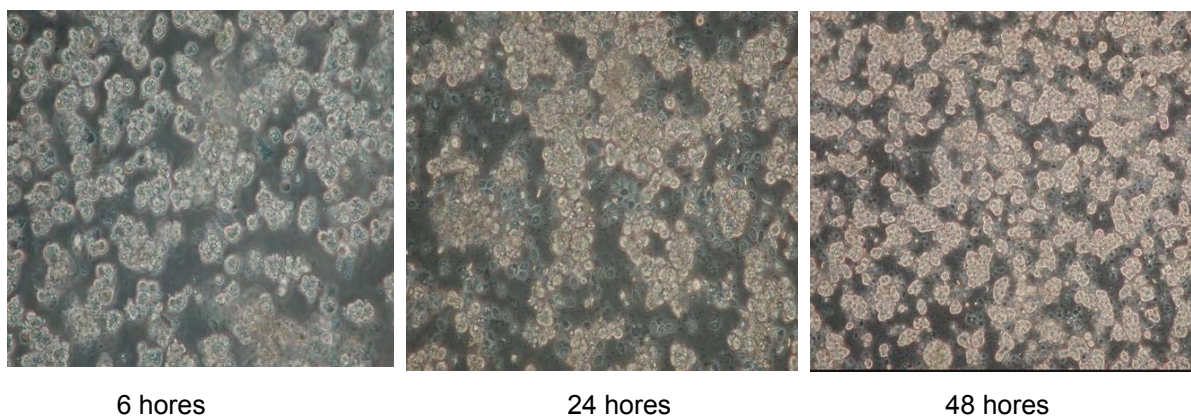


Figura II.2-1: Evolució dels cultius primaris d'hepatòcits d'orada (*Sparus aurata*) crescuts en polilisina, des de les poques hores de la seva extracció (6 hores) fins el moment d'aplicar els tractaments (48 hores).

Un cop optimitzat el mètode d'aïllament i manteniment del cultiu primari d'hepatòcits de l'orada es van aplicar diferents tractaments 48 hores després de la seva extracció. Així doncs, vam aplicar independentment 0,1 ng/ml de rTNF α o 100 ng/ml de cortisol i es va mirar la resposta de diferents gens en l'orada 12 hores després de l'estimulació (figura II.2-2). Els gens d'interès són el receptor glucocorticoide (GR), el factor de necrosi tumoral alfa (TNF α), la interleuquina 1 beta (IL1 β), el receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPAR γ), la catepsina D (catD) i el 18S com a control positiu de la reacció.

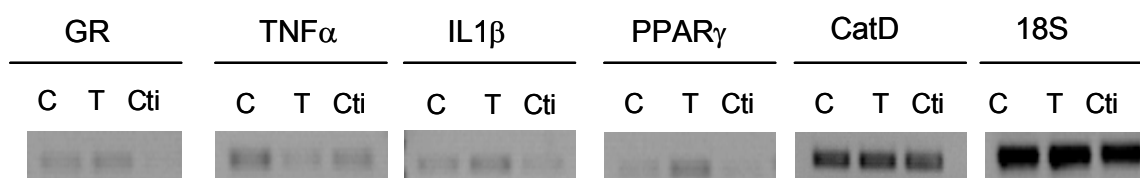


Figura II.2-2: Expressió dels diferents gens estudiats a hepatòcits d'orada, 12 hores després d'aplicar vehicle pels controls (C), 0,1 ng/ml de rTNF α (T) o 100 ng/ml de cortisol (Cti). Els gens d'estudi són el receptor glucocorticoide (GR), el factor de necrosi tumoral alfa (TNF α), la interleuquina 1 beta (IL1 β), el receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPAR γ), la catepsina D (catD) i el 18 S com a control positiu.

La resposta de cadascun dels gens va ser específica segons el tractament aplicat (figura II.2-2):

- Pel que fa al GR i la catD no es detecten canvis en la seva expressió 12 hores després del tractament amb 0,1 ng/ml de rTNF α respecte el control. En canvi, es disminueix l'expressió 12 hores després del tractament amb 100 ng/ml de cortisol.
- L'expressió del TNF α disminueix 12 hores després del tractament amb 0,1 ng/ml de rTNF α respecte el control. D'altra banda, no es detecten canvis amb el control 12 hores després del tractament amb 100 ng/ml de cortisol.
- La IL1 β i el PPAR γ augmenten lleugerament la seva expressió després del tractament amb 0,1 ng/ml de rTNF α i pràcticament no es detecten 12 hores després del tractament amb 100 ng/ml cortisol.

Posteriorment es van provar independentment dues dosis de rTNF α (10 o 100 ng/ml) i dues dosis de cortisol (5 o 500 ng/ml) i es va mirar l'expressió dels mateixos gens 12 hores després d'aplicar el factor estressant (figura II.2-3).

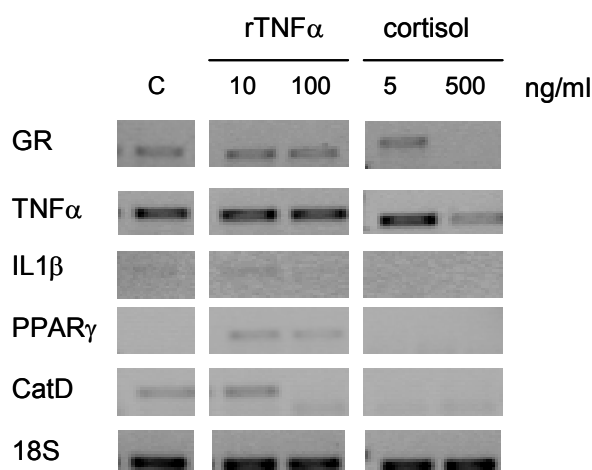


Figura II.2-3: Expressió dels diferents gens estudiats a hepatòcits d'orada, 12 hores després d'aplicar vehicle pels controls (C), 10 o 100 ng/ml de rTNF α i 5 o 500 ng/ml de cortisol. Els gens d'estudi són el receptor glucocorticoide (GR), el factor de necrosi tumoral alfa (TNF α), la interleuquina 1 beta (IL1 β), el receptor activat proliferador de peroxisoma gamma (PPAR γ), la catepsina D (catD) i el 18S com a control positiu.

En aquest cas, hem vist que la resposta d'alguns dels gens estudiats és diferent segons la dosi aplicada (figura II.2- 3):

- Pel que fa al GR i al TNF α no mostren diferències amb el grup control amb cap de les dosis de rTNF α aplicades. En canvi, les respostes de les dosis de cortisol estudiades són diferents

entre sí; es mantenen igual que el grup control 12 hores després d'aplicar la dosi de 5 ng/ml però disminueixen, el GR pràcticament ni es detecta, 12 hores després d'aplicar la dosi de 500 ng/ml de cortisol.

- D'altra banda, la IL1 β i la catD no mostren diferències amb el grup control amb la dosi de 10 ng/ml de rTNF α però disminueixen amb la dosi de 100 ng/ml de rTNF α . Pel que fa a la resposta després del tractament de cortisol, pràcticament no es detecten aquests gens i tampoc el PPAR γ .

Finalment, es va fer un seguiment al llarg del temps únicament del receptor glucocorticoide (GR) i del TNF α després d'aplicar 10 ng/ml de rTNF α o 500 ng/ml de cortisol (figura II.2-4).

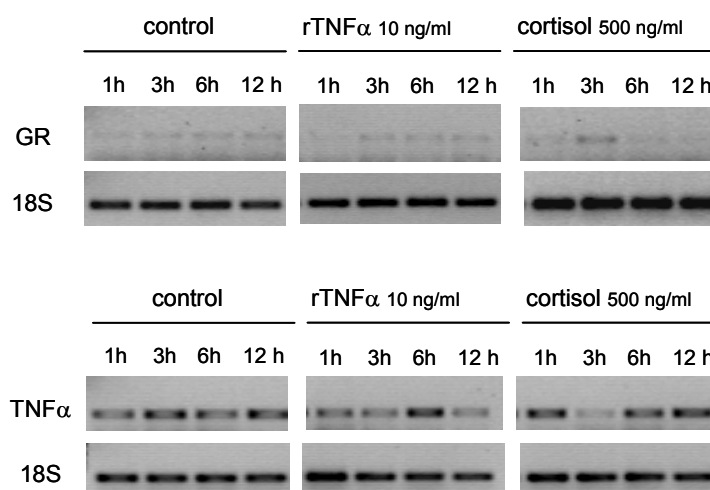


Figura II.2-4: Expressió del receptor glucocorticoide (GR) i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF α) a hepatòcits d'orada, 1, 3, 6 i 12 hores després d'aplicar vehicle pels controls (C), 10 ng/ml de rTNF α (rTNF α) o 500 ng/ml de cortisol. Per cada punt es mostra també l'expressió del 18S com a control positiu.

- En aquest estudi de seguiment temporal veiem que en conjunt, l'expressió del GR és bastant tènue en tots els tractaments. De tota manera, respon lleugerament a l'estímul de 10 ng/ml de rTNF α 1 hora després de l'exposició, es recupera posteriorment i es manté més o menys constant fins l'últim punt de mostreig. En canvi, quan apliquen 500 ng/ml de cortisol l'expressió del GR augmenta 3 hores després de l'aplicació de l'estrès i torna als valors basals en les hores posteriors (figura II.2-4).

- L'expressió del TNF α és més intensa fins i tot en els grups controls. En aquest cas, es veu un pic d'expressió 6 hores després d'aplicar 10 ng/ml de rTNF α . En el cas de la resposta a 500 ng/ml de cortisol veiem que es dona una disminució en l'expressió 3 hores després d'aplicar el tractament en comparació amb la resta de punts de mostreig.

5.3.3. DISCUSSIÓ.

S'han fet servir hepatòcits aïllats de teleostis des de la dècada dels 80 però cada espècie presenta particularitats pròpies respecte els requeriments del sistema de cultiu per la supervivència i funcionament òptims de les cèl·lules. Per exemple, en l'aïllament d'hepatòcits de truita irisada (*O. mykiss*) s'ha vist que milloren les relacions cel·lulars si es fa servir CaCl_2 en el medi de perfusió (Segner 1998). D'altra banda, en general, els cultius en monocapa permeten una supervivència més elevada però cada espècie mostra unes preferències concretes respecte el substrat de cultiu. Per exemple, els hepatòcits de la carpa (*Cyprinus carpio*) responen bé a diferents tipus de substrats perquè es fan agrupacions cel·lulars estables amb facilitat i en el cas de l'anguilla (*Anguilla japonica*) es formen principalment amb el substrat de fibronectina (Segner 1998). Per poder dur a terme aquest estudi amb orada, es va adaptar amb petits canvis un protocol d'aïllament d'hepatòcits (Mommensen i col. 1994). En aquest sentit, per exemple, nosaltres vam provar dos substrats diferents en les plaques de cultiu: col·lagen (resultats no mostrats) i polilisina. Les nostres proves ens van mostrar que els cultius d'orada, prefereixen la polilisina com a substrat, les cèl·lules s'adhereixen i s'estabilitzen més ràpidament i es manté elevada viabilitat durant més temps.

Els hepatòcits s'han utilitzat des de fa temps com a model cel·lular d'estudi per la seva capacitat de regulació en molts processos fisiològics (Moon 2004). En concret, els cultius primaris d'hepatòcits de teleostis s'han utilitzat per a estudiar diferents aspectes de la seva estructura i funció, com per exemple, l'aclimatació a la temperatura, la senescència de la cèl·lula, les interaccions cèl·lula-cèl·lula, el metabolisme lipoproteic, la síntesi de vitelogenina, l'expressió de receptors hormonals, el metabolisme relacionat amb el citocrom P450, la toxicologia o la regulació endocrina (Segner 1998). També s'han utilitzat hepatòcits en cultiu per veure la resposta de les proteïnes del complex format amb el receptor de cortisol, hsp70 i hsp90 principalment, en resposta a diferents situacions estressants (Basu i col. 2003; Basu 2001; Sathiyaa i col. 2001). Un dels avantatges més importants en la utilització d'aquest model experimental és que la manipulació d'hepatòcits aïllats *in vitro* facilita l'estudi de factors exògens estudiats de manera independent o combinats.

En peixos se sap que el LPS induïx l'expressió de citoquines proinflamàtores, concretament de $\text{TNF}\alpha$ en macròfags diferenciats i monòcits i en leucòcits primaris aïllats (MacKenzie i col. 2003; Hirono i col. 2001; Laing i col. 2001). S'ha demostrat que en macròfags el LPS induïx l'expressió de la $\text{IL1}\beta$ per una injecció bacteriana o amb LPS (Pelegrín i col. 2004; Engelsma i col. 2002; Pelegrín i col. 2001; Zou i col. 2000; Zou i col. 1999a; Zou i col. 1999b). A l'orada, no augmenta l'expressió de $\text{TNF}\alpha$ en macròfags estimulats amb LPS (García-Castillo i col. 2002). Pel que nosaltres sabem no s'havia estudiat l'efecte del LPS o de les citoquines que produeix en altres tipus cel·lulars.

Pel que fa a l'estudi del receptor glucocorticoide de cortisol, s'ha utilitzat prèviament aquest teixit com a eina per clonar el GR o per comprovar que s'expressa en el fetge a diferents espècies (Bury i col. 2003; Greenwood i col. 2003; Tagawa i col. 1997; Ducouret i col. 1995). També s'havia estudiat la seva resposta a diferents tractaments de cortisol en cultiu primari d'hepatòcits (Sathiyaa i Vijayan 2003; Vijayan i col. 2003). Nosaltres vam utilitzar el cultiu primari d'hepatòcits per a estudiar la resposta immune i endocrina a una situació estressant endocrina i immune, respectivament, i la possible interacció entre ambdós sistemes.

En primer lloc, amb les dosis inicials provades vam veure com, en hepatòcits d'orada, gens típicament immunes ($TNF\alpha$, $IL1\beta$ i $PPAR\gamma$) responien a l'estímul immune aplicat (0,1 ng/ml de $rTNF\alpha$), augmentant o disminuint la seva expressió, però no a l'estímul endocrí (100 ng/ml de cortisol). En canvi, gens més endocrins (GR i $catD$) responien a l'estímul endocrí, principalment disminuint la seva expressió, però no a l'estímul immune. Aquestes dosis utilitzades inicialment, tant de $rTNF\alpha$ com de cortisol, eren dosis fisiològiques típiques utilitzades en aquests tipus d'experiments en hepatòcits (Sathiyaa i Vijayan 2003; Panesar i col. 1999) però no mostraven cap tipus de relació entre els sistemes immune i endocrí. Donat que altres estudis havien provat també altres concentracions en leucòcits de ronyó anterior d'orada i en hepatòcits de salmó (García-Castillo i col. 2004; Jørgensen i col. 2000), vam decidir provar dues dosis més, tant de $rTNF\alpha$ (10 i 100 ng/ml) com de cortisol (5 i 500 ng/ml), per veure si la resposta era depenent de la concentració de l'estímul. En aquest cas, vam trobar que el GR i el $TNF\alpha$ disminuïen la seva expressió amb la dosi elevada de l'estímul endocrí, mostrant ja algun tipus de relació immuno-endocrina, però no responien a cap dosi de l'estímul immune. Excepte per a la $catD$, l'expressió de la resta de gens immunes pràcticament no es detectava amb cap dels estímuls aplicats. Aquests resultats estaven fets 12 hores després de l'aplicació de l'estímul i era possible que la relació entre ambdós sistemes fos més ràpida.

Finalment, vam fer un seguiment temporal únicament del GR i del $TNF\alpha$ per a determinar si la resposta d'aquests gens estava regulada amb el temps. L'expressió del GR augmenta 3 hores després d'aplicar 500 ng/ml de cortisol mentre en hepatòcits de la truita irisada l'augment del mRNA es detecta 24 hores d'aplicar cortisol (Sathiyaa i col. 2003). D'altra banda, l'expressió del $TNF\alpha$ disminueix a les 3 hores del mateix tractament, resposta oposada a la del GR. Mirant en paral·lel la resposta d'ambdós gens queda demostrat finalment que el GR en peixos també està implicat en la resposta inflamatòria i, per tant, queden demostrades les interaccions entre la via endocrina (concretament el paper del GR) i la via immune (principalment la resposta del $TNF\alpha$).

El nostre treball obre les portes cap a l'experimentació amb altres tipus cel·lulars que no siguin macròfags per a estudiar la resposta fisiològica a estímuls immunes i endocrins i les interaccions immuno-endocrines en peixos.

6. CAPÍTULO III:

Respostes fisiològiques en la perca europea (*Perca fluviatilis*, L.) sotmesa a estrès per transport i manipulació.

6.1. INTRODUCCIÓ.

Els peixos en instal·lacions de cultiu intensiu estan contínuament exposats a pràctiques de maneig com la manipulació o el transport, les quals comporten respostes estressants (Davis i col. 2002). Existeix molta bibliografia que ha analitzat la resposta dels peixos a factors estressants típics de les pràctiques aquícoles (Barton i col. 2000; Arends i col. 1999; Tort i col.1996; Waring i col. 1996; Maxime i col. 1995; Braley i Andersson 1992). La majoria d'aquests estudis s'han dut a terme en espècies aquícoles importants, especialment salmònids, però altres espècies, com la perca Europea (*Perca fluviatilis*), han rebut menys atenció tot i ser candidates potencials per a l'aqüicultura en algunes ciutats europees. L'aqüicultura de la *P. fluviatilis* s'ha introduït recentment al sud d'Europa per diversos motius, entre d'altres, perquè existeix un mercat bastant bo a Europa central i per l'important augment de la importació de la perca del Nil (*Lates niloticus*) que ha augmentat significativament el consum de la perca durant els darrers anys.

La resposta dels peixos a l'estrès es dona per diferents vies per tal de mantenir l'equilibri intern (Wedemeyer i col. 1990). Alguns dels canvis fisiològics que estan implicats en la resposta a l'estrès inclouen canvis en l'alliberament hormonal, i el metabolisme energètic (Carragher i Rees 1994; Barton i Iwama 1991), l'hematologia (Dethloff i col.1999) i l'osmolalitat (McDonald i Milligan 1997).

Una de les respostes primàries a l'estrès més acceptades és l'augment dels nivells de **cortisol** en plasma (Ortuño i col. 2002; Barton 2002; Barton i Iwama 1991; Pickering i Pottinger 1989). Per això és un dels paràmetres més utilitzats com a indicador de la resposta als factors estressants, essent diferent la magnitud de la resposta en funció del tipus d'estrès i l'espècie d'estudi. Així per exemple, en l'orada, *Sparus aurata*, l'exposició a l'aire produeix un augment de 50 vegades en les concentracions de cortisol plasmàtic (Arends i col. 1999) però dos dies de confinament augmenten 3 vegades el cortisol en plasma en la mateixa espècie (Tort i col. 1996). En canvi, en el turbot, *Scophthalmus maximus*, el confinament provoca un augment de 10 vegades en el cortisol plasmàtic (Waring i col. 1996).

Entre les respostes secundàries, les més estudiades són els nivells de **glucosa** i **lactat** en plasma. Se sap que els nivells de glucosa en plasma augmenten després de factors estressants com la manipulació i la captura o l'estrès agut (Lappivaara 2001; Barton i col. 2000; Waring i col. 1996; Braley i Andersson 1992). Està generalment acceptat que la mobilització de glucosa en resposta a l'estrès és una manera de proporcionar fonts extra d'energia, permetent a l'animal superar aquella alteració. De la mateixa manera, s'ha vist que les concentracions de lactat en plasma augmenten significativament en diverses espècies després d'un estrès greu o com a resultat de l'hipòxia (Arends i col. 1999; Cech i col. 1996; Carragher i Rees 1994).

Respecte a la perca europea (*Perca fluviatilis*), tenim coneixement sobre la biologia d'aquesta espècie (Craig 2000), la posta (Smith i col. 2001; Krieger i Fleig 1999; Sandström i col.

1997; Lang 1987), la patologia (Pavlov i col. 1994; Whittington 1993; Michel 1981), la parasitologia (Sures 2002; Halmetoja i col. 2000), els efectes de la pol·lució (Förlin i col. 1995) i la nutrició (Cuvier-Péres i Kestemont 2002; Abi-Ayad i col. 2000; Romare 2000). No obstant, hi ha pocs estudis disponibles sobre la seva fisiologia (Haux i Sjöbeck 1985; Larsson i col. 1985; Sjöbeck i col. 1984) i la resposta a l'estrès no s'ha estudiat encara a la *P.fluviatilis*, però s'ha estudiat a altres espècies de pèrcids com la perca americana, *Perca flavescens* (Barton 2002; Haukenes 2001; Hontela i col. 1995; Hontela i col. 1992). A més, es coneix poc de la resposta específica de la perca europea a factors estressants de l'aqüicultura.

Per tot això, el propòsit concret d'aquest treball era estudiar la resposta bàsica a l'estrès de la perca europea (*Perca fluviatilis*) quan se sotmet a dos factors estressants diferents habituals en les pràctiques de l'aqüicultura, transport i manipulació aguda.

Els factors estressants utilitzats van ser escollits perquè són tècniques reproduïbles i són rellevants en les pràctiques aquícoles:

- El transport es va escollir perquè la majoria de les piscifactories de la *P.fluviatilis* estan situades a l'Europa central i el subministrament de peixos a les piscifactories del sud implica un transport.

- La manipulació es va estudiar per a imitar els episodis habituals de manipulació dels animals (per classificar-los per categories o per transferir-los a tancs nous, per exemple) que prèviament s'haurien transportat a la piscifactoria.

Per tant, amb aquest estudi vam voler determinar el patró de resposta fisiològica i la recuperació de la perca europea per tal de millorar el seu control en l'aqüicultura.

6.2. MATERIALS I MÈTODES.

6.2.1. Animals experimentals. Disseny de l'experiment.

Vam obtenir 200 perques Europees (*Perca fluviatilis*) sexualment immadures de $57,82 \pm 7,22$ g de pes (mitjana \pm SEM, $n= 12$) de la piscifactoria Garona Verda (Les, Lleida) on les mantenien en tancs de 2000 L en circuit semitancat d'aigua dolça, equipats amb filtres físics i biològics i amb flux constant de 2200 L/h. El fotoperíode es mantenia constant a 12 h llum: 12 h fosc i la temperatura de l'aigua a 15°C.

