



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Jaime Figueroa V.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**CLONAMIENTO DEL PRECURSOR DE ISOTOCINA
DE *Salmo salar* Y EVALUACIÓN DE SU EXPRESIÓN EN PECES
SANOS Y ENFRENTADOS A PATÓGENOS BACTERIANOS**

Tesis de grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de ***Bioquímico***.

SEBASTIÁN ALEJANDRO FUENTES ALBURQUENQUE

VALDIVIA – CHILE

2006

*“Los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran,
sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez.”*

Gabriel García Márquez

AGRADECIMIENTOS

Sin duda la familia representa la base de la formación del individuo (en este caso yo) y por eso empezaré por ahí. A mis padres, Juan Carlos y Herminia, y a mi hermano Mauricio por su amor y cariño durante este cuarto de siglo que estoy en este planeta. También mencionar a abuelos, primos y tíos por contribuir directa o indirectamente a mi desarrollo. Aunque sin consanguinidad, Loretto a estas alturas ya es mi familia y es la persona que me ha acompañado en las buenas y en las malas durante los últimos 7 años; gracias por tu amistad, amor y paciencia.

Quiero expresar mi profunda gratitud hacia la gente del laboratorio de biología molecular de peces, especialmente al profesor Jaime Figueroa por su apoyo, conocimientos, buena disposición y especialmente su muy buen humor en la vida (una cualidad notable en cualquier persona). Igualmente a la profesora Gudrun Kausel por su buena disponibilidad para brindar apoyo y por su alegría. Un súper agradecimiento a Alex Romero, quien siempre estaba ahí para apoyarme (y a todo el que lo necesitara) y lo hacía con una paciencia inquebrantable ¡Graaaaaaande pelao! También agradezco a Denise y Rodrigo (Yogui) por su apoyo y gratas conversaciones.

Y el último grupo de gente (pero no menos importante) al que agradezco de todo corazón es al de amigos. Con ellos he pasado excelentes momentos y he compartido un montón de experiencias, nos hemos alimentado mutuamente para crecer como personas y ser mejores. A Franco, Jano, Felipe (Macaco), Nacho, Paola, Joaquín, Javier y Gaby por su amistad durante estos años de universidad; y a Jorge, Diego y Carlos porque a pesar del paso del tiempo y las distancias seguimos siendo los mismos desde que salimos del liceo.

Finalmente, a todos lo que pagan impuestos en este país, porque así el fisco pudo financiar el proyecto FONDECYT 1040073, sin el cual esta tesis no hubiese sido posible.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

		Pág
1	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
3	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1	MATERIALES	13
3.1.1	Reactivos	13
3.1.2	Soluciones	15
3.1.3	Enzimas	16
3.1.4	Kits	16
3.1.5	Anticuerpos	17
3.1.6	Instrumentos	17
3.1.7	Softwares	17
3.1.8	Material biológico	17
3.2	MÉTODOS	18
3.2.1	Clonamiento del precursor de isotocina de <i>Salmo salar</i>	18
3.2.1.1	Diseño de partidores	18
3.2.1.2	Preparación de RNA total	19
3.2.1.3	Síntesis de cDNA (transcripción reversa)	20
3.2.1.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
3.2.1.5	Electroforesis de DNA en geles de agarosa	21

3.2.1.6	Preparación de células competentes	21
3.2.1.7	Ligación al vector de clonamiento pGEM-Teasy®	22
3.2.1.8	Transformación con el producto de ligación y selección de clones	22
3.2.1.9	Secuenciación	23
3.2.2	PCR semicuantitativo: Precursor de isotocina y β -actina	24
3.2.2.1	Partidores	24
3.2.2.2	Cinética de amplificación	24
3.2.2.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
3.2.3	Generación del DNA competidor MIMICS	25
3.2.3.1	Preparación de DNA plasmidial	26
3.2.3.2	Obtención del fragmento de DNA correspondiente al precursor de isotocina	26
3.2.3.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
3.2.3.4	Digestión y religación	28
3.2.3.5	Ligación al vector de clonamiento pGEM-Teasy®	29
3.2.3.6	Transformación con el producto de ligación y selección de clones	29
3.2.4	Cinética de amplificación	30
3.2.5	Ensayos de competencia	31
3.2.6	Digestión con enzimas de restricción	33
3.2.7	Inmunohistoquímica	35
3.2.7.1	Fijación de los cortes histológicos	35

3.2.7.2	Inmunohistoquímica cromogénica	35
3.2.7.3	Inmunohistoquímica de fluorescencia	36
4	RESULTADOS	38
4.1	Clonamiento del precursor de isotocina	38
4.2	Cuantificación de los niveles de mRNA de isotocina	47
4.2.1	Cuantificación del transcrito de isotocina mediante RT-PCR semicuantitativo	49
4.2.2	Cuantificación del transcrito de isotocina mediante RT-PCR competitivo	53
4.3	Distribución de coceptín y prolactina en encéfalo de <i>S. salar</i>	58
4.4	Cuantificación de coceptín y prolactina en hipófisis de <i>S. salar</i>	63
5	DISCUSIÓN	68
5.1	Clonamiento y caracterización molecular del precursor de isotocina	68
5.2	Copeptín, prolactina e inmunidad innata de <i>S. salar</i>	71
6	BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE FIGURA Y TABLAS

		Pág
Figura 1	Secuencias de los nonapéptidos cíclicos de origen hipotalámico	8
Figura 2	Esquema general de las poliproteínas precursoras de los péptidos hipotalámicos	10
Figura 3	Estrategia experimental usada para generar el DNA competidor MIMIC	27
Tabla 1	Enzimas de restricción utilizadas a lo largo del presente trabajo con sus correspondientes temperaturas y tampones	34
Tabla 2	Anticuerpos y sus características utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica	37
Figura 4	Fraccionamiento en gel de agarosa-formaldehído de la muestra de RNA total de hipotálamo de <i>S. salar</i>	39
Figura 5	Fraccionamiento en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR utilizando los partidores <i>SSIT-1f</i> y <i>SSIT-2r</i>	40
Figura 6	Fraccionamiento de los productos de las digestiones efectuadas con <i>EcoRI</i> a las preparaciones de DNA plasmidial de los distintos clones	41
Figura 7	Fraccionamiento por electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión del clon psIT-1	43
Figura 8	Secuencia nucleotídica de psIT-1 clonado a partir de cDNA de hipotálamo de <i>S. salar</i>	44

Figura 9	Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica del cDNA del precursor de isotocina de <i>S. salar</i>	45
Figura 10	Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida del cDNA del precursor de isotocina de <i>S. salar</i>	46
Figura 11	Fraccionamiento en gel de agarosa-formaldehído de las muestras de RNA total de hipotálamo de alevines de <i>S. salar</i>	48
Figura 12	Cinética de amplificación para isotocina y β -actina	50
Figura 13	Comparación de los niveles de transcrito de isotocina entre diferentes muestras de <i>S. salar</i> mediante RT-PCR doble	51
Figura 14	Cinética de amplificación para isotocina y el competidor	54
Figura 15	Ensayo de competencia	56
Figura 16	Niveles de mRNA de isotocina en hipotálamo de <i>S. salar</i> bajo diferentes estados patológicos	57
Figura 17	Inmunodetección de coeptín y prolactina en corte sagital de la región hipotalámica y pituitaria de <i>S. salar</i> adulto	59
Figura 18	Inmunodetección de coeptín en corte sagital de la región hipotalámica y pituitaria de <i>S. salar</i> adulto	60
Figura 19	Inmunodetección de coeptín en <i>Rostral pars distalis</i> de pituitaria de <i>S. salar</i> adulto	62
Figura 20	Inmunodetección de Cp en hipófisis de <i>S. salar</i> en distintos estados patológicos	64
Figura 21	Inmunodetección de Cp en hipófisis de <i>S. salar</i> en distintos estados de desarrollo	65

Figura 22	Inmunodetección de PRL en hipófisis de <i>S. salar</i> en distintos estados patológicos	66
Figura 23	Inmunodetección de PRL en hipófisis de <i>S. salar</i> en distintos estados de desarrollo	67

LISTA DE ABREVIATURAS

aá	Aminoácido(s)
AVP	Arginina-vasopresina
AVT	Arginina-vasotosina
Cp	Copeptín
c.s.p.	Cantidad suficiente para
cDNA	Complementary DNA / DNA complementario
DNA	Desoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
GH	Growth hormone / Hormona del crecimiento
IOD	Integrated Optic Density / Densidad óptica integrada
IHQ	Inmunohistoquímica
IT	Isotocina
MCS	Multiple cloning site / Sitio de múltiple clonamiento
Np	Neurophysin / Neurofisina
NPO	Núcleo preóptico
NPV	Núcleo paraventricular
NSO	Núcleo supraóptico
OT	Ocitocina
pb	Pares de bases
PAP	Complejo Peroxidasa Anti-Peroxidasa

PCR	Polymerase Chain reaction / Reacción en cadena de la polimerasa
PRL	Prolactina
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ribonucleic acid / Ácido ribonucleico
RPD	Rostral pars distalis
RT - PCR	Reverse transcription - PCR / Transcripción reversa – PCR
UFC	Unidades formadoras de colonia

1. RESUMEN

Prolactina (PRL) es considerada la hormona más versátil de los vertebrados; entre los más de 300 efectos atribuibles a este péptido de origen hipofisiario se encuentra la modulación del sistema inmune, tanto en mamíferos como en peces. Respecto a la liberación de esta hormona desde las células lactotropas, se ha postulado que el motivo copeptín (Cp), presente en los precursores de isotocina/vasotocina y vasopresina, posee una actividad liberadora de PRL.

En el presente trabajo fue clonado el precursor de isotocina del Salmón del Atlántico, *Salmo salar*, a partir de RNA total de hipotálamo. La búsqueda *in silico* de secuencias permitió diseñar partidores específicos, con los que se logró clonar y secuenciar un fragmento de 510 pb, cuya secuencia aminoacídica deducida contiene la típica estructura de un precursor de esta clase: Péptido señal – Isotocina – Neurofisisina - Copeptín. El análisis de homologías mostró una alta identidad con precursores de especies salmonídeas cercanas.

Por otra parte, se evaluaron posibles diferencias en la expresión de este péptido en peces en diferente estado patológico. Fueron usados para este objetivo alevines controles y desafiados con los patógenos *Vibrio ordalii*, *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum*; en ellos se evaluó el nivel del copeptín a dos niveles: (1) transcripción, mediante RT-PCR competitivo y (2) expresión, por inmunohistoquímica. En ambos casos no se observaron diferencias significativas.

Finalmente, por medio de inmunohistoquímica se observó el patrón de distribución de Cp y su relación morfológica con las células lactotropas de la pituitaria en cortes sagitales de la región hipotalámica de salmones adultos.

Por tratarse de una especie de gran valor comercial en nuestro país, resulta de interés conocer a fondo los mecanismos que regulan la inmunidad innata del Salmón del Atlántico.

SUMMARY

Prolactin (PRL) is thought to be the most versatile hormone in the vertebrates, this hypophysial peptide has more than 300 effects including the modulation of the immune system in mammals and fish. Concerning the release of this hormone from the lactotroph cells, the copeptin moiety (Cp) of the isotocin/vasotocin and vasopressin precursors has been proposed as a putative PRL releasing factor.

In the present work, the isotocin precursor of the Atlantic Salmon (*Salmo salar*) was cloned from hypothalamus total RNA. Specific primers were designed by *in silico* sequence search, with which was possible to clone and sequence a 510 bp fragment. The deduced aminoacid sequence has the typical structure observed in these precursors: Signal peptide – Isotocin – Neurophysin – Copeptin. The homology analysis showed high identity with precursors from other salmonid species.

Control and *Vibrio ordalii*, *Piscirickettsia salmonis* and *Renibacterium salmoninarum*-challenged fries were used to evaluate potential differences in the expression of this peptide. Copeptin levels were assessed by: (1) transcription by competitive RT-PCR and (2) expression by immunohistochemistry. No significant differences were observed in both cases. Moreover, immunohistochemical assays in sagittal sections of hypothalamus from adult salmon showed the pattern of Cp and its morphologic relationship with the lactotroph cells of the pituitary.

This work contributes to the knowledge on the mechanisms that regulate the innate immunity of the Atlantic Salmon, of high commercial value in our country.

2. INTRODUCCIÓN

La existencia de una interacción entre el sistema endocrino y el sistema inmune es un hecho aceptado en la actualidad, fundamentada con abundante información que sugiere fuertemente esta relación, tanto en mamíferos como en peces. Para poder establecer una comunicación efectiva entre ambos sistemas, es necesario que exista un lenguaje químico común, es decir, que el sistema endocrino produzca mediadores que ejerzan un efecto sobre el sistema inmune, y viceversa. De esta manera, es posible mantener una comunicación bidireccional eficiente entre ambas partes, la que es esencial para la mantención de la homeostasis. Existe una amplia documentación acerca de este tema, la que se ha focalizado principalmente en la mediación de citoquinas por parte del sistema inmune hacia el sistema endocrino; y por cortisol, hormona del crecimiento (GH) y prolactina (PRL) desde el sistema endocrino hacia el sistema inmune (Harris & Bird, 2000).

Los integrantes del sistema inmune se comunican entre sí por medio de una familia de moléculas de origen peptídico denominadas citoquinas. De igual modo, el sistema endocrino integra sus distintos órganos y ejerce un efecto a nivel sistémico a través de su propio idioma: las hormonas, mediante las cuales, un organismo es capaz de adaptarse a los cambios que ocurren en el entorno y a los diferentes estadios de su desarrollo. Dentro de éstas, existe un grupo que ha sido estudiado por su posible participación en la regulación del sistema inmune. Aquí encontramos especialmente a las hormonas reproductivas y las pertenecientes al eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Weyts *et al.*, 1999; Harris & Bird, 2000).

En una diversidad de peces se han descrito variados efectos de diferentes hormonas sobre componentes del sistema inmune. Se ha descrito, por ejemplo, que la infiltración leucocitaria

hacia el timo, glándula adrenal y agallas se ve incrementada luego de la administración *in vivo* de cortisol (Maule & Schreck, 1990; Peters *et al.*, 1991; Balm & Pottinger, 1993; Iger *et al.*, 1995); además la adición *in vitro* de esta hormona tiene como resultado una inhibición en la proliferación de linfocitos (Grimm, 1985; Tripp *et al.*, 1987; Pulsford *et al.*, 1995; Espelid *et al.*, 1996; Weyts *et al.*, 1997) y una producción reducida de anticuerpos (Tripp *et al.*, 1987).

Las hormonas reproductivas también han mostrado ejercer un efecto sobre el sistema inmune. Se han observado variados ejemplos de esto en algunos salmonídeos como trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en donde la proliferación de linfocitos se ve estimulada por estradiol e inhibida por 11-cetotestosterona (Cook, 1994). Además, en otra especie de la misma familia, el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) se ha visto que testosterona reduce el número de células productoras de anticuerpos (Slater & Schreck, 1993).

La pituitaria es sin duda uno de los puntos de regulación más importantes en la mantención de la homeostasis. Ella produce y secreta una gran variedad de péptidos y hormonas esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. Entre estas últimas podemos destacar a dos de ellas por haber evidenciado algún tipo de efecto sobre el sistema inmune: hormona del crecimiento (GH) y prolactina (PRL) (Harris & Bird, 2000).

La hormona del crecimiento es una hormona de naturaleza peptídica sintetizada en la adenohipófisis que se encuentra ampliamente distribuida en los vertebrados y cuya función principal en el organismo es la regulación del crecimiento somático post-natal, sin embargo en peces también tiene influencia sobre la osmorregulación y estimula la síntesis de esteroides gonadales (Sakai *et al.*, 1996b). Adicionalmente, se ha observado que GH también está implicada en la regulación del sistema inmune en peces; ella ha mostrado estar involucrada en la estimulación de la linfopoyesis y fagocitosis en besugo marino de cabeza dorada (*Sparus aurata*)

y en besugo marino plateado, *Sparus sarba* (Calduch-Giner *et al.*, 1995 y 1997; Narnaware *et al.*, 1997) y además en estimular la mitogénesis leucocitaria en salmón chum, *Oncorhynchus keta* (Sakai *et al.*, 1996b). Igualmente, en trucha arco iris (*O. mykiss*) se ha descrito que la fagocitosis, actividad “Natural Killer”, producción de anticuerpos y actividad hemolítica del suero se ve aumentada por efecto de esta hormona (Kajita *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995 y 1996a; Yada *et al.*, 1999).

Prolactina, descrita por primera vez en 1928 como un factor hipofisiario capaz de estimular la secreción de leche en conejos, es considerada la hormona más versátil en los vertebrados. Se han descrito más de 300 efectos atribuibles a ella, los que han sido clasificados dentro de seis áreas: (1) balance de electrolitos y agua, (2) crecimiento y desarrollo, (3) endocrinología y metabolismo, (4) cerebro y comportamiento, (5) reproducción e (6) inmunorregulación y protección (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Esta hormona es producida principalmente en la pituitaria; las encargadas de la síntesis y secreción de PRL son las células lactotropas, características de la *Rostral pars distalis* (RPD) en la mayoría de las pituitarias de los teleósteos. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de expresión del gen de PRL en sitios extrahipofisarios, como hígado, intestino, riñón, gónadas, bazo, músculo, agalla y cerebro. Estructuralmente, PRL es un monómero de entre 185 y 188 aminoácidos en los teleósteos, con dos puentes disulfuro estabilizando su estructura tridimensional (Manzon, 2002).

Respecto al rol que jugaría PRL como moduladora de la inmunidad en peces, numerosos son los reportes que describen efectos en componentes del sistema inmune atribuibles a esta hormona. La estimulación de la linfopoyesis y fagocitosis en especies como el besugo marino plateado (*S. sarba*) y el aumento de la mitogénesis leucocitaria en salmón chum; aumento en la fagocitosis, actividad “Natural Killer”, producción de anticuerpos y actividad serohemolítica en

trucha e incremento del título plasmático de IgM son algunos ejemplos que han sido revisados en más de una oportunidad (Weyts *et al.*, 1999; Harris & Bird, 2000).

En el salmónido trucha arco iris (*O. mykiss*) se ha mostrado que PRL participa activamente en la regulación de los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas M (IgM), el principal componente del sistema inmune humoral en teleósteos, siendo necesaria para la mantención de los niveles circulantes de dichas inmunoglobulinas (Yada *et al.*, 1999). También ha sido reportado que PRL presenta un efecto estimulante sobre la actividad de células fagocíticas de esta misma especie (Sakai *et al.*, 1996c).

Como se mencionó anteriormente, a PRL le han sido atribuidas múltiples funciones, por lo que la amplia distribución de su receptor no hace más que avalar la versatilidad de esta hormona. En diferentes especies, el receptor de prolactina (rPRL) ha sido identificado en una diversidad de órganos como corazón, timo, hígado, páncreas, riñón, pituitaria, pulmón, bazo, páncreas, músculo esquelético y piel (Freeman *et al.*, 2000). Además, ha sido reportada la presencia de estos receptores en células de tejido hematopoyético de rata (Gagnerault *et al.*, 1993) y carpa, *Cyprinus carpio* (San Martín *et al.*, 2004).

Respecto a la liberación de prolactina desde la hipófisis, clásicamente se acepta que las células lactotropas poseen una alta actividad secretoria en forma constitutiva. Sin embargo, la secreción de prolactina desde pituitaria se encuentra bajo un control inhibitorio constante de origen hipotalámico efectuado por dopamina, siendo este neurotransmisor el principal factor inhibidor de la síntesis y liberación de PRL (Freeman *et al.*, 2000). Por el contrario, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) han mostrado actuar como factores liberadores de PRL en peces.

Se ha identificado un péptido con actividad secretora de PRL a partir de hipotálamo bovino (Hinuma *et al.*, 1998), el cual pertenece a la familia de péptidos denominados arginil-fenilalanil-amida o simplemente RFa (Fujimoto *et al.*, 1998) debido a que contienen este motivo en su región C-terminal. En peces, un péptido análogo fue descrito casi simultáneamente en carpa cruciana, *Carassius auratus langsdorfii* (Fujimoto *et al.*, 1998) y posteriormente se reportó su presencia en salmón chum, el cual tiene la capacidad de inducir la liberación de PRL *in vivo* e *in vitro* en trucha arco iris (Moriyama *et al.*, 2002). Además de los mencionados factores con actividad liberadora de PRL, se ha postulado que el motivo C-terminal del precursor de vasopresina en mamíferos, copeptín, también estimularía la liberación de PRL desde las células lactotropas (Nagy *et al.*, 1988).

Los nonapéptidos cíclicos de origen hipotalámico arginina-vasopresina (AVP) y ocitocina (OT) en mamíferos tienen sus correspondientes análogos en peces, arginina-vasotocina (AVT) e isotocina (IT) (Figura 1). En mamíferos, AVP (también llamada hormona antidiurética o ADH) principalmente estimula la reabsorción de agua en los riñones, manteniendo así la osmolaridad sanguínea en los niveles normales; OT en tanto, juega un papel fundamental en la reproducción, estimulando la contracción uterina durante el parto y la secreción de leche durante la lactancia (Gainer & Wray, 1994). En peces estos péptidos han sido involucrados en la osmorregulación y función vascular, stress y reproducción (Duarte *et al.*, 2002); aunque es muy probable que sus funciones no terminen ahí, puesto que se ha reportado la presencia de receptores de IT en una variedad de órganos como vejiga, bazo, cerebro, agalla, intestino, hígado, corazón, riñón y órganos reproductivos femeninos (Hausmann *et al.*, 1995). Además, esta familia de péptidos juega un importante rol en el comportamiento social y reproductivo en varias especies (Goodson & Bass, 2000; Goodson *et al.*, 2003; Bielsky & Young, 2004; Thompson & Walton, 2004).

