

PERFIL DE EXPRESION DE GENES IMPLICADOS EN LA DIGESTION DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO Y JUVENIL DE LA DONCELLA *Pseudoplatystoma punctifer*

Diana Castro R¹; Karl B Andree²; Christian Fernández M¹; Carmen García D¹; Enric Gisbert²; María J. Darias³

¹Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Programa de Investigación para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos, Iquitos, Perú

²Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Centre de Sant Carles de la Ràpita (IRTA-SCR), Unitat de Cultius Aqüícoles, Sant Carles de la Ràpita, España

³MARBEC, IRD, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Montpellier, Francia

RESUMEN

Pseudoplatystoma punctifer posee un gran potencial para la acuicultura, pero la alta tasa de canibalismo existente durante su etapa temprana de vida dificulta por ahora su cultivo a gran escala. Una nutrición adecuada reduce significativamente la incidencia de canibalismo y el conocimiento de la ontogenia funcional del sistema digestivo es esencial para adaptar el protocolo de alimentación a las capacidades digestivas de esta especie y así aumentar la producción de semilla. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue analizar la expresión de los principales genes implicados en la digestión (amilasa, tripsina, quimotripsina, pepsinógeno, fosfolipasa, lipoproteína lipasa y neuropéptido Y) durante el desarrollo larvario y juvenil temprano de *P. punctifer*. Los resultados mostraron que esta especie cuenta con la maquinaria enzimática necesaria para digerir el alimento exógeno antes de la primera alimentación (4 dpf). La expresión de los genes siguió el perfil común de una especie carnívora con un aumento significativo en la expresión de pepsinógeno a partir de los 10 dpf para pasar de una digestión proteica básica en el intestino (tripsina, quimotripsina) a una digestión proteica ácida más eficiente en el estómago (pepsina). Por tanto, *P. punctifer* está preparada para ser destetada con dietas complejas a partir de 10 dpf. Los resultados también mostraron que el cambio de dieta durante la etapa juvenil moduló la actividad enzimática a nivel transcripcional, por lo que el análisis de la expresión de los precursores enzimáticos digestivos será de utilidad en estudios nutricionales dirigidos a establecer la composición nutricional óptima para esta especie.

Palabras claves: *Pseudoplatystoma punctifer*, expresión génica, enzimas digestivos, ARNm, PCR tiempo real.

ABSTRACT

Pseudoplatystoma punctifer has a great aquaculture potential, although the high rate of cannibalism existing during its early life stages hampers its rearing at large scale. An adequate nutrition is known to significantly reduce the incidence of cannibalism. Knowledge of the functional ontogeny of the digestive system is essential for adapting the feeding protocol to the digestive capacities of this species and thus increase the production of the seed. The goal of the present study was to analyze the expression of the main genes involved in digestion (amylase, trypsin, chymotrypsin, pepsinogen, phospholipase, lipoprotein lipase and neuropeptide Y) during the larval and early juvenile development of *P. punctifer*. Results showed that this species counts with the enzymatic machinery necessary to digest exogenous food before first feeding (4 dpf). The expression of genes followed the common profile of a carnivorous species with a significant increase in the expression of pepsinogen from 10 dpf to switch from a basic protein digestion in the intestine (trypsin, chymotrypsin) to a more efficient acidic protein digestion in the stomach (pepsin). Therefore, *P. punctifer* is ready to be weaned with complex diets from 10 dpf. Results also showed that changes in the diet during the juvenile stage modulated the enzymatic activity at transcriptional level, therefore the analysis of the expression of digestive precursors could be helpful in nutritional studies aimed at establishing the optimal nutritional composition for this species.

Keywords: *Pseudoplatystoma punctifer*, gene expression, digestive enzyme precursors, mRNA, real time PCR.

INTRODUCCIÓN

La piscicultura de la doncella, *Pseudoplatystoma punctifer*, especie amazónica muy apreciada para el consumo y de elevado interés comercial, no se ha desarrollado hasta el momento debido a la ausencia de un protocolo de cultivo, especialmente de alimentación, adecuado a las etapas tempranas de vida, en las que un crecimiento y una supervivencia óptimos son necesarios para garantizar la producción de semilla a gran escala. Estudios recientes han permitido avanzar en el conocimiento de la ontogenia del sistema digestivo y la nutrición de esta especie (Gisbert et al., 2014, Darias et al., 2015, Fernández-Méndez et al., 2015, Castro-Ruiz et al., 2019). Sin embargo, sigue existiendo una elevada tasa de mortalidad debido a un alto índice de canibalismo, por lo que se hace necesario profundizar en los conocimientos de fisiología digestiva de esta especie, especialmente en las capacidades digestivas, las necesidades nutricionales y en cómo los alimentos suministrados influyen en