Les vam transportar durant 4 hores fins a les nostres instal·lacions de la Universitat mantenint condicions òptimes pel transport en relació a l'oxigenació, que es va mantenir constant durant tot el trajecte, la temperatura a 15°C i la densitat baixa a 8 kg/m³.

En arribar a les nostres instal·lacions es van distribuir immediatament en tancs de 300 L amb sistema tancat de circulació d'aigua dolça, equipats amb filtres físics i biològics i amb un flux constant de 280 L/h. La temperatura de l'aigua es va mantenir a 15°C i el fotoperíode era constant amb 12 h llum: 12 h fosc (250 Lux). Els peixos s'alimentaven un cop al dia amb una dieta comercial fins les 24 hores abans de començar els experiments perquè els períodes de menja podrien interferir en les nostres mesures.

Es van mostrejar 12 animals a la piscifactoria d'origen abans del transport que es van utilitzar com a grup control. Immediatament després de l'estabulació (temps 0), vam mostrejar 8 peixos ($n=8$), per mesurar la resposta a l'estrès deguda al transport. Vam utilitzar dos tancs, i 4 peixos per tanc, per cadascun dels punts següents de mostreig escollits: 0, 2, 7, 14 i 21 dies després del transport.

La resta de peixos es van deixar en les condicions d'estabulació anteriorment descrites fins el moment de començar el següent experiment de manipulació. Després de 21 dies, els peixos es van sotmetre a un estrès per manipulació que consistia en capturar-los amb una xarxa i mantenir-los fora de l'aigua; tot el procés va durar un minut. El grup control d'aquest experiment van ser els animals prèviament aclimatats i recuperats durant 21 dies després del transport. Es van fer quatre mostrejos en aquest experiment a diferents temps: 0,5, 1, 4 i 24 hores, amb 8 peixos per mostreig.

6.2.2. Obtenció de mostres.

Els peixos es van anestesiar amb 2-fenoxietanol (Sigma) a una concentració de 0,75 ml/L i es va extreure sang de la vena caudal amb agulles hipodèrmiques. La sang es va extreure en menys de 3 minuts per evitar l'alliberació de cortisol induïda per la manipulació del mostreig i vam dividir el total de la sang extreta en dues sèries;

- En una d'elles, els tubs contenien heparina (*Lithium heparin*, Deltalab) per fer les anàlisis hematològiques: hemoglobina, hematòcrit i recompte d'eritròcits.

- En l'altra sèrie, sense anticoagulant, la sang es va deixar coagular a 4°C i es va centrifugar a 9000 r.p.m. durant 5 minuts a temperatura ambient. El sèrum recollit es va guardar a -80°C per a les anàlisis posteriors: osmolalitat, glucosa, lactat i cortisol.

Les anàlisis hematològiques dels peixos mostrejats a la piscifactoria d'origen abans del transport es van fer immediatament a la mateixa piscifactoria però la resta de paràmetres es van analitzar al laboratori.

6.2.3. Tècniques analítiques.

Els nivells d'hemoglobina (Hb, g/dl) es van determinar amb un *kit* comercial (MPR3, Roche) que mesura, per colorimetria, la formació de cianometahemoglobina.

L'hematòcrit (Hc, %) es mesura immediatament després del mostreig en capilars de vidre fent pujar la sang per capilaritat i centrifugant-la durant 5 minuts en una microcentrífuga d'hematòcrit.

Es van comptar els eritròcits (RBC, red blood cells, cels/ μ l) al microscopi utilitzant una càmera de Neubauer diluint prèviament la sang amb solució salina.

Es van fer les equacions hematimètriques (Tort i Torres 1988) per determinar el volum corpuscular mitjà (MCV, μ m³), l'hemoglobina corpuscular mitjana (MCH, pg/cel) i la concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana (MCHC, g/dl).

Vam mirar l'osmolalitat en sèrum (mOsm/kg) amb un osmòmetre (Osmomat 030 Gonotec, Berlin) que mesura el punt de congelació en funció de la concentració de sals.

Els nivells de cortisol (ng/ml) en sèrum es van mesurar per radioimmunoanàlisi (R.I.A) (Rotllant i col. 2001). Vam utilitzar un anticòs policlonal de conill (Biolink, S.L., Costa Mesa, California) a una dilució final de 1:6000. Aquest anticòs mostra reaccions creuades amb el cortisol (100%), la 21-desoxicorticosterona (11,40%), 11-desoxicortisol (8,90%) i la 17 α -hidroxiprogesterona (1,60%).

Es va fer la validació del radioimmunoanàlisi per a la perca europea, mesurant la radioactivitat amb un contador de centelleig. Vam trobar un elevat grau de paral·lelisme entre les

dilucions de les mostres i l'estàndard de la corba (figura III.1), amb una sensibilitat del 6×10^{10} ng/ml. Es va comprovar l'exactitud de la tècnica determinant la recuperació del cortisol afegit a les mostres i era del 92 al 106%. Es va analitzar la precisió també determinant el coeficient de variació (CV) intra-assaig i es va trobar que era del 3,94%.

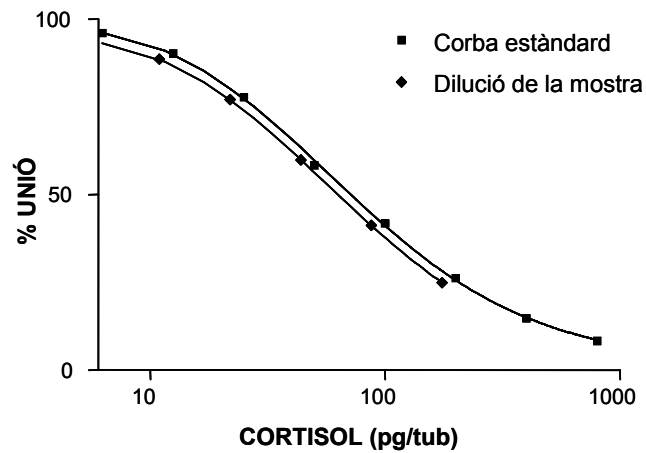


Figura III.1: Paral·lelisme entre la dilució de les mostres de sèrum de la perca europea (*Perca fluviatilis*) i la corba estàndard.

Vam determinar la glucosa i el lactat mitjançant anàlisis enzimàtiques de colorimetria en plaques d'ELISA fent servir *kits* comercials (Biomerieux).

6.2.4. Anàlisi estadística.

Els experiments fets per duplicat es van analitzar per comprovar si hi havia diferències per efecte del tanc usant l'anàlisi de la variança (ANOVA). No es van trobar diferències entre tancs, de manera que, es van juntar els duplicats de cada punt de mostreig. Les diferències entre grups es van analitzar fent l'anàlisi de la variança (ANOVA) de mostres repetides i prenent al peix com a unitat estadística, comprovant prèviament que les mostres tenien homogeneïtat en la variança. Posteriorment, es va mirar la significació de les diferències entre les dades amb l'anàlisi *a posteriori* per DMS (diferència menys significativa) el qual detecta diferències particulars entre grups.

Es considerà estadísticament significatiu quan $p < 0,05$, indicat a les figures i a les taules amb un asterisc (*). Els valors ($n=8$ per tots els grups excepte pel grup control de l'experiment del transport amb $n=12$) estan representats com a mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (mean \pm S.E.M).

6.3. RESULTATS.

6.3.1. Efecte del transport.

Els valors hematològics referents a nivells d'hemoglobina (Hb), nombre d'eritròcits (RBC) i hemoglobina corpuscular mitjana (MCH) no van mostrar variacions importants al llarg del temps (taula III.1).

Els valors d'hematòcrit (Hc), en canvi, van donar diferències significatives amb el grup control trobant el nivell més elevat el segon dia de mostreig ($23.91 \pm 2.29 \%$, taula III.1) i el valor més baix el dia 14è ($13.99 \pm 1.27 \%$, taula III.1).

Tot i que no era estadísticament significatiu, es va trobar un augment transitori en el volum corpuscular mitjà (MCV) el primer dia (taula III.1).

Els valors de la concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana (MCHC), van augmentar significativament a partir del setè dia (taula III.1).

DIA	Hb (g/dL)	Hc (%)	RBC (10^6 cels/ μ L)	MCV (μm^3)	MCH (pg/cel)	MCHC (g/dL)
Control	$3,71 \pm 0,55$	$18,37 \pm 0,93$	$1,06 \pm 0,13$	$203,15 \pm 38,30$	$37,55 \pm 5,27$	$19,91 \pm 2,52$
0	$2,87 \pm 0,63$	$16,49 \pm 1,29$	$0,81 \pm 0,15$	$268,32 \pm 55,06$	$34,72 \pm 8,32$	$17,38 \pm 4,06$
2	$4,47 \pm 0,51$	$23,91 \pm 2,29^*$	$1,31 \pm 0,16$	$193,84 \pm 16,42$	$36,24 \pm 3,85$	$19,20 \pm 1,99$
7	$5,24 \pm 0,62$	$17,04 \pm 1,65$	$1,13 \pm 0,14$	$157,72 \pm 12,60$	$47,75 \pm 4,20$	$30,26 \pm 1,22^*$
14	$4,26 \pm 0,50$	$13,99 \pm 1,27^*$	$0,99 \pm 0,16$	$157,12 \pm 16,41$	$47,34 \pm 5,25$	$30,71 \pm 2,18^*$
21	$4,01 \pm 0,40$	$14,05 \pm 1,45$	$1,01 \pm 0,09$	$146,07 \pm 12,82$	$39,71 \pm 1,76$	$28,69 \pm 2,69^*$

Taula III.1: Efectes del transport sobre els paràmetres hematològics de la perca europea (*Perca fluviatilis*): Hb (hemoglobina), Hc (hematòcrit), RBC (eritròcits, *red blood cells*), MCV (volum corpuscular mitjà), MCH (hemoglobina corpuscular mitjana) i MCHC (concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana). El temps està expressat en dies després de l'inici de l'estudi, fent servir un grup control de la piscifactoria d'origen. Les diferències significatives (amb $p < 0.05$) dels diferents grups amb el grup control estan marcades amb asteriscs (*). Es donen els resultats com a mitjana \pm SEM ($n=8$ a cada grup excepte al grup control amb $n=12$).

Durant el temps que va durar l'estudi, l'osmolalitat va donar valors significativament més baixos respecte el grup control excepte el segon dia de mostreig (figura III.2A). Els nivells de cortisol van augmentar 3 vegades després del transport amb nivells màxims el segon dia (145.68 ± 41.44 ng/ml, figura III.2B) i recuperant els valors basals a partir del setè dia.

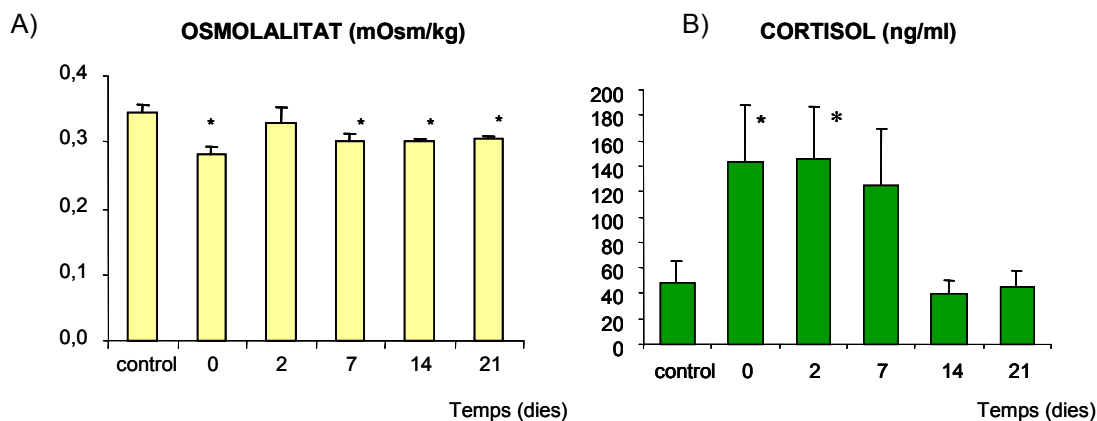


Figura III.2: Efectes del transport en els nivells de l'osmolalitat (A) i el cortisol (B) de la perca europea (*Perca fluviatilis*). Els valors controls corresponen als peixos mostrejats abans del transport mentre la resta del temps està expressat en dies després del transport. Les dades representen la mitjana \pm SEM (n=8 per a cada grup excepte el grup control amb n=12). Les columnes amb asteriscs (*) són significativament diferents amb el grup control amb $p < 0,05$.

Immediatament després del transport, els valors de glucosa tendien a augmentar, però els valors més elevats es van trobar el segon dia (70.9 ± 9.98 mg/dl, figura III.3A) mostrant diferències significatives amb el grup control i recuperant-se a partir d'aquest punt de mostreig. Els valors de lactat van disminuir lleugerament el catorzè dia després del transport sense diferències significatives (figura III.3B).

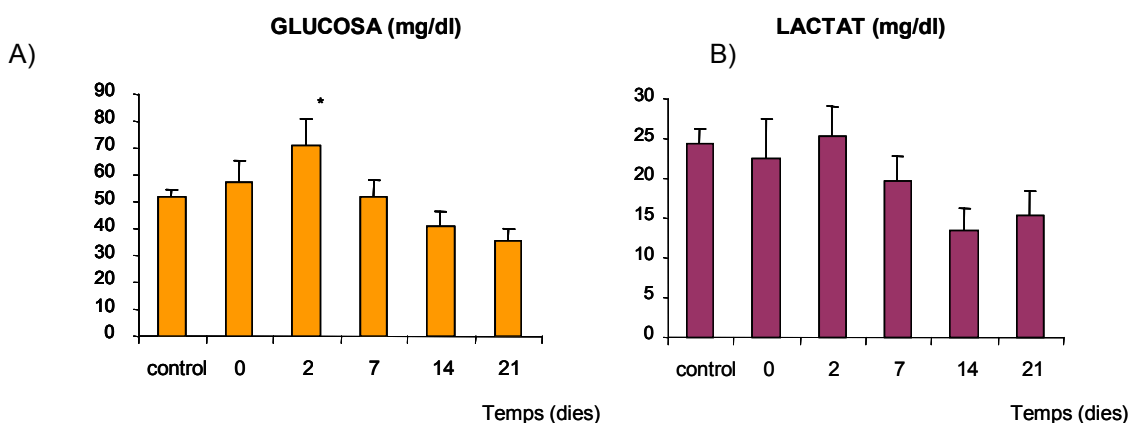


Figura III.3: Efectes del transport en els nivells de la glucosa (A) i el lactat (B) de la perca europea (*Perca fluviatilis*). Els valors controls corresponen als peixos mostrejats abans del transport mentre la resta del temps està expressat en dies després del transport. Les dades representen la mitjana \pm SEM (n=8 per a cada grup excepte el grup control amb n=12). Les columnes amb asteriscs (*) són significativament diferents amb el grup control amb $p < 0,05$.

Durant els temps que va durar l'estudi vam trobar un 6% de mortalitat.

6.3.2. Efecte de la manipulació.

Tot i que l'hemoglobina (Hb) va mostrar oscil·lacions mentre va durar l'estudi, l'anàlisi estadística no va revelar diferències significatives (taula III.2).

Els valors de l'hematòcrit (Hc) durant el temps que va durar l'experiment van ser més elevats en tots els grups mostrant diferències significatives amb el grup control ($14,05 \pm 1,45\%$, taula III.2).

El recompte d'eritròcits (RBC) va donar un augment significatiu a 0,5 i 4 hores respecte els valors controls. En relació al volum corpuscular mitjà, MCV (μm^3), es van obtenir valors bastant constants amb un valor màxim, però no significatiu, una hora després de la manipulació ($173,29 \pm 24,52 \mu\text{m}^3$, taula III.2).

L'hemoglobina corpuscular mitjana, MCH (pg/cel·la) tampoc va donar diferències durant l'experiment.

Els valors de la concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana, MCHC (g/dl) van oscil·lar constantment amb valors màxims a les 4 hores ($33,63 \pm 4,24 \text{ g/dl}$, taula III.2), però sense diferències estadísticament significatives.

DIA	Hb (g/dL)	Hc (%)	RBC (10^6 cels/ μL)	MCV (μm^3)	MCH (pg/cel)	MCHC (g/dL)
Control	$4,01 \pm 0,40$	$14,05 \pm 1,45$	$1,01 \pm 0,09$	$146,07 \pm 12,82$	$39,71 \pm 1,76$	$28,69 \pm 2,69$
0,5	$5,10 \pm 0,52$	$19,41 \pm 1,23^*$	$1,37 \pm 0,07^*$	$142,08 \pm 6,23$	$37,53 \pm 3,73$	$26,75 \pm 2,98$
1	$4,18 \pm 0,23$	$19,34 \pm 1,46^*$	$1,24 \pm 0,15$	$173,29 \pm 24,52$	$37,20 \pm 4,85$	$22,37 \pm 1,72$
4	$5,78 \pm 0,61$	$19,01 \pm 1,48^*$	$1,56 \pm 0,13^*$	$120,67 \pm 6,15$	$37,91 \pm 4,06$	$33,63 \pm 4,24$
24	$4,77 \pm 0,30$	$21,18 \pm 2,74^*$	$1,27 \pm 0,20$	$150,41 \pm 8,53$	$40,65 \pm 3,40$	$27,76 \pm 3,03$

Taula III.2: Efectes de la manipulació en els paràmetres hematològics de la perca europea (*Perca fluviatilis*): Hb (hemoglobina), Hc (hematòcrit), RBC (eritròcits, red blood cells), MCV (volum corpuscular mitjà), MCH (hemoglobina corpuscular mitjana) i MCHC (concentració d'hemoglobina corpuscular mitjana). El temps està expressat en hores després de l'inici de l'estudi. Es donen els resultats com a mitjana \pm SEM (n=8 a cada grup). Les diferències significatives (amb $p < 0,05$) dels diferents grups amb el grup control estan marcades amb asteriscs (*).

En relació a l'osmolalitat, no es van trobar canvis significatius durant l'experiment (figura III.4A). Els valors de cortisol van mostrar la típica resposta d'estrès agut, augmentant immediatament després de l'aplicació de l'estrès. Els valors a partir de les 4 hores després de la manipulació i fins el final de l'estudi van mantenir-se similars als valors control (figura III.4B).

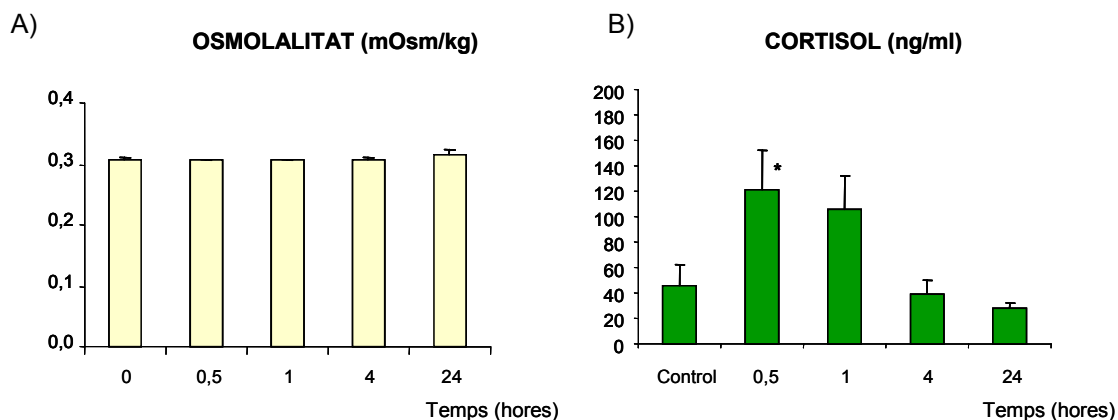


Figura III.4: Efectes de l'estrès per manipulació en els nivells d'osmolalitat (A) i cortisol (B) en la perca europea (*Perca fluviatilis*). Els temps de mostreig són 0, 0,5, 1, 4 i 24 hores després de l'inici de l'estrès. Les dades representen la mitjana \pm SEM (n=8 en cada grup). Les columnes amb asteriscs (*) són diferents significativament respecte el grup control ($p < 0,05$).

Encara que es van trobar valors elevats de glucosa una hora després de l'estrès ($55,89 \pm 8,08$ mg/dl, figura III.5A), no es van trobar diferències significatives en la concentració de glucosa al llarg de l'estudi. Els nivells de lactat van augmentar lleugerament, tot i que no era significatiu, 0,5 hores després de la manipulació ($22,11 \pm 1,56$ mg/dl, figura III.5B).

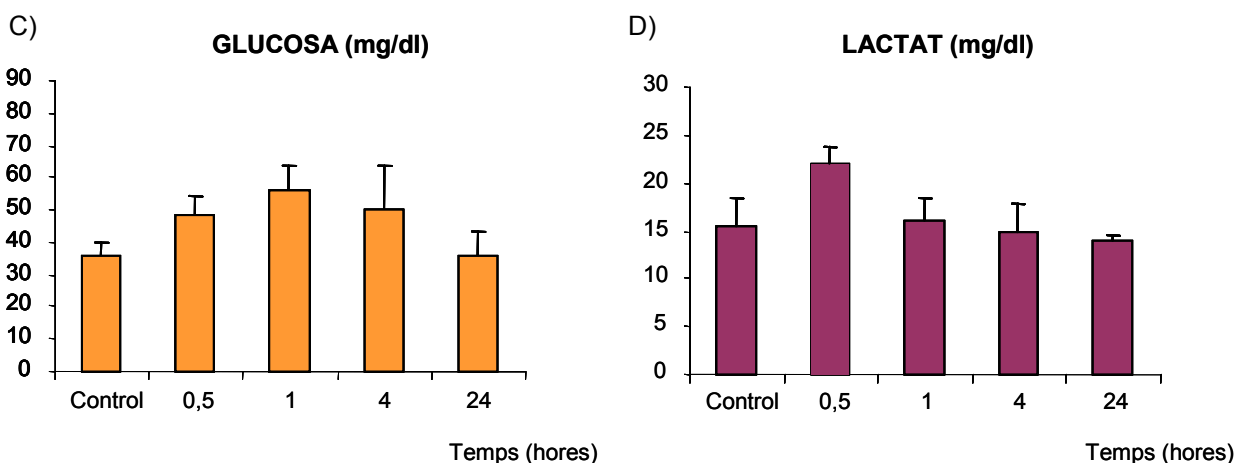


Figura III.5: Efectes de l'estrès per manipulació en els nivells de glucosa (A) i lactat (B) en la perca europea (*Perca fluviatilis*). Els temps de mostreig són 0, 0,5, 1, 4 i 24 hores després de l'inici de l'estrès. Les dades representen la mitjana \pm SEM (n=8 en cada grup). Les columnes amb asteriscs (*) són diferents significativament respecte el grup control ($p < 0,05$).