1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Cys	- Tyr	- Ile	- Ser	- Asn	- Cys	- Pro	- Ile	- Gly	- NH ₂	IT
Cys	- Tyr	- Ile	- Gln	- Asn	- Cys	- Pro	- Arg	- Gly	- NH ₂	AVT
Cys	- Tyr	- Ile	- Gln	- Asn	- Cys	- Pro	- Leu	- Gly	- NH ₂	OT
Cys	- Tyr	- Phe	- Gln	- Asn	- Cys	- Pro	- Arg	- Gly	- NH ₂	AVP
Cys	- Tyr	- Ile	- Gln	- Asn	- Cys	- Pro	- Ile	- Gly	- NH ₂	MT
*					*					

Figura 1: Secuencias de los nonapéptidos cíclicos de origen hipotalámico. Los residuos de cisteína 1 y 6 (asteriscos) forman un puente disulfuro que mantiene la estructura tridimensional. Se muestra también mesotocina (MT), el análogo de IT en reptiles, aves y anfibios. AVP y AVT se caracterizan por la presencia de un residuo aminoacídico básico en la posición 8, mientras que OT, IT y MT poseen un residuo hidrofóbico en esa posición. Los componentes de esta familia poseen un grupo amida en el residuo de glicina al extremo carboxilo terminal.

Estos péptidos son producidos principalmente en neuronas magnocelulares organizadas en núcleos o cúmulos discretos en la región hipotalámica. En mamíferos, los somas neuronales productores de OT y AVP se encuentran en el núcleo paraventricular (NPV) y núcleo supra-óptico (NSO), cuyas prolongaciones axonales liberan su contenido a la sangre en la pituitaria posterior (Bielsky & Young, 2004). En peces, estas neuronas se encuentran en grupos ubicados en el núcleo preóptico (NPO) y sus axones se extienden hasta la neurohipófisis, lugar en el cual se acumula el producto de síntesis a la espera del estímulo indicado para ser liberado al torrente sanguíneo (Van den Dungen *et al.*, 1982).

Los péptidos pertenecientes a esta familia son sintetizados como parte de una poliproteína de aproximadamente 150 residuos aminoacídicos. Todas presentan una organización característica similar, encontrándose un péptido señal en el extremo amino terminal, seguido del nonapéptido propiamente tal, neurofisina (Np) y una región rica en residuos de leucina llamada copeptín (Cp) hacia el extremo carboxilo terminal (Figura 2). Todas ellas presentan la señal de corte proteolítico *Gly-Lys-Arg* entre el nonapéptido y Np, indicando que en algún punto, probablemente durante su transporte axonal, ambos componentes son escindidos.

La mayor diferencia entre los precursores de mamíferos y peces se encuentra en el motivo carboxilo terminal o copeptín. En mamíferos sólo el precursor de AVP contiene este fragmento, mientras que el de OT carece de él; además este posee una señal de N-glicosilación (por lo que a menudo es también conocido como glicopéptido) y se puede encontrar liberado de Np por hallarse un sitio de corte entre ellos, representado por un residuo de arginina. En peces ambos precursores poseen el motivo Cp, el cual carece de la señal de glicosilación, y posiblemente permanece unido a neurofisina debido a que no se observa el mencionado residuo de arginina entre ambos.

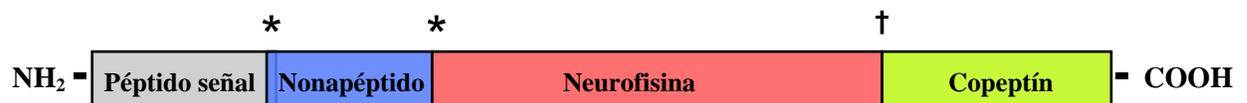


Figura 2: Esquema general de las poliproteínas precursoras de los péptidos hipotalámicos. Los asteriscos (*) indican señales de corte proteolítico responsables de la escisión del nonapéptido, las que se encuentran presentes en todos los precursores y en todas las especies conocidas. Un tercer sitio de corte (†) se encuentra en los precursores de AVP en mamíferos.

En peces, los precursores de AVT e IT han sido clonados en varias especies (Heierhorst *et al.*, 1989; Figueroa *et al.*, 1989; Hyodo *et al.*, 1991; Flores, 2001), compartiendo todos ellos caracteres en común. En las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias de sus cDNAs se puede observar que siguen el mismo patrón anteriormente mencionado.

Mientras que a neurofisiina se le ha atribuido una función de transporte, el papel que jugaría copeptín aún permanece poco claro, siendo su rol como posible factor liberador de prolactina una posibilidad. Sobre este último punto, aunque ensayos funcionales realizados en mamíferos han originado reportes contradictorios (Nagy *et al.*, 1988; Schally *et al.*, 1991), resultados estructurales obtenidos mediante inmunohistoquímica (IHQ) en pituitaria de carpa, *C. carpio*, han revelado la existencia de una relación morfológica entre Cp y las células lactotropas productoras de PRL (Flores, 2001), por lo que es esperable que tal nexo se encuentre presente en otras especies de peces.

El salmón del Atlántico (*Salmo salar*) es un teleósteo de gran trascendencia en la industria acuícola nacional, siendo nuestro país el segundo productor a nivel mundial. De ahí la importancia de enriquecer el conocimiento sobre los mecanismos que regulan el sistema inmunológico de esta especie, ya que cualquier esfuerzo por comprender y mejorar este aspecto va en directo beneficio de esta actividad. En la actualidad se han desarrollado variadas vacunas con el fin de proteger los cultivos ante determinadas enfermedades, pero no se han realizado exhaustivas investigaciones apuntadas a la posible utilización del propio sistema inmune innato del pez como un medio viable de protección.

Los antecedentes anteriormente expuestos sugieren que copeptín se encuentra formando parte de los precursores de AVT e IT en *S. salar*, y que posiblemente existe una relación entre este y la liberación de prolactina.

Bajo la hipótesis de que copeptín posee una actividad ligada a la liberación de prolactina en esta especie, actividad que se ve aumentada en peces que están en contacto con bacterias patógenas; el presente trabajo se aboca a dilucidar este punto mediante dos principales objetivos: (1) obtener información sobre la forma y función de copeptín mediante el análisis de secuencia de su cDNA, y (2) estudiar la relación entre la presencia de copeptín y la producción y/o secreción de prolactina en *S. salar*, tanto en peces sanos como en peces que se encuentran en contacto con patógenos bacterianos comúnmente encontrados en centros de cultivo de la región.

Resumiendo, en el presente trabajo se pretende establecer una evidencia de la relación copeptín / liberación de prolactina / modulación del sistema inmune aplicado al modelo de *Salmo salar*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

- Acetato de sodio, USBiological.
- Ácido acético, Merck.
- Ácido clorhídrico, *HCl*, Merck.
- Ácido etilendiamino tetracético, *EDTA*, Riedel-de Haën.
- Ácido 3-(N-2-morfolino) propano sulfónico, *MOPS*, Sigma.
- Ácido pícrico, Merck.
- Agarosa, Winkler.
- Albúmina de suero bovino, *BSA*, Winkler.
- Alcohol etílico, Riedel-de Haën.
- Alcohol isoamílico, Sigma.
- Alcohol isopropílico, Baker Chemical Co.
- Ampicilina, Sigma.
- Azul de bromofenol, Sigma.
- Bacto-agar, Winkler.
- Bacto-triptona, USBiological.
- Bálsamo de Canadá, Scharlau.
- 5-Bromo-3-indolil- β galactosido, *X-Gal*, Invitrogen.
- Bromuro de etidio, Promega.

- Citrato de sodio, Winkler.
- Cloroformo, Winkler.
- Cloruro de calcio, $CaCl_2$, Merck.
- Cloruro de magnesio, $MgCl_2$, Merck.
- Cloruro de potasio, KCl , Merck.
- Cloruro de sodio, $NaCl$, Scharlau.
- Diaminobenzidina, *DAB*,
- Dimetilformamida, Merck.
- Dithiothreitol 0,1M; *DTT*, Invitrogen.
- Desoxinuclósidos trifosfato, *dATP*, *dCTP*, *dGTP*, *dTTP*, Invitrogen.
- Dodecil sulfato de sodio, *SDS*, Winkler.
- Extracto de levadura, GibcoBRL.
- Formaldehído 37%, Merck.
- Formalina, Merck.
- Formamida, Merck.
- Glicerol, Promega.
- Glucosa, Merck.
- Histosec, Merck.
- Isopropil β -tiogalactopiranosido, *IPTG*, Invitrogen.
- Medio de montaje acuoso para fluorescencia, DakoCytomation.
- N-Lauril-sarcosina, Sigma.
- Perhidrol 30%, H_2O_2 , Merck.

- Tiocianato de guanidina, Merck
- Tris base, Invitrogen.
- Triton X-100, Merck.
- Xilen cianol, Sigma.
- Xilol, Arquimed.

3.1.2 Soluciones

- Bouin acuoso: Cada 100 ml contiene 75 ml de ácido pícrico saturado en agua, 25 ml de formalina 40% y 5 ml de ácido acético.
- Tampón carga para muestra de DNA y RNA 6X: glicerol 50%; EDTA 1 mM pH 8,0; azul de bromofenol 0,25%; xilen cianol 0,25%.
- Medio LB: Bacto-triptona 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l. Autoclavado.
- Medio LB-agar: medio LB, Bacto-agar 15 g/l. Autoclavado.
- Medio SOB: bacto-tiptona 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 0,5 g/l; KCl 2,5 mM. Autoclavado.
- Medio SOC: medio SOB, MgCl₂ 10 mM, Glucosa 20 mM.
- MOPS 5X (tampón corrida RNA): MOPS 0,1 M pH 7,0; acetato de sodio 40 mM; EDTA 5 mM pH 8,0.
- PBS: NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 1,44 g/l; KH₂PO₄ 0,24 g/l. pH 7,4.
- Solución de bloqueo: PBS; BSA 1%; Triton X-100 0,3% y leche descremada 5%.
- Solución de Chomczynski: tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM; N-lauril sarcosina 0,5% p/v. Fue autoclavado y se agregó β-mercaptoetanol 0,1 M.

- Solución de revelado: 40 ml PBS; 30 μ l H₂O₂ 30%; 2 ml DAB 10 mg/ml.
- STETL: Tris/HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0; NaCl 0,1 M; triton X-100 5%; lisozima 0,5 g/l agregada antes de usar.
- TAE 50X (tampón corrida DNA): Tris base 2 M; ácido acético glacial 5,71% v/v; EDTA 0,05 M. Autoclavado.

3.1.3 Enzimas

- DNAsa RQ1 RNase-free, Promega.
- *EcoRI*, Invitrogen.
- Inhibidor de RNAsas, *RNaseOUT*, Invitrogen.
- Lisozima, Promega.
- *NcoI*, Invitrogen.
- *NciI*, New England Biolabs
- *SmaI*, Invitrogen.
- *Taq* DNA polimerasa, Invitrogen.
- T4 DNA Ligasa, Gibco BRL.
- Transcriptasa reversa, Invitrogen.

3.1.4 Kits

- E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit I, Omega Bio-tek.
- E.Z.N.A. Gel extraction kit, Omega Bio-tek.
- pGEM-T easy, Promega.

3.1.5 Anticuerpos.

- Anti Copeptín de carpa (*Cyprinus carpio*) hecho en conejo, LabBMP.
- Anti Prolactina de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) hecho en conejo. Donado por el Dr. Marc Muller, Universidad de Liege, Bélgica
- Anti IgG de conejo hecho en cabra.
- Anti Prolactina de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) hecho en ratón, LabBMP.
- Complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) hecho en conejo, Rockland.
- Anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado a Alexa[®]488, Molecular Probes.
- Anti IgG de ratón hecho en cabra conjugado a Alexa[®]568, Molecular Probes.

3.1.6 Instrumentos

- Termociclador Thermo Px2.
- Centrífugas Boeco M-240R y Sorvall RC5B
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 2

3.1.7 Softwares

- Un Scan It, Silk scientific Inc.
- Image Pro Plus, Media Cybernetics.

3.1.8 Material biológico

- Las muestras de hipófisis e hipotálamos, tanto para RT-PCR como para inmunohistoquímica, fueron obtenidas de alevines de *Salmo salar* en etapa de agua

dulce de 20 a 30 gramos desde el centro de experimentación perteneciente a *Novartis*, Puerto Varas, Chile.

- Las muestras de encéfalos fueron obtenidas a partir de individuos adultos de *Salmo salar* que se consiguieron en el centro de faenación de la empresa salmonera Marine Harvest (ex StoltSeafarm), Puerto Montt, Chile.
- Células *Escherichia coli* JM109, Promega.

3.2 Métodos

3.2.1 Clonamiento del precursor de isotocina de *Salmo salar*

3.2.1.1 Diseño de partidores

Se llevó a cabo un rastreo *in silico* de secuencias nucleotídicas de isotocina de los distintos salmonídeos presentes en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de cDNAs de isotocina encontradas fueron las de salmón chum (*Oncorhynchus keta*), salmón sockeye o rojo (*Oncorhynchus nerka*) y salmón masú (*Oncorhynchus masou*). Sobre la base de estas secuencias se diseñó un juego de partidores que amplifican un fragmento de 510 pb correspondiente a la región codificante del transcrito de isotocina de *Salmo salar*:

SSIT-1f : 5' - CAA AGC CTC AAC CTC AAC AC - 3' Forward

SSIT-2r : 5' - AGA GGC TGT TTT ATT GGT GG - 3' Reverse

3.2.1.2 Preparación de RNA total

-Extracción de RNA total desde hipotálamo de *S. salar*

Se homogeneizaron las muestras de tejido (50 mg) en 500 µl de solución de Chomczynski (Chomczynski & Sacchi, 1987) utilizando un Ultraturax. Luego se agregaron 50 µl de acetato de sodio 2 M pH 4,0 y 500 µl de fenol saturado en agua pH 5,0, mezclando bien luego de añadir cada solución. En frío se adicionaron 400 µl de cloroformo:alcohol isoamilo 24:1 y se centrifugó a 13000 g a 4°C por 10 minutos. En seguida se trasladó la capa superior acuosa (conteniendo el RNA) a un tubo nuevo y se le agregaron 500 µl de isopropanol frío y se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

Al día siguiente se sedimentó la muestra centrifugándola a 13000 g por 30 minutos a 4°C, para luego eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 µl de Tris/HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0; SDS 0,5% y posteriormente añadir 400 µl de cloroformo:alcohol isoamilo 24:1, mezclando por agitación. Nuevamente se separaron las fases centrifugando a 13000 g por 10 minutos a 4°C, extrayendo la fase superior acuosa y depositándola en un nuevo tubo. El RNA se precipitó adicionando 100 µl de acetato de sodio 2 M pH 5,0 y 520 µl de isopropanol frío e incubando toda la noche a -20°C.

Finalmente, se centrifugó a 13000 g por 30 minutos a 4°C y se resuspendió el precipitado en 20 µl de agua desionizada estéril. Posteriormente se cuantificó el RNA por espectrofotometría a 260 nm, utilizando la relación 1 U.A. = 40 µg/ml.

-Evaluación de la integridad del RNA por electroforesis denaturante

La muestra se preparó mezclando 2 µl de MOPS 5X, 3,5 µl de formaldehído, 10,0 µl de formamida desionizada y 4,5 µl de RNA (30 µg máximo). Posteriormente se calentó a 65°C por

15 minutos, se colocó en hielo inmediatamente y se le agregaron 2 μ l de buffer carga 6X y 1 μ l de bromuro de etidio 1 mg/ml.

Para llevar a cabo la electroforesis, primero se limpió acuciosamente la cámara con agua destilada y luego con etanol. Se preparó un gel de agarosa al 1%, pesando 0,3 g de agarosa y fundiéndolos en 19 ml de agua estéril, se dejó enfriar y se adicionaron 6 ml de MOPS 5X y 5 ml de formaldehído 37%. Antes de cargar las muestras, se precorrió el gel por 5 minutos a 40 mA. En seguida se cargaron las muestras y se realizó la corrida electroforética a 40 mA constante. Una vez finalizada la corrida, el gel se expuso a luz ultravioleta para poder visualizar los RNAs. Una vez que la integridad del RNA fue corroborada, éste se guardó a -70°C .

3.2.1.3 Síntesis de cDNA (transcripción reversa)

Previo a la reacción de síntesis del cDNA, el RNA fue tratado con DNAsa a fin de eliminar cualquier interferencia por posibles trazas de DNA genómico. La reacción se llevó a cabo en una mezcla conteniendo 0,5 Unidades de DNAsa RQ1 RNase-free, 2 μ l de tampón DNAsa RQ1 RNase-free 10X, 5 μ g de RNA y agua estéril c.s.p. 20 μ l. La solución fue incubada por 1 hora a 37°C seguido de 10 minutos a 70°C .

La transcripción reversa se realizó en un total de 40 μ l de solución, pero dividido en dos partes. La primera reacción se efectuó en una mezcla conteniendo 1 μ M de oligo-dT; 0,5 mM de cada dNTP; 5 μ g de RNA y agua estéril c.s.p. 24 μ l. Ésta se incubó por 10 minutos a 65°C . Paso seguido se le adicionó la segunda mezcla comprendida de 100 Unidades de transcriptasa reversa, 8 μ l del tampón de la transcriptasa reversa 5X, 2 Unidades de RNaseOUT y 10 mM de dTT; en un total de 16 μ l. Como último paso, los 40 μ l de mezcla final se incubaron por 50 minutos a 42°C seguido de 10 minutos a 70°C .

3.2.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó en un tubo de 0,2 ml conteniendo; 0,5 Unidades de *Taq* DNA polimerasa; 2,5 μ l del tampón de *Taq* DNA polimerasa 10X; 2 mM de $MgCl_2$; 0,4 mM de cada dNTP; 0,4 μ M de cada partidor (*SSIT-1f* y *SSIT-2r*); 0,5 μ l de cDNA y agua estéril c.s.p. 25 μ l.

La mezcla contenida en el tubo fue incubada en el termociclador de la siguiente manera:

- | | | |
|------------------------|---|-----------|
| 1.- 3 minutos a 94°C | } | 30 ciclos |
| 2.- 30 segundos a 94°C | | |
| 3.- 25 segundos a 60°C | | |
| 4.- 25 segundos a 72°C | | |
| 5.- 7 minutos a 72°C | | |

3.2.1.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los geles se prepararon fundiendo 0.3 g de agarosa en 30 ml de TAE y agregando 1 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml. Las muestras se prepararon mezclando 10 μ l de la reacción de PCR con 2 μ l de buffer de carga 6X. Se cargaron las muestras y se realizó la corrida electroforética a 75 mA. Una vez finalizada la corrida, el gel se expuso a luz ultravioleta para poder visualizar los DNAs.

3.2.1.6 Preparación de células competentes

Con un asa de micrón se raspó un stock de glicerol guardado a -70°C de *E. coli* JM109 y se sembró en una placa Petri con LB - agar y se incubó a 37°C por 12 a 16 horas. Luego se tomó una colonia y se creció un cultivo de 2,5 ml en medio LB por 12 - 16 horas. Una vez crecido, este cultivo fue agregado sobre 250 ml de medio LB en un matraz de 1 litro (dilución 1:100). Se

incubó a 37°C agitando a 225 rpm en un agitador orbital hasta que la densidad óptica a 600 nm fuese igual a 0,5; esto es entre 3 y 4 horas aproximadamente. Acto seguido, el cultivo se puso en hielo y se traspasó a un tubo de centrifuga de 250 ml y se centrifugó por 5 minutos a 800 g a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el sedimento, moviendo el tubo por 3 a 5 minutos en cámara fría, en 62,5 ml (1/4 del volumen inicial) de MgCl₂ 100 mM previamente enfriado a 4°C.

Una vez resuspendido completamente el sedimento, se centrifugó por 5 minutos a 800 g a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el sedimento en 12,5 ml (1/20 del volumen inicial) de CaCl₂ 100 mM enfriado a 4°C. Luego se adicionaron 112,5 ml más (9/20 del volumen inicial) de CaCl₂ 100 mM enfriado a 4°C y se dejó a 4°C (o en hielo) por 20 minutos.

Nuevamente se sedimentó por 5 minutos 800 g a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente se resuspendieron las células en 2,5 ml (1/100 del volumen inicial) de 85% $\frac{v}{v}$ CaCl₂ 100 mM, 15% $\frac{v}{v}$ glicerol y se guardaron a -70°C en alícuotas de 100 y/o 200 μ l.

3.2.1.7 Ligación al vector de clonamiento pGEM-Teasy®

La ligación del amplicón al vector se realizó en una mezcla conteniendo 50 ng del vector, 5 μ l del tampón de T4 DNA ligasa 2X, 3 Unidades de T4 DNA ligasa y 3 μ l de producto de PCR en un volumen final de 10 μ l. Se incubó a 4°C por toda la noche.

3.2.1.8 Transformación con el producto de ligación y selección de clones

Suavemente un tubo que contenía 100 μ l de células competentes se descongeló a temperatura ambiente e inmediatamente se colocó en hielo, en seguida se transfirió todo el producto de ligación (10 μ l) a dicho tubo y se dejó por 30 minutos a 4 °C. Luego el tubo fue incubado a 42°C

por 45 segundos y acto seguido fue colocado en hielo por 2 minutos. Se transfirió el contenido sobre 0,9 ml de medio SOC mantenido a 37°C y la nueva mezcla se incubó por 1 hora a 37°C a 225 rpm. Transcurrido dicho tiempo, se sembró el cultivo dividiéndolo en dos placas Petri de 9 cm de diámetro conteniendo LB - agar - ampicilina 50 µg/ml más 800 µg de IPTG y 800 µg de X-Gal. Se incubó a 37°C por 12 a 16 horas.

Para buscar los clones correctos se tomaron con un asa de micrón 10 colonias de color blanco más una colonia azul como control y se crecieron en 2 ml de LB - ampicilina 50 µg/ml por 12 a 16 horas. Después se realizó una purificación de DNA plasmidial empleando el kit comercial *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit I*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Con el fin de visualizar el inserto de DNA incorporado al vector, el plasmidio purificado fue sometido a una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Un fraccionamiento electroforético en gel de agarosa permitió visualizar los insertos buscados.

Con el objeto de confirmar la presencia del clon buscado, se practicaron reacciones de digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *SmaI*, las que reconocen segmentos conservados en las otras especies salmonídeas investigadas. La enzimas de restricción y su uso se detallan en la Tabla 1. Finalmente el clon positivo fue guardado a -70°C como stock de glicerol, mezclando 0,85 ml de cultivo líquido con 0,15 ml de glicerol autoclavado.

3.2.1.9 Secuenciación

La secuenciación se realizó por el método de didesoxinucleotidos (Sanger et *al.*, 1977). Este se llevó a cabo utilizando partidores complementarios a las secuencias de los promotores *SP6* y *T7*, las que flanquean la región de múltiple clonamiento (MCS) del vector. Este proceso fue efectuado por la empresa de servicios *Genytec*, Santiago de Chile.

3.2.2 PCR semicuantitativo: Precursor de isotocina y β -actina

Una cuantificación relativa se llevó a cabo mediante la realización de un RT-PCR doble, en la que se amplificó el precursor de isotocina junto a β -actina, para evaluar las posibles diferencias en los niveles de transcrito de isotocina al comparar las diferentes poblaciones de peces.

3.2.2.1 Partidores

Los partidores utilizados para la amplificación de β -actina fueron diseñados a partir de la secuencia de dicho cDNA ubicado en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y amplifican un fragmento de 701 pb:

β -Act-F : 5' - TAT CCT GAC TCT GAA GTA CCC C - 3' Forward

β -Act-R : 5' - TGT TGG CGT ACA GAT CCT TAC G - 3' Reverse

3.2.2.2 Cinética de amplificación

Con la finalidad de comprobar que ambos amplicones se comportan de similar manera durante la amplificación, antes de llevar a cabo el RT-PCR semicuantitativo se realizó una cinética de amplificación de ambos templados en cuestión, estableciendo de esta manera un número de ciclos en el que ambas reacciones se encuentren en la etapa exponencial de la amplificación. La amplificación por PCR se realizó siguiendo el mismo protocolo del punto siguiente (3.2.2.3)

Cada mezcla de reacción se realizó por quintuplicado, sacando un tubo a los 15, 20, 25, 30 y 35 ciclos, dejándolos en hielo inmediatamente después de su retiro. Una vez finalizados los 35

ciclos se fraccionaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, siempre siguiendo el protocolo de preparación descrito en el punto 3.2.1.5.

3.2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR se realizó en un tubo de 0,2 ml conteniendo 1 Unidad de *Taq* DNA polimerasa; 1 μ l del tampón de *Taq* DNA polimerasa 10X; 4 mM de $MgCl_2$; 0,8 mM de cada dNTP; 0,4 μ M de cada partidor (*SSIT-1f* y *SSIT-2r*; *β -act-F* y *β -act-R*); 0,3 μ l del cDNA correspondiente y agua estéril c.s.p. 10 μ l.

La mezcla contenida en el tubo fue incubada en el termociclador de la siguiente manera:

- | | |
|------------------------|-------------|
| 1.- 3 minutos a 94°C | |
| 2.- 30 segundos a 94°C | } 30 ciclos |
| 3.- 20 segundos a 57°C | |
| 4.- 25 segundos a 72°C | |
| 5.- 7 minutos a 72°C | |

3.2.3 Generación del DNA competidor MIMICS

El DNA utilizado para realizar los ensayos de RT-PCR competitivo se fabricó a partir del clon del precursor de isotocina obtenido con anterioridad, basándose en la metodología empleada por Sperisen *et al.* (1992). La deleción de un fragmento central de 167 pb mediante una digestión con la enzima de restricción *NciI* permitió la construcción de un competidor de 343 pb. Así, el producto final contiene los mismos sitios de unión a los partidores y compite con el cDNA durante la reacción de amplificación. El proceso general se esquematiza en la Figura 3.

3.2.3.1 Preparación de DNA plasmidial

Siguiendo lo descrito por Sambrook *et al.* (1989), a partir del stock de glicerol que contenía el clon de isotocina, se raspó con un asa de micrón su superficie congelada y se inoculó en 2 ml de LB- ampicilina 50 µg/ml y se incubó a 37°C por 12 - 16 horas a 200 rpm. Terminado este período se transfirieron 1,5 ml del cultivo a un tubo Eppendorf de 1,6 ml y se centrifugó por 5 minutos a 10.000 g a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el sedimento formado, producto de la sedimentación de las células, fue resuspendido en 110µl de STETL. Se hirvió la solución por 1 minuto y en seguida se centrifugó por 10 minutos a 12.000 g a temperatura ambiente. El sobrenadante transparente fue trasladado a un nuevo tubo Eppendorf y descartando el sedimento de restos celulares. Un volumen equivalente de isopropanol fue adicionado al sobrenadante y fue mezclado con Vortex unos instantes.

El DNA plasmidial presente en la solución se sedimentó centrifugando por 15 minutos a 12.000 g a temperatura ambiente para luego descartar el sobrenadante y añadir 0,5 ml de etanol 70% lentamente por la pared contraria al precipitado. Se dejó reposar por aproximadamente 3 minutos y se centrifugó unos segundos a baja velocidad (spin-down). En último lugar, se aspiró todo el etanol y ventiló unos minutos hasta secar completamente el sedimento, el que luego se resuspendió en 30 µl de agua estéril. Este punto corresponde al paso 1 en la Figura 3.

3.2.3.2 Obtención del fragmento de DNA correspondiente al precursor de isotocina

El DNA plasmidial purificado se sometió a una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, la que reconoce el vector a ambos lados del MCS, escindiendo el inserto del vector; ambos segmentos fueron separados a través de un fraccionamiento por electroforesis en gel de agarosa, según lo indicado en el punto 3.2.1.5, y la banda correspondiente al inserto fue purificada a partir

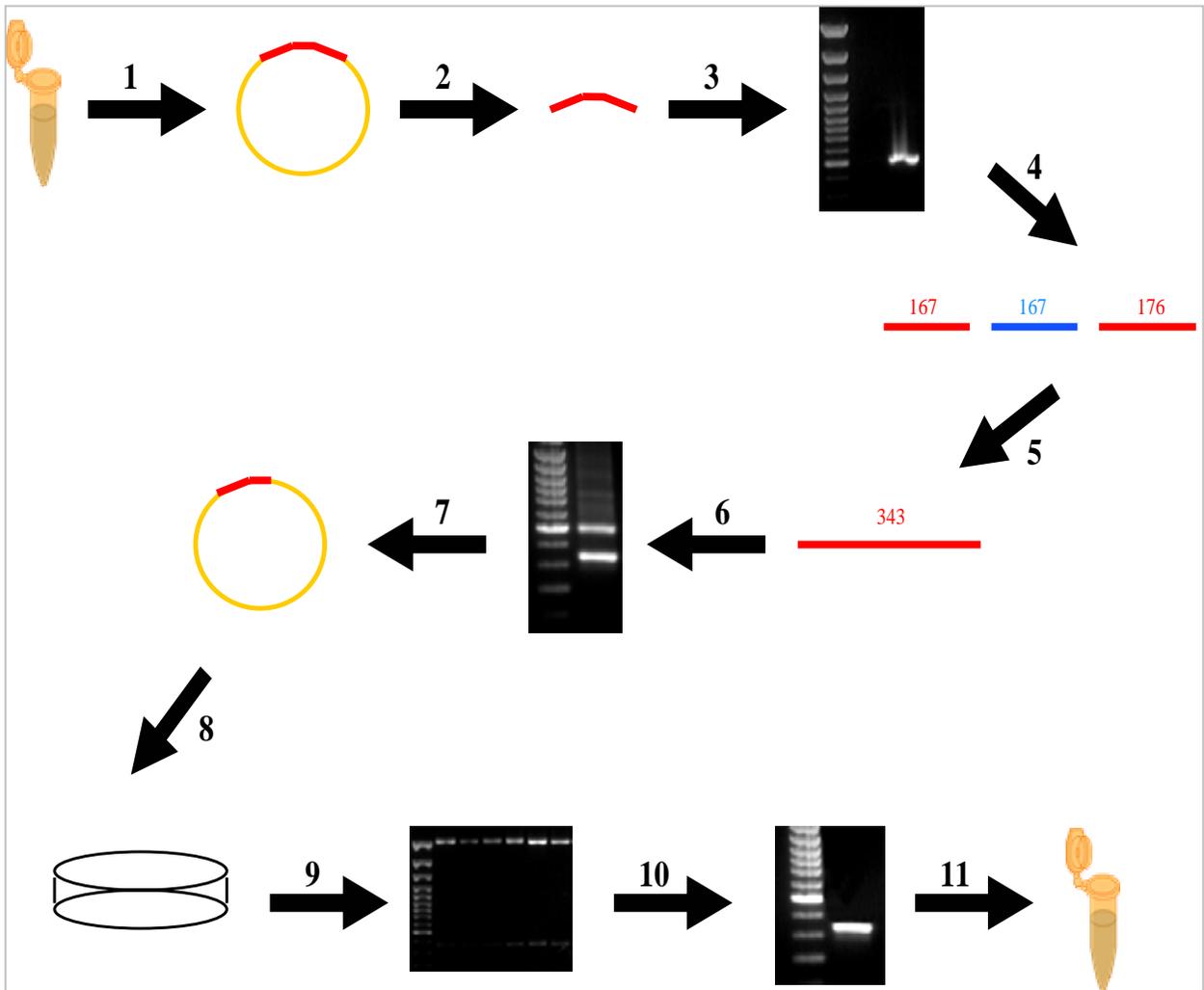


Figura 3: Estrategia experimental usada para generar el DNA competidor MIMIC.

del gel ocupando el kit comercial *E.Z.N.A. Gel extraction kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El inserto purificado se empleó como templado para una nueva amplificación por PCR, obteniéndose una cantidad adecuada para los posteriores pasos. En la Figura 3, los pasos 2 y 3 ejemplifican este proceso, en el que se ilustra la digestión y amplificación, respectivamente.

3.2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó en un tubo de 0,2 ml conteniendo 0,5 Unidades de *Taq* DNA polimerasa; tampón 2,5 μ l del tampón de *Taq* DNA polimerasa 10X; 2 mM de $MgCl_2$; 0,4 mM de cada dNTP; 0,4 μ M de cada partidor (*SSIT-1f* y *SSIT-2r*); 0,5 μ l de cDNA y agua estéril c.s.p. 25 μ l.

La mezcla contenida en el tubo fue incubada en el termociclador de la siguiente manera:

- | | | |
|------------------------|---|-----------|
| 1.- 3 minutos a 94°C | } | 30 ciclos |
| 2.- 30 segundos a 94°C | | |
| 3.- 25 segundos a 60°C | | |
| 4.- 25 segundos a 72°C | | |
| 5.- 7 minutos a 72°C | | |

3.2.3.4 Digestión y religación

El producto de PCR de 510 pb, correspondiente al cDNA del precursor de isotocina, fue digerido con la enzima de restricción *NciI*; la que divide dicho DNA en tres fracciones de 167, 167 y 176 pb. Las especies resultantes fueron sometidas a una reacción de ligación conteniendo 5 Unidades de T4 DNA Ligasa, 2,0 μ l del tampón de T4 DNA Ligasa 5X, 1,5 μ l del producto de digestión y agua estéril c.s.p. 10 μ l. Con el propósito de enriquecer los productos de ligación

deseados por sobre la población total, se efectuó una nueva amplificación por PCR bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Por último, la especie de interés de 343 pb de extensión, generada por la ligación de los fragmentos extremos del DNA, se purificó desde el gel de agarosa ocupando el kit comercial *E.Z.N.A. Gel extraction kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante. En la Figura 3 se pueden apreciar estos procesos, en donde el paso 4 corresponde a la digestión con la endonucleasa de restricción *NciI*, el paso 5 representa la ligación, y el paso 6 la amplificación mediante PCR.

3.2.3.5 Ligación al vector de clonamiento pGEM-Teasy®

Este punto corresponde al paso 7 de la Figura 3, en donde el fragmento purificado a partir del gel de agarosa fue ligado al vector de clonamiento. La ligación del segmento de 343 pb al vector se realizó en una mezcla conteniendo 50 ng del vector, 5 µl del tampón de T4 DNA ligasa 2X, 3 Unidades de T4 DNA ligasa y 3 µl del fragmento purificado en un volumen final de 10 µl. Se incubó a 4°C por toda la noche.

3.2.3.6 Transformación con el producto de ligación y selección de clones

Suavemente un tubo que contenía 100 µl de células competentes se descongeló a temperatura ambiente e inmediatamente se colocó en hielo, se transfirió todo el producto de ligación (10 µl) a dicho tubo y se dejó por 30 minutos a 4°C. Luego el tubo fue incubado a 42°C por 45 segundos y acto seguido fue colocado en hielo por 2 minutos. Se transfirió el contenido sobre 0,9 ml de medio SOC preentibado a 37°C y la nueva mezcla se incubó por 1 hora a 37°C a 225 rpm. Transcurrido dicho tiempo, se sembró el cultivo dividiéndolo en dos placas Petri conteniendo LB

- agar - ampicilina 50 $\mu\text{g/ml}$ más 800 μg de IPTG y 800 μg de X-Gal. Se incubó a 37°C por 12 a 16 horas (paso 8, Figura 3).

Para buscar los clones correctos se tomaron con un asa de micrón 10 colonias de color blanco más una colonia azul como control y se crecieron en 2 ml de LB - ampicilina 50 $\mu\text{g/ml}$ por 12 a 16 horas. Después se realizó una purificación de DNA plasmidial empleando el kit comercial *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit I*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Con el fin de visualizar el inserto de DNA incorporado al vector, el plasmidio purificado fue sometido a una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Un fraccionamiento electroforético en gel de agarosa, según lo indicado en el punto 3.2.1.5, permitió visualizar los insertos buscados (paso 9, Figura 3).

Con el objeto de confirmar la presencia del clon buscado, se practicaron reacciones de amplificación por PCR, siempre en las condiciones ya descritas (paso 10, Figura 3). Finalmente el clon positivo fue guardado a -70°C como stock de glicerol, mezclando 0,85 ml de cultivo líquido con 0,15 ml de glicerol autoclavado (paso 11, Figura 3).

3.2.4 Cinética de amplificación

Para validar los resultados del ensayo de competencia fue necesario conocer las cinéticas de amplificación de ambos templados en cuestión, con el fin de realizar las amplificaciones por PCR a un número de ciclos en el que ambas reacciones se encuentren en la etapa exponencial de la amplificación (Sarmiento, 2001). Para esta validación se prepararon dos mezclas en tubos de 0,2 ml, conteniendo ambas 0,5 Unidades de *Taq* DNA polimerasa; 1 μl del tampón de *Taq* DNA polimerasa 10X; 2 mM de MgCl_2 ; 0,4 mM de cada dNTP y 0,4 μM de cada partidor (*SSIT-1f* y *SSIT-2r*). Una de ellas contenía 0,7 atomoles del DNA competidor y la otra, igual cantidad del

cDNA de isotocina. Ambas reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 10 μ l. Las mezclas contenidas en los tubos fueron incubadas en el termociclador de la siguiente manera:

- 1.- 3 minutos a 94°C
 - 2.- 30 segundos a 94°C
 - 3.- 25 segundos a 60°C
 - 4.- 25 segundos a 72°C
 - 5.- 7 minutos a 72°C
- } 45 ciclos

Cada mezcla de reacción se realizó por sextuplicado, sacando un tubo de cada una a los 20, 25, 30, 35, 40 y 45 ciclos, dejándolos en hielo inmediatamente después de su retiro. Una vez finalizados los 45 ciclos se fraccionaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, siempre siguiendo el protocolo de preparación descrito en el punto 3.2.1.5.

3.2.5 Ensayos de competencia

Por medio de estos ensayos, siguiendo la metodología empleada por Sarmiento (2001), se evaluaron posibles diferencias en los niveles de transcrito de isotocina en muestras de hipotálamo de *S. salar* en etapa de agua dulce de 20 - 30 gramos. Los cDNAs utilizados como templado, que se sintetizaron de igual manera a lo descrito en los puntos 3.2.1.2 y 3.2.1.3, provenían de tres tipos de muestras: Peces sanos, infectados con *V. ordalii* y con *P. salmonis*.

Con la finalidad de proveer una cantidad normalizada del cDNA templado a cada reacción de amplificación durante el ensayo de competencia, primero se amplificó mediante PCR el cDNA de β -actina de las tres muestras (los partidores utilizados se muestran en el punto 3.2.2.1). Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un tubo de 0,2 ml conteniendo 1 Unidad de *Taq*

DNA polimerasa; 1 μl del tampón de *Taq* DNA polimerasa 10X; 2 mM de MgCl_2 ; 0,4 mM de cada dNTP; 0,4 μM de cada partidor ($\beta\text{-act-F}$ y $\beta\text{-act-R}$) y 0,8 μl del cDNA correspondiente. Todo en un volumen final de 10 μl . Los tubos fueron incubados en el termociclador de la siguiente manera:

- | | | |
|------------------------|---|-----------|
| 1.- 3 minutos a 94°C | } | 30 ciclos |
| 2.- 30 segundos a 94°C | | |
| 3.- 30 segundos a 55°C | | |
| 4.- 25 segundos a 72°C | | |
| 5.- 7 minutos a 72°C | | |

Los productos de PCR fueron analizados mediante un fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 1,5 %. En este caso el gel fue teñido luego de la corrida, sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g/ml}$ por 20 minutos. La imagen obtenida fue analizada con el programa UN-SCAN-IT y los valores obtenidos fueron utilizados para calcular las cantidades de templado normalizadas para cada cDNA.

En el ensayo de competencia propiamente tal, cada reacción se llevó a cabo en un tubo de 0,2 ml conteniendo 0,5 Unidades de *Taq* DNA polimerasa; 1 μl del tampón de *Taq* DNA polimerasa 10X; 2 mM de MgCl_2 ; 0,4 mM de cada dNTP; 0,4 μM de cada partidor (*SSIT-1f* y *SSIT-2r*); el correspondiente cDNA (0,3 μl de la muestra de peces sanos; 0,1 μl de la muestra de peces infectados con *V. ordalii* y 0,1 μl de la muestra de peces infectados con *P. salmonis*) y agua estéril c.s.p. 10 μl . En total, se efectuaron en paralelo 12 reacciones: cuatro para cada cDNA, las que coamplificaron con 1, 10, 50 y 250 zeptomoles del DNA competidor MIMICS. Cada reacción se realizó por triplicado.

Las mezclas de reacción fueron incubadas en el termociclador de la siguiente manera:

- 1.- 3 minutos a 94°C
 - 2.- 30 segundos a 94°C
 - 3.- 25 segundos a 60°C
 - 4.- 25 segundos a 72°C
 - 5.- 7 minutos a 72°C
- } 30 ciclos

Los resultados fueron visualizados mediante un fraccionamiento por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. En este caso el gel fue teñido luego de la corrida, sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml por 20 minutos. La imagen obtenida fue digitalizada y analizada con el programa UN-SCAN-IT. Se graficó el valor del logaritmo de la relación entre la intensidad de fluorescencia entre el DNA competidor y el cDNA contra el logaritmo de la cantidad molar del competidor correspondiente a cada reacción, La concentración del cDNA problema se obtuvo por interpolación del gráfico de regresión lineal en el punto en que las ordenadas equivalen a cero.

3.2.6 Digestión con enzimas de restricción

Todas las digestiones se efectuaron en un volumen total de 10 µl conteniendo 1X del tampón correspondiente, 1 unidad de la enzima, 4 µl de DNA (tanto para los productos de PCR y los DNAs plasmidiales) y agua destilada para completar el volumen final. La mezcla final se incubó a la temperatura correspondiente por 1 hora y 30 minutos. Los datos para cada enzima se muestran en la tabla 1.

Enzima	<i>SmaI</i>	<i>NcoI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>NciI</i>
Tampón	REact 4 ¹	REact 3 ¹	REact 3 ¹	NEB 4 ²
Temperatura	30 °C	37 °C	37 °C	30 °C

Tabla 1: Enzimas de restricción utilizadas a lo largo del presente trabajo, con sus correspondientes temperaturas y tampones. (1) Invitrogen. (2) New England Biolabs.

3.2.7 Inmunohistoquímica

3.2.7.1 Fijación de los cortes histológicos

Todas las muestras de tejido utilizadas para inmunohistoquímica fueron incubadas por 48 horas en Bouin acuoso y posteriormente deshidratadas mediante una batería de etanol en concentraciones crecientes, seguida de un tratamiento con xilol para finalmente incluirlas en parafina sólida (Histosec). Finalmente, los cortes fueron hechos con micrótopo y fueron colocados sobre portaobjetos.

3.2.7.2 Inmunohistoquímica cromogénica

Los cortes se inmunotñeron utilizando el método del complejo peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) (Sternberger *et al.*, 1970). Primero, fueron desparafinados con xilol y luego rehidratados por medio de una batería decreciente de etanol, desde etanol 100% hasta 50%. Luego se incubaron por 10 minutos en perhidrol 3% en metanol, con el fin de inactivar las peroxidases endógenas del tejido. Se lavaron con PBS por 5 minutos y se incubaron por 30 minutos con solución de bloqueo. Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo por toda la noche (mínimo 12 horas) a 20°C en cámara húmeda. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron las secciones tres veces por 5 minutos con PBS y luego se incubaron con el segundo anticuerpo diluido en solución de bloqueo por 30 minutos a 20°C en cámara húmeda. Se les realizaron nuevos lavados con PBS, 3 veces por 5 minutos, para ser incubados por 30 minutos con PAP diluido en solución de bloqueo. Luego de tres nuevos lavados con PBS se agregó sobre los cortes la solución de revelado y 10 minutos más tarde se adicionaron otros 15 µl de H₂O₂ 30% y se dejó otros 5 minutos.

Se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se procedió al montaje de los cortes utilizando una batería de etanol en concentraciones ascendentes, desde 50% hasta 100%. Finalmente se trataron con xilol, fueron montados con bálsamo de Canadá y se les colocó un cubreobjeto.