Durant aquest estudi no es van comptabilitzar mortalitats.

6.4. DISCUSSIÓ.

En les condicions de cultiu estudiades, la perca europea (*Perca fluviatilis*), ha presentat un valor basal de cortisol elevat (aproximadament de 45 ng/ml). Aquest valor està a la franja superior dels nivells de cortisol basals de peixos:

- Per exemple, entre els peixos d'aigua dolça, la truita irisada, *Oncorhynchus mykiss*, presenta una mitjana de valors basals baixos, 1,7 ng/ml, mentre la carpa té nivells més elevats, 7,4 ng/ml (Barton 2002). A altres espècies de pèrcids, per exemple, a la perca americana, *Perca flavescens*, s'han trobat valors que oscil·len entre 3,4 i 8,3 ng/ml (Barton 2002; Haukenes 2001). Els nivells de cortisol de la perca americana, *P. flavescens*, després d'aplicar un estrès crònic per elevada densitat augmenten a 46 ng/ml després de 3 dies i estan a 20 ng/ml després de dues setmanes (Haukenes 2001). Aquests valors estan molt a prop dels valors basals que nosaltres hem trobat en la perca europea.

- Els peixos d'aigua marina tenen valors de 2 ng/ml en l'orada, *Sparus aurata* (Rotllant i col. 2001), o de 6 ng/ml en el pagre, *Pagrus pagrus* (Rotllant i Tort 1997). També s'han trobat valors basals més elevats, per exemple, el llobarro, *Dicentrarchus labrax* té valors basals de 20 ng/ml (Cerdà-Reverter i col. 1998; Roche i Bogé 1996; Planas i col. 1990). Treballs previs en els mecanismes d'alliberació de cortisol han demostrat que en el llobarro hi ha una producció contínua de cortisol sota condicions controls però baixa reactivitat als pulsos d'ACTH (Rotllant i col. 2003).

Tenint en compte tot això, sembla que la perca europea seria una espècie més similar al llobarro en termes de dinàmica de cortisol, o bé que aquesta espècie té baixa capacitat d'adaptació a les condicions de cultiu i mostra, d'aquesta manera, una elevat grau de producció i alliberació de cortisol. Volem remarcar que els valors basals elevats del nostre estudi es van trobar en peixos no estressats mostrejats en la piscifactoria d'origen i també en els animals recuperats 4 setmanes després del transport (figures III.1 i III.2).

Respecte a la magnitud de la resposta, hem observat un augment de més de 3 vegades després del transport arribant a 150 ng/ml i de gairebé 3 vegades amb la manipulació arribant a 120 ng/ml, semblants als valors trobats en d'altres espècies. Així, el transport indueix augments ràpids del cortisol plasmàtic de 100 a 160 ng/ml en 15-30 minuts de captura i posterior càrrega del cultiu pel transport dels juvenils de la corvina, *Sciaenops ocellatus* (Robertson i col. 1988). Cal tenir en compte que la magnitud de la resposta depèn del factor estressant aplicat i de l'espècie d'estudi. Així, en la perca americana, *P. flavescens*, Haukenes (2001) va demostrar que 30 segons d'estrès aeri amb xarxa augmentaven 24 vegades els nivells de cortisol a valors de 85 ng/ml, i en canvi només 3-4 vegades després d'una manipulació o injecció de solució salina a valors de 30-35 ng/ml. El llobarro estriat, *Morone saxatilis* augmenta 3,5 vegades els nivells de cortisol a 400 ng/ml després d'estrès per exercici i manipulació (Cech i col. 1996). En l'orada *Sparus aurata*,

l'exposició a l'aire va produir un augment de 50 vegades en els nivells de cortisol plasmàtic i el confinament de més de 24 hores induïa un augment inicial de la concentració de cortisol en plasma 8 vegades superiors als controls (Arends i col. 1999). En altres espècies, com a la perca dorada, *Macquaria ambigua*, els valors poden ser més elevats (240 ng/ml) mesurats després de 30 minuts d'estrès mitjançant persecució amb xarxa i confinament (Carragher i Rees 1994). D'altra banda, altres grups de peixos semblen mostrar baixa reactivitat. Així, quan l'esturió siberià, *Acipenser baeri*, per exemple, se sotmetia a modificacions severes de la pressió parcial d'oxigen a l'aigua durant 30 minuts, augmentaven els nivells de cortisol en plasma 6 vegades per sobre de 30 ng/ml (Maxime i col. 1995). Les tècniques de confinament amb xarxa provocaven un augment de 10 vegades en els nivells de cortisol en plasma per sobre de 70 ng/ml, 1 hora després de l'estrès en el turbot, *Scophthalmus maximus* (Waring i col. 1996).

Els resultats presentats en el nostre estudi indicaven que, en la perca europea, la dinàmica de resposta també depèn del tipus d'estrès aplicat. La *P. fluviatilis* mantenia nivells elevats de cortisol set dies després de l'estrès per transport recuperant els valors basals el 14è dia. D'altra banda, vam observar la resposta temporal típica de la manipulació aguda, amb una recuperació als nivells basals 4 hores després de l'augment agut observat a les 0,5 hores. S'ha observat aquest tipus de dinàmica a gran nombre de peixos, els quals també recuperaven els nivells basals entre les 4 i els 8 hores després d'aplicar l'estrès agut (Molinero i col. 1997).

En relació a les respostes secundàries en la perca europea (*P. fluviatilis*), els valors de glucosa i lactat en plasma van mostrar la resposta catabòlica típica després de l'estrès per transport, proporcionant així fonts extra d'energia, permetent a l'animal superar l'alteració de l'equilibri intern.

Les alteracions en el metabolisme de la glucosa són una resposta comú a l'estrès per captura en els peixos (Rotllant i col. 2001; Barton i Iwama 1991) incloent altres espècies com la perca dorada, *Macquaria ambigua* (Braley i Andersson 1992). L'esturió siberià, *Acipenser baeri*, sotmès a modificacions severes de la pressió parcial d'O₂ a l'aigua durant 30 minuts, va mostrar augments importants en la glucosa en plasma, de més del 50% (Maxime i col. 1995). En el present treball, no obstant, tot i que es va observar un augment en la glucosa en sèrum, no es van trobar diferències significatives.

Respecte els valors de lactat, no es van trobar canvis significatius després d'aplicar ambdós factors estressants en la perca europea. Això podria estar relacionat amb el baix nivell d'activitat observat en els peixos després del transport, apatia que es va observar també en la resposta a la manipulació. En altres espècies, l'exercici i l'estrès per manipulació produïen una acidosi significativa immediatament després de l'exercici, com el llobarro estriat, *Morone saxatilis* manipulat durant 5 minuts (Cech i col. 1996). A l'orada, *Sparus aurata*, l'exposició a l'aire augmenta l'acidosi pel lactat en plasma perquè augmenta l'activitat anaeròbica del múscul (Arends

i col. 1999). La perca dorada, *Macquaria ambigua*, respònd ràpidament a l'estrès per confinament i manipulació amb xarxa augmentant el lactat plasmàtic (Carragher i Rees 1994).

S'assumeix que el temps d'exposició a l'estrès pot influir en la magnitud de la resposta fisiològica. Pel que sembla amb els resultats que presentem, la *P. fluviatilis* tampoc necessita una exposició molt prolongada d'aquest tipus d'estrès per a disparar la resposta de glucosa i lactat o, el que és més probable que, la resposta conductual a l'estrès no implica un elevat grau d'activitat muscular, ja que tampoc es van detectar canvis després del transport. Barton i col (2000) van demostrar que els esturions pàlids juvenils (*Scaphirhynchus albus*) i els híbrids entre l'esturió pàl·lid i el de sorra (*S. albus x platyrhynchus*) eren "indiferents" a estar fora de l'aigua mantinguts en una xarxa, mostrant relativament poca activitat muscular.

Per últim, una alteració en el balanç electrolític del plasma estava correlacionat amb l'augment del cortisol plasmàtic (McDonald i Milligan 1997). El transport indueix canvis més evidents en els nivells d'osmolalitat, cosa que indica una alteració important en el balanç osmòtic a les brànquies. Malgrat això, petites exposicions temporals a la hipòxia i a la manipulació no donen canvis immediats en els nivells d'osmolalitat en la *Perca fluviatilis*.

L'augment en l'hematòcrit el segon dia després del transport pot indicar policitemia deguda a l'estrès i hemoconcentració, probablement deguda a que l'alteració en la brànquia també mostra canvis osmòtics (Larsson i col. 1985). Vam detectar nivells d'hematòcrit elevats durant els experiments de manipulació aguda i un augment en el nombre d'eritròcits a les 0,5 i 4 hores comparats amb els valors controls. Aquests resultats semblen indicar que, amb aquestes condicions d'assaig, l'efecte directe de la major demanda metabòlica durant l'estrès és conseqüència de l'augment en l'eficiència de transport d'oxigen per elevació de l'hematòcrit i del nombre d'eritròcits, més que per l'ús del metabolisme anaeròbic mesurat per l'augment del lactat.

Pel que sabem, aquest ha estat el primer treball que analitza la resposta fisiològica de la perca europea (*Perca fluviatilis*) sota diferents situacions estressants. Tot i que aquests resultats mostren la magnitud i durada d'aquest tipus de resposta, hem de tenir en compte que aquesta espècie no ha estat sotmesa a condicions de cultiu o domesticació durant molt temps (en nombre de generacions). A més, s'haurien de fer més estudis per a discernir si característiques com els nivells de cortisol basal elevats i baixos nivells de lactat són respostes relacionades amb l'espècie o es modificarien amb una adaptació més llarga a les condicions de cultiu. Un cop ben establerta la resposta fisiològica de la perca europea a altres factors estressants i, en conseqüència, les condicions del seu cultiu, es podria intentar estudiar la seva resposta inflamatòria.

7. DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS

7. DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS.

L'estrès en peixos activa l'eix hipotalàmic-pituitàrio-interrenal (HPI) desencadenant l'alliberació de cortisol, principal glucocorticoide en teleostis (Mommensen i col. 1999). Els nivells plasmàtics d'aquesta hormona s'han utilitzat des de fa temps com a mesura d'estrès perquè són un bon indicador fisiològic d'aquesta resposta. En l'orada (*Sparus aurata*), al igual que en altres espècies, la resposta endocrina d'alliberació de cortisol es coneix des de fa anys, però conèixer els nivells de cortisol plasmàtic no ens dóna informació sobre els principals teixits on està actuant la hormona en cada moment, un cop alliberada. En aquest treball s'ha avançat en aquest sentit amb la clonació i el posterior estudi de l'expressió del receptor glucocorticoide (GR) de cortisol en l'orada (*S. aurata*).

L'activitat aquícola implica controlar diferents paràmetres perquè la producció sigui rendible, i malgrat que ha millorat molt des dels seus inicis, encara queden dubtes per resoldre. Seran necessaris uns quants anys per a determinar l'eficàcia dels marcadors moleculars com a predictors de la salut dels peixos i utilitzar-los per a millorar la pràctica aquícola. No obstant, qualsevol descobriment en la investigació acadèmica bàsica, per exemple en relació a les respostes fisiològiques de l'animal enfront situacions estressants diferents, serveix de plataforma per a desenvolupar en el futur les eines necessàries per a estudiar el benestar de l'animal.

Per tant, en la línia de la investigació bàsica, el més important d'aquest treball és el clonatge, per primera vegada, del receptor glucocorticoide (GR) de l'orada (*S. aurata*), una espècie de gran interès en la piscicultura mediterrània. Per dur a terme aquest estudi, al principi ens van basar en estudis previs fets amb aquest receptor en altres espècies de peixos teleostis (Greenwood i col. 2003; Tagawa i col. 1997; Ducouret i col. 1995). El GR obtingut finalment en l'orada (4586 pb) es tradueix en una proteïna de 784 aa que mostra elevada homologia amb els receptors glucocorticoides d'altres espècies de vertebrats, concretament amb els dominis funcionals principals, el domini d'unió a DNA i el domini d'unió a l'hormona, que a més són els dominis que estan més conservats entre els receptors nuclears.

Encara hi ha moltes preguntes per a respondre i discutir sobre la duplicació gènica addicional en peixos (Robinson-Rechavi i col. 2001; Meyer 1999) però, en relació als receptors de cortisol, s'ha trobat duplicat el receptor glucocorticoide de cortisol, a dues espècies de peixos teleostis (Greenwood i col. 2003; Bury i col. 2003; Ducouret i col. 1995). Aquests estudis es basaven principalment en diferències estructurals i d'expressió tissular però no s'ha establert amb detall la participació diferencial de cadascun en les funcions biològiques ni les implicacions que se'n deriven d'aquesta duplicació. Fins i tot en humans, que presenten dues isoformes de la proteïna GR, està encara per determinar la importància funcional d'una d'elles (concretament la forma hGR β) ja que no pot activar la transcripció i la seva funció està en discussió (DeRijk i col.

2002). De la mateixa manera, en peixos caldria determinar si tots els receptors de cortisol que s'expressen són funcionals.

D'altra banda, recentment s'ha descobert que, en dues espècies de peixos, la truita irisada (*O. mykiss*) i la tilàpia (*H. burtoni*), les accions mineralocorticoidees del cortisol estan mediades per un receptor mineralocorticoide (MR), però encara queden dubtes sobre la seva regulació o sobre les seves funcions que desenvolupa (Greenwood i col. 2003; Sloman i col. 2001; Colombe i col. 2000). Nosaltres hem descobert amb els nostres estudis que, a diferència del MR que s'expressa a uns tipus cel·lulars específics en peixos, el GR de l'orada s'expressa de manera ubíqua a tots els teixits. Aquests resultats ens indiquen que en peixos l'actuació dels glucocorticoïdes sobre els diferents processos fisiològics es dona a través del GR de manera generalitzada en l'organisme. Tot i que, l'estudi amb el MR en peixos és bastant recent, seria interessant també estudiar si existeix el MR en l'orada i el seu comportament front l'estrès.

Les condicions de cultiu intensiu en aqüicultura, derivades o relacionades amb l'estrès, poden facilitar l'aparició de patologies que poden arribar a ser letals (Bricknell i col 2006; Toranzo i col 2005). És necessari estudiar aquestes patologies per a poder-les controlar, així com els mecanismes que les originen, per exemple, causades per bacteris o virus. Abans del present estudi es coneixia la resposta endocrina de l'orada (*Sparus aurata*) a diferents factors estressants (Rotllant i col. 2001) però no s'havia estudiat experimentalment el patró d'alliberació de cortisol després d'una injecció bacteriana en aquesta espècie. La injecció intraperitoneal d'endotoxina és un bon model experimental per a estudiar aquesta resposta, i ja s'havia utilitzat anteriorment a la truita irisada (*O. mykiss*) per a determinar la resposta de secreció de cortisol (Holland i col. 2002). Al igual que en la truita irisada, l'administració de LPS *in vivo* en l'orada també estimula l'eix HPI, mitjançant l'augment dels nivells de cortisol plasmàtic seguint un patró de secreció aguda, si més no, quan s'apliquen dosis superiors a 4 mg/kg de LPS.

Era important establir la resposta endocrina d'alliberació de cortisol en l'orada després d'una injecció bacteriana d'aquest tipus en l'orada. Però, el resultat més impactant era el fet de poder determinar on exerceix majoritàriament els seus efectes aquesta hormona en cada moment en l'organisme, un cop alliberada en resposta a la injecció. Els nostres resultats indiquen que, els efectes a nivell transcripcional del cortisol, en definitiva els efectes que es donen a través del GR, no tan sols es veuen a tots els teixits sinó que a més es veu una regulació específica en funció del teixit. A més, la seqüència de resposta temporal de l'expressió del GR analitzada a nivell tissular indica la seva relació amb l'alliberament de cortisol, és a dir, amb la presència o no de l'hormona en plasma. Així, tal com es veu en el gràfic, els nostres resultats mostren la dinàmica temporal de la resposta endocrina completa (hormona i receptor glucocorticoide) en els diferents teixits (figura A).

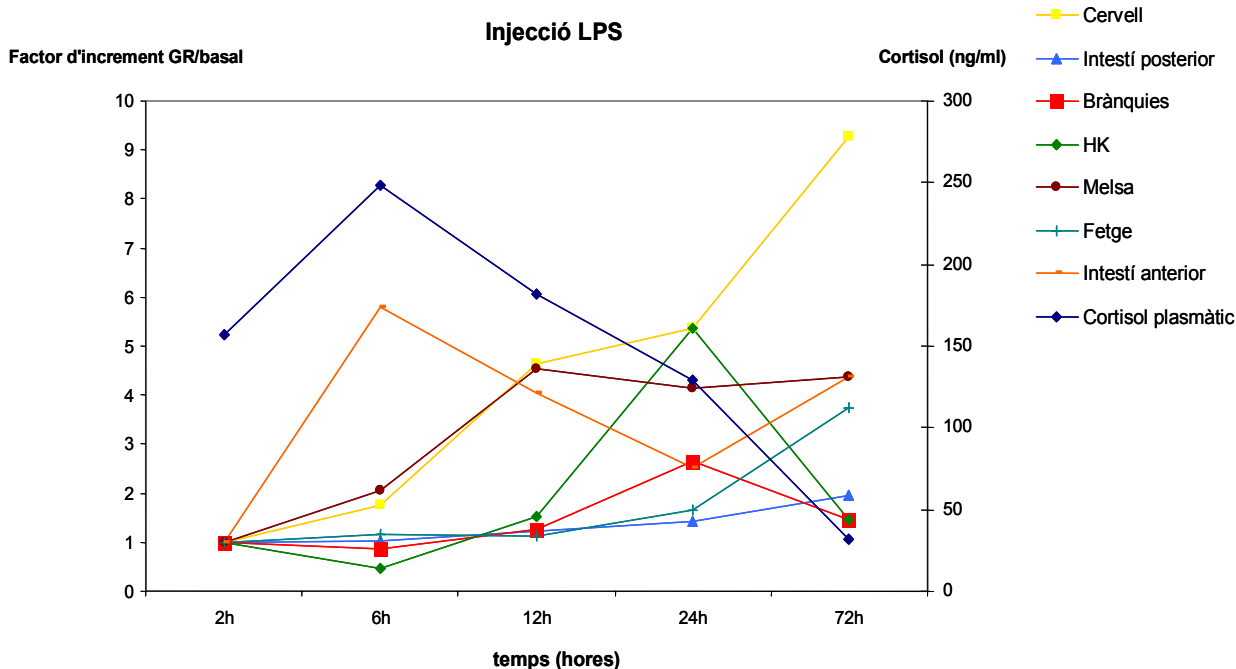


Figura A: Dinàmica temporal del cortisol plasmàtic (expressat en ng/ml) i del receptor glucocorticoide (GR, expressat com a factor d'increment respecte el basal) en els diferents teixits estudiats en l'orada (*Sparus aurata*) després d'una injecció intraperitoneal (i.p) de LPS.

En concret doncs, podem dir que el cortisol, un cop alliberat en resposta a una injecció intraperitoneal de LPS, activa la resposta del receptor glucocorticoide en els diferents teixits de manera específica. Per tant, l'efecte seria màxim 6 hores després de la injecció a l'intestí anterior, després de 12 hores a la melsa, a les 24 hores al ronyó anterior i a les brànquies i, finalment al cervell i intestí posterior 72 hores després de l'estímul. Aquesta dinàmica indicaria una resposta del receptor més ràpida en primer lloc en el lloc d'injecció, seguida per l'activació d'òrgans immunes i hematopoètics i, finalment dels centres reguladors. Tot i que aquest estudi és prou exhaustiu perquè abarca un ampli ventall de teixits, seria interessant analitzar també la resposta del GR a la resta de teixits que no hem estudiat. De la mateixa manera, seria interessant establir si el patró de resposta tissular del GR i la seva regulació és diferent en funció de l'estrès aplicat. Utilitzant aquest model de dinàmica hormona-receptor es podrien determinar en futures investigacions els mecanismes de resposta tissular i local de l'estrès en relació a l'agent estressant aplicat.

La resposta inflamatòria al LPS engloba reaccions a nivell molecular i cel·lular per a reparar o contrarestar un determinat dany. En mamífers es coneixen amb detall les vies implicades en aquesta resposta però en peixos falta confirmar aquests mecanismes. Amb el model experimental utilitzat en l'orada, hem comprovat que el LPS, a més d'activar l'alliberament de cortisol, també

activa, de manera específica, la resposta de diferents gens immunes en diversos teixits, principalment els que desenvolupen funcions immunològiques en els teleostis. Els canvis trobats en l'expressió dels gens immunes estudiats amb el nostre treball, plantegen preguntes sobre la resposta immune concreta *in vivo* a aquest tipus d'injecció bacteriana en peixos, però no era el propòsit inicial del nostre estudi. Per tant, amb el nostre treball es plantegen nous reptes i s'obren noves vies de recerca, per exemple, adreçades a estudiar la resposta d'aquests gens immunes en altres teixits o a comparar la resposta d'aquests teixits a altres tipus d'estímuls. Per a poder estudiar la resposta immune concreta a aquest tipus d'injecció seria necessari, per tant, realitzar-ne un estudi particular.

Tanmateix però, els nostres resultats ens aporten prou informació per a determinar que efectivament existeix una relació entre els sistemes immune i l'endocrí en els peixos i, en concret, en l'orada (*S. aurata*). En primer lloc, perquè el LPS activa l'alliberament endocrí de cortisol a través del sistema immune. En segon lloc perquè el cortisol modula aquesta resposta inflamatòria exercint retroalimentació negativa directament sobre ell mateix però també sobre el sistema immune a través del seu receptor glucocorticoide (figura B).

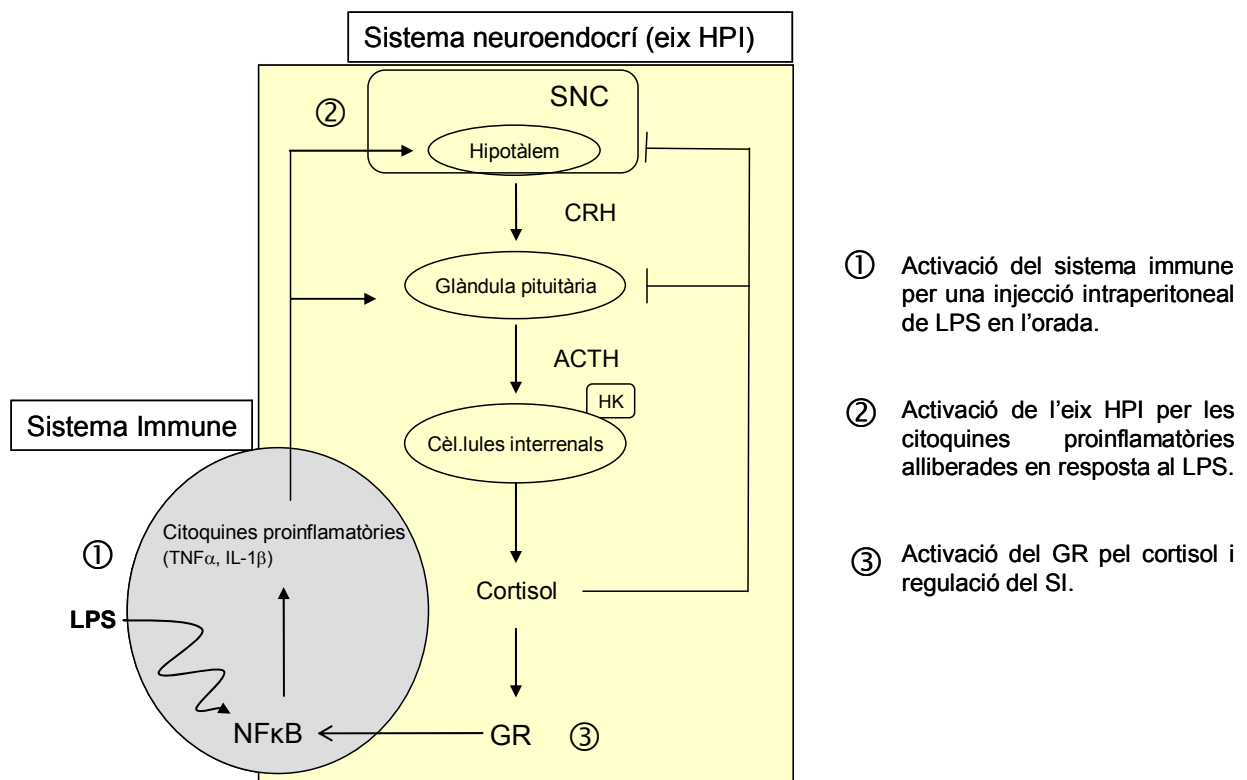


Figura B: Representació esquemàtica de la relació entre els sistemes immune i endocrí, a través de l'eix hipotalàmic-pituitàrio-interrenal (HPI) en l'orada (*Sparus aurata*) després d'una injecció intraperitoneal (i.p) de LPS. Està especificada amb nombres la seqüència temporal.

En mamífers, la resposta inflamatòria està regulada pels glucocorticoides que inhibeixen la producció de citoquines induïdes pel LPS (Haddad i col. 2002) i aquesta regulació es dona a través del GR. Per a poder determinar amb detall les interaccions entre els dos sistemes, el model d'injecció *in vivo* però podria no ser el millor model per estudiar la implicació del GR sobre el sistema immune en peixos o, en tot cas, representava una visió no completa per a determinar les interaccions immuno-endocrines. La utilització de models experimentals *in vitro*, per exemple, permet establir relacions i donar aproximacions al respecte, tot i que, la resposta d'una cèl·lula aïllada, pot ser molt diferent del seu comportament *in vivo*.

En mamífers, s'ha vist que els hepatòcits responen directament a l'endotoxina per l'activació de la via NF κ B (Thirunavukkarasu i col. 2005; Ebisawa i col. 2004; Monshouwer i col. 2003; Panesar i col. 1999) i com el GR interacciona amb les proteïnes del factor NF κ B (Widen i col. 2003). Hem sigut pioners en utilitzar un cultiu primari d'hepatòcits d'orada com a model experimental per estudiar el paper del receptor glucocorticoide en la resposta inflamatòria. Els resultats trobats amb el cultiu primari d'hepatòcits d'orada no només mostren la capacitat d'aquestes cèl·lules a respondre a estímuls immunes i endocrins sinó que, a més, la resposta depèn de la dosi i el temps. Per primera vegada, es mostra la implicació del GR en la resposta inflamatòria en peixos i, per tant, les interaccions entre la via endocrina (concretament el paper del GR) i la via immune (principalment la resposta del TNF α). A la vista dels resultats, no obstant, es plantegen altres preguntes per resoldre com, per exemple, quina seria la resposta de la cèl·lula a un segon estímulo immune o endocrí, o com respondria si estigués exposada a un agent immune i endocrí a la vegada. En definitiva, obre les portes cap a estudis posteriors per acabar d'entendre els mecanismes moleculars que regulen la resposta inflamatòria.

Arribar a establir la resposta immuno-endocrina en peixos permetria actuar més ràpidament en aplicacions sobre la salut i benestar del peixos en les activitats aquícoles. No obstant, hi ha espècies, com la perca europea (*Perca fluviatilis*), en les que encara cal establir la resposta fisiològica a condicions d'estrès habituals en l'activitat aquícola per a poder actuar en conseqüència. El nostre estudi analitza, per primera vegada, la resposta fisiològica i el patró de recuperació a l'estrès per transport i manipulació. De tota manera, seria interessant estudiar la resposta d'aquesta espècie a altres factors estressants com el confinament o a una injecció bacteriana, per exemple, així com també caracteritzar el receptor de cortisol i conèixer la seva implicació en la resposta inflamatòria.

En concret, les **conclusions** que es deriven d'aquesta tesi són:

1) S'ha clonat, per primera vegada, el receptor glucocorticoide (GR) de l'orada (*Sparus aurata*), concretament la regió codificant i el 3'UTR. La regió codificant es tradueix en una proteïna de 784 aa i mostra elevada homologia amb els dominis funcionals principals, domini d'unió a DNA i domini d'unió a l'hormona, d'altres receptors glucocorticoïdes, inclosos els de mamífers.

2) L'expressió del GR de l'orada (*S. aurata*) és ubíqua, ja que s'ha detectat a tots els teixits estudiats: cor, fetge, melsa, ronyó anterior i posterior, intestí, gònada, teixit adipós, brànquia, cervell, i múscul.

3) L'administració *in vivo* de LPS estimula l'eix hipotalàmic-pituitario-interrenal (HPI) en l'orada (*S. aurata*) desencadenant l'alliberació de cortisol. La secreció de cortisol en resposta a la injecció d'endotoxina segueix un patró de resposta aguda.

4) El LPS regula l'expressió del GR en l'orada (*S.aurata*) de manera específica segons el temps i el teixit. En general, existeix una correlació inversa entre els nivells de cortisol plasmàtic i els nivells d'expressió del GR en els teixits.

5) El LPS activa la resposta de gens immunes ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, proteïna Mx, catD, $\text{PPAR}\gamma$) en els principals teixits immunològics de l'orada (*S.aurata*). Els canvis en l'expressió de cadascun d'aquests gens és diferent en el temps i en funció del teixit.

6) Les dosis de 0,1 ng/ml de $\text{rTNF}\alpha$ (agent immune) i de 100 ng/ml de cortisol (agent endocrí) activen l'expressió diferencial de gens immunes i endocrins, respectivament, en el cultiu primari d'hepatòcits d'orada (*S.aurata*).

7) La dosi de 10 ng/ml de $\text{rTNF}\alpha$ augmenta l'expressió del $\text{TNF}\alpha$ 6 hores després del tractament, en el cultiu primari d'hepatòcits d'orada (*S.aurata*).

8) La dosi de 500 ng/ml de cortisol augmenta l'expressió del GR i disminueix l'expressió del $\text{TNF}\alpha$ en el cultiu primari d'hepatòcits d'orada (*S. aurata*) 3 hores després del tractament.

Aquesta resposta mostra que, en peixos, la regulació de la resposta inflamatòria també es dona a través del GR.

9) La perca europea (*Perca fluviatilis*) sotmesa a factors estressants típics de les pràctiques aquícoles (transport i manipulació) mostra la resposta fisiològica primària d'alliberació de cortisol però baix nivell d'activitat en les respostes secundàries.

8. BIBLIOGRAFIA ---

8. BIBLIOGRAFIA.

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. y Pober J.S. (2001). *Inmunología Celular y Molecular*. Cuarta edición. Madrid.
2. Abi-Ayad S-M.E-A., Kestemont P. and Mélard C. (2000). Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 233-243.
3. Acerete L., Balasch J.C., Espinosa E., Josa A. and Tort L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237, 167–178.
4. Adcock I.M. and Caramori G. (2001). Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunology and Cell Biology* 79, 376-384.
5. Almawi W.Y. and Melemedjian O.K. (2002). Negative regulation of nuclear factor κ B activation and function by glucocorticoids. *Journal of Molecular Endocrinology* 28, 69–78.
6. Andersen Ø', Eijnsink V.G.H. and Thomassen M. (2000). Multiple variants of the peroxisome proliferator-activated factor (PPAR) γ are expressed in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene* 255, 411-418
7. Arends R.J., Mancera J.M., Muñoz J.L. and Wendelaar Bonga S.E. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology* 163, 149-157.
8. Balm P.H.M. (1997). Immune-endocrine interactions. *Fish stress and health in Aquaculture*, editat per Iwama G.K., Pickering A.D., Sumpter J.P., Schreck C.B. and Ruane N.M. Cambridge. pp. 195-221.
9. Balm P.H.M., van Lieshout E., Lokate J. and Wendelaar-Bonga S.E. (1995). Bacterial lipopolysaccharide (LPS) and interleukin 1 (IL-1) exert multiple physiological effects in the tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei). *Journal of Comparative and Physiology B* 165, 85-92.
10. Barton B. (2002). Stress in fishes: A diversity with particular reference in changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517-525.

11. Barton B., Bollig H., Hauskins B.L. and Jansen C.R. (2000). Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. Albus x platorynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126 A, 125-134.
12. Barton B. and Iwama G. (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.
13. Basu N., Kennedy C.J. and Iwama G.K. (2003). The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134 A, 655-663.
14. Basu N., Nakano T., Grau E. G. and Iwama G. K. (2001). The Effects of Cortisol on Heat Shock Protein 70 Levels in Two Fish Species. *General and Comparative Endocrinology* 124, 97-105.
15. Beishuizen A. and Thijs L.G. (2003). Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of Endotoxin Research* 9 (1), 3-24.
16. Belvisi M.G., Hele D.J. and Birrell M.A. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. *European Journal of Pharmacology* 533 (1-3), 101-109.
17. Bertók L. (1998). Endotoxins and endocrine system. *Domestic animal endocrinology* 15 (5), 305-308.
18. Berzci I, Bertók L. and Bereznai T. (1966). Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Canadian Journal of Microbiology* 12, 1070-1071.
19. Bird S., Zou J., Wang T., Munday B., Cunningham C. and Secombes C.J. (2002). Evolution of Interleukin-1 β . *Cytokine and growth factor reviews* 13, 483-502.
20. Blanco M.M., Gibello A., Fernández-Garayzábal J.F. and Domínguez L. (2004). La Enfermedad de Invierno en la producción de Dorada: Aspectos microbiológicos. *AquaTIC* 20, 79-87.
21. Bobe J. and Goetz F.W. (2001). Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129, 475-481.

22. Borski R.J. (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11 (10), 427-436.
23. Braley H. and Andersson T.A. (1992). Changes in blood metabolite concentrations in response to repeated capture, anesthesia and blood sampling in the Golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103A, 445-450.
24. Bricknell I.R., Bron J.E. and Bowden T.J. (2006). Diseases of gadoid fish in cultivation: a review. *ICES Journal of Marine Science* 63, 253-266.
25. Brooks S., Tyler C.R., Carnevali O., Coward K. and Sumpter J.P. (1997). Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* 201 (1-2), 45-54.
26. Bury N.R., Sturm A., Rouzic P.L., Lethimonier C., Ducouret B., Guiguen Y., Robinson-Rechavi M., Laudet V., Rafestin-Oblin M.E. and Prunet P. (2003). Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish. *Journal of Molecular Endocrinology* 31, 141-156.
27. Carnevali O., Centonze F., Brooks S., Marota I. and Sumpter J.P. (1999). Molecular cloning and expression of ovarian Cathepsin D in seabream, *Sparus aurata*. *Biology of reproduction* 61, 785-791.
28. Carragher J.F. and Rees C.M. (1994). Primary and secondary stress responses in golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107A, 49-56.
29. Cech J.J., Bartholow S.D., Young P.S. and Hopkins T.E. (1996). Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. *Transaction of the American Fisheries Society* 125, 308-320
30. Cerdá-Reverter J.M., Zanuy S., Carrillo M. and Madrid J.A. (1998). Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiology and Behavior* 64 (3), 245-250.
31. Colombe L., Fostier A., Bury N., Pakdel F. and Guiguen Y. (2000). A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: cloning and characterization of its steroid binding domain. *Steroids* 655, 319-328.
32. Cuvier-Péres A. and Kestemont P. (2002). Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 279-285.

33. Craig J.F. (2000). The biology of perch and related fish. Timber Press, Portland Oregon. 317 pp.
34. Dadoun F., Guillaume V., Sauze N., Farisse J., Velut J.G., Orsoni J.C., Gaillard R. and Oliver C. (1998). Effect of endotoxin on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in sheep. *European Journal of Endocrinology* 138, 193-197.
35. Davis C.R., Okihira M.S. and Hinton D.E. (2002). Effects of husbandry practices, gender, and normal physiological variation on growth and reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 60 (3-4), 185-201.
36. Dean D.B., Whitlow Z.W. and Borski R.J. (2003). Glucocorticoid receptor upregulation during seawater adaptation in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology* 132, 112-118.
37. DeRijk R.H., Schaaf M. and de Kloet E.R. (2002). Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 81, 103-122.
38. Dethloff G.M., Schlenk D., Khan S. and Bailey H.C. (1999). The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36 (4), 415-23.
39. de Sostoa A., Allué R., Bas C., Camarasa J.M., Casals F., Casaponsa J., del Castillo M., Doadrio I., Fernández i Colomé J.V., Franquesa R., Lloris D., Lobón-Cervià J., Matallanas J., Muñoz Chapuli R., de Sostoa F.J. i Vinyoles D. (1990). *Història Natural dels Països Catalans*. Vol. 11 Peixos. Barcelona.
40. Dittmar K.D. and Pratt W.B. (1997). Folding of the Glucocorticoid Receptor by the reconstituted hsp90-based chaperone machinery. *The Journal of Biological Chemistry* 372 (20), 13047-13054.
41. Ducouret B., Tujague M., Ashraf J., Mouchel N., Serval N., Valotaire Y., and Thompson E.B. (1995). Cloning of a teleost fish glucocorticoid receptor shows that it contains a deoxyribonucleic acid-binding domain different from that of mammals. *Endocrinology* 136 (9), 3774-3783.
42. Ebisawa Y., Kono T., Yoneda M., Asama T., Chisato N., Sugawara M., Ishikawa K., Iwamoto J., Ayabe T., Kohgo Y. and Kasai S. (2004). Direct Evidence That Induced Nitric Oxide Production in Hepatocytes Prevents Liver Damage During Lipopolysaccharide Tolerance in Rats. *Journal of Surgical Research* 118, 183-189.

43. Engelsma M.Y., Huising M.O., van Muiswinkel W.B., Flik G., Kwang J., Savelkoul H.F.J. and Verburg-van Kemenade B.M.L. (2002). Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin 1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87, 467-479.
44. Engelsma M.Y., Stet R.J.M., Schipper H. and Verburg-van Kemenade B.M.L. (2001). Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 195-203.
45. Evans R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 (4854), 889-895.
46. Förlin L., Andersson T., Balk L. and Larsson A. (1995). Biochemical and Physiological effects in fish exposed to Bleached Kraft mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 164-170.
47. Fuller P.J., Lim-Tio S.S. and Brennan F.E. (2000). Specificity in mineralocorticoid versus glucocorticoid action. *Kidney International* 57, 1256-1264.
48. García-Castillo J., Chaves-Pozo E., Olivares P., Pelegrín P., Meseguer J. and Mulero V. (2004). The tumor necrosis factor α of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cellular and Molecular Life Science* 61, 1331-1340.
49. García-Castillo J., Pelegrín P., Mulero V. and Meseguer J. (2002). Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor α from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics* 54, 200-207.
50. Goetz F.W., Iliev D.B., McCauley L.A.R., Liarte C.Q., Tort L.B., Planas J.V. and MacKenzie S. (2004a). Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Molecular Immunology* 41, 1199-1210.
51. Goetz F.W., Planas J.V. and MacKenzie S. (2004b). Tumor necrosis factors. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 487-497.
52. Grassi Milano E., Basari F. and Chimenti C. (1997). Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *General and Comparative Endocrinology* 108, 483-496.
53. Greenwood A.K., Butler P.C., White R.B., DeMarco U., Pearce D. and Fernald R.D. (2003). Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology* 144 (10): 4226-4236.

54. Grinevich V., Ma X.-M., Herman J.P., Jezova D., Akmayev I. and Aguilera G. (2001). Effect of repeated lipopolysaccharide administration on tissue cytokine expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 13, 711-723.
55. Guyton A.C. and Hall J.E. (2002) *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª edición. Ed. Mc-Graw-Hill-Interamericana de España.
56. Haddad J.J., Saadé N.E. and Safieh - Garabedian B. (2002). Cytokines and neuro-immune endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *Neuroimmunology* 133, 1-19.
57. Halmetoja A., Valtonen E.T. and Koskenniemi E. (2000). Perch (*Perca fluviatilis* L.) parasites reflect ecosystem conditions: a comparison of a natural lake and two acidic reservoirs in Finland. *International Journal for Parasitology* 30, 1437-1444.
58. Harris J. and Bird D.J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 77, 163-176.
59. Haukenes H. and Barton B.A. (2004). Characterization of the cortisol response following an acute challenge with lipopolysaccharide in yellow perch and the influence of rearing density. *Journal of Fish Biology* 64, 851-62.
60. Haukenes H. (2001). Characterization of the impact of a chronic density stressor on the neuroendocrine and innate immune responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to an acute challenge with lipopolysaccharide. Ph.D. Thesis. University of South Dakota, USA.
61. Haux C. and Sjöbeck M.L. (1985). Physiological stress responses in a wild fish population of perch (*Perca fluviatilis*) after capture and during subsequent recovery. *Marine Environmental Research* 15, 77-95.
62. Hayashi R., Wada H., Ito K. and Adcock I.M. (2004). Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology* 500, 51– 62.
63. Hirono I., Nam B., Kurobe T. and Aoki T. (2001). Molecular Cloning, Characterization, and expression of TNF cDNA and Gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Immunology* 165 (8), 4423-4427.
64. Holland J.W., Pottinger T.G. and Secombes C.J. (2002). Recombinant interleukin-1 β activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Endocrinology* 175, 261-267.

65. Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G. and Evans R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635–641.
66. Hontela A., Dumont P., Duclos D. and Fortin R. (1995). Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology And Chemistry* 14 (4), 725-731.
67. Hontela A., Rasmussen J.B., Audet C. and Chevalier G. (1992). Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs and mercury. *Archives of Environmental Contamination and toxicology* 22, 278-283.
68. Iliev D.B., Roach J.C., Mackenzie S., Planas J.V and Goetz F.W. (2005). Endotoxin recognition: In fish or not in fish? *FEBS Letters* 579, 6519–6528.
69. Jørgensen J.B., Lunde H., Jensen L., Whitehead A.S., Robertsen B. (2000). Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1b, IL-6 and TNFa or bacterial lipopolysaccharide. *Developmental and Comparative Immunology* 24, 553-563.
70. Knoebl I., Fitzpatrick M.S. and Schreck C.B. (1996). Characterization of a glucocorticoid receptor in the brains of Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *General and Comparative Endocrinology* 101, 195-204.
71. Kokkonen N., Rivinoja A., Kauppila A., Suokas M., Kellokumpu I. and Kellokumpu S. (2004). Defective acidification of intracellular organelles results in aberrant secretion of cathepsin D in cancer cells. *Journal of Biology and Biochemistry* 279, 39982-8.
72. Krieger J. and Fleig R. (1999). Yolk mobilization in perch, *Perca fluviatilis* L, embryos. *Fish Physiology and Biochemistry* 21, 157-165.
73. Kumar R. and Thompson E.B. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: Function relationship. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 94, 383-394.
74. Kumar R. and Thompson E.B. (2003). Transactivation Functions of the N-Terminal Domains of Nuclear Hormone Receptors: Protein Folding and Coactivator Interactions. *Molecular Endocrinology* 17(1),1–10.
75. Kumar R. and Thompson E.B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319.