3.2.7.3 Inmunohistoquímica de fluorescencia

Se realizó una inmunohistoquímica doble en la cual se utilizaron en conjunto los anticuerpos primarios Anti-Cp de carpa hecho en conejo y Anti-PRL de tilapia hecho en ratón. Los procesos de desparafinado, rehidratación, incubación con los primeros anticuerpos y lavados se llevaron a cabo de igual manera a lo descrito en el punto anterior, excepto por el paso de incubación con perhidrol 3% en metanol. La incubación de los cortes con los segundos anticuerpos fluorescentes se realizó por 30 minutos a 20°C en cámara húmeda y en oscuridad. Luego se lavó tres veces por 5 minutos con PBS y se agregó sobre el portaobjetos el medio de montaje acuoso para fluorescencia y se les colocó un cubreobjeto, siempre en oscuridad. La Tabla 2 resume los anticuerpos utilizados en el presente trabajo.

ANTICUERPO	ORIGEN	CLASE	DILUCIÓN	USADO EN
Anti-Cp de carpa	conejo	primario	1:500	cromogénico, fluorescencia
Anti-IgG de conejo	cabra	secundario	1:500	cromogénico
PAP	conejo	terciario	1:1000	cromogénico
Anti-PRL de tilapia	ratón	primario	1:1000	fluorescencia
Anti-IgG de conejo ¹	cabra	secundario	1:200	fluorescencia
Anti-IgG de ratón ²	cabra	secundario	1:200	fluorescencia

Tabla 2: Anticuerpos y sus características utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica.

1: Anticuerpo conjugado a Alexa[®]488, emite fluorescencia verde. 2: Anticuerpo conjugado a Alexa[®]568, emite fluorescencia roja.

4. RESULTADOS

4.1 Clonamiento del precursor de isotocina

Una vez finalizada la extracción de RNA total a partir de hipotálamo de *Salmo salar*, la integridad de éste fue corroborada mediante electroforesis en condiciones denaturantes. En la Figura 4 se pueden distinguir claramente las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18S y 28S, características de una muestra de RNA total bien conservado. Con este resultado se demuestra que el RNA aislado presentaba una calidad apropiada, haciéndolo viable para los posteriores ensayos en que sería empleado.

El cDNA sintetizado a partir de los RNAs mensajeros presentes en la muestra de RNA total sirvió como templado para la amplificación por PCR en la que se esperaba observar un producto de 510 pb. Este fragmento de DNA correspondería, según el diseño de los partidores, a la región codificante del RNA mensajero del precursor de isotocina. En la Figura 5 se puede apreciar el amplicón resultante, el que se ajusta perfectamente al tamaño esperado.

Con el objetivo de obtener una mayor cantidad del producto de PCR, el amplicón de 510 pb fue ligado al vector de clonamiento pGEM-Teasy para ser así amplificado mediante clonamiento en *E. coli* JM109. La Figura 6 muestra el inserto escindido del vector, el cual tiene un tamaño de 530 pb, mediante su digestión con la enzima de restricción *EcoRI* realizada en 10 clones seleccionados al azar. De estos clones, el número 6 fue seleccionado para ser purificado y secuenciado.

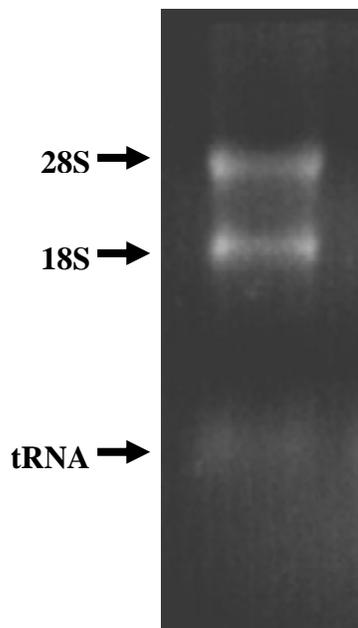


Figura 4: Fraccionamiento en gel de agarosa-formaldehído de la muestra de RNA total de hipotálamo de *S. salar*. Fueron cargados 3 μg de RNA total en el carril.

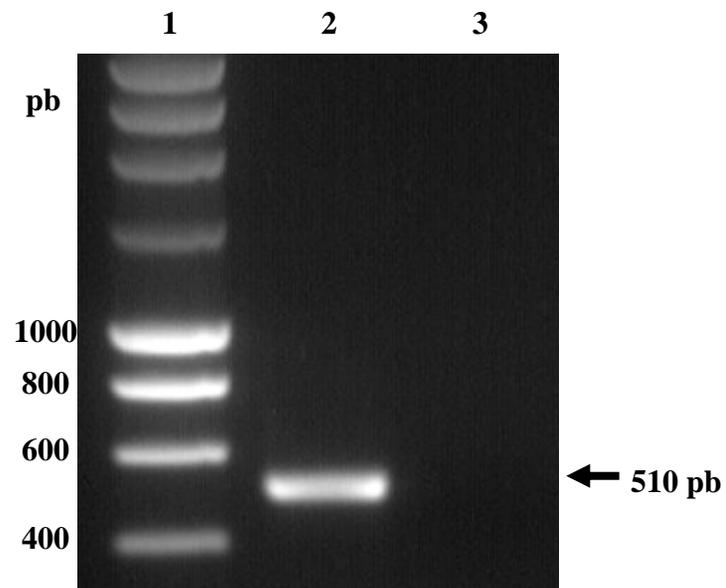


Figura 5: Fraccionamiento en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR utilizando los partidores *SSIT-1f* y *SSIT-2r*. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular *Smart* (Eurogentec). **Carril 2:** Amplificación usando cDNA de hipotálamo como templado. **Carril 3:** Amplificación sin templado (control negativo).

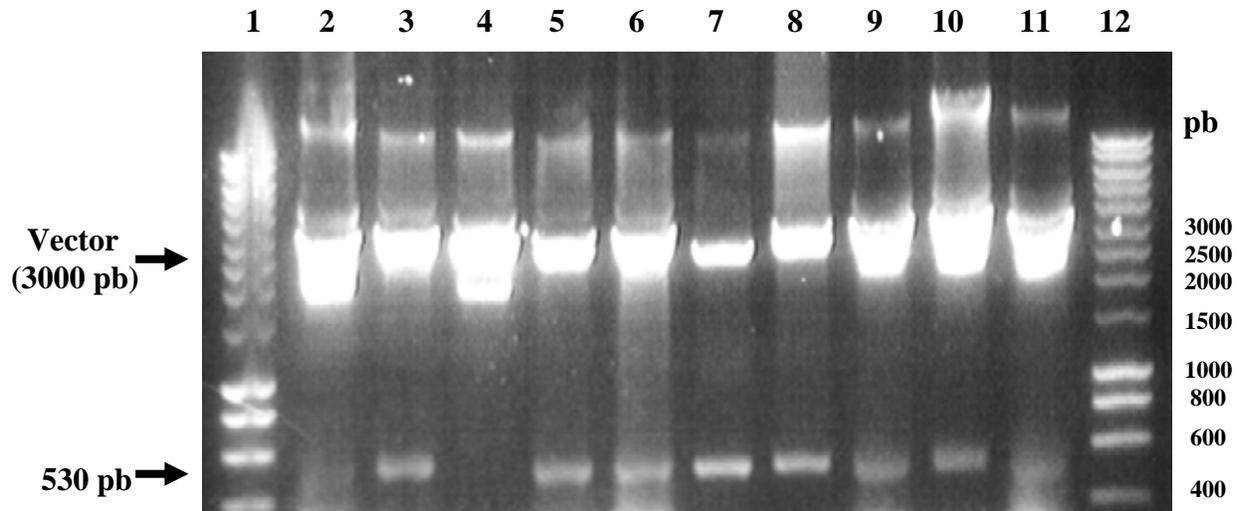


Figura 6: Fraccionamiento en gel de agarosa al 1% de los productos de las digestiones con la enzima *EcoRI* a las preparaciones de DNA plasmidial de los clones. **Carriles 1 y 12:** Marcador de tamaño molecular *Smart* (Eurogentec). **Carriles 2 a 11:** Digestión de DNA plasmidial correspondiente a los diez clones tomados al azar.

Previo a la secuenciación, se deseó comprobar que el amplicón de 510 pb correspondía efectivamente a la secuencia buscada. Se buscaron sitios de restricción conservados en los cDNAs de los precursores de isotocina de los salmónidos cercanos *Oncorhynchus keta*, *O. nerka* y *O. masou*. Así, se emplearon las enzimas de restricción *NcoI* y *SmaI*, las que digieren el cDNA en fragmentos de 430 y 80 pb y en fragmentos de 343 y 167 pb, respectivamente. Los resultados de dichas digestiones se presentan en la Figura 7, en la que se observan bandas que se ajustan a lo esperado. Da aquí en adelante el clon será nombrado psIT-1.

La Figura 8 muestra la secuencia nucleotídica resultante de 510 pb, dentro de la cual se encuentra la región codificante de este precursor de 480 pb, comprendida entre las bases número 21 y 500. Además, se expone la secuencia aminoacídica deducida en la que se destacan las regiones características para este tipo de precursor: el péptido señal en el extremo N-terminal, seguido del nonapéptido propiamente tal, un sitio de procesamiento proteolítico, neurofisina y copeptín en el extremo C-terminal.

Estableciendo una comparación entre el clon psIT-1 y las secuencias *O. keta*, *O. Nerka*, *O. masou* y *C. carpio* se observa una alta similitud entre ellas, especialmente al cotejarla con las secuencias de los tres salmónidos, en donde la identidad supera el 90%. Por otra parte, el segmento correspondiente al nonapéptido de isotocina es idéntico en las cinco secuencias (ver recuadro en la Figura 9). Todo esto sugiere que estamos efectivamente en presencia del cDNA del precursor de isotocina de *S. salar*.

Del mismo modo, la secuencia aminoacídica presenta también una gran analogía con las de los salmónidos aquí comparados, con una identidad superior al 90% y una homología mayor al 95%. Este punto se ilustra en la Figura 10, en donde se incluyen las secuencias de los precursores de vasopresina bovina (*Bos taurus*), humana (*Homo sapiens*) y del cobayo (*Cavia porcellus*).

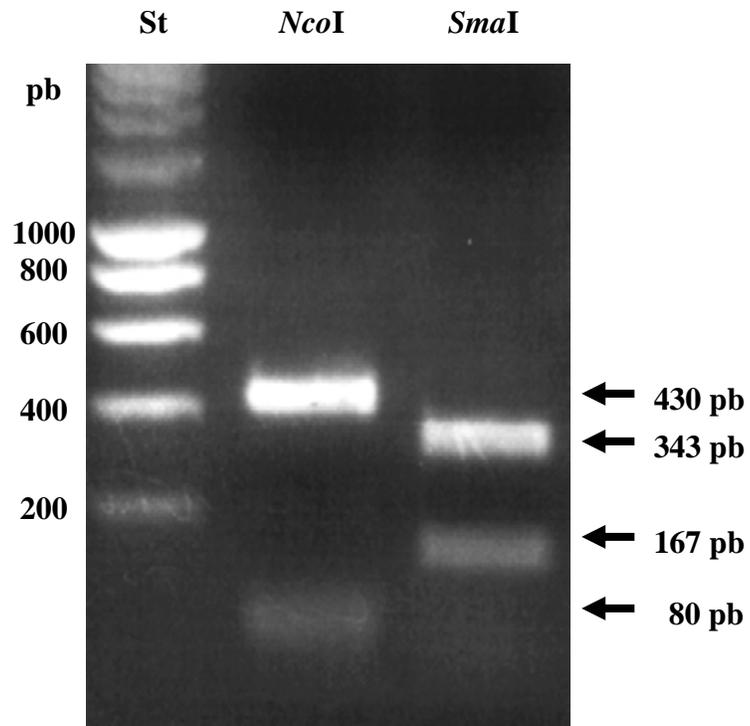


Figura 7: Fraccionamiento por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de digestión del clon psIT-1.

5'	CAAAGCCTCAACCTCAACAC <u>ATGGCTATGTTTGGCACCCCAGTGTCT</u>	47
	<u>M A M F G T P V S</u>	9
48	GCCCTCTGTCTGCTGTTCCCTGCTATCTGTATGCACTGCCTGCTACATCTCC	98
10	A L C L L F L L S V C T A C Y I S	26
99	AACTGCCCCATAGGAGGCAAGAGATCAGCACTAGCTTTCCCATCCAGAAAG	149
27	N C P I G G K R S A L A F P S R K	43
150	TGCATGTCATGTGGCCCCGGGGACAGGGGCCGCTGCTTTGGCCCAATATC	200
44	C M S C G P G D R G R C F G P N I	60
201	TGCTGTGGGGAGGGGATGGGCTGCTACGTGGGCTCTCCAGAGGCAGCTGGC	251
61	C C G E G M G C Y V G S P E A A G	77
252	TGCGTGGATGAGAACTACCTGCCCTCCCCCTGTGAGGCCGGAGGAAGAGTG	302
78	C V D E N Y L P S P C E A G G R V	94
303	TGTGGCACTGAGGAGGGACGTTGTGCTGCACCGGGGATCTGCTGTGACGTG	353
95	C G T E E G R C A A P G I C C D V	111
354	GAGGGTTGTAGTATTGACCAATCCTGTACTGAGGAGGACGAAGCCGAATAC	404
112	E G C S I D Q S C T E E D E A E Y	128
405	ATAAGCCAATCAGTGAGCCGTAGCCATGGCCACGATCTGCTGATGAAGCTT	455
129	I S Q S V S R S H G H D L L M K L	145
456	CTGAACATGATTAGCCACACCCCTCCCCACAGAGTCCACCA <u>ATAAA</u> CAGC	506
147	L N M I S H T P P H R V H Q Stop	159
507	CTCT	3'

Figura 8: Secuencia nucleotídica de psIT-1 clonado a partir de cDNA de hipotálamo de *S. salar* utilizando los partidores *SSIT-1f* y *SSIT-2r*. La secuencia de 510 pb contiene una región codificante de 480 pb, cuya secuencia aminoacídica deducida se muestra abajo. En la secuencia aminoacídica se destaca en rojo a isotocina, en azul a neurofisisina y en verde a copeptín. Se destacan subrayados los codones de inicio y de término.

1 S. salar	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90
2 O. keta	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3 O. nerka	AACCATCGACAAATT	OGCAGATCATCTCA	TCAAAGCCTCAACCT	CAACACATGGCT--A	TGTTTTGGCACCCTCAG	42
4 O. masou	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5 C. carpio	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1 S. salar	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
2 O. keta	TGCTGTTCCCTGCTAT	CTGTATGCACCTGCT	GCTACATCTCCAACCT	GCCCCATAGGAGGCA	AGAGATCAGCAGCTAG	132
3 O. nerka	TGTCGGCCCTCTGTG	TGCTGTTCCCTGCTAT	CTGTATGCACCTGCT	GCCCCATAGGAGGCA	AGAGATCAGCAGCTAG	178
4 O. masou	TGCTGTTCCCTGCTAT	CTGTATGCACCTGCT	GCTACATCTCCAACCT	GCCCCATAGGAGGCA	AGAGATCAGCAGCTAG	140
5 C. carpio	TGCTGTTCCCTGCTAT	CTGTATGCACCTGCT	GCTACATCTCCAACCT	GCCCCATAGGAGGCA	AGAGATCAGCAGCTAG	154
1 S. salar	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270
2 O. keta	AGTGCAATGTCATGTG	GCCCCGGGACAGGG	GCCGCTGCTTTGGCC	CAAAATATCTGCTGTG	GGGAGGGGATGGCT	222
3 O. nerka	AGTGCAATGTCATGTG	GCCCCGGGACAGGG	GCCGCTGCTTTGGCC	CAAAATATCTGCTGTG	GGGAGGGGATGGCT	268
4 O. masou	AGTGCAATGTCATGTG	GCCCCGGGACAGGG	GCCGCTGCTTTGGCC	CAAAATATCTGCTGTG	GGGAGGGGATGGCT	230
5 C. carpio	AGTGCAATGTCATGTG	GCCCCGGGACAGGG	GCCGCTGCTTTGGCC	CAAAATATCTGCTGTG	GGGAGGGGATGGCT	244
1 S. salar	285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360
2 O. keta	CAGAGGCCAGCTGGCT	CGGTGGATGAGAACT	ACCTGCCCCCTCCCT	GTGAGGCCGGAGGAA	GAGTGTGTGGCTCTG	312
3 O. nerka	CAGAGGCCAGCTGGCT	CGGTGGATGAGAACT	ACCTGCCCCCTCCCT	GTGAGGCCGGAGGAA	GAGTGTGTGGCTCTG	358
4 O. masou	CAGAGGCCAGCTGGCT	CGGTGGATGAGAACT	ACCTGCCCCCTCCCT	GTGAGGCCGGAGGAA	GAGTGTGTGGCTCTG	320
5 C. carpio	CAGAGGCCAGCTGGCT	CGGTGGATGAGAACT	ACCTGCCCCCTCCCT	GTGAGGCCGGAGGAA	GAGTGTGTGGCTCTG	283
1 S. salar	375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450
2 O. keta	CTGCACCCGGGATCT	GCTGTACCTGGAGG	GTTGTAGTATTGACC	AATCTCTACTGAGG	AGGACGAAGCCGAAT	402
3 O. nerka	CTGCACCCGGGATCT	GCTGTACCTGGAGG	GTTGTAGTATTGACC	AATCTCTACTGAGG	AGGATGAAGCTGAAT	448
4 O. masou	CTGCACCCGGGATCT	GCTGTACCTGGAGG	GTTGTAGTATTGACC	AATCTCTACTGAGG	AGGATGAAGCTGAAT	410
5 C. carpio	CTGCACCCGGGATCT	GCTGTACCTGGAGG	GTTGTAGTATTGACC	AATCTCTACTGAGG	AGGATGAAGCTGAAT	370
1 S. salar	465 466	480 481	495 496	510 511	525 526	540
2 O. keta	TGAGCCGTAGCCA-T	GGCCACGATCTGCTG	ATGAAAGCTTCTGAAAC	ATGATTAGCCACACC	CCTCCCCACAGAGTGC	491
3 O. nerka	TGAGCCGTAGCCA-T	GGCCACGATCTGCTG	ATGAAAGCTTCTGAAAC	ATGATTAGCCACACC	CCTCCCCACAGAGTGC	537
4 O. masou	TGAGCCGTAGCCA-T	GGCCACGATCTGCTG	ATGAAAGCTTCTGAAAC	ATGATTAGCCACACC	CCTCCCCACAGAGTGC	499
5 C. carpio	TGAGCCGTAGCCA-T	GGCCACGATCTGCTG	ATGAAAGCTTCTGAAAC	ATGATTAGCCACACC	CCTCCCCACAGAGTGC	513
1 S. salar	555 556	570 571	585 586	600 601	615 616	630
2 O. keta	CTCTAATTCAGTGGC	AGTCCGTGATTTGAAA	GACAGTGTAAAAAAT	CTGTACATCTCAAT	GTCAGAGGCATACCT	510
3 O. nerka	CTCTAATTCAGTGGC	AGTCCGTGATTTGAAA	GACAGTGTAAAAAAT	CTGTACATCTCAAT	GTCAGAGGCATACCT	627
4 O. masou	CTCTAATTCAGTGGC	AGTCCGTGATTTGAAA	GACAGTGTAAAAAAT	CTGTACATCTCAAT	GTCAGAGGCATACCT	589
5 C. carpio	CTCTAATTCAGTGGC	AGTCCGTGATTTGAAA	GACAGTGTAAAAAAT	CTGTACATCTCAAT	GTCAGAGGCATACCT	595

Figura 9: Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica del cDNA del precursor de isotocina de *S. salar*. Se compara con las secuencias correspondientes de tres salmónidos cercanos, más el de carpa (*Cyprinus carpio*). En el recuadro se indica la secuencia que codifica para el nonapéptido de isotocina.

4.2 Cuantificación de los niveles de mRNA de isotocina

Teniendo como objetivo evaluar la posible relación entre copeptín y prolactina, y la interacción de esta última con el sistema inmune del pez; se quiso evaluar los posibles cambios en los niveles de copeptín que se pudieran producir cuando un individuo se ve enfrentado a algún agente patógeno. Para establecer estas diferencias se compararon los niveles del mensajero del precursor de isotocina, el cual contiene la secuencia codificante de copeptín, en distintas poblaciones de peces según el estado patológico en que éste se encuentre.

Se tomaron para este efecto tres poblaciones de peces (alevines de 20 a 30 g), de las cuales dos correspondían a grupos de individuos sobrevivientes al desafío con los patógenos *Vibrio ordalii* y *Piscirickettsia salmonis*, y una tercera al grupo control. Los desafíos se realizaron inyectando un inóculo de 10^3 UFC/ml vía intraperitoneal de la correspondiente bacteria diluida en solución salina (NaCl 0,85%); siendo los peces tomados para este trabajo los supervivientes tras 35 días post-inyección, los que presentaban todos los signos característicos de cada infección. El grupo control fue inoculado solamente con el medio salino.

Se extrajo el RNA total a partir de pools de las muestras de hipotálamo de alevines en los diferentes estados patológicos y se comprobó la integridad de éste por medio de una electroforesis en condiciones denaturantes, en la que se observaron las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18S y 28S, indicativo de la presencia de un RNA en buenas condiciones. El resultado de esta electroforesis de las tres muestras se expone en la Figura 11, en donde cada carril fue cargado con el RNA total proveniente de pools de hipotálamos de peces sanos (n=10), infectados con *V. ordalii* (n=9) y con *P. salmonis* (n=5).

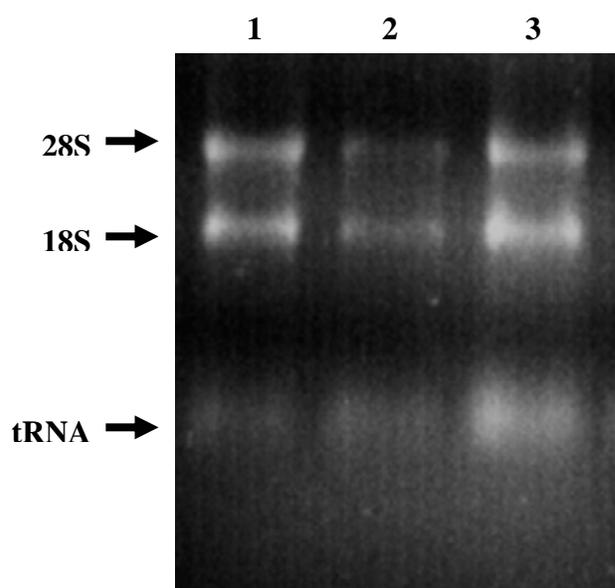


Figura 11: Fraccionamiento en gel de agarosa-formaldehído de las muestras de RNA total de hipotálamo de alevines de *S. salar*. **Carril 1:** Peces sanos. **Carril 2:** Peces infectados con *V. ordalii*. **Carril 3:** Peces infectados con *P. salmonis*. Fueron cargados 3 μg de RNA total en cada carril.