76. Laing K.J., Wang T., Zou J., Holland J., Hong S., Bols N., Hirono I., Aoki T. and Secombes C.J. (2001). Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α . *European Journal of Biochemistry* 268, 1315-1322.
77. Lang C.H., Silvis C., Deshpande N., Nystrom G. and Frost R.A. (2003). Endotoxin stimulates *in vivo* expression of inflammatory cytokines tumor necrosis alpha, interleukin-1 β , -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* 19 (6), 538-546.
78. Lang C. (1987). Mortality of perch, *Perca fluviatilis* L., estimated from the size and abundance of eggs strands. *Journal of Fish Biology* 31, 715-720.
79. Lappivaara J. (2001). Effects of acute handling stress on Whitefish *Coregonus lavaretus* after prolonged exposure to biologically treated and untreated bleached Kraft mill effluent. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 55-64.
80. Larsson A., Haux C. and Sjöbeck M.L. (1985). Fish Physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and environmental safety* 9, 250-281.
81. Lauzurica P., Martínez-Martínez S., Marazuela M., Gómez del Arco P., Martínez-A. C., Sánchez-Madrid F. and Redondo J.M. (1999). Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF- α . *European Journal of Immunology* 29, 1890–1900.
82. Leaver M.J., Boukouvala E., Antonopoulou E., Diez A., Favre-Krey L., Tariq Ezaz M., Bautista J.M., Tocher D.R. and Krey G. (2005). Three Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Isotypes from Each of Two Species of Marine Fish. *Endocrinology* 146 (7), 3150–3162.
83. Lethimonier C., Tujague M., Kern L. and Ducouret B. (2002). Peptide insertion in the DNA-binding domain of fish glucocorticoid receptor is encoded by an additional exon and confers particular functional properties. *Molecular and Cellular Endocrinology* 194, 107-116.
84. MacKenzie S., Planas J.V. and Goetz F.W. (2003). LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor- α mRNA in primary trout monocytes and *in vitro* differentiated macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 393-400.
85. Marsigliante S., Barker S., Jimenez E. and Storelli C. (2000). Glucocorticoid receptors in the euryhaline teleost *Anguilla anguilla*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 162, 193-201.

86. Maxime V., Nonnotte G., Peyraud C., Williot P. and Truchot J.P. (1995). Circulatory and respiratory effects of an hypoxic stress in the Siberian sturgeon. *Respiration Physiology* 100, 203-212.
87. McDonald G. and Milligan L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P, Schreck, C.B. (Eds.). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 119–144.
88. McEwen B.S., Biron C.A., Brunson K.W., Bulloch K., Chambers W.H., Dhabhar F.S., Goldfarb R.H., Kitson R.P., Miller A.H., Spencer R.L. and Weiss J.M. (1997). The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews* 23, 79-133.
89. Meyer A. and Scharl M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current opinion on cell biology* 11, 699-704.
90. Michel C. (1981). A bacterial disease of perch (*Perca fluviatilis* L.) in an alpine lake: Isolation and preliminary study of the causative organism. *Journal of Wildlife Diseases* 17 (4), 505-510
91. Molinero A., Gómez E., Balasch J. and Tort L. (1997). Stress in fish removal in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*: a time course study on the remaining fish in the same tank. *Journal of applied aquaculture* 7 (2), 1-12.
92. Mommsen T.P., Vijagan M.M. and Moon T.W. (1999). Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
93. Mommsen T.P., Moon T.W and Walsh P.J. (1994). Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In: Hochachka P.W. and Mommsen T.P. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of fishes. Analytical techniques vol. 3*. Canada. Chapter 30, 355-397.
94. Monshouwer M. and Hoebe K.H.N. (2003). Hepatic (dys-)function during inflammation. *Toxicology in Vitro* 17, 681–686.
95. Moon T.W. (2004). Hormones and fish hepatocyte metabolism: the good, the bad and the ugly! *Comparative Biochemistry and Physiology* 139 B, 335–345.
96. Necela B.M. and Cidlowski J.A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proceedings of the American thoracic society* 1, 239-246.

97. Ortuño J., Esteban A. and Meseguer J. (2002). Lack of effect of combining different stressors on innate responses of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 84, 17-27.
98. Panesar N., Tolman K. and Mazuski J.E. (1999). Endotoxin Stimulates Hepatocyte Interleukin-6 Production. *Journal of Surgical Research* 85, 251–258.
99. Pavlov D.F., Chuiko G.M. and Shabrova A.G. (1994). Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.) *Comparative Biochemistry and Physiology* 108 C (1), 113-115.
100. Pelegrín P., Chaves-Pozo E., Mulero V. and Meseguer J. (2004). Production and mechanism of secretion of interleukin-1 β from the marine fish gilthead seabream. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 229-237.
101. Pelegrín P., García-Castillo J., Mulero V. and Meseguer J. (2001). Interleukin-1 β isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines. *Cytokine* 16 (2), 67-72.
102. Pickering A.D. and Pottinger T.G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry* 7 (1-4), 253-258.
103. Planas J., Gutierrez J., Fernández J., Carrillo M. and Canals P. (1990). Annual daily variations of plasma cortisol in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 91, 171-178.
104. Raetz C.R.H. and Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Reviews of Biochemistry* 71, 635–700.
105. Robertson L., Thomas P. and Arnold C.R. (1988). Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture* 68, 115-130.
106. Robinson-Rechavi M., Marchand O., Escriva H., Bardet P-L., Zelus D., Hughes S. and Laudet V. (2001). Euteleost Fish Genomes are Characterized by Expansion of Gene Families. *Genome Research* 11, 781–788.
107. Roche H. and Bogé G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research* 41, 27-43.

108. Romare P. (2000). Growth of larval and juvenile perch: the importance of diet and fish density. *Journal of Fish Biology* 56, 879-889.
109. Rotllant J., Ruane N.M., Caballero M.J., Montero D. and Tort L. (2003). Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 136 A, 613-620.
110. Rotllant J., Balm P.H.M., Pérez-Sánchez J., Wendelaar-Bonga S.E. and 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.
111. Rotllant J. and Tort L. (1997). Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology* 51, 21-28.
112. Saeij J.P.J., Stet R.J.M., de Vries B.J., van Muiswinkel W.B. and Wiegertjes G.F. (2003). Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance? *Developmental and Comparative Immunology* 27, 29-41.
113. Salinas I., Lockhart K., Bowden T.J., Collet B., Secombes C.J. and Ellis A.E. (2004). An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 159-170.
114. Sandström O., Abrahamsson I., Andersson J. and Vetemaa M. (1997). Temperature effects on spawning and eggs development in Eurasian perch. *Journal of Fish Biology* 51, 1015-1024.
115. Sathiyaa R. and Vijayan M.M. (2003). Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 284, 1508-1515.
116. Sathiyaa R., Campbell T. and Vijayan M.M. (2001). Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129 B, 679-685.
117. Scapigliati G., Costantini S., Colonna G., Facchiano A., Buonocore F., Bossù P., Cunningham C., Holland J.W. and Secombes C.J. (2004). Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 429-441.

118. Scherrer L.C., Dalman F.C., Massa E., Meshinchi S. and Pratt W.B. (1990). Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-Hsp90 complex. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (35), 21397-21400.
119. Schoneveld O.J.L.M., Gaemers I.C. and Lamers W.H. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1680, 114-128.
120. Segner H. (1998). Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120 A, 71-81.
121. Sjöbeck M.L., Haux C., Larsson A. and Lithner G. (1984). Biochemical and hematological studies on perch, *Perca fluviatilis*, from the cadmium-contaminated river Eman. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 8 (3), 303-312.
122. Sloman K.A., Desforges P.R. and Gilmour K.M. (2001). Evidence for a mineralocorticoid-like receptor linked to branchial chloride cell proliferation in freshwater rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology* 204, 3953-3961.
123. Smith C., Douglas A. and Jurajda P. (2001). Oviposition site selection and embryo mortality in perch. *Journal of Fish Biology* 58, 880-882.
124. Smoak K. and Cidlowski J.A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development* 125, 697-706.
125. Sturm A., Bury N., Dengreville L., Fagart J., Flouriot G., Rafestin-Oblin M.E. and Prunet P. (2005). 11-Deoxycorticosterone Is a Potent Agonist of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mineralocorticoid Receptor. *Endocrinology* 146 (1), 47-55.
126. Sures B. (2002). Competition for minerals between *Acanthocephalus lucii* and its definitive host perch (*Perca fluviatilis*) *International Journal for Parasitology* 32, 1117-1122.
127. Tafalla C., Aranguren R., Secombes C.J., Figueras A. and Novoa B. (2004). Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 11-24.
128. Tafalla C. and Novoa B. (2000). Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 24 (6-7), 623-631.
129. Tagawa M., Hagiwara H., Takemura A., Hirose S. and Hirano T. (1997). Partial cloning of the hormone-binding domain of the cortisol receptor in tilapia, *Oreochromis mossambicus*, and changes in the mRNA level during embryonic development. *General and Comparative endocrinology* 108, 132-140.

130. Tasker J.G., Si S. and Malcher-Lopes R. (2005). Rapid central corticosteroid effects: evidence for membrane glucocorticoid receptors in the brain. *Integrative and Comparative Biology* 45, 665-671.
131. Terova G., Gornati R., Rimoldi S., Bernardini G. and Saroglia M. (2005). Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reared at high stocking density. *Gene* 357, 144 – 151.
132. Thirunavukkarasu C., Uemura T., Iian fu Wang, Watkins S.C. and Gandhi C.R. (2005). Normal rat hepatic stellate cells respond to endotoxin in LBP-Independent manner to produce inhibitor(s) of DNA synthesis in hepatocytes. *Journal of cellular physiology* 204, 654–665.
133. Toranzo A.E., Magariños B. and Romalde J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37– 61.
134. Tort L., Balasch J.C and MacKenzie S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* 22 (3), 277-286.
135. Tort L., Padrós F., Rotllant J. and Crespo S. (1998a). Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish and Shellfish Immunology* 8, 37-47.
136. Tort L. (1998b). Stress and immunosuppression in fish. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* 5, 17-29.
137. Tort L., Gómez E., Montero D. and Sunyer O. (1996). Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquaculture International* 4, 31-41.
138. Tort L. and Torres P. (1988). The effects of sublethal concentrations of cadmium on hematological parameters in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Journal of Fish Biology* 32, 277-282.
139. Turnbull A.V. and Rivier C.L. (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological Reviews* 79 (1), 1-71.
140. Venkatesh B. (2003). Evolution and diversity of fish genomes. *Current opinion in Genetics and Development* 13, 588-592.
141. Vijayan M.M., Raptis S. and Sathiyaa R. (2003). Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 132, 256–263.

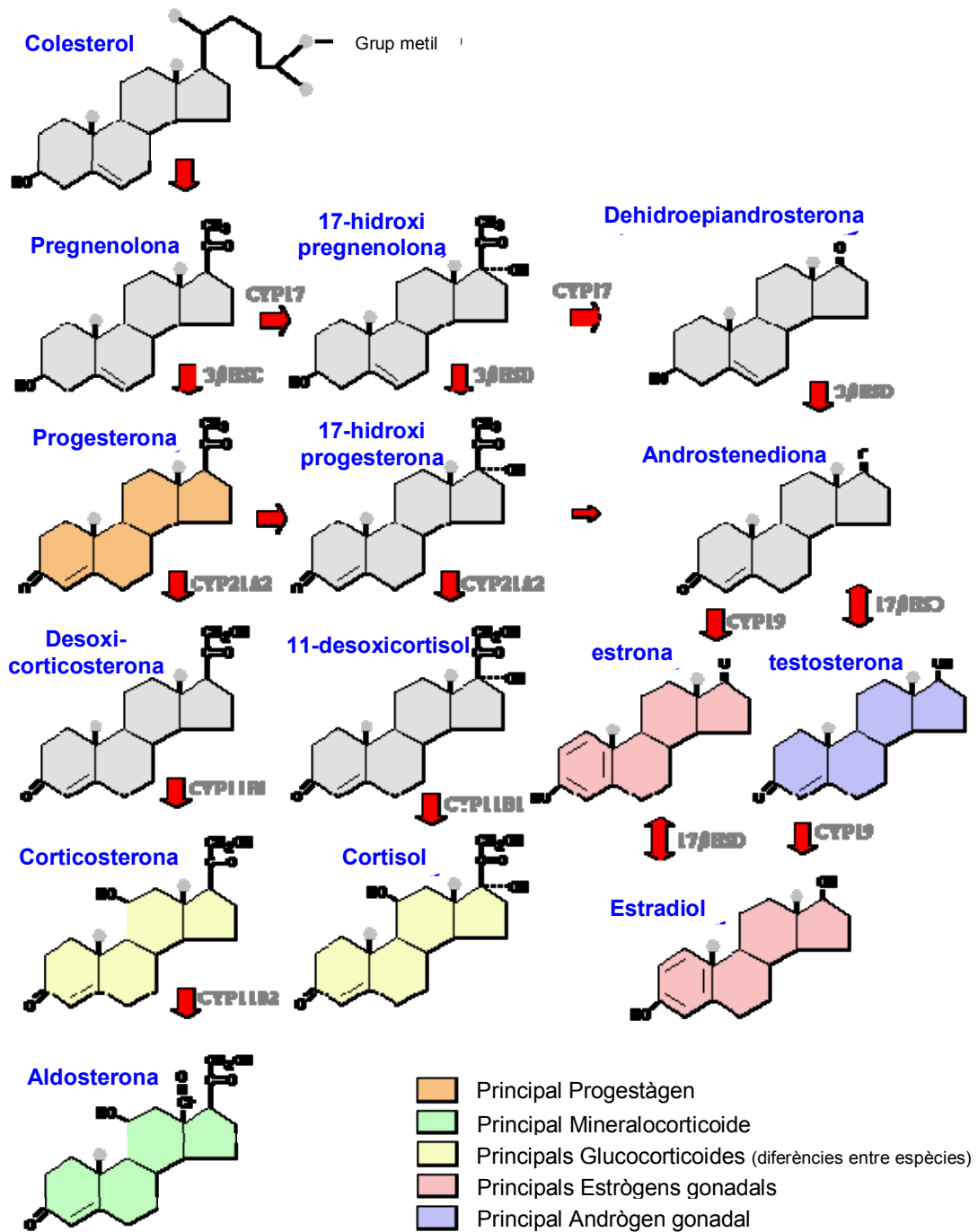
142. Wang T., Johnson N., Zou J., Bols N. and Secombes C.J. (2004). Sequencing and expression of the second allele of the interleukin-1 β gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): identification of a novel SINE in the third intron. *Fish & Shellfish Immunology* 16, 335–358.
143. Waring C.P., Stagg R.M. and Poxton M.G. (1996). Physiological responses to handling in the turbot. *Journal of Fish Biology* 48, 161-173.
144. Wedemeyer G.A., Barton B. and McLeay D.J. (1990). Stress and acclimation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. Chapter 14, 451– 489.
145. Wendelaar Bonga S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77 (3), 591-625.
146. Weyts F.A.A., Cohen N., Flik G. and Kemenade W. (1999). Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9, 1-20.
147. Weyts F.A.A., Verburg-van Kemenade B.M.L. and Flik G. (1998). Characterisation of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio* L. *General and Comparative Endocrinology* 111, 1-8.
148. Whittington R.J. (1993). Purification and partial characterization of serum immunoglobulin of the European perch (*Perca fluviatilis*, L.). *Fish & Shellfish Immunology* 3, 331-343.
149. Widen C., Gustafsson J. A° and Wikström A.C. (2003). Cytosolic glucocorticoid receptor interaction with nuclear factor- κ B proteins in rat liver cells. *Biochemistry Journal* 373, 211–220.
150. Wojtaszek J., Dziewulska-Szwajkowska D., Lozinska-Gabsa M., Adamowicz A. and Dzugaj A. (2002). Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology* 125, 176-183.
151. Zou J., Holland J., Pleguezuelos O., Cunningham C. and Secombes C.J. (2000). Factors influencing the expression of interleukin-1 β in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 24, 575-582.
152. Zou J., Grabowski P.S., Cunningham C. and Secombes C.J. (1999a). Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Cytokine* 11 (8), 552-560.

153. Zou J., Cunningham C., and Secombes C.J. (1999b). The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 β gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *European Journal of Biochemistry* 259, 901-908.

9. ANNEXOS

9. ANNEXOS.

1. Vies principals en la biosíntesi d'esteroides (Introducció).



2. Seqüència nucleotídica (experiment 1 capítol I). Alineament entre les seqüències nucleotídiques de pronefros (HK), melsa, cor i fetge.

```

HK          TAGTGCTCCTGGCTGTTTCTTATGTCTTTTCGGTCTTGGCTGGAGGTCTTACCAGCAGTGC 60
Melsa      TAGTGCTCCTGGCTGTTNCTNATGTCTTTTCGGTCTTGGCTGGAGGTCTTACCAGCAGTGC 60
cor        -AGTGCTCCGGCTGTTT-CTGATGTCTTTTCGGTCTTGGCTGGAGGTCTTACCAGCAGTGC 58
fetge     -AGTGCTCCTGGCTGTT-CTCATGTCTTTTCGGTCTTGGCTGGAGGTCTTACCAGCAGTGC 58
          ***** *          ** ** *****

HK          AACGGCAACATGCTGTGCTTCGCGCCAGACCTCGTCATAAACGAGGAGCGGATGAAGCTG 120
Melsa      AACGGCAACATGCTGTGCTTCGCGCCAGACCTCGTCATAAACGAGGAGCGGATGAAGCTG 120
cor        AACGGCAACATGCTGTGCTTCGCGCCAGACCTCGTCATAAACGAGGAGCGGATGAAGCTG 118
fetge     AACGGCAACATGCTGTGCTTCGCGCCAGACCTCGTCATAAACGAGGAGCGGATGAAGCTG 118
          *****

HK          CCCTACATGGCTGACCAGTGCGAACAGATGCTGAAGATCTCCAGCGAGTTTGTCCGGCTG 180
Melsa      CCCTACATGGCTGACCAGTGCGAACAGATGCTGAAGATCTCCAGCGAGTTTGTCCGGCTG 180
cor        CCCTACATGGCTGACCAGTGCGAACAGATGCTGAAGATCTCCAGCGAGTTTGTCCGGCTG 178
fetge     CCCTACATGGCTGACCAGCGCGAACAGATGCTGAAGATCTCCAGCGAGTTTGTCCGGCTG 178
          *****

HK          CAGGTTTCCCACGACGAGTATTTGTGCATGAAGGTCTTGCTGCTGCTCAGCACAGTGCCA 240
Melsa      CAGGTTTCCCACGACGAGTATTTGTGCATGAAGGTCTTGCTGCTGCTCAGCACAGTGCCA 240
cor        CAGGTTTCCCACGACGAGTATTTGTGCATGAAGGTCTTGCTGCTGCTCAGCACAGTGCCA 238
fetge     CAGGTTTCCCACGACGAGTATTTGTGCATGAAGGTCTTGCTGCTGCTCAGCACAGTGCCA 238
          *****

HK          AAGGATGGCCTGAAGAGCCAGGCGGTGTTTCGACGATATTCGGATGTCGTACATCAAGGAG 300
Melsa      AAGGATGGCCTGAAGAGCCAGGCGGTGTTTCGACGATATTCGGATGTCGTACATCAAGGAG 300
cor        AAGGATGGCCTGAAGAGCCAGGCGGTGTTTCGACGATATTCGGATGTCGTACATCAAGGAG 298
fetge     AAGGATGGCCTGAAGAGCCAGGCGGTGTTTCGACGATATTCGGATGTCGTACATCAAGGAG 298
          *****

HK          CTGGGTAAAGCCATCGTAAAGCGTGAGGAGAACTCGAGCCAGAACTGGCAGCGTTTCTAT 360
Melsa      CTGGGTAAAGCCATCGTAAAGCGTGAGGAGAACTCGAGCCAGAACTGGCAGCGTTTCTAT 360
cor        CCGGGTAAAGCCATCGTAAAGCGTGAGGAGAACTCGAGCCAGAACTGGCAGCGTTTCTAT 358
fetge     CTGGGTAAAGCCATCGTAAAGCGTGAGGAGAACTCGAGCCAGAACTGGCAGCGTTTCTAT 358
          * *****

HK          CAGCTCACCAGGCTGCTCGATTCCATGCACGAGATGGTCGGAGGACTGCTCAGCTTCTGC 420
Melsa      CAGCTCACCAGGCTGCTCGATTCCATGCACGAGATGGTCGGAGGACTGCTCAGCTTCTGC 420
cor        CAGCTCACCAGGCTGCTCGATTCCATGCACGAGATGGTCGGAGGACTGCTCAGCTTCTGC 418
fetge     CAGCTCACCAGGCTGCTCGATTCCATGCACGAGATGGTCGGAGGACTGCTCAGCTTCTGC 418
          *****

HK          TTCTACACCTTTGTGAATAAAATCCCTGAGCGTGGAGTTCCCGGAGATGCTGGCCGAGATC 480
Melsa      TTCTACACCTTTGTGAATAAAATCCCTGAGCGTGGAGTTCCCGGAGATGCTGGCCGAGATC 480
cor        TTCTACACCTTTGTGAATAAAATCCCTGAGCGTGGAGTTCCCGGAGATGCTGGCCGAGATC 478
fetge     TTCTACACCTTTGTGAATAAAATCCCTGAGCGTGGAGTTCCCGGAGATGCTGGCCGAGATC 478
          *****

HK          ATCAGCAACCAAGGANNGAAA- 501
Melsa      NTCAGCAACCAAGGAAANGAAA 502
cor        ATCAGCAACCAATTACCGAAAA 500
fetge     ATCAGCAACCAATTACCGAAAA 500
          ***** *          **

```


Percentatge de similitud entre les seqüències nucleotídiques de pronefros (HK), melsa, cor i fetge:

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	cor	500	2	fetge	500	99
1	cor	500	3	HK	501	98
1	cor	500	4	Melsa	502	98
2	fetge	500	3	HK	501	98
2	fetge	500	4	Melsa	502	98
3	HK	501	4	Melsa	502	98

3. Seqüència aminoacídica (experiment 1 capítol I). Percentatge de similitud entre les seqüències aminoacídiques de pronefros (HK), melsa, cor i fetge:

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	HK	163	2	melsa	163	98
1	HK	163	3	cor	163	96
1	HK	163	4	fetge	161	96
2	melsa	163	3	cor	163	96
2	melsa	163	4	fetge	161	96
3	cor	163	4	fetge	161	98

4. Fragment de la llibreria d'orada (experiment 1, capítol I). Seqüències nucleotídiques dels extrems del clon 1 aïllat a partir del rastreig de la llibreria de cDNA de glàndula pituitària de *Sparus aurata* utilitzant com a sonda el fragment de receptor glucocorticoide (GR) de ronyó anterior aïllat per RT-PCR.

>Extrem 5' GR - clon 1 (717 pb)

```
5' GGCACGAGCAGACGGCCAGCGTCTGTTCTCCATCGCTGTCAGCAGAGTTCAACACCTCCACCTGCTGGCTCAGAGAAGA
GTCTCTGAGCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGGAGAACGCTAGCCAGAACTGGCAGCGCTTCTATCAGCTAACTAAGCTAC
TGGACTCGATGCAGGAGATGGTTCGAGGGTCTTCTCCAGATCTGTTTCTACACCTTTGTGAATAAAAACCTCAGTGTGGAGT
TCCCGGAGATGCTGGCGGAGATCATCACCAACCAGATACCAAAATTCAAAGACGGGAGTGTCAAGCCTCTGCTGTTTCATC
AGAAGTGACTGCCTTAACTGTGAAGCAATGCCTTAAATTCGCCCTCCCTGCGTACCTCTCCTGGGCCCAAGCTTTCAC
CCCGAGCCCTAAGCCTTCGCTTGGCCTGCCGCCCCACCATCGCTCTAGATTTCGATTCCCTCGGTTTTTCCAGGTCCCCTCT
AGGAATTCGCCAACCCTCCAGGCCTCAGCCATTCGGCCTAATCTCGGAGCACAAAACCTGTGGCCTCACACCTCCTAAT
CCCATCCCGGGTTTGGTTAACTACGGGAGGACATCCACCACCGACCTGTAGCCCTTCCCTGTTGGCTAACCAAGAAGAAT
TTGTCCTCCGGGGGGTTTGTGGCTCTGAATGTCTCGCGGGCAGGATGCGTTTTGGGCAATCTGTTTTTT-3'
```

>Extrem 3' GR - clon 1 (886 pb)

```
5' ATAAATATAGACATCTCCAGTCGTTATCGCAACATCTTTAGAGTCCAGTACCCAGATTATATTAGAAATATAATGT
GGAATACATCCAAATACCTTTCTTTTGACAAGCTTGTGACAACTTGGTGCTTAATGGATGCCACTGGAATTTTAAACAAGGC
ATATCTAATATTTTGTAAATATTACGGAGCAGATTTGGAATAATCACAGTCGCTCATTGGAATGAAATTTGTTTACAAACAC
TGTCAGTGTATTTCAGACGCGATGATGATCGAGTCGACCCGGCTTGAAGTCCGTCGGTCCGTCCTCACTGCCAGCTGCCT
CCACGCGACGTTCTAATCACACCTTTATTGAGCTCCAATCAGAGAGACTACCTGGACACACCTGCCTGCCACTGCA
GAAATCACAGCTCCACACAAATCCTCTTGTGTTGTAGCCAGTGGTTTTTAAATTAGACCACCAACCCTGATTTAAAA
ACATTTTGTCCCTCATCTGATTAGAATTCGCTTTTAGATGATTTATTACAGAAAGTTACAGATTGATCCTGTCAAAGTGT
TACTTATGAATATGAGTCACGAGATGAATCAAGAATCTCTGTGTAACCTAACAGACTAGACTGGCTGATAGACAGCAGCA
GGTAACCTCACCATGCAGAACTACTTACAGGTGGACACAAAACACGGTATTATTAAAAAGTATTGACTCAATATACAATT
TTAGATGAAATATGCCCTTAAATCAACTTCATCTCAAAGCGTTGACAAAGCAGGACGTTGAGCTTTATATTTAAATTTTAT
GCTCAACTCCACGGAAGAGGTAATAAATATATTTACATATTTCTATTGTACCATGACGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'
```

5. Seqüència aminoacídica del receptor glucocorticoide en l'orada ([DQ486890](#)) (capítol II)

Clon 3 (blau, 1358 pb), clon 2 (taronja, 974 pb) i clon 1 (en verd, 2561 pb). En negreta es mostra el codó d'stop i subratllada la senyal de poliadenilació.

```

5' ATGGATCAGGGTGGACTGAAAAAGATTACATACAGAAGAGATGACCATTCAAGCAAATTGGTCTACACCGAAAGCACTGAGGAGGGAGTCT
ATTTAAAGTCACTCCTCAGAGTGCATGTCCATCACCTCTGCCGCATCTGTCTGTTTCCATCCAGCCCGTTGATGCAGCCAGGACAGGTGCCG
AACGGCCTCAGTGACAGCCCTTCCAGAGGAGCTCACCTCCATTACAGCCACTGTAGGGCCCTGTTAGAAGTCCAGAGTCCAGGGGCTAA
CCAAAGATCAGAGGGTTCAGCAGCAGTTCCTCCAGACATACTTCCACTACATTTGGGCGTCAAATCTTGAGGGAGCACTTGCCCCAGTTGGA
GGCCAGTATAGCAGACATTAAACCAATCCCAATGGATTCACTTATTGGGGGGTCAAGTCCCAACTTCTCCCAATGAAAACAGAGGATTTCTCC
ATGGATAAAGGGCAGCAAGACCCCAATTGACCTTGATCAGCCTTTGAGCACATTTGGCAAAGATGTGGACGTTTACCAGAAAATGTTTCACTGACA
ACGCTCTAGACTTGCCTCAAGACTTCGAGCTCACTGGGTCCCCCTCAAGATTTTATGTAGGGGATGATGCCCTTCTGCTCTCTGGCAGACGA
TTCTCTGCTTGGGGAGTGGCTCAGAGAGGGACACAAAGTCTGCTGTGGTGAAGCATTAAACGGCAGTGGGGCAGTCTTTGTTGCTCTCAAT
GGCAGTAAATATGACAAGTCCAGATCAGTCTGTCCTAGCATATCCCATCTGCTTCCCTTAAACCCCTACAAACCACTTTGCTGCATTGGTGAAGA
AAGAAAAAGATGCCAGTTCATTGAGCTCTGCACCCAGGGCGTATCAAACAGGAGAAGACGCTCTGCAGGCCAGAGTTATTGCCAAATGAGCCG
CACATCTTCCACAGACATGCCAGCTTAACTCCATCTGCTGTTGGGTGAGCACTTCAGGAGGACAGAGTACCCTTTGGAGTCAACCC
AGCAACAACGAAACTCAGCAGCAAAAGGATCAGAAAACAGTGACCAGCCTGTTTCTCCAGTGCAGCACCATCGCTGGCCCTGGAACCCGAGCC
AGGTATTGGGGACAACGGCGTGTGAACAGGGCCAGTGAGGCTTTCTCGAGCACTCCCCCTTCTCCACAGCTTTTCCAGTTCTATCTCCAG
ACAGGAAGCGGTCACTGCTACGTTTTCAGCACAGGGAAAGAGCGGACTCATAAAATCTGCTGGTCTGCTCTGACGAGGCTTCAGGCTGCCAC
TACGGCGTCTCACCTGTGGCAGCTGCAAGGTGTTCTTCAAGAGAGCAGTGGAAAGGGCAGCATAATTACCTGTGTGCTGGGAGGAATGACTGCA
TAATAGACAAGATCAGGAGGAAGAACTGCCCGGCTGTGCTTCCGCAAGTGTCTGATGGCTGGCATGAACCTGGAAGCACGCAAAATCCAAAA
GTTGAACCGCTTAAAGGGCAACCTGCCAGCAACCCGCCGAGCTGACCACCTCTCCACCGATGGAGGCTCGCTCCCTAGTGCCCAAGTGCATG
CCTCAACTCGTCCCAACGATGTTGTCCTGTGAAGGCCATTGAGCCGGACACCATCTACGCCGGCTACGACAGCACCCCTGCCTGCACCTCCA
CCCCCTTGATGACACCTCAACAGGTTGGCGGCCGGCAGGTCACTCAGCTGTCAAGTGGGCCAAGGCTCTGCCAGTTCAGGAACCTGCA
CCTGGACGACAGATGACTCTGCTGCAGTGTCTCTGGCTCTTCTTAATGCTTTTCGGTCTTGGCTGGAGGTCTTACCAGCAGTGAACGGCAAC
ATGCTGTGCTTCGCGCCAGACTCGTCAATAACAGGAGCGGATGAAGTGCCTACATGGCTGACCAGTGCAGAACAGATGCTGAAGATCTCCA
CCGAGTTTGTCCGGTGCAGGTTTCCACGACGAGTATTGTGCATGAAGTCTTGTGCTGCTCAGCACAGTGCACAAAGGATGGCCTGAAGAG
CCAGCCGTTGTTTCAGCAGATAATTCGGATGTCGTACATCAAGGAGCTGGGTAAAGCCATCGTAAAGCGTGAAGAGAACCGTAGCCAGAACTGGCAG
CGCTTCTATCAGCTAACTAAGTACTGGACTCGATGCAGGAGATGGTCGAGGGTCTTCTCCAGATCTGTTTCTACACCTTTGTGAATAAAACCC
TCAGTGTGAGTTCCCGGAGATGCTGGCGGAGATCATCACAACAGATACCAAAAATCAAAAGAGCGGAGTGTCAAGCCTCTGCTGTTTATCA
GAAGTCACTGCCTTAAACTGTGAAGCAATGCCTTAAATTTGCCCTCCCTGCGTACCTCTCTGGGCCCAAGCTTTCACCCGAGCCCTAAGC
TTTCGCTTGGCCTGCCGCCCCACCATGCTCTAGATTTCGATTCCTCGGTTTTTCCAGGTCCTCTAGGAATTTGTCACCCCTCCAGCCCT
CAGCCATTCGGCTAATCTCGGAGCACAAAACCTGTGGCCTCACACCTCCTAATCCCATCCGGGTTTGGTTAAACTACGGGAGGACATCCACC
CACGACCTGTAGCCCTTCTGTTGGCTAACCAAGAAGAAATTTGTCCTCGGGGGGTTTGTGGCTCTGAATGTCTCGCGGCAGGATGCGTT
TTGGCAATCTGTTTTTCTCAGCCTCCTCATCTCCTCTCCGTCACGGCCCTGCTCAGGTTTCTGACGCTGTTTATTGCGGGCCGCCCT
GCCTTTAAGCTCTACTGCTCCGTTGATTTATCGCTGTTTTCACTGACAAGCAACACCTAGAAAAGCCTTTCCCTCCCTCAACTTGAGACAC
TGCTCACCCCAAGCTCAGGCCTTCTGTTCTCTGCTCACCTGCCCGGCTTGTCTCTCGTTTGCCTCCCGAGCTCCACTGCGCAGAGAATGTA
GTGAGTGTCTACTTGTGTGGTTTCCCGAGGACTGTCCGGCGGCAAGGGGATGAACCTAAACACGGAAAATGAGAAACATACTCTGTGATGA
GAGGATCTTTTATCTTCTGACCCGAGGACATGGAGGACGAACGTTTTTCAGCTGTGAGTCGGTTATCTTTTATGAAATTTATGAATCAGAT
TTATATATCCCACCGATGGACGAAGAGAAGACGGCTAGAGGAATATTGGTTTTATTTTTGACAGTCAATGCTTACATGCTTACACACAGGAAC
ACAGACAaAACACAAAGTATAAGCAGACACACACTCACTCAGCAAGATGTTTACACATGATGATCTGAGAAAGGAAAAACAGTGCCTTTTAGCT
TTTAAAGCTCGTCATAGCCATCCCTCTGAGAATCTAACCTTGACATCCTTCCACATATTTCTTCTTTTAGTTTTTCCACGCTGGCAATTT
CTGTTTTCTTCCAAAGCCACATTTTGTGTTTTTAATGTGGGAGCTCTCTGTTCTGGTCCCAGACACAAACGTTAGGACGACAGCCGATGG
TACAGATTTGAAAAAAGCAGAGCAGTGTGAAATATTAACCTCTGGGAGTCAATAGGAAAAGTATAAAAGATGTTAAAGGCCCAAAACACATT
TCAGTGTGCTCTGTGAAAATATAATTTGATAAATATAAATATAGAGCATCTCCACAGTCTTATCGCAACATCTTTAGAGTTCAGTACCCAG
ATTTATATTAGAAATATAATGTGGAATACATCCAATACTTTCTTTTGAACGCTTGTGACAAACTTGGTCTTAAATGGATGCCACTGGAATTTT
AACAAAGCATACTAATATTTGTAATATACGGAGCAGATTTGGAATAATCACAGTCGCTCATTGGAATGAAATTTGTTTACAAACACTGTCA
GTGTATTACAGCCGATGATGATCGAGTGCACCCGGCTTGAAGTCCGTCGTCGCTCCGCTCACTGCCAGCTGCGTCCACGGCAGCTTCTAAT
CACACCTTTATTGAGCTCAATCAGAGAGACTCACCTGGACACACCTGCTGCTCCACTGCAGAAATCACAGCTCCACACAAATCTCTTGTGTT
TGTGTAGCCAGTGGTTTTTAAATTAGACCACCAACCCCTGATTTAAAACATTTTGTCCCTCATCTGATTAGAATCTGCTTTTAGATGATT
TATTACAGAAAGTTACAGATGATCCTGTCAAAGTGTACTTATGAATATGAGTCAAGAGATGAATCAAGAATCTCTGTTGTAACCTAACAGAC
TAGACTGGCTGATAGACAGCAGGTAACCTCACCATGCAGAATACTTACAGGTGGACACAAAACAGGTAATTTATTAAGAAATTTAGACTC
AATATACAATTTTAGATGAAATATGCCCTTAAATCAACTCATCTCAAAGCGTGCACAAAGCAGGACGTGGAGCTTTATATTAATTAATCTTATGC
TCAACTCCAGGAAGAGGTAATAAATAATATTTACATATTTCTATTGTACCATGACGTGAAAAAATAAAAAAAAAA-3

```

6. Proteïna corresponent al receptor glucocorticoide d'orada (capítol II).

Es mostra el domini d'unió al DNA (verd) amb els dos anells de Zinc i el domini d'unió a la hormona (taronja)

```

5 ' MDQGGLKKITYRRDDHSSKLVYTESTEEGGLLKVTPQSAMSITSAASVVLPSPLM
QPGQVPNGLSDSPFPEELTSITATVGPLLEVPESRGLTKDQRVQQQLQTHSTTTFR
QILREHLPQLEASIADINQSSMDSLIGGSDPNFFPMKTEDFSMKGDQDPIDLDHAFE
HIGKDVDVHQKLFSDNALDLLQDFELTGPSEFYVGDDAFLSSLADDSLLGDVGSERD
TKSAVAESINGSGAVFVALNGSNMTSPDQSCPSISPSASLTPTTTLPALVKKEKDAF
IQLCTQGVIKQEKTSAGQSYCQMSGTSSDTMPPSSNSISICGVSTSGGQSYRFGVNPSN
NETQQQKDQKTVTSLFPLVTTIAGPWNRSQIGDNAVLNRASEAFSSSTPPFSTSFSSS
ISRQEAVTATSSAQGKSGTHKICILVCSDEASGCHYGVLTCGSKVFFKRAVEGQHNYL
CAGRNDCIIDKIRRKNCPACFRFRKCLMAGMNLARKSKKLNRLKGNLPSNPPELTTTP
PMEARSLVPKCMPQLVPTMLSLKAI EPDTIYAGYDSTLPDTSTRLMTTLNRLGGRQV
ISAVKWAKALPGFRNLHLLDDQMTLLQCSWFLMSFGLGWRSYQQCNGNMLCFAPDLVI
NEERMKLPYMAHQCEQMLKISSEFVRLQVSHDEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFD
DIRMSYIKELGKAIVKREENASQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVEGLLQICFYTFVNKTL
SVEFPEMLAEIITNQIPKFKDGSVKPLLFHQK-3 '

```

7. Alineament del GR (capítol II).

Alineament de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna de GR d'orada (*Sparus aurata*) amb el mateix receptor de: *Petromyzon marinus* (lamprea marina) *Oncorhynchus mykiss* (truita irisada), *Danio rerio* (peix zebra), *Pimephales promelas* (peix gat dels canals), *Salmo trutta* (truita comú), *Dicentrarchus labrax* (llobarro) i *Paralichthys olivaceus* (fals halibut de Japó), *Haplochromis burtoni* (tilàpia), *Xenopus laevis* (granota), *Gallus gallus* (gall), *Oryctolagus cuniculus* (conill), *Cavia porcellus* (conillet d'Índies), *Guinea pig* (porc), *Sus scrofa* (porc senglar), *Canis familiaris* (gos), *Tupaia belangeri* (esquirol), *Pongo pygmaeus*, *Saguinus oedipus*, *Aotus nancymae*, *Callithrix jacchus* (espècies de micos), *Rattus norvegicus* (rata), i *Homo sapiens* (home).

H.sapiens	MDSKESLTPG--REENPSSVLA-QERGDVMDFYKTLRGGATVKVSASSPSLAVASQSDSK	57
P.pygmaeus	MDSKESLTPG--REENPSSVLA-QERGNVMDFYKTLRGGATVKVSASSPSLAVASQSDSK	57
S.oedipus	MDSKESLTPG--KEENPSSVLT-QERGNVMDFKILRGGATLKVSVSSTSLAASQSDSK	57
A.nancymae	MDSKESLTPG--KEENPSSVLT-QERGNVMDFKILRGGATLKVSVSSTSLAASQSDSK	57
C.jacchus	MDSKESLTPG--KEENPSSVLT-QERGNVMDFKILRGGATLKVSVSSTSLAASQSDPK	57
T.belangeri	MDSKESLTSP--SEEIPSSVHG-QERGNVMDFYKTRRGGATVKVFMPSPSLGGSSQSDSK	57
S.scrofa	MDPKESLTTPS--REEIPSSVLG--RERAHVMDFYKSLRGGTPVKVSAASP SLAAVSPQSDSK	58
C.familiaris	MDSKESLSPPS--KEEISSSVLG--RERGNVMDFYKTLRGGATVKVSASSPSLAAASQSDSK	58
C.porcellus	MDLKESVTSS---KEVPSSVLG--SERRNVIDFYKTVRGGATVKVSASSPSLAAAAQSDSK	56
G.pig	MDLKESVTSS---KEVPSSVLG--SERRNVIDFYKTVRGGATVKVSASSPSLAAAAQSDSK	56
R.norvegicus	MDSKESLAPPG--RDEVPGSLLG--QGRGSMDFYKSLRGGATVKVSASSPSVAAASQADSK	58
O.cuniculus	MDSKESLSPPG--REEVPSSVLRPAERGNVMDLYKTLRGGAPVRVPASSPSLAPAAQPDSDK	59
G.gallus	MDSKELKSSD--QDETRKNALMSTKGGIVMDFHPPFRGGASAQAPVSAAPLPVSSQSDSA	59
X.laevis	MDPKDLLKPSGSPAVRGSPHYNDKPGNVIEFFGNVRGGVSVSVASCP--TSTASQSNTR	59
P.marinus	-----	
S.aurata	MD-QGGLKKITYRRDDHSSKLVYTESTEEGGLLKVTPQSAMSITSAASVVLPSPLMQPG	59
burtoni1	MD-KGGVKKIAYRRDDHLSKLVYTESPEEGGLLRVAPHSAMSVTSPASVVLPSSSLMQPG	59
O.mykiss2	-----	
D.rerio	MD-QGGLKNGA-KRDERLNTLDYNSKRATEG--ILPRRIQSTMSVAP--TSMVPQAGPMMQPV	56
P.promelas	MD-QGGLKNGA-KRDERLNTLDYNSKRATEG--ILRSGIQSAMSVP--TSMVPQPSPLMQPV	56
D.labrax	MD-QGGLKRSAFFEMR--SDI-WGGRSWSRQSIQADTAG--SLLQ-SAMHLPGPSVQP	53
P.olivaceus	MD-QGGLKRNCNRDD---SLT-FGETAVGVGSDTGDTAG--SLLQPAAMHLPSPSSLPQL	53
burtoni2a	MD-QGGLKRNGNRDD-----GLTFAEIEGTGDTPG--SLFQ-TAMHLPG--SPPPA	45
burtoni2b	MD-QGGLKRNGNRDD-----GLTFAEIEGTGDTPG--SLFQ-TAMHLPG--SPPPA	45
O.mykiss1	MD-PGGLKHS--KDKG--LAFGKLSSESVESFSGDTGGKSTTSTSLMHLPGSRPQPPA	55
S.trutta	MD-PGGLKHSNKDNG--LAFGKLSSESVESFSGDAGGKSTTSTSLMHLPGSRPQPPA	57

H.sapiens QR-----RLLVDFPKGSVSNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 91
P.pygmaeus QR-----RLLVDFPKGSVSNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 91
S.oedipus QQ-----RLLVDFPKGSVSNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 91
A.nancymaae QQ-----RLLVDFPKGSVSNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 91
C.jacchus QQ-----RLLVDFPKGSVSNVQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 91
T.belangeri QQ-----RLLVDFPKGSVSNVQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 91
S.scrofa QQ-----RLAVDFPKGSGSNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 92
C.familiaris QQ-----RLLVDFPKGSGSHAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 92
C.porcellus QR-----RLLVDFPKGSGSNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 90
G.pig QR-----RLLVDFPKGSGSNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 90
R.norvegicus QQ-----RILLDFSKGSTSNVQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPDLKAVSLSMGLYMG 111
O.cuniculus QQ-----RLAVDFPKGSASNAQQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 93
G.gallus QQ-----PALADFSKGLVNNVPP-----PDLKAVSLSMGLYMG 93
X.laevis QQQHFKQLTATGDSTNGLNINNVPQ-----PDLKAVSLSMGLYMG 100
P.marinus -----
S.aurata -----QVPNGLSDSPFP-----EELT--SITATVGPPLLE 86
burtonil -----QVPNGLNNTLP-----EELTSASVTATVGSLLID 88
O.mykiss2 -----
D.rerio SG-----DIPNGLSNSPTL-----EEHTSSVSSIFGD---D 84
P.promelas SA-----DLPNGLSNSPTL-----EEHTTSTLGFME---D 84
D.labrax T-----VCTNGQGGTKDQ-----GELG-GLFESPQ-HHVM 81
P.olivaceus T-----VAPNGGAGTKDQ-----GEFG-GLFESPRGQCEG 82
burtoni2a T-----VAPNRQGGTNGQ-----GELG-GLFESHQHHLVIG 74
burtoni2b T-----VAPNRQGGTNGQ-----GELG-GLFESHQHHLVIG 74
O.mykiss1 R-----DSANGLNVTITQ-----MEL-----STGGLTIE 79
S.trutta R-----DSANGLNVTITQ-----MEL-----STGGLTIE 81