4.2.1 Cuantificación del transcrito de isotocina mediante RT-PCR semicuantitativo

A modo de una primera estimación, se compararon los niveles del mensajero de isotocina entre las distintas poblaciones de peces mediante RT-PCR normalizando las muestras con el transcrito de un gen cuya expresión es estable: β -actina. Si bien ha sido demostrado en carpa que la expresión de este gen puede variar bajo determinadas condiciones (Sarmiento *et al.*, 2000), en este caso se considera como expresión constitutiva debido a que todas las poblaciones eran homogéneas.

Primeramente se llevó a cabo una cinética de amplificación con la finalidad de tener la certeza de que ambos amplicones tuvieran un similar comportamiento durante la reacción de PCR. La reacción se efectuó según lo descrito en el punto 3.2.2.2 y el resultado de este proceso se ilustra en la Figura 12.

Una vez comprobado que tanto β -actina como isotocina poseían similar cinética de amplificación, se eligió un número de ciclos en que ambas reacciones estuvieran en la fase exponencial del proceso. Bajo este criterio, se optó por realizar el RT-PCR semicuantitativo a 30 ciclos. La reacción se llevó a cabo según lo descrito en el punto 3.2.2.3 y se evaluaron por este medio las diferencias en la transcripción de isotocina según dos variables: el estado patológico y la edad del pez. Los resultados de este proceso se muestran en la Figura 13.

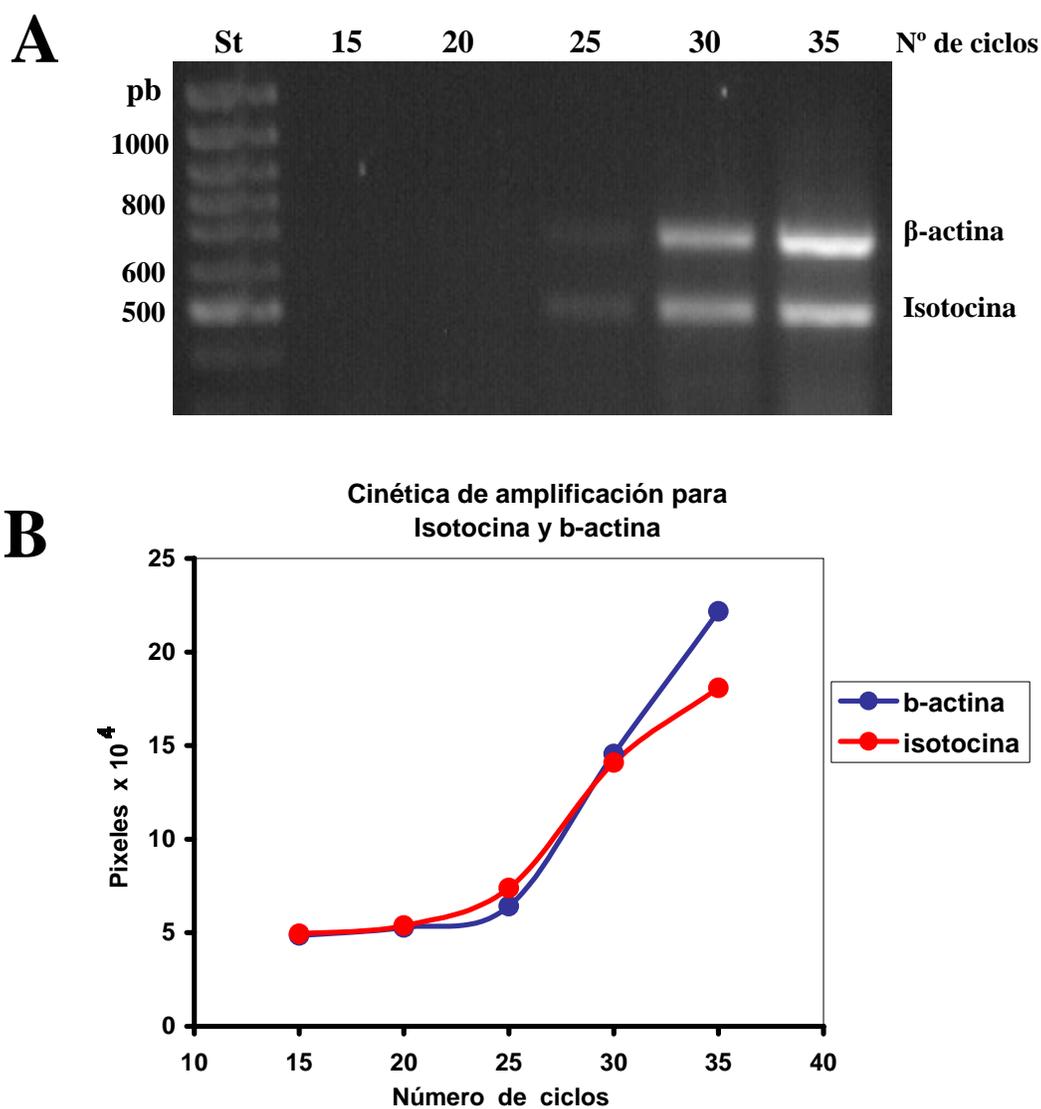
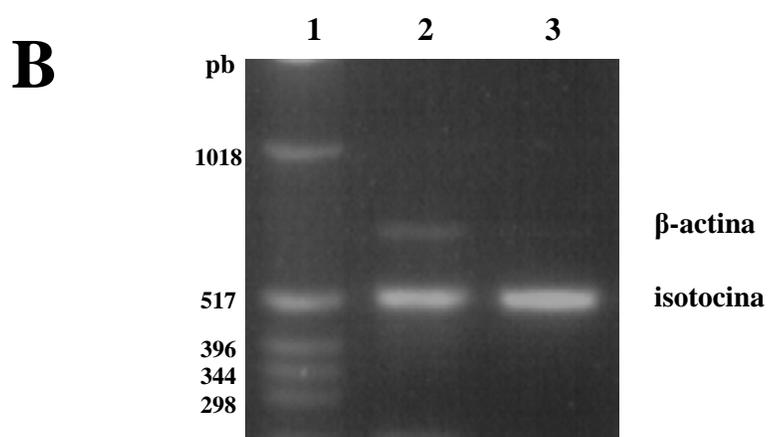
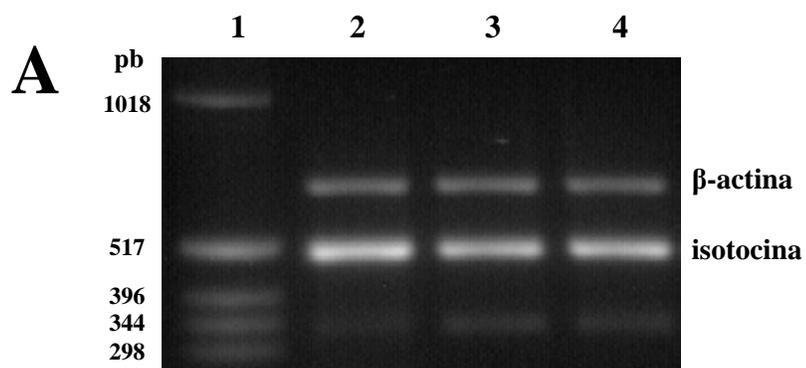


Figura 12: Cinética de amplificación para isotocina y β -actina. **A)** Fraccionamiento electroforético de los amplicones de isotocina y β -actina en el que se muestra la cantidad de producto a cada número de ciclo indicado. **B)** Gráfico que ilustra el aumento en la cantidad de cada amplicón a medida que avanza la reacción de amplificación. La imagen en (A) fue digitalizada y cada banda fue cuantificada utilizando el programa Un-Scan-It; el valor (en píxeles) se grafica contra el número del ciclo correspondiente.



C

Niveles de expresión relativa de isotocina
en hipotálamo de *Salmo salar*

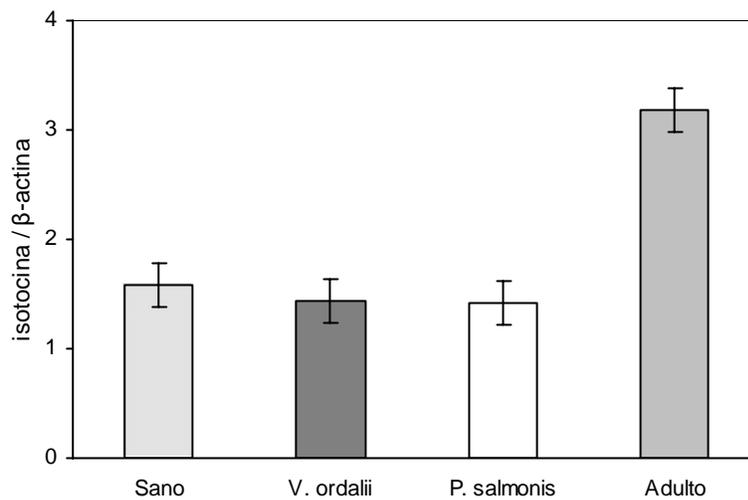


Figura 13: Comparación de los niveles de transcrito de isotocina entre diferentes muestras de *S. salar* mediante RT-PCR doble utilizando los juegos de partidores para isotocina y β -actina. **A)** Fraccionamiento en gel de agarosa de los productos para las muestras de alevines en diferentes estados patológicos. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular. **Carril 2:** Peces sanos. **Carril 3:** Peces infectados con *V. ordalii*. **Carril 4:** Peces infectados con *P. salmonis*. **B)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos para las muestras de peces en diferentes estados etarios. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular. **Carril 2:** Alevines. **Carril 3:** Peces adultos. **C)** Gráfico que ilustra las diferencias en la transcripción de isotocina para las distintas condiciones. Las imágenes en (A) y (B) fueron digitalizadas y cada banda fue cuantificada utilizando el programa Un-Scan-It. La relación entre los valores (en píxeles) de las bandas de isotocina y β -actina da cuenta de la cantidad relativa de mensajero presente en cada muestra.

4.2.2 Cuantificación del transcrito de isotocina mediante RT-PCR competitivo

Para determinar valores de transcripción de isotocina más precisos se llevó a cabo un ensayo de competencia o RT-PCR competitivo. Para esto se construyó un DNA que contiene sitios de unión al mismo juego de partidores, *SSIT-1f* y *SSIT-2r*, y por lo tanto compite con el cDNA de isotocina durante la amplificación por PCR. La construcción del DNA competidor se expone en el punto 3.2.3 en materiales y métodos.

Al igual que en el punto anterior, primero se determinó si el DNA competidor MIMICS posee una cinética de amplificación similar al del cDNA de isotocina. La reacción se realizó según lo descrito en el punto 3.2.4 y el resultado del análisis electroforético se ilustra en la Figura 14. Con este resultado queda corroborado el hecho de que el competidor se comporta de manera semejante al cDNA de isotocina durante la reacción de amplificación.

Tomando en cuenta el resultado anteriormente descrito, se seleccionó un número de ciclos en que ambas reacciones estuvieran en la fase exponencial del proceso. Así, se decidió realizar el ensayo de competencia a los 30 ciclos. La reacción se efectuó según lo descrito en el punto 3.2.5 y en este punto se evaluaron las diferencias en la transcripción de isotocina tomando en cuenta solamente la variable del estado patológico del pez, es decir, se compararon las muestras de alevines sanos e infectados con las dos bacterias patógenas anteriormente mencionadas (*V. ordalii* y *P. salmonis*).

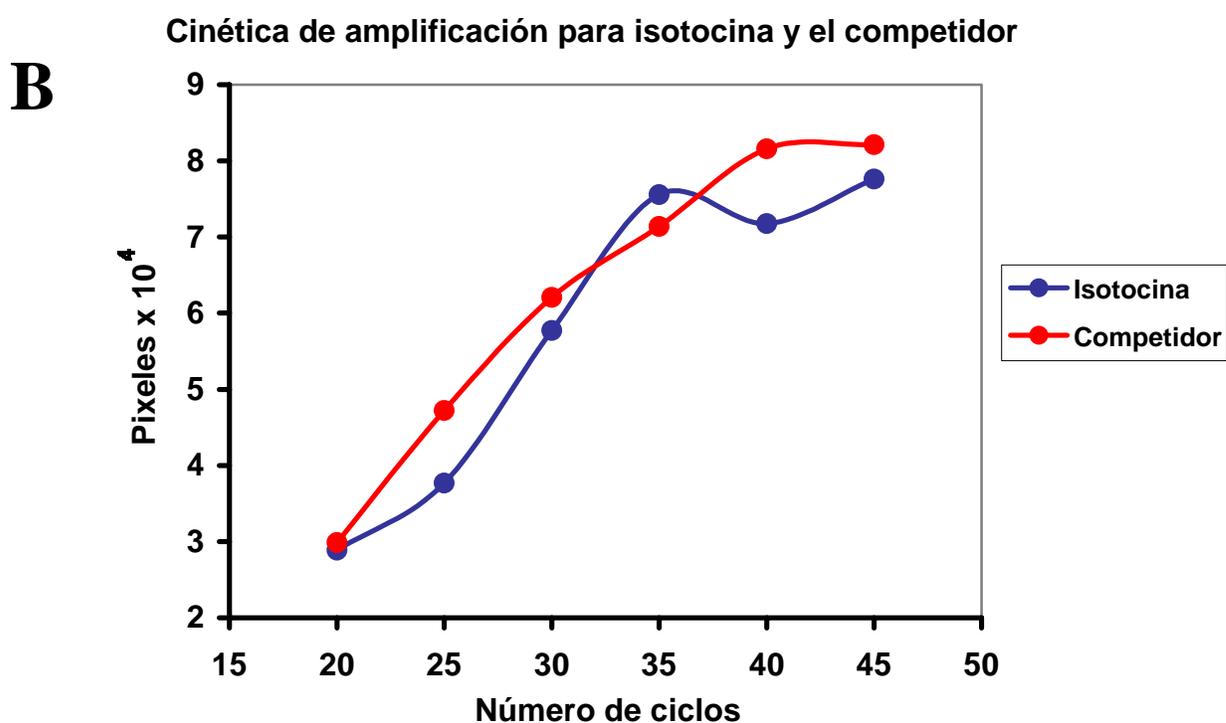
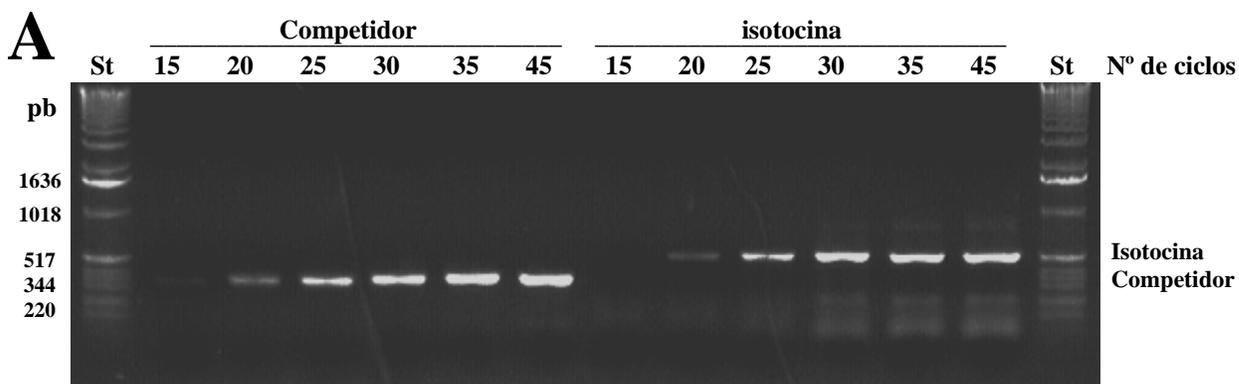


Figura 14: Cinética de amplificación para isotocina y el competidor. **A)** Fraccionamiento electroforético de los amplicones de isotocina y competidor en el que se muestra la cantidad de producto a cada número de ciclo indicado. **B)** Gráfico que ilustra el aumento en la cantidad de cada amplicón a medida que avanza la reacción de amplificación. La imagen en (A) fue digitalizada y cada banda fue cuantificada utilizando el programa Un-Scan-It; el valor (en píxeles) se grafica contra el número del ciclo correspondiente.

En los resultados expuestos en la Figura 15-A se puede observar la base del funcionamiento del RT-PCR competitivo. Para cada muestra, a medida que la cantidad molar de DNA competidor presente en cada reacción es mayor, disminuye la amplificación del cDNA del precursor de isotocina, debido a que este último se encuentra en menor proporción en la mezcla. Al realizar un análisis mediante digitalización de la imagen del gel obtenido se puede hacer una relación entre la cantidad del DNA competidor y el cDNA de la muestra, graficando el logaritmo de la razón de intensidad de fluorescencia entre el DNA competidor sobre el cDNA, en función del logaritmo de la dilución de DNA competidor utilizada (Figura 15-B). Bajo condiciones de competencia, una relación de 1 entre la intensidad del producto de amplificación del competidor y su respectivo cDNA (cuando $Y=0$ en el gráfico de regresión lineal) significa que ambos templados se encuentran en cantidad equimolar, por lo que los valores de la cantidad de transcrito se puede obtener por simple interpolación en el gráfico.

Se realizó un cálculo para llevar los resultados obtenidos en el gráfico (15-B) a valores relacionados con la cantidad de RNA total. La cantidad molar de transcritos de isotocina para los peces sanos fue de 34,19 zeptomoles. Como en la reacción se agregaron 0,3 μl de cDNA sintetizados a partir de un stock 125 ng/ μl (es decir, se agregaron 37,5 ng de cDNA), dividiendo los 34,19 zmoles en 37,5 ng de cDNA obtenemos un resultado final de 0,912 atomoles por μg de RNA total. El cálculo anterior se hace válido bajo el supuesto de que la reacción de transcripción reversa tuvo una eficiencia del 100%. Los resultados de estos valores se exponen en la Figura 16.

Con este resultado se corrobora el punto anterior y en consecuencia se puede aseverar que no existen diferencias significativas en la transcripción de isotocina para las condiciones aquí estudiadas.

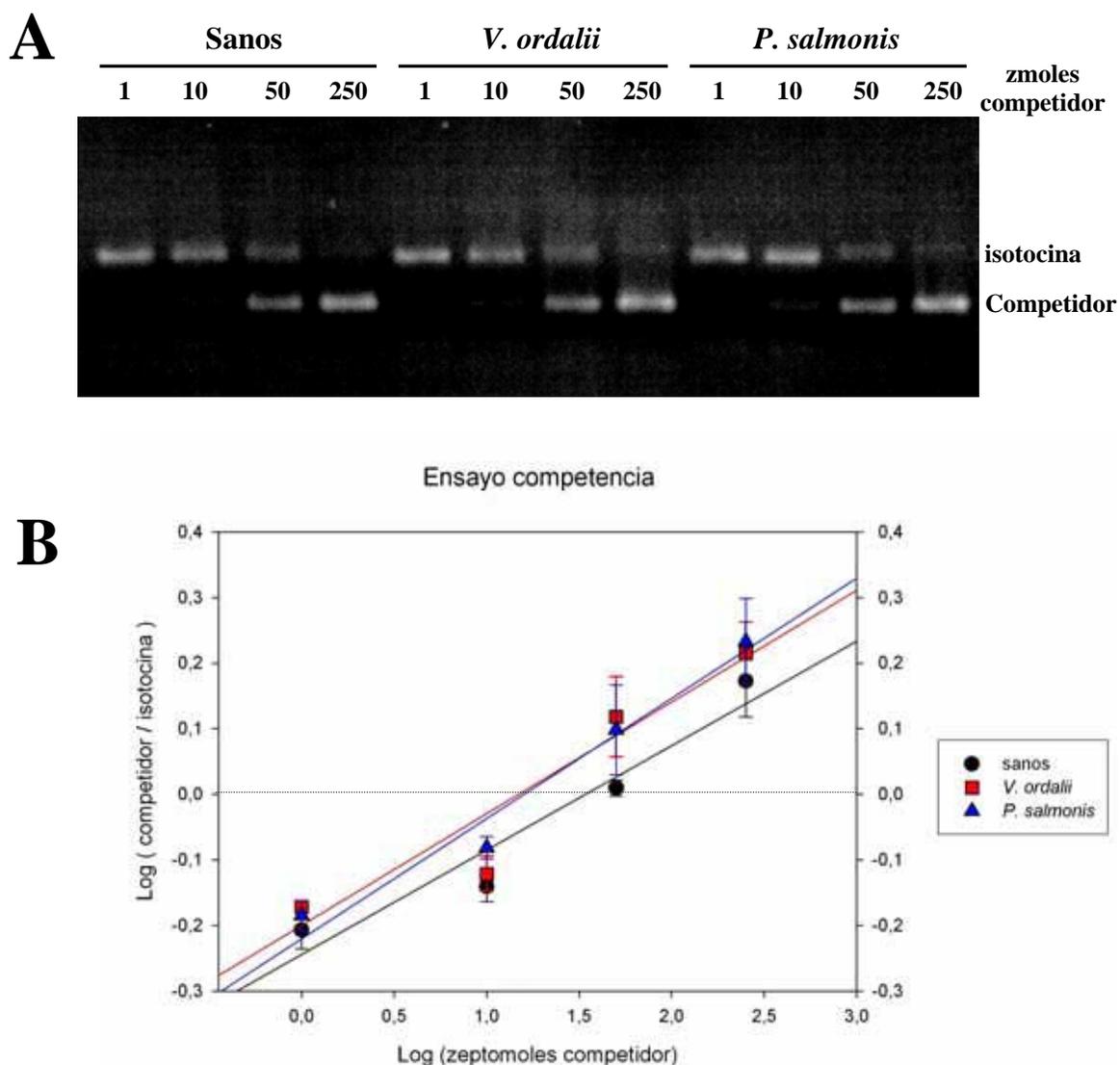
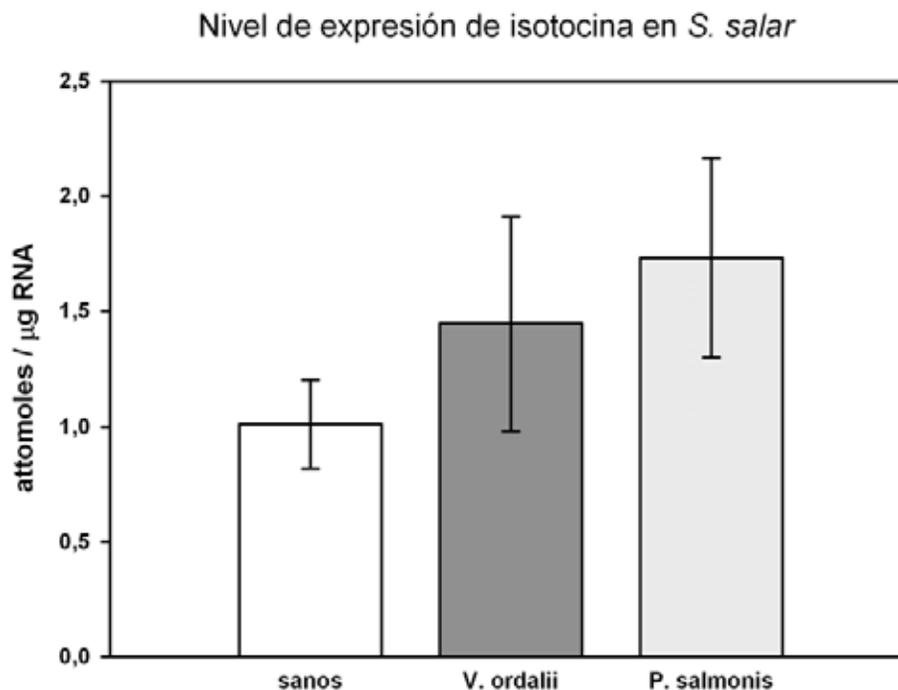