H.sapiens ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLSSGE-----TDLKLEESIANLN----RSTSVPEN 138
P.pygmaeus ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLSSGE-----TDLKLEESIANLN----RSTSVPEN 138
S.oedipus ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLSSGE-----TDLQLEESIANLN----RSTSVPEN 138
A.nancymaae ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLSSGE-----TDLQLEESIANLN----RSTSVPEN 138
C.jacchus ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLSSGE-----TDLQLEESIANLN----RSTSVPEN 138
T.belangeri ETETKVMGNDLGFPPQQGQITLSSGE-----TNLQLEESIANLN----RSTSVPEH 138
S.scrofa ETETKVMGSDLGFPPQQGQISLSSGE-----TDFRLEESIANLS----RSTSVPEN 139
C.familiaris ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLSSGE-----TDFRLEESIANLN----RSTSVPEN 139
C.porcellus ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLPSGE-----TDFRLEESIANLS----RSTSVPEN 137
G.pig ETETKVMGNDLGFPPQQGQISLPSGE-----TDFRLEESIANLS----RSTSVPEN 137
R.norvegicus ETETKVMGNDLGYPPQQQLGLSSGE-----TDFRLEESIANLN----RSTSVPEN 158
O.cuniculus ETETKVMGSDLAFPPQQGQTSLSSE-----TDFRLEESIASLN----RSASGADN 140
G.gallus ETDAKVMGNDLGFSSQQGQGISSE-----TDFRLEESIASLN----KSSSLAED 140
X.laevis ESDTKVMSSDIAFPPSQEQIGISTGE-----TDFSLEESIANLQ----AKSLAPDK 147
P.marinus -----GVEFQLP-----YSASA-----TSFR-----PSVATSS-----ASG----- 26
S.aurata VPESRGLTKDQR-VQQQFLQTHSTTFGRQILREHLPQLEASIADIN----QSS--MDS 138
burtonil SPQPRGLTKDQRPQHQLLQTQT--TFGHQTLSENLSQLDASMDIT----QSS--MDS 139
O.mykiss2 -----MDS 3
D.rerio SEL-KLLGKEQRALQQQTLVPPFT-----LGDLSLGLASIADLN-----NPPSPMDS 130
P.promelas SELQKAVGKEQRAQQQALCSFT-----LGDLSLGLASIADIN----SSSPIDS 131
D.labrax S--DMKEGEIIRMKQKQQQQQHQDMDIFNMEDSLPLLKQSTDLNKSTSVIISTSDTS 139
P.olivaceus S--EMKEGKIIRLQKRK-----HHLDIGFMNMDNLSLLNQNISDLNRTSTSVIISTSDTS 135
burtoni2a EGTDMKEGKMIRMKQKQQQQ--QQQDIGFGMGDSLPLFNQCISDT---PTSVINTSDTS 129
burtoni2b EGTDMKEGKMIRMKQKQQQQ--QQQDIGFGMGDSLPLFNQCISDT---PTSVINTSDTS 129
O.mykiss1 EAEVKVMEKAIRMQQPQK---PQQNQLF---ENFALLEASIADLN----RSNTPGSS 127
S.trutta ESEVKVMEKALRMQQPQK---PQQNQLF---ENFALLEASIADLN----RSNTPGSS 129

H.sapiens PKSSASTAVSAAPEKEFPKTHSDVSSEQ--QHLKGQTGTNGGN-VKLYTTDQSTFDI-- 193
P.pygmaeus PKSSASTAVSAAPEKEFPKTHSDISSEQ--QHLKGQTGTNGGN-VKLYTTDQSTFDI-- 193
S.oedipus PKSSASSVSAAPKEKEFPKTHSDVSSEQ--QNLKGQTGTNGGN-AKLCTADQSTFDI-- 193
A.nancymaae PKSSASSVSAAPKEKEFPKTHSDVSSEQ--QNLKGQTGTNGGN-VKLYTADQSTFDI-- 193
C.jacchus PKSSASSVSAAPKEKEFPKTHSDVSSEQ--QNLKGQTGTNGGN-VKLYTADQSTFDI-- 193
T.belangeri PKISASAVSAALLKKELEPETPSDVSEQ--QNLKGQTGTNGGN-VKLCADQSTFDI-- 193
S.scrofa PKSSASAGPAAPAEKAFPKTHSDGAPPEQ--PNVKGQTGTNGGN-VKLFTTDQSTFDIWR 196
C.familiaris PKSSVSASV--AAPTEKEFAQTLSDVSSEQ--QHLKGQTGTNGGN-VKLYTTDQSTFDVWR 195
C.porcellus PKNSASAVS--GTPTEEFPKTQSDLSSEQ--ENLKSQAGTNGGN-VKFP-PDQSTFDI-- 189
G.pig PKNSASAVS--GTPTEEFPKTQSDLSSEQ--QNLKSQAGTNGGN-VKFP-PDQSTFDI-- 189
R.norvegicus PKSSTSATGCATPEKEFPKTHSDVSSEQ--QNRKSQGTNGGS-VKLYPTDQSTFDL-- 213
O.cuniculus PRSTAPAAGSAAPETEG-FPKTHSDLASER--QNPKGQTGGSAGS-AKLHPTDQSTFDI-- 194
G.gallus AKG---AVSSEAPLEPDPVGMARGPLEPG-ASVQSQVSGSNGGS-LKLSSEDDQSTLDI-- 193
X.laevis LIEISEDPG-----GFKCDISAQP--RPSMGQGSNGSSSTNLFPKDQCTFDL-- 193
P.marinus -----
S.aurata LIGGSD-PNFFPMKTEDFSMDKGDQDPIDL-DHAFEHIGKDVVDV-HQKLFSDNAL---- 190

burtoni1	LIGGSD-PNFFPLKTEFSLDKGEQDPIDL-DNAFEPIGKMDMV-NQKLFSDNTL-----	191
O.mykiss2	LIIGDSD-PNLFPMsMRTFAFSRDQNPMDM-DQE-GYIGKD-----QKLFSDNTL-----	50
D.rerio	LIGGVD-PNLFPLKTEFSPMIKGDMDLD--QDSFGHIGKDVVGNHKLFSNDTL-----	182
P.promelas	MIGGVD-PNLFPLKTEQFSPMKCDIDL--QDSFGPMGKDVVGNHKLFSNDTL-----	183
D.labrax	VLGNLPLPDLFPQHIKQEGNFSLDKDMETY-SGHIGAGPCDMG-NSGR LIEDT-----	191
P.olivaceus	VLGKLPPLNLFQHIKQEGGFSLKELGTY-GGHTGGGPCDLLG-NSGHLIEDT-----	187
burtoni2a	VLGNLPLPDLFSPHIKTESILSLDKDLGTY-SGHTGTGPCDLLG-NSGR LIEDT-----	181
burtoni2b	VLGNLPLPDLFSPHIKTESILSLDKDLGTY-SGHTGTGPCDLLG-NSGR LIEDT-----	181
O.mykiss1	VLGRP--HDLFS--LKTENFSPMDKDRMLDMSVVSFGQSQKDLDV-NERLLGDNTM----	177
S.trutta	VLERP--HDLFS--LKTE-----KDRMLDMSVVSFGQSQKDLDV-NDRL LGDNTM----	173
H.sapiens	--LQDLEFSSGSPGKETNESPWRSDLL--IDENCLLSPLAGEDDSFLL EGN SNEDCKPLI	249
P.pygmaeus	--LQDLEFSSGSPGKETNESPWRSDLL--IDENCLLSPLAGEDDSFLL EGN SNEDCKPLI	249
S.oedipus	--LQDLEFSSGSPGKETNQSPWRSDLL--IDENCLLSPLAGEDDSFLL EGN SNEDCKPLI	249
A.nancymaae	--LQDLEFSSGSPGKETNQSPWRSDLL--IDENCLLSPLAGEDDSFLL EGN SNEDCKPLI	249
C.jacchus	--LQDLEFSSGSPGKERNQSPWRSDLL--IDENCLLSPLAGEDDSFLL EGN SNEDCKPLI	249
T.belangeri	--LQDLEFSSASPGRETNESPWRSDLL--LDENCLLSPLAVEDDPFLL EGN LKEDCKPLI	249
S.scrofa	KKLQDLELPSGSPGKETNESPWRSDLL--IDENCLLSPLAGEDDPFLL EGSSTEDCKPLV	254
C.familiaris	KKLQDLDFTSGSPEKEASESPWRSDLL--IDENCLLSPLAGEDDPFLL EGN SNEDCKPLV	253
C.porcellus	--LKDLEFSSGSPGKERSESPWRPDL--MDESCLLSPLAGEDDPFLL EGN SNEDCKPLI	245
G.pig	--LKDLEFSSGSPGKERSESPWRPDL--MDESCLLSPLAGEDDPFLL EGN SNEDCKPLI	245
R.norvegicus	--LKDLEFSSGSPGKDTNESPWRSDLL--IDEN-LLSPLAGEDDPFLL EGD TNE DCKPLI	268
O.cuniculus	--LQDLEFS-GSPSKDRSESPWRSDLL--MDENCLLSPLAGEDDPFLL EGN SSEDCKPLI	249
G.gallus	--LQDLELPSVSPGKEPNGSPWRDLPL--LDDGGLLSPIS-ADDTFLL EGN LGEDCKPPI	248
X.laevis	--LRDLGISPDSPLDGKS-NPWLDPDFDEQAFNLLSPLGTGDPFFMKSEVLSEGSKTL	250
P.marinus	-----	
S.aurata	DLLQDFELTGSP--SEFYVG-DDAFLSSLADDSLLGVDVGSERDTKSAVAESINGSGAVF	246
burtoni1	DLLQDFDLGSP--SDFYVG-DDAFLSSLADDSLLG-VTSEERDIKPAVVDSSNTTGAVP	246
O.mykiss2	DLLQDFELTGSP--SDFYVG-DDAFLSSLADDTLLGDESQDRGVSNSSTKPK-AATMTNS	105
D.rerio	DLLQDFELDGSP--SDFYVA-DDAFLSTIGEDALLSELPTNLD RDSKAAVS-----GS	232
P.promelas	DLLQDFELDGSP--SDFYVA-DDAFLSTIGEDAMLGDLSTNAERDSKASIS-----VN	233
D.labrax	EIWQDLDLPSSLPEISDFELDSVAHLNLDHDSMGGSGPVSGLLKETKVPTVWT-GVNC	250
P.olivaceus	EIWQDLDLPSSLPEISDFELDSVAHLNLDHDSMGGSGPDGSLKETKVVLVGN--GGNC	245
burtoni2a	EIWQDLDLPSSLPEISAFELDSVAHLNLDHDSMGGGCPVGGLPKEIKPLMGN--GENC	239
burtoni2b	EIWQDLDLPSSLPEISAFELDSVAHLNLDHDSMGGGCPVGGLPKEIKPLMGN--GENC	239
O.mykiss1	DLLQDLDLPSSLSDLNEFYVSDAAFLSSLSVED---VLLEDGNMETKPIDCSN-GGNC	232
S.trutta	DILQDLDLPSSLSDLNEFYVSDAAFLSSLSVED---VLLEDGNMETKPIDCSN-GGNC	228
H.sapiens	LPDTK-----PKIKDNGDL-----VLSSPSNVTL PQ	275
P.pygmaeus	LPDTK-----PKIKDNGDL-----VLSSPSNVTL PQ	275
S.oedipus	LPDTK-----PKIKDNGDL-----VLSSSSNVTL PQ	275
A.nancymaae	LPDTK-----PKIKDNGDL-----VLSSSSNVTL PQ	275
C.jacchus	LPDTK-----PKIKDNGDL-----VLSSSSNVTL PQ	275
T.belangeri	LPDTK-----PKIKDNGDL-----ILSSPKNVLPQ	275
S.scrofa	LPDTK-----PKVKDNGEL-----ILPSPNSVPLPQ	280
C.familiaris	LPDTK-----PKIKDNGDL-----ILASPNVPLPQ	279
C.porcellus	LPDTK-----PKIKDNGDG-----ILSSSNSVPQPQ	271
G.pig	LPDTK-----PKIKDNGDG-----ILSSSNSVPQPQ	271
R.norvegicus	LPDTK-----PKIKDTGDT-----ILSSPSSVALPQ	294
O.cuniculus	LPDTK-----PKIKDNGDL-----ILSNSNNVPLPQ	275
G.gallus	LSDTK-----PKINDRGDL-----LPSS--KMPMPQ	272
X.laevis	LEDGT-----QRLGDHAKD-----MLLPSADRPISQ	276
P.marinus	-----	
S.aurata	VALNGSNMTSPD---QSCPSISPSA-----SLTPTTTLPALV	280
burtoni1	VALNGSSVTSPD---LSSPTISTTT-----SLSPTTTLFAMV	280
O.mykiss2	GSFSGSNTTTLNGSSLLACQDESNS--TSMTTTATFPMV	143
D.rerio	NTLNG-----TASSS-----LSTANTSILPNI	254
P.promelas	STLNG-----MSTSS-----TTTTTS--LANV	252
D.labrax	TNGKDGGHGTP-ISGIHHPIQHSHQKPH-HLLQHQQHQLQHQQPGSLLSSVMIKE	308
P.olivaceus	TDVNG-----TDQQHPLQHQQHQQHQLHLLQHQQHQLHQQHQPSSLSSVMIKE	296
burtoni2a	TSVNG-----TKQQHHLHPHQQQQHHQLIHHQQHQP--QHHQPQALLSTIIIKE	288
burtoni2b	TSVNG-----TKQQHHLHPHQQQQHHQLIHHQQHQP--QHHQPQALLSTIIIKE	288
O.mykiss1	TNVDS-----ADQKQQLLEAG-----VSMPVIKT	256
S.trutta	TDVDS-----ADQKQQLLEPG-----ISMPVIKT	252

H.sapiens VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLGTVYQCASFPGANIIGNKMS-----AISVHGV 324
P.pygmaeus VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLGTVYQCAGFPFPGANIIGNKMS-----AISVHGV 324
S.oedipus VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLSTVYQCASFPGANIIGNKMS-----AISIHGV 324
A.nancymaae VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLSTVYQCASFPGANVIGNKMS-----AISIHGV 324
C.jacchus VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLSTVYQCASFPGANIIGNKMS-----AISIHGV 324
T.belangeri VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLGPVYQCANFSGANIIGNKMS-----AISVHGV 324
S.scrofa VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLGPAYCQASFSGANIIGGKMS-----AISVHGV 329
C.familiaris VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLGPVYQCASFSGANIIGNKMS-----AISVHGV 328
C.porcellus VKIGKEDFIELCTPGVIKQE---KLGPVYQCASFSGANIIGNKMS-----AISVHGV 320
G.pig VKMEKEDFIELCTPGVIKQE---KLGPVYQCASFSGANIIGNKMS-----AISVHGV 320
R.norvegicus VKTEKDDFIELCTPGVIKQE---KLGPVYQCASFSGTNIIGNKMS-----AISVHGV 343
O.cuniculus VKTEKEDFIELCTPGVIKQE---KLGPVYQCASFSGANIIGNKIS-----AISVHGV 324
G.gallus VKTEKEDFIELCTPG-IKQE---NVGPIYQCANFSGSNMLGTKVS-----AISIHGV 320
X.laevis VKTEKEDYIELCTPGVNEE---KFGPVYCVGNFSGSGLFGNKSS-----AISVHGV 325
P.marinus -----ISNFSN-----GNNFG-----FLSPNGV 44
S.aurata KKEKDASFIQLCTQGVIKQEKTSAGQS-YCQMSGTSSTDMPPSSNS-----ISICGV 330
burtonil KKEKDADFIQLCTPGVVKQEKTSAGQS-YCQISGTASRDMAGTNA-----ISVCGV 330
O.mykiss2 KMEKESGFIQLCTPGVIKQENTSAMRSSSCQMSGSTGGSTSSSPSELSSSSPSPISICGV 203
D.rerio KVEKDS-IIQLCTPGVIKQE--NTG-ASYCQGGHSTP-----INICGV 294
P.promelas KVEKDS-IIQLCTPGVIKQE--NVGGTNYCQMLHSTP-----INICGV 293
D.labrax EKDPDDSFIIHSTPGVVKQE--KQEGAGFCQAQCLQS--SLHGGGP-----MSSPMGV 357
P.olivaceus EKDHDSFIHIRTPGVVKQE--KQENGFCQSQCLQSSMSLHGGGP-----MSSPMGA 348
burtoni2a EKDPDESFIQICTPGVIKQE--KQDNG-FCQPQCLQSGISSLHGGGPRP----MSSPVSV 341
burtoni2b EKDPDESFIQICTPGVIKQE--KQDNG-FCQPQCLQSGISSLHGGGPRP----MSSPVSV 341
O.mykiss1 EEDADTSFIQLCTPGVIKQE--NDRRS-FCQISSLDLP-----STHNSA 297
S.trutta EEDADTSFIQLCTPGVIKQE--NDRRS-YCQISSLDLP-----STHNSV 293

H.sapiens STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGDD 373
P.pygmaeus STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGDD 373
S.oedipus STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGDD 373
A.nancymaae STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGDD 373
C.jacchus STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGDD 373
T.belangeri STSGGQMYHYDMNTAT-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGDE 373
S.scrofa STSGGQLYHYDMNTAAS-----LSKQQEQKP-LFNVIPIPVGSENWNRQCGSGDD 379
C.familiaris STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGDD 377
C.porcellus STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGED 369
G.pig STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-IFNVIPPVPVGSENWNRQCGSGED 369
R.norvegicus STSGGQMYHYDMNTAS-----LSQQDQKP-VFNVIPIPVGSENWNRQCGSGED 392
O.cuniculus STSGGQMYHYDMNAQQ-----QEKP-LFNVIPIPVGSENWNRQCGSGDD 369
G.gallus STSGGQMYHYDLNTAS-----LSQQDQKP-IFNIIPSLPAGSENWNRQCGSGDE 369
X.laevis STSGGQMYHYDLNTAT-----ISQQDVKP-VFNLGSPGTSIAEGWNRCHGSGND 373
P.marinus QQDG----- 48
S.aurata STSGGQSYRFGVNP-----SNNETQQKDKT-VTSLFLPVTTIAGPWNRSQIGDN 381
burtonil STSGGQTYHFGVNT-----LSSDTPQLNEQKP-VSSLFLPVTTIGGIWNRQGIQGN 381
O.mykiss2 STSGGQSYHFGNSSINTTLASTTSGASQQKDKPSVFLYPLVTVGEAWN-NISYGDV 262
D.rerio TTSSGQSFLFGNSS-----PTAVVGLQKDKP-DFNMYTPLTSSGDGWSRSQGFNV 345
P.promelas TTSSGQSFLFGAGP-----STAALSQQKDKP-IFNVYPTLTSSEDSWSRKGFGNA 344
D.labrax GAGPG--YHYRANP-----SPTVGLQ-DQKP--FGMYSNLPLVGEWARGNRYGES 403
P.olivaceus GAVPG--YHYKASP-----SSTVGLQ-DQKP--FGIFSNLPAVAESWTRGGFRGEP 394
burtoni2a GAVPG--YHYTANL-----SSTMDIQ-DQKP--FDMYSNMLMGDWARGKRYGET 387
burtoni2b GAVPG--YHYTANL-----SSTMDIQ-DQKP--FDMYSNMLMGDWARGKRYGET 387
O.mykiss1 GSISGSPYPYGANT-----STAVSLQDQKP-VFGLYPLPSVSDSWNRNGYATG 347
S.trutta GSMGQSPYPYGANT-----STAVSLQDQKP-VFGLYPLPSVSDSWNRNGYGTG 343

H.sapiens NLTSLGTLNFPGR---TVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSSS-TATTGPPPKLCLVCSDEAS 429
P.pygmaeus NLTSLGTLNFPGR---TVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSSS-TATTGPPPKLCLVCSDEAS 429
S.oedipus NLTSLGTLNFPGR---TVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSSS-TATTGPPPKLCLVCSDEAS 429
A.nancymaae NLTSLGTLNFPGR---TVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSSS-TATTGPPPKLCLVCSDEAS 429
C.jacchus NLTSLGTLNFPGR---TVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSSS-TATTGPPPKLCLVCSDEAS 429
T.belangeri NLTSLGTLNFSGR---SVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSNS--LSAVGPPPKFCLVCSDEAS 428
S.scrofa NLTSLGTLNFSGR---SVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSNS--SAATGPPPKLCLVCSDEAS 434
C.familiaris NLASLGTNFPGR---SVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSNS--SAATGPPPKLCLVCSDEAS 432
C.porcellus NLTSLGTVNFPGR---SVFSNGYSSPGLRPDVSSPPSSNS--STTTGPPPKLCLVCSDELS 424
G.pig NLTSLGTVNFPGR---SVFSNGYSSPGLRPDVSSPPSSNS--STTTGPPPKLCLVCSDEAS 424
R.norvegicus SLTSLGALNFPGR---SVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSNS--SAATGPPPKLCLVCSDEAS 447
O.cuniculus NLTSLGTMNFPGR---SVFSNGYSSPMRPDVSSPPSSNS--TTAAGPPPKLCLVCSDEAS 424
G.gallus ALAPLGTNLSGR---PAFSNGYSSPGLSDVSSSPSTT--SATAGPPPKLCLVCSDEAS 424
X.laevis TAASPGNVNFPNR---SVFSNGYSSPGRSDASPSPTS--STSTGPPPKLCLVCSDEAS 428
P.marinus -----FP-----YPGFTSP-----AQSSVPPQKACLICSDAS 76
S.aurata AVLNRASEAFSS---TPPFSTPS--ISRQEAVTATSSAQKSG--THKICLVCSDEAS 435
burtonil SLVQRAGEGFSS---SPSYPTST---RQEGSTATSSTQKSG--THKICLVCSDEAS 431
O.mykiss2 ---ASGMQGLSSP---TSAFSSSYAS-STSKLGGGAASCTTQKAGT-THKVCLVCSDEAS 315