Figura 15: Ensayo de competencia. **A)** Análisis electroforético de los amplicones de isotocina y competidor para cada tipo de muestra. **B)** Gráfico de regresión lineal de intensidad de fluorescencia. La imagen en (A) fue digitalizada y cada banda fue cuantificada utilizando el programa Un-Scan-It. Cuando el valor de las ordenadas corresponde a cero, el valor interpolado en las abscisas es igual al Logaritmo de la cantidad molar de isotocina presente en la muestra.



	sanos	<i>V. ordalii</i>	<i>P. salmonis</i>
Concentración cDNA de isotocina (attomotes/µg RNA total)	1,011 ± 0,191	1,445 ± 0,464	1,731 ± 0,435

Figura 16: Niveles de mRNA de isotocina en hipotálamo de *S. salar* bajo diferentes estados patológicos. Cada ensayo de competencia se realizó por triplicado a partir de su correspondiente pool. El gráfico de barras representa el promedio de los valores obtenidos en cada ensayo \pm error estándar.

4.3 Distribución de copeptín y prolactina en encéfalo de *S. salar*

Secciones sagitales de la región media de encéfalos de *S. salar* adultos fueron utilizadas para este objetivo, el que se abordó de dos diferentes maneras: mediante inmunohistoquímica cromogénica y de fluorescencia doble. De esta forma se observó la distribución de copeptín y la de copeptín y prolactina en conjunto, respectivamente.

En la Figura 17-A se muestra una inmunohistoquímica de fluorescencia doble, en la que se utilizaron anticuerpos anti-Cp, en verde; y anti-PRL, en rojo. En esta imagen se puede tener una visión general de cómo este péptido es producido y secretado. Se observan cuerpos neuronales en la zona correspondiente al Núcleo preóptico (NPO), la misma región en donde se ha descrito que ocurre la síntesis de isotocina y vasotocina (Van den Dungen *et al.*, 1982). Asimismo se advierte la ruta seguida por sus axones, los que se prolongan a través del tallo hipofisiario para ir a desembocar a nivel de la neurohipófisis. También se pueden apreciar claramente en esta imagen las células lactotropas de la *Rostral pars distalis* (RPD); células grandes organizadas en acinos que sintetizan prolactina, por lo que se inmunotiñen fuertemente de color rojo. Un aumento mayor permite visualizar la cercanía existente entre los axones transportadores de copeptín y estas células (Figura 17-B), hecho que estaría avalando la posibilidad de una relación funcional entre ambas partes.

El ensayo de inmunohistoquímica cromogénica para Cp se muestra en la Figura 18-A. Aquí se aprecia la existencia de otro núcleo, de cuerpos neuronales de mayor tamaño, que dan una fuerte reacción positiva. Este resultado coincide con lo reportado en *Salmo gairdneri*, en donde las neuronas productoras de IT se encontraron en el NPO pars magnocellularis y las sintetizadoras de AVT, en el NPO pars parvocellularis (Van den Dungen *et al.*, 1982). En la imagen expuesta en 18-C se puede notar la diferencia en los tamaños de las células.

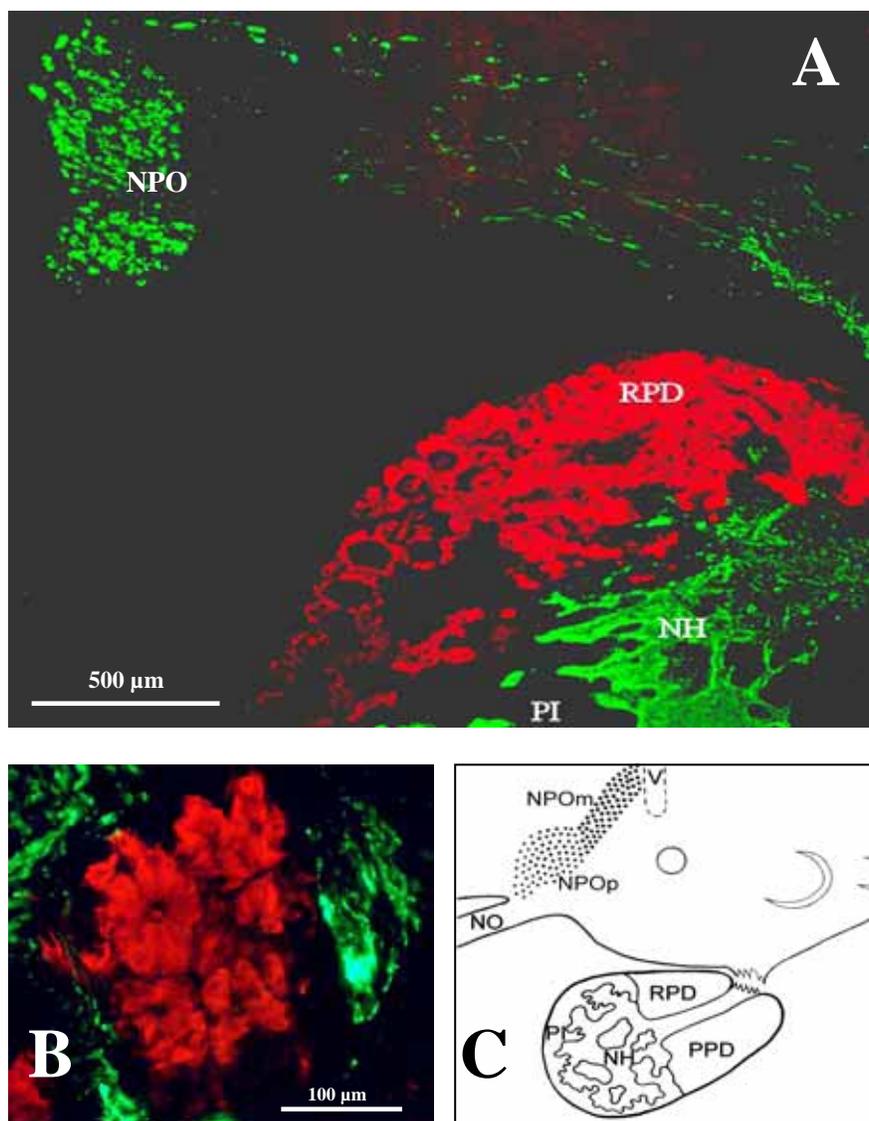


Figura 17: Inmunodetección de copeptín (verde) y prolactina (rojo) en corte sagital de la región hipotalámica y pituitaria de *S. salar* adulto. **A)** Perspectiva general de Cp y PRL en esta zona. **B)** Mayor aumento de un acino de la RPD y su cercanía con la señal positiva de copeptín. **C)** Esquema que ilustra las zonas de la hipófisis y el núcleo preóptico (NPO) del hipotálamo en teleósteos. NH: neurohipófisis, NO: nervio óptico, NPOm: NPO pars magnocellularis, NPOp: NPO pars parvocellularis, PI: pars intermedia, PPD: proximal pars distalis, RPD: rostral pars distalis, V: ventrículo.

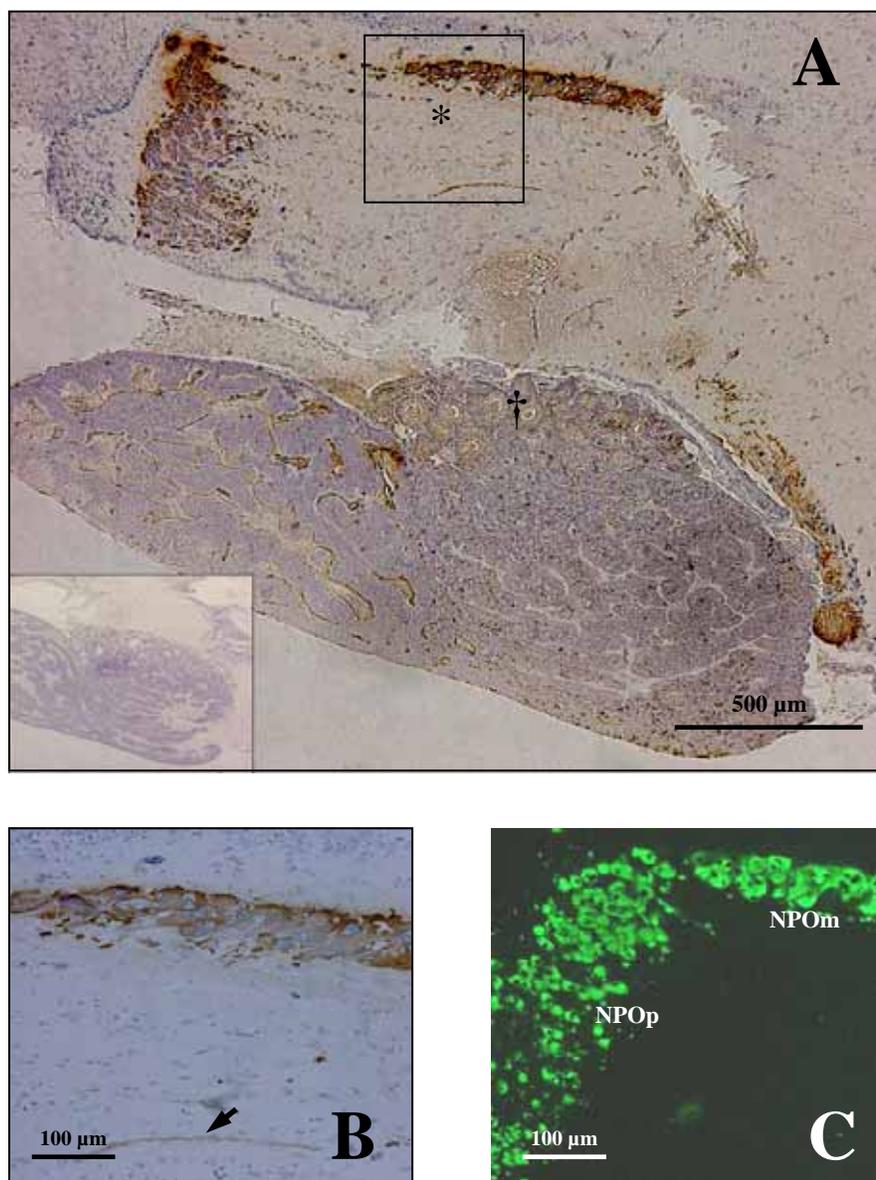


Figura 18: Inmunodetección de copeptín en corte sagital de la región hipotalámica y pituitaria de *S. salar* adulto. **A)** Inmunorreacción cromogénica. Recuadro inferior: control negativo sin anticuerpo primario. El asterisco indica la zona ampliada en las figuras B y C, la cruz indica la región ampliada en la Figura 19. **B)** Acercamiento de uno de los núcleos de cuerpos neuronales con reacción positiva. La flecha indica un axón transportando dicho péptido hasta su lugar de secreción. **C)** Inmunorreacción de fluorescencia. Se destaca aquí la existencia de dos tipos de cuerpos neuronales de diferente tamaño.

Otro punto interesante y que merece la pena ser destacado es el patrón observado a alto aumento en los acinos de las células lactotropas en la RPD. Aquí se observa una inmunoreacción en la región apical de estas células, además de una distribución radial con respecto al acino (Figura 19). También en esta imagen se puede notar reacción positiva en lo que, en un primer análisis, puede corresponder al líquido al interior del acino.

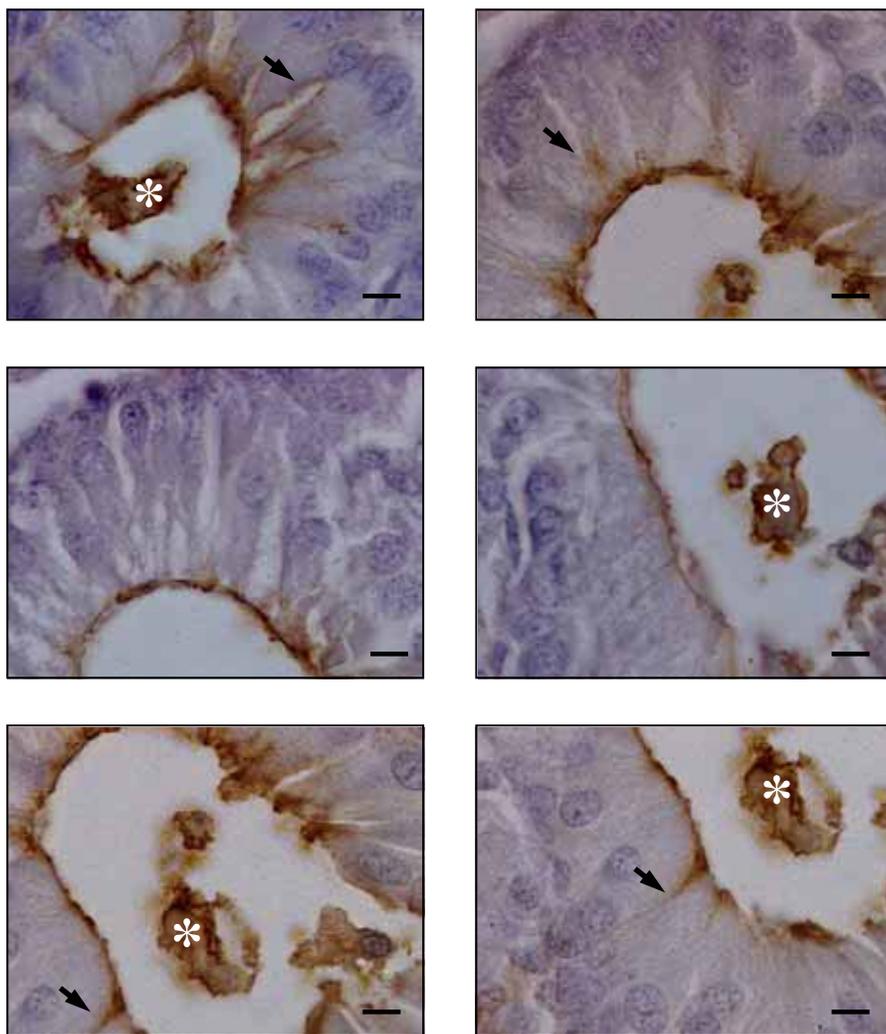


Figura 19: Inmunodetección de copeptín en *Rostral pars distalis* de pituitaria de *S. salar* adulto, correspondiente a la región demarcada con una cruz (†) en la Figura 18-A. Las imágenes muestran distintos acinos de células lactotropas de la RPD en la hipófisis. Las flechas indican la distribución radial respecto al acino de la señal y los asteriscos destacan lo que parece ser restos de líquido del interior del acino. Barra: 10 μ m.

4.4 Cuantificación de copeptín y prolactina en hipófisis de *S. salar*

Resultados anteriores mostraron que los niveles de mensajeros del precursor de isotocina no se ven alterados al encontrarse los peces en diferentes estados patológicos. El presente punto tiene como fin establecer si tales estados determinan alguna diferencia en los niveles tanto de copeptín como de prolactina, en su forma aminoacídica.

Este objetivo se realizó mediante inmunohistoquímica de fluorescencia en cortes de pituitaria de *S. salar* para detectar copeptín, según lo descrito en el punto 3.2.7.3. Se utilizaron para este efecto hipófisis de alevines sanos e infectados con *V. ordalii*, *P. salmonis* y *R. salmoninarum*, además de hipófisis de salmones adultos en etapa de agua salada.

Las Figuras 20 y 21 muestran los resultados para Cp al comparar alevines sanos con desafiados y alevines con adultos, respectivamente; en ellas solo se muestra una foto representativa de cada tipo. Del mismo modo, las Figuras 22 y 23 exponen los resultados para PRL comparando alevines sanos con desafiados y alevines con adultos, respectivamente. En el caso de prolactina existe la salvedad de que por la imposibilidad de conseguir un número adecuado de muestras, los datos correspondientes a alevines desafiados con *V. ordalii* no fueron incluidos.

Los gráficos que se presentan en las siguientes figuras fueron elaborados todos bajo el mismo sistema. Cada imagen digitalizada fue analizada con el programa Image Pro Plus, el que le otorga un valor de intensidad lumínica (luminosidad) a cada pixel. Así, el programa entrega un valor promedio de la luminosidad de todos los pixeles, descartando los pixeles no luminosos correspondientes al fondo negro, para cada fotografía. El gráfico de barras, finalmente, representa la media de estos valores de luminosidad entregados, y se incluye el error estándar para cada caso.

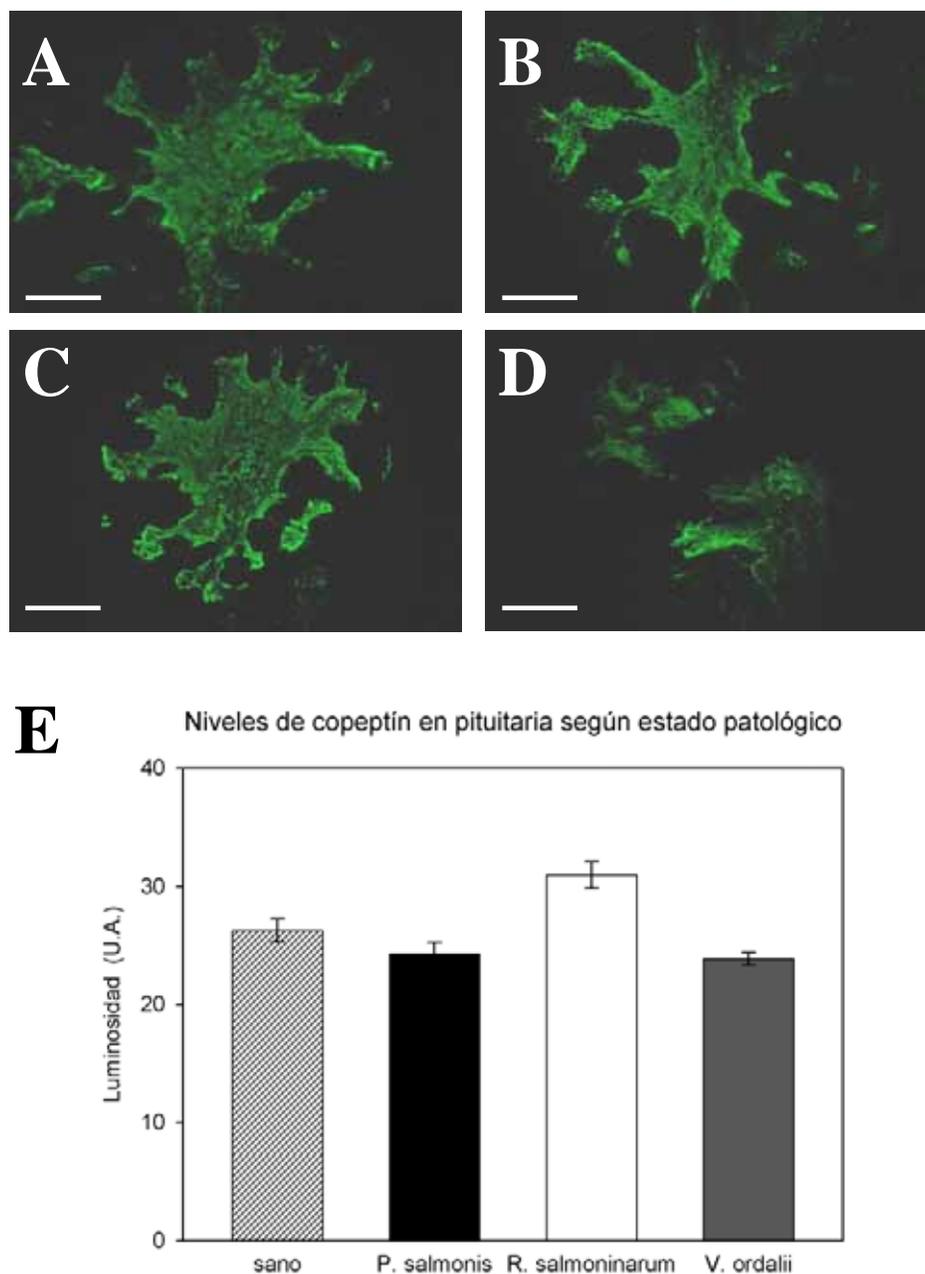


Figura 20: Inmunodetección de Cp en hipófisis de *S. salar* en distintos estados patológicos. **A)** Sanos (n=6). **B)** Desafiados contra *P. salmonis* (n=15). **C)** Desafiados contra *R. salmoninarum* (n=14). **D)** Desafiados contra *V. ordalii* (n=3). **E)** Gráfico de los niveles de inmunorreacción de copeptín en pituitaria para cada caso. Barras: 100 μ m. U.A. = Unidades Arbitrarias.

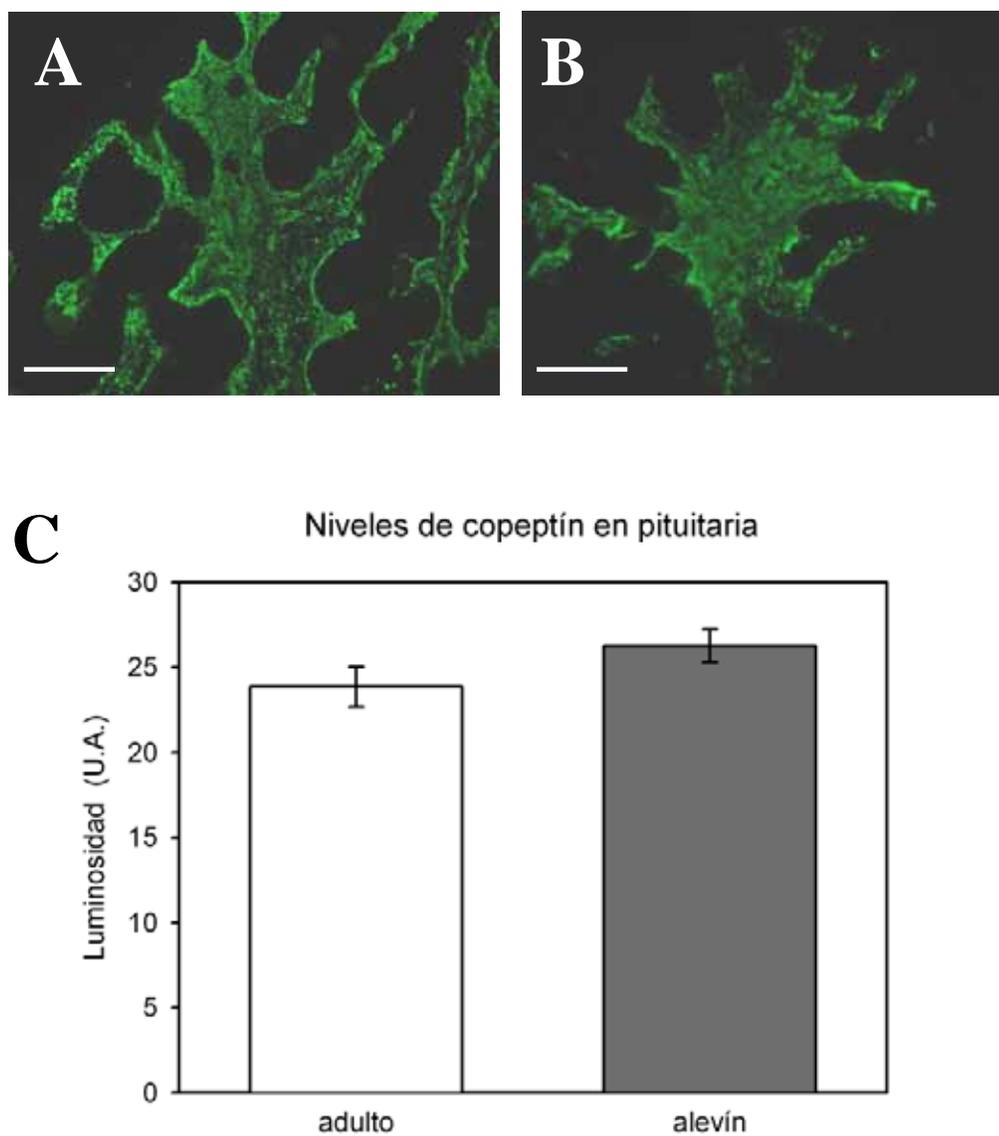


Figura 21: Inmunodetección de Cp en hipófisis de *S. salar* en distintos estados de desarrollo. **A)** Adultos. **B)** Alevines. **C)** Gráfico de los niveles de inmunorreacción de Cp en pituitaria para adultos (n=16) y alevines (n=6). Barras: 100 μ m. U.A. = Unidades Arbitrarias.

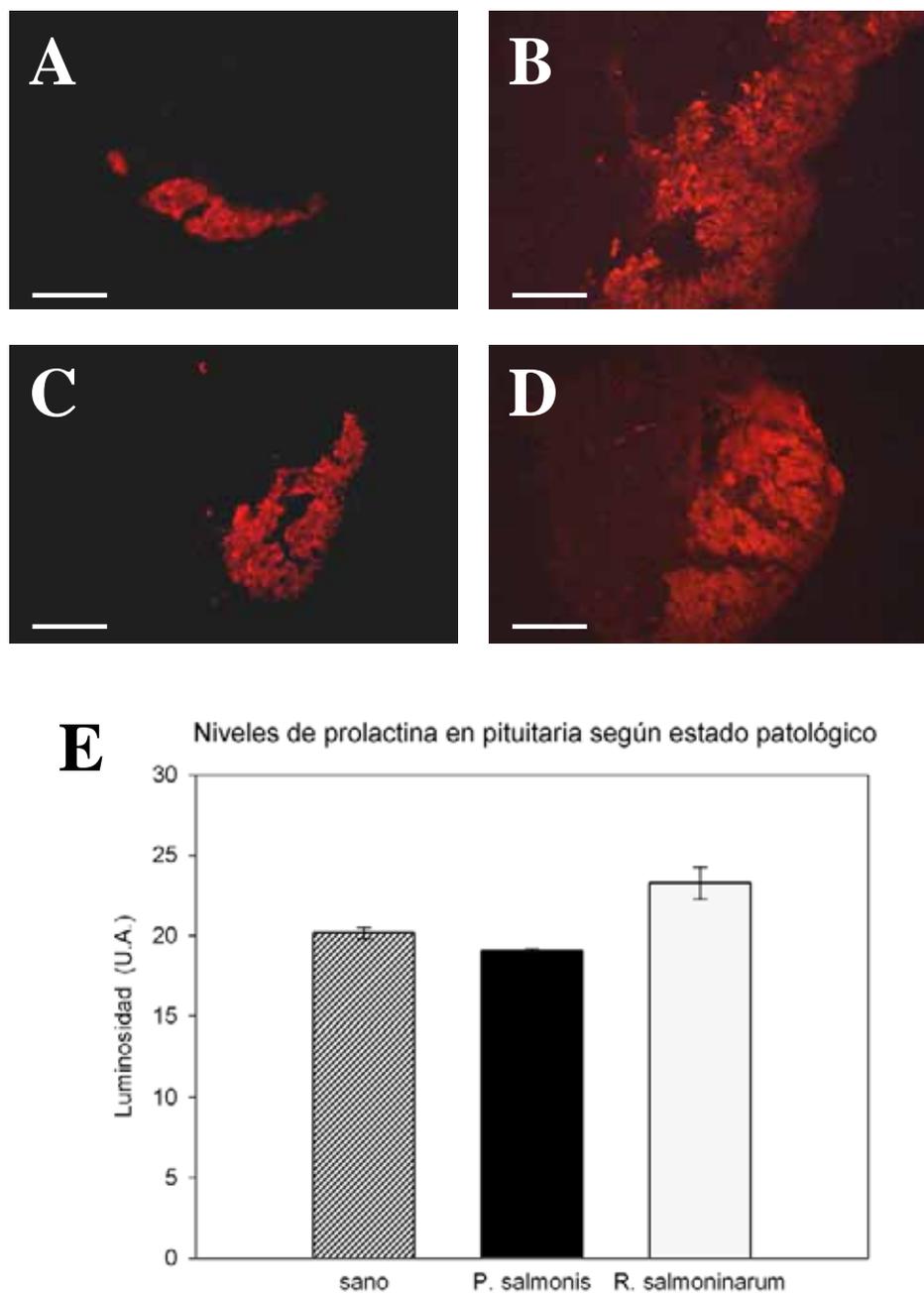


Figura 22: Inmunodetección de PRL en hipófisis de *S. salar* en distintos estados patológicos. **A)** Sanos (n=3). **B)** Desafiados contra *P. salmonis* (n=6). **C)** Desafiados contra *R. salmoninarum* (n=9). **D)** Desafiado contra *V. ordalii* (muestra única). **E)** Gráfico de los niveles inmunorreacción de prolactina en pituitaria para cada caso. Barras: 100 μ m. U.A. = Unidades Arbitrarias.

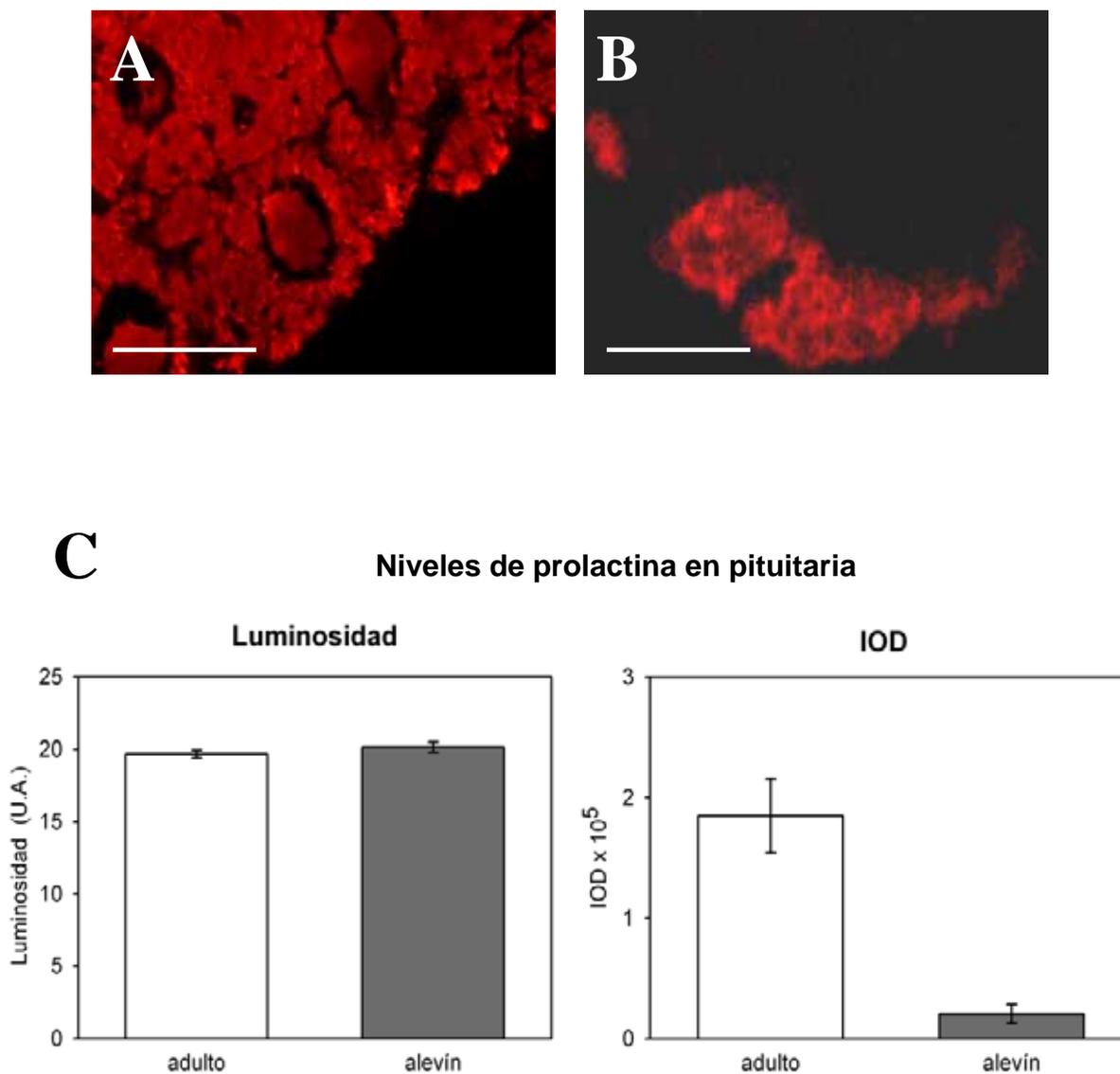


Figura 23: Inmunodetección de PRL en hipófisis de *S. salar* en distintos estados de desarrollo. **A)** Adultos. **B)** Alevines. **C)** Niveles de inmunorreacción de PRL en pituitaria para adultos (n=12) y alevines (n=3) evaluados de dos maneras: tomando solo la intensidad de la señal (luminosidad) y mediante un parámetro que incluye también la variable del área (IOD). Barras: 100 μ m. U.A. = Unidades Arbitrarias.

5. DISCUSIÓN

5.1 Clonamiento y caracterización molecular del precursor de isotocina de *S. salar*

A pesar de que el nombre “prolactina” hace alusión a la idea de un estímulo de la producción y/o secreción de leche, los efectos fisiológicos que le son atribuidos a esta hormona son tan vastos que ya en el año 1968 fueron propuestos los nombres “omnipotina” o “versatilina” para renombrarla (Bern & Nicoll, 1968). Sus más de 300 funciones descritas abarcan aspectos tan extensos y disímiles como comportamiento, metabolismo, balance de electrolitos, reproducción e inmunidad.

Basándose en la gran cantidad de funciones fisiológicas sobre las cuales PRL estaría ejerciendo algún efecto, resulta casi obvio que los mecanismos que regulan su síntesis/liberación no son nada simples. El presente trabajo se centró en el estudio de uno de los factores que estarían estimulando la secreción de PRL desde células lactotropas: copeptín. Aunque en mamíferos existen reportes contradictorios (Nagy *et al.*, 1988; Schally *et al.*, 1991), ensayos *in vitro* realizados en *C. carpio* alimentan la hipótesis de que este péptido posee efectivamente un efecto liberador de prolactina, al menos en peces (Soto, 2003).

Copeptín es sintetizado como parte de la poliproteína precursora de los nonapéptidos isotocina y vasotocina; consiste en un motivo rico en residuos de leucina ubicado al extremo carboxilo terminal de dicho precursor. Esta poliproteína fue clonada y secuenciada en *S. salar* en la actual tesis, obteniéndose como resultado la secuencia de la región codificante de su mRNA.

Al analizar los resultados, se puede notar claramente que el clon que se logró contiene las mismas características descritas para esta clase de precursores. Un alineamiento múltiple con las

secuencias nucleotídicas de otros peces da cuenta de una altísima identidad, especialmente cuando se la compara con las de especies cercanas. Los salmónidos *O. keta*, *O. nerka* y *O. masou* son las especies más íntimamente relacionadas cuyas secuencias se encontraron en la base electrónica de datos, por lo que fueron ellos los tomados como referencia para el diseño de partidores. Justamente con estas especies fue la mayor identidad observada entre las secuencias nucleotídicas, llegando sobre el 90% con cada una de ellas.

Era esperada en el transcurso del trabajo la existencia de una identidad tan alta con estas tres especies; tanto así, que previo a la secuenciación se realizaron digestiones con enzimas de restricción basándose exclusivamente en sitios conservados en ellas. Este es el resultado expuesto en la Figura 9, que sirvió como control para indicar que el proceso iba bien encaminado antes de enviar el clon a secuenciar.

En relación a la secuencia aminoacídica deducida, esta se ajusta perfectamente a lo esperado. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas arrojó también una gran similitud con las de las especies cercanas, sobre un 90% de identidad y 95% de homología con las de los salmonídeos analizados. Se observa en ella la estructura típica de estas poliproteínas, que enmarca a este grupo dentro de la gran familia de neuropéptidos regulatorios estructuralmente conservados y que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal (Nojiri *et al.*, 1986; Figueroa, 1995):

1) Péptido señal: consta de los primeros 22 residuos aminoacídicos y es una región rica en residuos hidrofóbicos, indicativa de que el péptido naciente debe ser ingresado al lumen del retículo endoplasmático durante la traducción.

2) Isotocina: residuos 23 al 31, corresponde al péptido biológicamente activo. Se encuentran presentes aquí los residuos de cisteína en la posición 1 y 6 del nonapéptido, las que forman un

puente disulfuro que mantiene la estructura tridimensional del mismo. El residuo de glicina número 32 corresponde a una señal de amidación (Van Kesteren *et al.*, 1992).

3) Señal de corte: la secuencia aminoacídica dibásica *Lys-Arg* es una señal de procesamiento proteolítico altamente conservado en esta familia de precursores.

4) Neurofisina: segmento rico en residuos de cisteína al que se le atribuye una función de plegamiento y transporte; en el clon obtenido está compuesto por los residuos 35 al 123. Los residuos de cisteína mencionados se encuentran altamente conservados en todas las especies.

5) Copeptín: extremo carboxilo terminal caracterizado por un núcleo rico en residuos de leucina, en el clon corresponde a los aminoácidos 124 al 159.

En mamíferos, el precursor de arginina-vasopresina contiene un sitio de N-glicosilación en el motivo Cp, dado por la secuencia *Asn - Xaa - Thr*, en donde *Xaa* es cualquier aminoácido hidrofóbico. En los precursores de arginina-vasotocina e isotocina que han sido clonados en diferentes especies de peces, esta señal se encuentra ausente (Heierhorst *et al.*, 1989; Figueroa *et al.*, 1989; Hyodo *et al.*, 1991; Flores, 2001). Como era de esperarse, este motivo carece de dicha señal de glicosilación en el salmón del Atlántico.

Al contrario de lo observado en los precursores de AVP en mamíferos, en la secuencia aminoacídica derivada de IT no se aprecia el sitio de procesamiento proteolítico entre neurofisina y copeptín, representado por un residuo básico de arginina (Van Kesteren *et al.*, 1992). Por lo tanto, al igual que lo reportado en otras especies de peces, es muy probable que ambos se encuentren formando parte de un solo dominio neurofisina/copeptín, tal como ha sido observado en carpa (Flores, 2001).

5.2 Copeptín, prolactina e inmunidad innata de *S. salar*

Cuando un organismo se ve enfrentado a un agente patógeno, se produce una activación del sistema inmune con el objetivo de eliminar al invasor. Tomando como base que el sistema inmune está regulado en parte por el sistema endocrino, y que dentro de las hormonas que participan en esta regulación encontramos a prolactina estimulando la respuesta, entonces se tiende a pensar inevitablemente que los niveles de esta hormona se podrían ver eventualmente aumentados. Si esto es verdadero, lo lógico sería que este aumento sea producto de una elevación en los niveles de los factores que estimulan su liberación. Así, uno de los objetivos de esta tesis correspondió a evaluar si bajo condiciones de patogenicidad, los niveles de copeptín se ven alterados; puesto que este motivo ha mostrado tener una relación con la liberación de PRL (Nagy *et al.*, 1988; Soto, 2003).

Para cumplir este objetivo se determinaron los valores del mRNA de isotocina en tres poblaciones de alevines: desafiados contra *Vibrio ordalii*, contra *Piscirickettsia salmonis* y un grupo control. Los detalles del desafío se explican en el punto 4.2 de los resultados. Los individuos utilizados fueron los sobrevivientes tras 35 días post-infección, es decir, los que resistieron hasta ese punto por “algo”; si ese “algo” fue un sistema inmune fortalecido por un mayor nivel de PRL, es lo que se quiso evaluar indirectamente mediante determinación de los niveles del copeptín; isotocina, en este caso. Se emplearon dos metodologías para evaluar este punto: RT-PCR semicuantitativo por normalización con β -actina y RT-PCR competitivo.

La primera manera de determinar los niveles de transcrito de isotocina fue mediante la realización de un RT-PCR múltiple, en donde se coamplificó el cDNA blanco y un cDNA de referencia, el que debe cumplir con el requisito de ser expresado de forma constante. Se escogió a β -actina para este propósito, ya que en nuestro laboratorio se había trabajado anteriormente con

este cDNA y los partidores necesarios se encontraban a disposición. Si bien ha sido demostrado que en carpa la expresión de este gen puede variar bajo determinadas condiciones (Sarmiento *et al.*, 2000), en este caso se considera como expresión constitutiva debido a que todas las poblaciones eran homogéneas.

La eficiencia de amplificación está determinada principalmente por la secuencia de los partidores (Siebert & Larrick, 1992), además de la longitud y secuencia del amplicón. Considerando que en un PCR múltiple se necesita comparar el producto final de dos amplicones distintos, previo al ensayo se debe comprobar que ambos amplifiquen con similar eficiencia durante la reacción. Con el resultado expuesto en la Figura 14, este punto quedó zanjado para realizar así el PCR múltiple sin problemas.

Los resultados que se obtuvieron en este ensayo de PCR múltiple no dieron cuenta de alguna diferencia significativa entre los niveles de isotocina de los distintos estados patológicos; sin embargo, un claro aumento en los niveles se apreció en los peces adultos (Figura 15).

A pesar de no haberse notado diferencias significativas mediante el uso del RT-PCR múltiple, se decidió evaluar esta misma variable utilizando un sistema cuantitativo: el RT-PCR competitivo. Debido a la gran sensibilidad y especificidad de la tecnología del PCR, este método ha sido utilizado con éxito en la determinación pequeñas cantidades de mRNA (Gilliland *et al.*, 1990; Siebert & Larrick, 1993). En este trabajo se optó por utilizar un fragmento de DNA homólogo elaborado a partir del mismo clon obtenido, es decir, del cDNA del precursor de isotocina. Este método fue más conveniente que el de ligar los partidores a un fragmento de DNA no homólogo, ya que mediante una simple reacción de digestión con enzima de restricción seguida por una ligación, se obtuvo el DNA competidor sin mayores inconvenientes (Figura 5).