D.rerio	S----GMQQRAS----LCFSKNFSSSPYRPEDESTATSSAGGKTGT--HKICLVCSDSEAS	395
P.promelas	S----GMQQRAS----ECFSKNYTS-PYARPEDESTATPSTVGKSGTGVMHKICLVCSDSEAS	395
D.labrax	SGIQRGDDGLPSAAAVAAFSVFSSSSPRAGETSSSVVPVQSKPSSGQTHKICLVCSDSEAS	463
P.olivaceus	SGIQRGNDGLP-SAAMSPPFSVFSFSSSSPRGTGENSSSAVPGLSKPSGPTHKICLVCSDSEAS	453
burtoni2a	SGIQSSDDGPTPVASLAPFVSVGFSGSSPREGEISSVVPAQSKTSGQTHKICLVCSDSEAS	447
burtoni2b	SGIQSSDDGPTPVASLAPFVSVGFSGSSPREGEISSVVPAQSKTSGQTHKICLVCSDSEAS	447
O.mykiss1	SGMSS-----SSFPVGFSSPKARP-EASGSASSAPAKPSGPTHKICLVCSDSEAS	395
S.trutta	SGTSS-----SSFPVGFSSPTARP-EASSPTSSAPAKHSGPTHKICLVCSDSEAS	391
	. : :	* * * : * * * * *
H.sapiens	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEGR-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	481
P.pygmaeus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	480
S.oedipus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	480
A.nancymaeae	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	480
C.jacchus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	480
T.belangeri	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	479
S.scrofa	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	485
C.familiaris	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	483
C.porcullus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRENCPACRYRK	475
G.pig	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	475
R.norvegicus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	498
O.cuniculus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVKG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	475
G.gallus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	475
X.laevis	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK	479
P.marinus	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRLRK	127
S.aurata	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	486
burtoni1	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	482
O.mykiss2	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEGTGAR---GQHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	371
D.rerio	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	446
P.promelas	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	446
D.labrax	GCHYGVVTCGSKVFFKRAVEGWRRARQNTDQGHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	523
P.olivaceus	GCHYGVVTCGSKVFFKRAVEGWRRARQNTDQGHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	513
burtoni2a	GCHYGVVTCGSKVFFKRAVEG-----QHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	498
burtoni2b	GCHYGVVTCGSKVFFKRAVEGWRRARQNTDQGHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	507
O.mykiss1	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEGWRRARQNTDQGHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRFK	455
S.trutta	GCHYGVLTCGSKVFFKRAVEGWRRARQNTDQGHNYLCAGRNDCIIDRIRRKNCPACRFK	451
	***** : ***** *	
H.sapiens	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQETS ENPKNKTIV-----PATLPQ	528
P.pygmaeus	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQETPENPANKTIV-----PATLPQ	527
S.oedipus	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQETS ENPANKTIV-----PATLPQ	527
A.nancymaeae	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQETS ENPANKTIV-----PATLPQ	527
C.jacchus	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQETS ENPANKTIV-----PATLPQ	527
T.belangeri	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----TTTGISQETPENSAKNTIV-----PATLPQ	526
S.scrofa	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQETS ENSAKNTIV-----PATLPQ	532
C.familiaris	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATPGASQETS ENPANKTIV-----PATLPQ	530
C.porcullus	CLQAGMNLQARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQNTSENPNKTIV-----PATLPQ	521
G.pig	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATTGVSQNTSENPNKTIV-----PATLPQ	521
R.norvegicus	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----ATAGVSQDTS ENPNKTIV-----PAALPQ	544
O.cuniculus	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----TSTGVSQETS ENPSNRTVV-----PAALPQ	522
G.gallus	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----TTATGTREAAEAGNKSUV-----PASLQ	522
X.laevis	CLQAGMNLARKTKK--KIKGIQQ----STTATARESPTS MTRTLV-----PASVAQ	526
P.marinus	CIQAGMTLGARKLKKQGRVKG ENRSPASSTATTSSATPQPSSNSTAVTTFSPPTGEPI	187
S.aurata	CLMAGMNLARKSKKLNRLKG--N----LPSNPPELTTPPPEARSL-----VPKCMQ	534
burtoni1	CLMAGMNLARKLKK--NRLKG--V----QSNPPEVTPSPPEVTRSL-----VPKCMQ	529
O.mykiss2	CLLAGMNLARKTKKLNRLKG--V----QPTTAELTPRPLPEARSL-----VPKSMQ	419
D.rerio	CLMAGMNLARKSKSKARQAGKVI----QQQSIPERNLPLPEARAL-----VPKMPQ	496
P.promelas	CLMAGMNLARKTK--KGRQTGKVI----QPTIPERNLSPLPEARAL-----VPKMPQ	495
D.labrax	CLQAGMNLARKNKKLIKMKV-----QRP SG--SSEPI SNMPVPV-----IPRCMPQ	568
P.olivaceus	CLQAGMNLARKNKKLIKMKV-----HRPTG--SAEPI SNMPVPV-----IPR--MPQ	557
burtoni2a	CLQAGMNLARKNKKLIKMKV-----HRAGA--SEPI SNMPVPV-----VPRSMQ	543
burtoni2b	CLQAGMNLARKNKKLIKMKV-----HRAGA--SEPI SNMPVPV-----VPRSMQ	552
O.mykiss1	CLQAGMNLARKNKKLIRLKG-----QQTMEPNPPPPDERACAL-----IPKSMQ	502
S.trutta	CLQAGMNLARKNKKLIRFKG-----QQTTEPNSPAPDERACTL-----IPKSMQ	498
	* : * * * . *	
H.sapiens	LTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	588
P.pygmaeus	LTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	587
S.oedipus	LTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSTVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	587
A.nancymaeae	LTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSTVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	587
C.jacchus	LTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSTVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	587
T.belangeri	LTPTPVSLLEVIEPEVLYAGYDSSLPDSTWRIMSALNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	586
S.scrofa	LTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSSIPDSTWRIMTALNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	592
C.familiaris	LTPTLVSLLEVIEPEVLYAGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL	590

C.porcellus LTPTLVSLLEVIPEVVIHSGYDSTSPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFKNL 581
 G.pig LTPTLVSLLEVIPEVVIHSGYDSTSPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFKNL 581
 R.norvegicus LTPTLVSLLEVIPEVLYAGYDSSVPDSSAWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL 604
 O.cuniculus LTPTLVSLLEVIPEVLYAGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL 582
 G.gallus LTPTLVSLLEVIPEVLYSGYDSTLPDSSWRIMSTLNMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRNL 582
 X.laevis LTPTLISLLEVIPEVLYSGYDSSIPDTRRLMSSLNMLGGRQVVSAVRWAKAIPGFRNL 586
 P.marinus FSPTLIAILQAIPEVVMVSGYDNTRSQTTAYMLSSLNRLCDKQLVSIKWKASLPGFRNL 247
 S.aurata LVPTMSSLKAIPEDTIYAGYDSTLPDSTRLMTTLNRLGGRQVISAVKWAKALPGFRNL 594
 burtoni1 LVPTMSSLKAIPEDTIYAGYDSTLPDNFTRLMTTLNRLGGRQVISAVKWAKALPGFRNL 589
 O.mykiss2 LTPTMSSLKAIPEDTIYSGYDSTLPDSTRIMTTLNRLGGRQVVSAVKWAKALPGFRNL 479
 D.rerio LVPTMSSLKAIPEDTIYAGYDSTIPDTSVRLMTTLNRLGGRQVISAVKWAKALPGFRNL 556
 P.promelas LVPTMSSLKAIPEPTIYAGYDSTVPDSTRMLTTLNRLGGRQVISAVKWAKALPGFRNL 555
 D.labrax LVPTMSSLKAIPEPTIYSGYDSTLPDSTSSWLMTTLNRLGGQQVISAVKWAKSLPGFRNL 628
 P.olivaceus LVPTMSSLKAIPEPTIYSGYDSTLPDSTRMLTTLNRLGGQQVISAVKWAKSLPGFRNL 617
 burtoni2a LVPTMSSLKAIPEPTIYSGYDSTLPDTSRMLSTLNRLGGQQVVSAVKWAKSLPGFRNL 603
 burtoni2b LVPTMSSLKAIPEPTIYSGYDSTLPDTSRMLSTLNRLGGQQVVSAVKWAKSLPGFRNL 612
 O.mykiss1 LVPTMSSLKAIPEPTIYSGYDSTIPDSTRMLTTLNRLGGQQVVSAVKWAKSLPGFRNL 562
 S.trutta LVPTMSSLKAIPEPTIYSGYDSTIPDSTRMLTTLNRLGGQQVVSAVKWAKSLPGFRNL 558
 : ** ::*:.*: : :*:.*: : . : :*:.* * .*:.* :*:.*:***:*

H.sapiens HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 648
 P.pygmaeus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 647
 S.oedipus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 647
 A.nancymaae HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 647
 C.jacchus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 647
 T.belangeri HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 646
 S.scrofa HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 652
 C.familiaris HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 650
 C.porcellus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 641
 G.pig HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 641
 R.norvegicus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 664
 O.cuniculus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 642
 G.gallus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 642
 X.laevis HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 646
 P.marinus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 307
 S.aurata HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 654
 burtoni1 HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 649
 O.mykiss2 HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 539
 D.rerio HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 616
 P.promelas HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 615
 D.labrax HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 688
 P.olivaceus HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 677
 burtoni2a HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 663
 burtoni2b HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 672
 O.mykiss1 HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 622
 S.trutta HLDDQMTLLQYSWMFLMAFALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTPCMYDQCKHML 618
 *:***.*:.*:.*: :* :*:.*: : . : :*:.* * .*:.* :*:.*:***:*

H.sapiens YVSSSELHRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 708
 P.pygmaeus YVSSSELHRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 707
 S.oedipus YVSSSELHRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 707
 A.nancymaae YVSSSELHRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 707
 C.jacchus YVSSSELHRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 707
 T.belangeri FVSSSELQRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 706
 S.scrofa YVSSSELQRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 712
 C.familiaris FVSSSELQRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 710
 C.porcellus YVSSSELKRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 701
 G.pig YVSSSELKRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 701
 R.norvegicus FVSSSELQRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 724
 O.cuniculus FVSSSELKRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 702
 G.gallus MVARELSRLQVSYEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 702
 X.laevis KIAGEMSSLQISYDEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 706
 P.marinus QVSEDFMKLQVTSSEYLCMKTLTLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGN 367
 S.aurata KISSSEFVRLQVSHDEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDDIRMSYIKELGKAIVKREEN 714
 burtoni1 KICSEFVRLQVSHDEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMSYIKELGKAIVKREEN 709
 O.mykiss2 KISSSEFVRLQVSHDEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMSYIKELGKAIVKREEN 599
 D.rerio KISNEFVRLQVSTEEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMSYIKELGKAIVKREEN 676
 P.promelas KISNEFVRLQVSTEEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMSYIKELGKAIVKREEN 675
 D.labrax KICNEFVRLQVSYDEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMTYIKELGKAIVKREEN 748
 P.olivaceus KICNEFVRLQVSYDEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMTYIKELGKAIVKREEN 737
 burtoni2a KICNEFVRLQVSYEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMTYIKELGKAIVKREEN 723
 burtoni2b KICNEFVRLQVSYEYLCMKVLLLLSTVPKDGLKSQAVFDEIRMTYIKELGKAIVKREEN 732


```

O.mykiss1      KISTEFVRLQVSYDEYLCMKVLLLLLSTVPKDGKLSQAVFDEIRMTYIKELGKAIVKREEN 682
S.trutta      KISTEFVRLQVSYDEYLCMKVLLLLLSTVPKDGKLSQAVFDEIRMTYIKELGKAIVKREEN 678
               :. :.  **:. :*:***. **: :*:***:  *::*:***:*. :. :. * *

H.sapiens     SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVVENLLNYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 767
P.pygmaeus    SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVVENLLNYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 766
S.oedipus     SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVVENLLNYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 766
A.nancymaae   SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVVENLLNYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 766
C.jacchus     SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVVENLLNYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 766
T.belangeri   SSQNWQRFYQLTKLLDSMHDVVENLLNYCFQTFD-KTMRIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 765
S.scrofa      SSQNWQRFYQLTKLLDSMHDVVENLLNYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 771
C.familiaris  SSQNWQRFYQLTKLLDSMHDVVENLLNFCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 769
C.porcellus   SSQNWQRFYQLTKLLDSLHEIVGNLLNICFKTFD-KTMNIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 760
G.pig         SSQNWQRFYQLTKLLDSLHEIVGNLLNICFKTFD-KTMNIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 760
R.norvegicus  SSQNWQRFYQLTKLLDSMHDVVENLLTYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 783
O.cuniculus   SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVVENLLHYCFQTFD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 761
G.gallus      SSQNWQRFYQLTKLLDSMHDVVENLLSFCFQTFD-KSMSIEFPEMLAEIISNQIPKYSN 761
X.laervis     SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVAENLLAFCFSLFD-KSMSIEFPDMLSEIISNQIPKYSN 765
P.marinus     AVQCWQRFYQLTKLLXCMQDLVSKLLVFCFATFTQTQVMSVEFPDMLAEIISAQLASHHG 427
S.aurata      ASQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVEGLLQICFYTFVN-KTLSVEFPEMLAEIITNQIPKFKD 773
burtoni1     SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEMVGGLLSFCFYTFVN-KSLSVEFPKMLAEIISNQLPKFKA 768
O.mykiss2     SSQNWQRFYQLTKLLDSMHEMVGGLLDFCFYTFVN-KSLSVEFPEMLAEIISNQLPKFKA 658
D.rerio       SSQNWQRFYQLTKLLDSMHDVGNLLNFCFYTFVN-KSLSVEFPEMLAEIISNQLPKFKD 735
P.promelas   SSQNWQRFYQLTKLLDSMHDVGNLLNFCFFTFVN-KSLSVEFPEMLAEIISNQLPRFRA 734
D.labrax     ASQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVESLLQICFYTFVN-KTLSVEFPEMLAEIITNQIPKFKD 807
P.olivaceus   ASQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVEGLLQICFYTFVN-KTLSVEFPEMLAEIITNQIPKFKD 796
burtoni2a     PSQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVEGLLQICFYTFVN-KTLSVEFPEMLAEIISNQIPKFKD 782
burtoni2b     PSQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVEGLLQICFYTFVN-KTLSVEFPEMLAEIISNQIPKFKD 791
O.mykiss1     SSQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVGGLLQICFYTFVN-KSLSVEFPEMLAEIISNQLPKFKD 741
S.trutta      SSQNWQRFYQLTKLLDSMQEMVGGLLQICFYTFVN-KSLSVEFPEMLAEIITNQIPKFKD 737
               . * ***** .: :. :.  ** ** : * : :  : * * . * : * * : * . .

H.sapiens     GNIKLLLFHQK----- 778
P.pygmaeus    GNIKLLLFHQK----- 777
S.oedipus     GNIRKLLLFHQK----- 777
A.nancymaae   GNIKLLLFHQK----- 777
C.jacchus     GNIKLLLFHQK----- 777
T.belangeri   GNIKLLLFHQK----- 776
S.scrofa      GNIKLLLFHQK----- 782
C.familiaris  GNIKLLLFHQK----- 780
C.porcellus   GDIKLLLFHQK----- 771
G.pig         GDIKLLLFHQK----- 771
R.norvegicus  GNIKLLLFHQK----- 794
O.cuniculus   GNIKLLLFHQK----- 772
G.gallus      GNIKLLLFHQK----- 772
X.laervis     GNLKLLLFHQK----- 776
P.marinus     REARALHFHKK----- 438
S.aurata      GSVKPLLFHQK----- 784
burtoni1     GSVKPLLFHQK----- 779
O.mykiss2     GSVKPLLFHQK----- 669
D.rerio       GSVKPLLFHQK----- 746
P.promelas   GSVKALLFHHK----- 745
D.labrax     GSVKPLLFHQK----- 818
P.olivaceus   GSVKPLLFHQK----- 807
burtoni2a     GNVKALLFHHK----- 793
burtoni2b     GNVKALLFHHK----- 802
O.mykiss1     GSVKPLLFHALNHDTMP 758
S.trutta      GSVKPLLFHALNHDTMP 754
               . : * **

```

Percentatge de similitud del GR de l'orada (*Sparus aurata*) amb les seqüències aminoacídica del GR de les seqüències de l'alineament anterior. Es mostra la similitud per la seqüència sencera, el domini d'unió al DNA (DBD) o el domini d'unió a l'hormona (HBD).

SIMILITUD vs <i>Sparus aurata</i>	GR sencer	DBD	HBD
<i>Petromyzon marinus</i>	47	92	51
<i>Haplochromis burtoni</i> 1	81	100	92
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 1	57	98	91
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 2	70	97	92
<i>Danio rerio</i>	64	100	90
<i>Pimephales promelas</i>	64	100	90
<i>Salmo trutta</i>	58	97	92
<i>Dicentrarchus labrax</i>	51	97	92
<i>Paralichthys olivaceus</i>	51	97	93
<i>Haplochromis burtoni</i> 2a	48	97	89
<i>Haplochromis burtoni</i> 2b	48	97	89
<i>Xenopus laevis</i>	42	95	69
<i>Gallus gallus</i>	44	95	72
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	47	94	76
<i>Cavia porcellus</i>	44	92	73
Guinea pig	44	95	73
<i>Sus scrofa</i>	43	95	73
<i>Canis familiaris</i>	44	95	74
<i>Tupaia belangeri</i>	44	95	73
<i>Pongo pygmaeus</i>	43	95	74
<i>Saguinus oedipus</i>	43	95	74
<i>Aotus nancymaeae</i>	44	95	74
<i>Callithrix jacchus</i>	46	95	74
<i>Rattus norvegicus</i>	35	95	74
<i>Homo sapiens</i>	43	95	74

10. AGRAÏMENTS ---

10. AGRAÏMENTS.

Mirant endarrera, és difícil repassar els més de cinc anys que m'ha portat elaborar aquesta tesi doctoral. Sou molts els que, directa o indirectament, ho heu fet possible ja que, només amb la meua il·lusió i esforç no ho hauria aconseguit. Ara és el moment de donar-vos les gràcies a tots.

En primer lloc, als meus directors de tesi, en Lluís Tort i en Simon MacKenzie, per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi en el grup, proposar-me aquest difícil repte i per ajudar-me, com a bons "jefes", durant el desenvolupament de la investigació.

Cal agrair al conveni a càrrec dels projectes Flamicell Verd i Projectia perquè han ajudat, des d'un punt de vista econòmic, a fer possible la realització d'aquest treball.

Vull agrair al personal de la Universidade do Algarve la seva càlida acollida durant la meua estància amb ells. Concretament a l'Adelino Canario i a la Deborah Power, per acceptar-me al seu laboratori i, especialment, a la Begoña per ensenyar-me la tècnica de rastreig de la llibreria però, sobretot, per la seva amistat.

A tots els companys de departament, començant pels "jefes" dels altres grups (Amàlia, Antonio, Juan Ma, Mercè i Roser). Als tècnics de laboratori i estabulari (Marc, Pilar i Roger) per ajudar-me amb els peixos que hem hagut de sacrificar per fer Ciència i descobrir alguna cosa nova sobre la seva vida. Gràcies Olga per la teua ajuda "administrativa" i la teua complicitat... No em puc oblidar de la resta del PAS implicat (Ernesto, Gemma, Javier, Josep, Maica i Sílvia).

A tots els companys del grup de peixos (Alex, Carmen, Joan Carles, Laia i Nerea) fins i tot als que ja no hi sou (Abbas, Adri, Anna, Cristina, Edu, Leif, Pep i Mila) pels bons moments compartits dins el laboratori o durant els mostresos, però sobretot a fora. A les noves incorporacions de peixos (Agnés, Davinia i Virgínia) us encoratjo a tirar endavant.

A la resta de "matxaques" de Físio (Albert, Almu, Carol, les tres Cristines, David, Humberto, Jordi, Lorena, Mar, Natàlia, Quino, Raül A, Raül D, Santi, Sergi, Sheila, Sílvia, Xavi i Yas), espero no oblidar-me de ningú, per compartir tantes coses (esquiades, calçotades, pernilades, cates de vins, festes...) i per no qüestionar massa les meves bogeries ja que tots esteu tant o més bojos que jo... És la única manera per explicar per què esteu en aquest "mundillo".

Als meus amics de fora d'aquest món (Conchi, Dani, Eva, Mar, Marta i Núria) per escoltar-me, encara que no sempre ho entenguéssiu, i estar al meu costat quan més ho necessitava.

Vull agrair especialment als meus pares la confiança que sempre han tingut en les meves possibilitats per fer qualsevol cosa que em proposés a la vida i per ensenyar-me a valorar les coses realment importants. A la resta de família, Mònica (la millor germana), Andreu, Eulàlia, Francesc i Ramón (els millors cunyats), Francina i Josep M^a (els millors sogres) i als petits, Oriol, Raquel i Arnau (els nebots més *guapos*) us he d'agrair que, tot i no saber explicar què feia ni per què, sempre ho heu respectat.

A tu Martí per la paciència i els ànims que m'has donat en els moments difícils de la tesi, però sobretot per donar-me la mà en el camí de la vida i fer-la tan fàcil i divertida.

"SI NO LO SIENTES NUNCA LO LOGRARÁS" (Göethe, Fausto).