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia de amplificación está determinada principalmente por la secuencia de los partidores; esto es verdadero a menos que entre los amplicones exista una gran diferencia de tamaño o de porcentaje de G/C (Siebert & Larrick, 1992). Una de las ventajas del PCR competitivo es que al utilizar los mismos juegos de partidores para los dos DNAs, este problema es evitado. Además, como en el presente trabajo se utilizó un DNA homólogo, la única posible diferencia en las eficiencias de amplificación estaría dada por la diferencia de tamaño. En este caso, la diferencia de tamaño entre el DNA competidor y el cDNA blanco es de 167 pb, diferencia pequeña como para presentar inconvenientes, ya que en estudios anteriores han existido diferencias aún mayores, sin afectar el ensayo (Siebert & Larrick, 1992; Sarmiento *et al.*, 2000). Conforme a lo esperado, ambos amplicones no mostraron diferencia en sus eficiencias de amplificación (Figura 16), permitiendo así utilizar este DNA para los ensayos de competencia. En la Figura 18 se exponen los resultados finales del ensayo de competencia; en ellos no se aprecia una diferencia significativa entre las tres condiciones mencionadas.

Existe una consideración técnica que no se puede dejar de mencionar; los resultados fueron expresados en attomotes/ μ g RNA total, lo cual no es del todo preciso. Como se indicó en los resultados, este valor se hace válido bajo el supuesto de que la reacción de transcripción reversa tenga una eficiencia del 100%. El paso de transcripción reversa es la fuente de la mayor variabilidad en un experimento de RT-PCR cuantitativo, puesto que la enzima transcriptasa reversa es bastante sensible a sales, alcohol y fenol que pudiesen quedar como remanentes del proceso de purificación (Freeman *et al.*, 1999). Igualmente, en este proceso de purificación se produce siempre una pérdida de RNA, por lo que también habría que tomar en cuenta la eficiencia de este paso. No obstante, la importancia de este ensayo de competencia es la cuantificación comparativa entre las diferentes muestras (diferentes estados) y no una

cuantificación absoluta. Además, estas variables fueron minimizadas en este trabajo al procesar todas las muestras en paralelo; las mismas soluciones, los mismos pipeteos y las mismas mezclas fueron utilizadas para todas las muestras, evitando así el error de tubo a tubo.

Al vincular a copeptín de manera directa con la liberación de prolactina, se hace necesaria una relación morfológica entre este péptido y las células lactotropas de la RPD. Las células lactotropas se encontraron en el salmón del Atlántico distribuidas en forma de acinos; esta distribución ha sido descrita también para otras especies (Batten *et al.*, 1999), pero no se encuentra presente en carpa (Flores, 2001). Mediante IHQ en cortes sagitales de encéfalo de peces adultos se reveló la distribución del Cp y su relación con la zona productora de PRL de la hipófisis. El anticuerpo anti-Cp utilizado en los ensayos de IHQ en el presente estudio fue elaborado en base a un péptido sintético de 16 residuos correspondiente a este motivo en carpa (Flores, 2001).

Las neuronas productoras de este péptido fueron encontradas en dos cúmulos de células en el núcleo preóptico, que corresponderían al NPO pars magnocellularis y NPO pars parvocellularis, lugar de síntesis de IT y AVT, respectivamente (Van den Dungen *et al.*, 1982).

Se observa una señal muy fuerte en la neurohipófisis, dada por los axones transportadores de las poliproteínas precursoras de IT y AVT. Similar a lo reportado en carpa (Flores, 2001), una pequeña parte de la señal positiva fue encontrada en la RPD, indicando la posibilidad de que algunos terminales axonales se desvíen hacia esta zona productora de PRL. Adicionalmente, se observó parte de la señal positiva de Cp dentro de los folículos de células lactotropas en la RPD y de una manera bastante peculiar (Figura 21). Esta señal se concentró en la región apical de las células lactotropas y en algunos acinos se observó un patrón en forma de “rayos de bicicleta”; también hubo señal en lo que pareciera ser restos de líquido al interior del folículo. Estos

resultados, junto al hecho de que en nuestro laboratorio se ha observado una situación similar para el péptido RFa, otro posible factor liberador de PRL, dejan abierta la posibilidad de que la regulación de la liberación de PRL ocurra por factores encontrados dentro del acino. El uso de microscopía confocal para evaluar esta situación se hace necesario; en todo caso, la duda queda sembrada.

Si bien se determinó previamente que no existen diferencias significativas en los niveles del mensajero de coeptín (isotocina) entre peces en las distintas condiciones evaluadas, se quiso ver si ocurría algo diferente a nivel de proteína. Para cumplir con este objetivo se realizaron ensayos de IHQ en cortes de hipófisis de alevines en distinto estado patológico. Al igual que en la cuantificación del transcrito, se utilizaron muestras de peces sanos y peces desafiados contra los patógenos *V. ordalii*, *P. salmonis* y además *Renibacterium salmoninarum*. También se incluyeron muestras de individuos adultos, las que fueron comparadas con las muestras de alevines (peces sanos, en el caso anterior). Los resultados no arrojaron diferencias notables en la cantidad de coeptín presente en la pituitaria cuando fueron comparados los alevines sanos contra los desafiados con los distintos patógenos, ni tampoco cuando la comparación se estableció entre individuos en diferente estado etario.

Tal como se ha explicado en el punto 4.4 de los resultados, el parámetro utilizado para estas cuantificaciones fue el de luminosidad. El programa Image Pro Plus analiza cada imagen digital y entrega una variedad de resultados, entre los que se incluyen área, luminosidad promedio, densidad óptica integrada (IOD), valores máximos y mínimos (de luminosidad), cantidad de píxeles, un histograma, etc. De todos ellos, el que refleja de mejor manera la cantidad de Cp presente en la hipófisis es el de luminosidad promedio, ya que toma en cuenta solamente la intensidad de la señal (verde en este caso), descartando los píxeles correspondientes al fondo

negro. Por lo tanto este valor hace referencia a la concentración de Cp en la pituitaria, ya que en las zonas en donde este péptido se encuentra más concentrado la señal es más intensa. Al excluir otras variables como el área, se evitaron posibles errores atribuibles al corte histológico. Debido al pequeño tamaño de la pituitaria, resulta prácticamente imposible manipularla para darle una orientación en el momento de incluirlas en parafina sólida, por esto la disposición del corte histológico es aleatoria.

Se deseó establecer de la misma manera si existen diferencias en la cantidad de PRL presente en la hipófisis. Se emplearon las mismas muestras mencionadas recién para el copeptín, con la salvedad de que la muestra de hipófisis de peces desafiados contra *V. ordalii* era una sola, por lo que su resultado no fue incluido en el gráfico de barras correspondiente. Por tratarse de la misma metodología anterior, todo lo dicho referente a ella es válido para este caso también, con la diferencia obvia de que en este caso el anticuerpo secundario iba ligado a un fluoróforo que emite fluorescencia roja. Al igual que en los casos anteriores, los resultados tampoco evidenciaron alguna diferencia significativa al comparar los distintos estados patológicos.

El último resultado expuesto muestra la cuantificación de PRL en alevines y en peces adultos y en el han sido graficados los valores de luminosidad e IOD, por lo que se hace necesario una explicación a esto. Como se mencionó anteriormente, el valor de luminosidad es el que da cuenta de mejor modo de la cantidad de proteína, ya que va en directa relación con ella sin tomar en cuenta otras variables. Sin embargo, en este caso pareció oportuno incluir el valor del IOD, ya que si bien no se observa una diferencia en la concentración de PRL, representada por el valor de luminosidad promedio, sí se puede aseverar que hay más PRL en la pituitaria del pez adulto, puesto que la superficie analizada es más grande. Sin embargo, este resultado no debe ser mal interpretado, puesto que si bien hay más cantidad de isotocina, el tamaño del individuo en el que

debe distribuirse también es mayor. Además, esto también puede explicarse por el estado de desarrollo del pez y el medio en que se encuentra, recordemos que el pez adulto habita en el mar, en donde la salinidad del agua obliga al individuo a adaptarse fisiológicamente a este medio. Así, una cuantificación de los niveles séricos sería ideal para complementar esta información.

Antecedentes previos han mostrado la importancia de PRL en la regulación positiva del sistema inmune, tanto en peces como en mamíferos (Sakai *et al.*, 1996b; Sakai *et al.*, 1996c; Yada *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2000; Harris & Bird, 2000). Parece lógico entonces pensar que como parte de la respuesta inmune se genere un alza en los niveles circulantes de esta hormona, ya sea para auxiliar el desencadenamiento y/o la mantención en el tiempo de dicha respuesta. Como este alza difícilmente ocurra por sí solo, es altamente esperable que alguno de los factores que regulan su secreción también vean alterados sus niveles. Así, bajo la hipótesis de que copeptín estimula la secreción de PRL, se lo tomó para su estudio.

En un principio, el papel de copeptín como factor liberador de prolactina fue estudiado utilizando un modelo mamífero (Nagy *et al.*, 1988), en el cual este motivo presenta características estructurales que difieren de las encontradas en peces. Un sitio de glicosilación, junto a otro de procesamiento que lo escinde de neurofisina, le otorgan a este motivo propiedades que bien hacen pensar que posee alguna función biológica; sino ¿por qué entonces la maquinaria celular gastaría energía y recursos en una sintetizar este péptido, y además glicosilado? El hecho de que los mencionados sitios no se encuentren en los precursores de peces deja abierta la posibilidad de que su función biológica sea exclusiva de organismos más evolucionados. Sin embargo, los reportes que demuestran una estrecha relación morfológica entre Cp y las células lactotropas, además de un efecto liberador de PRL *in vitro* (Flores, 2001; Soto, 2003; los presentes resultados), sugieren fuertemente que copeptín posee una función ligada a la liberación de prolactina

Poniendo juntos todos los antecedentes aquí presentados, se puede inferir que el motivo copeptín no estaría jugando un rol en la liberación de prolactina desde pituitaria como parte de la respuesta a la infección de patógenos, al menos cuando se trata de agentes bacterianos. Sin embargo, sería conveniente poder corroborar si lo mismo sucede con patógenos virales o fúngicos. Por otra parte, estudios en paralelo realizados en nuestro laboratorio han mostrado que, contrario a lo esperado, los niveles de PRL presentes en plasma y en leucocitos disminuyen en los peces desafiados contra patógenos bacterianos. Sin embargo, la expresión del receptor de PRL en leucocitos y en riñón cefálico, órgano hematopoyético en peces, se ve aumentada (Montes *et al.*, 2004); lo que sugiere que lo que aumenta es la susceptibilidad de los componentes del sistema inmune a prolactina y no los niveles circulantes de la hormona propiamente tal.

Por último, también hay que tomar en consideración la gran gama de efectos que ejerce prolactina (Freeman *et al.*, 2000) y la posibilidad lógica de que la acción de copeptín sobre la liberación de prolactina esté determinada por alguno de ellos; a modo de ejemplo, sería interesante investigar si Cp se ve incrementado en peces durante la adaptación a agua dulce, ya que los niveles de PRL en plasma e hipófisis aumentan en esta situación (Manzon, 2002).

Que aquí no se haya logrado relacionar concretamente la cantidad de copeptín con la sobrevida de peces enfrentados a agentes patógenos, no supone en ningún caso la inexistencia de una relación entre Cp y prolactina; por el contrario, plantea la necesidad de futuros estudios con el fin de dilucidar si su actividad liberadora de PRL es dependiente efectivamente de la inmunidad del pez, o si su efecto tiene relación con alguna de las demás abundantes acciones de esta hormona.

6. BIBLIOGRAFÍA

Balm, P. H. M., Pottinger, T. G. (1993) Acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to low environmental pH does not involve an activation of the pituitary-interrenal axis, but evokes adjustments in branchial ultrastructure. *Can J Fish Aquat Sci.* 50: 2532-2541.

Batten, T. F. C., Moons, L., Vandesande, F. (1999) Innervation and control of the adenohypophysis by hypothalamic peptidergic neurons in teleost fishes: EM immunohistochemical evidence. *Microsc Res Tech.* 44: 19-35.

Bern, H. A., Nicoll, C. A. (1968) The comparative endocrinology of prolactin. *Rec Prog Horm Res.* 24: 681-720.

Bielsky, I. F., Young, L. J. (2004) Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides.* 25: 1565-1574.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 19(3): 225-268.

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

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1): 156-159.

Cook, J. (1994) The effects of stress, background colour and steroid hormones on the lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de Ph.D., Universidad de Sheffield.

Duarte, G., Segura-Noguera, M. M., Martín del Río, M. P., Mancera, J. M. (2002) The hypothalamo-hypophyseal system of the white seabream *Diplodus sargus*: immunocytochemical identification of arginine-vasotocin, isotocin, melanin-concentrating hormone and corticotropin-releasing factor. *Histochem J.* 33: 569-578.

Espelid, S., Løkken, G. B., Steiro, K., Bøggwald, J. (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Fish Shellfish Immunol.* 6: 95-110.

Figuroa, J., Morley, S. D., Heierhorst, J., Krentler, C., Laderis, K., Richter, D. (1989) Two isotocin genes are present in the white sucker *Catostomus commersoni* both lacking introns in their protein coding regions. *EMBO J.* 8(10): 2873-2877.

Figuroa, J. (1995) Organización de los genes de IT del pez teleósteo *Catostomus commersoni* (White sucker). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 152 pp.

Flores, C. (2001) Clonamiento y caracterización del copeptín asociado a las poliproteínas precursoras de vasotocina e isotocina del pez *Cyprinus carpio*. Tesis Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 136 pp.

Freeman, W. M., Walter, S. J., Vrana, K. E. (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 26(1): 112-125.

Freeman, M., Kanyicska, B., Lebrant, A., Nagy, G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 80(4): 1523-1631.

Fujimoto, M., Takeshita, K., Wang, X., Takabatake, I., Fujisawa, Y., Teranishi, H., Ohtani, M., Muneoka, Y., Ohta, S. (1998) Isolation and characterization of a novel bioactive peptide, Carassius RFamide (C-RFa), from the brain of the Japanese crucian carp. *Biochem Biophys Res Commun*. 242: 436-440.

Gagnerault, M. C., Touraine, P., Savino, W., Kelly, P. A., Dardenne, M. (1993) Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J Immunol*. 150: 5673-5681

Gainer, H., Wray, S., (1994) Cellular and molecular biology of oxytocin and vasopressin. En: Knobil, E., Neill, J.D. (ed) *The Physiology of Reproduction*: pp. 1099-1129. New York: Raven.

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, F. (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 2725-2729.

Goodson, J. L., Evans, A. K., Bass, A. H. (2003) Putative isotocin distributions in sonic fish: relation to vasotocin and vocal-acoustic circuitry. *J Comp Neurol*. 462: 1-14.

Grimm, A. S. (1985) Suppression by cortisol of the mitogen-induced proliferation of peripheral blood leucocytes from plaice, *Pleuronectes platessa*. En: Manning, M. J. & Tatner, M. F. (ed) *Fish Immunology*: pp.263-271. Londres: Academic Press.

Harris, J., Bird, D. (2000) Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet Immunol Immunopathol*. 77: 163-176.

Hausmann, H., Meyerhof, W., Zwiers, H., Lederis, K., Richter, D. (1995) Teleost isotocin receptor: structure functional expression, mRNA distribution and phylogeny. *FEBS Lett*. 370: 227-230.

Heierhorst, J., Morley, S. D., Figueroa, J., Krentler, C., Lederis, K., Richter, D. (1989) Vasotocin and isotocin precursors from the white sucker, *Catostomus commersoni*: cloning and sequence analysis of the cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 5242-5246.

Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., Sekiguchi, M., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H., Fujino, M. (1998) A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*. 393: 272-276.

Hyodo, S., Kato, Y., Ono, M., and Urano, A. (1991) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding vasotocin and isotocin precursors of chum salmon, *Oncorhynchus keta*: evolutionary relationships of neurohypophysial hormone precursors. *J Comp Physiol B*. 160: 601–608.

Iger, Y., Balm, P. H. M., Jenner, H. A., Wendelaar Bonga, S. E. (1995) Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinology*. 97: 188-189.

Kajita, Y., Sakai, M, Kobayashi, M., Kawauchi, H. (1992) Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. *Fish Shellfish Immunol*. 2: 155-157.

Manzon, L. (2002) The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen Comp Endocrinol*. 125: 291-310.

Maule, A. G., Schreck, C. B. (1990) Changes in the numbers of leucocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. *J Aquat Anim Health*. 2: 298-304.

Montes, N., Kausel, G., Hausmann, D., Figueroa, J. (2004) Participación de prolactina en la sobrevivencia de *Salmo salar* desafiados con patógenos bacterianos. *Biol Res.* 37(4): R-72.

Moriyama, S., Ito, T., Takahashi, A., Amano, M., Sower, S. A., Hirano, T., Yamamori, K., Kawauchi, H. (2002) A homolog of mammalian PRL-releasing peptide (fish arginyl-phenylalanyl-amide peptide) is a major hypothalamic peptide of PRL release in teleost fish. *Endocrinology.* 143: 2071-2079.

Nagy, G., Mulchahey, J. J., Smyth, D. G., Neill, J. D. (1988) The glycopeptide moiety of vasopressin-neurophysin precursor is neurohypophysial prolactin releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 151(1): 524-529.

Narnaware, Y. K., Kelly, S.P., Woo, N. Y. S. (1997) Effect of injected growth hormone on phagocytosis in silver sea bream (*Sparus sarba*). *Fish Shellfish Immunol.* 7: 515-517.

Nojiri, H., Ishida, I., Miyashita, E., Sato, M., Urano, A., Deguchi, T. (1987) Cloning and sequence análisis of cDNA for neurohypophysial hormones vasotocin and mesotocin for the hypothalamus of toad, *Bufo japonicus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 3043-3046.

Peters, G., Nübgen, A., Raabe, A., Möck, A. (1991) Social stress induces structural and functional alterations of phagocytes in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 1: 17-31.

Pulsford, A. L., Crampe, M., Langston, A., Glynn, P. J. (1995) Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 631-643.

Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H. (1995) Enhancement of chemiluminescent responses of phagocytic cells from rainbow trout, *Oncorhynchus keta*, by injection of growth hormone. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 375-379.

Sakai, M., Kajita, Y., Kobayashi, M., Kawauchi, H. (1996a) Increase in haemolytic activity of serum from rainbow trout *Oncorhynchus keta* injected with exogenous growth hormone. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 615-617.

Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H. (1996b) Mitogenic effect of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leukocytes *in vitro*. *Vet Immunol Immunopathol.* 53: 185-189.

Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H. (1996c) *In vitro* activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. *J Endocrinol.* 151: 113-118.

Sambrook, K.J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2^a Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74 (12): 5463-5467.

San Martín, R., Cáceres, P., Azócar, R., Álvarez, M., Molina, A., Vera, M. I., Krauskopf M. (2004) Seasonal environmental changes modulate the prolactin receptor expression in an eurythermal fish. *J Cell Biochem*. 92: 42-52.

Sarmiento, J., Leal, S., Quezada, C., Kausel, G., Figueroa, J., Vera, M. I., Krauskopf, M. (2000) Environmental acclimatization of the carp modulates the transcription of β -actin. *J Cell Biochem*. 80: 223-228.

Sarmiento, J. (2001) Transcripción de β -actina en carpa: efecto de la aclimatización. Tesis Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 71 pp.

Schally, A. V., Gouth, J. G., Redding, T. W., Groot, K., Rodríguez, H. Szonyi, E., Stults, J., Nikolics, K. (1991) Isolation and characterization of two peptides with prolactin release-inhibiting activity from porcine hypothalami. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 3540-3544.

Siebert, P. D., Larrick, J. W. (1992) Competitive PCR. *Nature*. 359: 557-558.

Siebert, P. D., Larrick, J. W. (1993) PCR MIMICS: competitive DNA fragment for use as internal standards in quantitative PCR. *Biochem*. 14: 244-249.

Slater, C. H., Schreck, C. B. (1993) Testosterone alters the immune response of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen Comp Endocrinol.* 89: 291-298.

Soto, M. (2003) Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de pituitaria de carpa: efecto del coceptín en la liberación de prolactina. Seminario de titulación Escuela de Tecnología médica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. 43 pp.

Sperisen P., Wang, S. M., Reichenbach, P., Nabholz, M. (1992) A PCR-based assay for reporter gene expression. *PCR Methods Appl.* 1(3): 164-170.

Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculis, J. J., Meyer, H. G. (1970) The unlabeled antibody methods of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 18(5): 315-333.

Thompson, R. R., Walton, J. C. (2004) Peptide effects on social behavior: effects of vasotocina and isotocin on social approach behavior in male goldfish (*Carassius auratus*). *Behav Neurosc.* 118(3): 620-626.

Tripp, R. A., Maule, A. G., Schreck, C. B., Kaattari, S. L. (1987) Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocyte responses *in vitro*. *Dev Comp Immunol.* 11: 565-576.

Van den Dungen, H. M., Buijs, R. M., Pool, C. W., Terlouw, M. (1982) The distribution of vasotocin and isotocin in the brain of the rainbow trout. *J Comp Neurol.* 212: 146-157.

Van Kesteren, R. E., Smit, A. B., Dirks, R. W., De With, N. D., Geraerts, W. P., Joosse, J. (1992) Evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: characterization of a cDNA encoding a vasopressin-related precursor, preproconopressin, from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(10): 4593-4597.

Weyts, F. A. A., Verburg-van Kemenade, B. M. L., Flick, G., Lambert, J. G. D., Wendelaar Bonga, S. E. (1997) Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes. *Brain Behav Immun.* 11: 95-105.

Weyts, F., Cohen, N., Flik, G., Verburg-van Kemenade, B. (1999) Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 1-20.

Yada, T., Nagae, M., Moriyama, S., Azuma, T. (1999) Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol.* 115: 46-52.