los procesos digestivos para poder optimizar el protocolo de alimentación. La biología molecular permite responder a estas necesidades de conocimiento a través del estudio de la expresión de genes implicados en la digestión, evaluando así la modulación de dichos genes a lo largo del desarrollo y en función de la dieta suministrada. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue generar conocimientos sobre las capacidades digestivas de la doncella durante sus etapas tempranas de vida, a través del estudio de la expresión de genes implicados en la digestión, para contribuir a desarrollar un protocolo de alimentación optimizado para esta especie que permita el desarrollo de su piscicultura en la Amazonía peruana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las larvas y juveniles de doncella fueron obtenidos por inducción hormonal de una pareja de reproductores mantenidos en cautividad en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP, Iquitos). Los huevos fertilizados fueron incubados en incubadoras cilíndrico-cónicas de 40 L a 27 °C. Las larvas eclosionaron 18 h más tarde y fueron transferidas a los 4 días post fertilización (dpf) a tanques de 40 L conectados a un sistema de recirculación de agua con filtros biológicos y mecánicos. Las larvas fueron cultivadas por triplicado (90 larvas L⁻¹), bajo un fotoperiodo de 0L:24D y alimentadas con nauplios de artemia hasta los 17 dpf. A partir de este momento, los juveniles fueron destetados gradualmente durante 3 días con una dieta balanceada (proteína cruda 58%, lípidos 15%). A partir de los 20 dpf y hasta el final del experimento los juveniles sólo fueron alimentadas con la dieta balanceada.

Se aislaron y secuenciaron parcialmente los genes amilasa, tripsina, quimotripsina, pepsinógeno, fosfolipasa, lipoproteína lipasa, neuropéptido Y y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de la doncella y posteriormente se diseñaron primers específicos para el análisis de la expresión génica a lo largo del desarrollo. Para ello, se colectaron por triplicado 200 mg de peso húmedo de larvas y juveniles de doncella a 3, 10, 13, 18 y 24 dpf y se conservaron en RNAlater a -80 °C hasta su análisis. Se extrajo el ARN total de los individuos colectados usando Trizol™ (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se midió la concentración del ARN extraído por espectrofotometría (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y se determinó su pureza midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Se verificó la calidad del ARN extraído mediante un gel de agarosa al 1%. Se retrotranscribió 1 µg de ARN total a ADNc con el uso del kit Super Script™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen), previo tratamiento con ADNasa I. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo en un termociclador (Mastercycle R nexus GSX1, Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo por triplicado en un Termociclador 7300 Real Time (Applied Biosystems, Roche). El master mix se preparó a partir de 10 µl SYBR Green Supermix (Life Technologies), 20 µM de cada primer y 1 µl de ADNc (dilución 1/20) en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95 °C, 40 ciclos [20 seg a 95 °C, 1 min a 60°C, 15 seg a 95 °C] y 15 seg a 60 °C. Se determinó la eficiencia (E) de los qPCRs para cada gen a partir de la pendiente obtenida del análisis de expresión de la curva estándar de cada gen usando el programa de Applied Biosystems y aplicando la ecuación $E=10^{-1/\text{slope}}$, donde E corresponde a la eficiencia de la amplificación. El ratio de la expresión génica relativa para cada gen se calculó según Pfaffl (2001) y la expresión génica relativa fue normalizada usando el gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, ya que mostró un nivel de expresión constante durante el periodo analizado.

Los resultados se expresaron en promedio \pm desviación estándar (n= 9). Previa comprobación de la normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de la varianza (Bartlett) de los datos, se llevó a cabo el ANOVA de una vía para analizar las diferencias de expresión de los genes digestivos durante el desarrollo de la doncella. Cuando se encontraron diferencias significativas (P < 0.05) se usó el test a posteriori de Holm-Sidak para discriminar las diferencias mediante comparaciones múltiples por pares. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Sigma Stat 3.0 (Systat Software Inc., Richmond, EEUU).

RESULTADOS

El perfil de expresión de los genes analizados durante el desarrollo de la doncella se muestra en la Fig. 1. La expresión de todos los genes fue detectada desde los 3 dpf. El nivel de expresión de la amilasa se duplicó de los 3 a los 10 dpf, para posteriormente disminuir a la mitad de los 10 a los 13 dpf y mantenerse constante hasta los 18 dpf. Entre los 18 y los 24 dpf, el nivel de expresión de la amilasa aumentó 3 veces. El nivel de expresión del tripsinógeno aumentó de los 3 a los 10 dpf, luego disminuyó a los 13 dpf para luego aumentar progresivamente hasta el final del periodo estudiado. El nivel de expresión de la quimotripsina aumentó 4 veces desde los 3 a los 10 dpf. De los 10 a los 13 dpf el nivel de expresión volvió a descender a valores cercanos a los obtenidos a los 3 dpf y continuó descendiendo progresivamente hasta los 18 dpf para mantenerse constante hasta los 24 dpf. El nivel de expresión del pepsinógeno aumentó significativamente de los 10 a los 13 dpf y continuó aumentando significativamente y de manera exponencial hasta el final del periodo estudiado. La expresión de la fosfolipasa aumentó significativamente de los 3 a los 10 dpf para luego mantenerse constante hasta los 24 dpf. El nivel de expresión de la lipoproteína lipasa aumentó significativamente de los 3 a los 10 dpf, luego se mantuvo constante hasta los 13 dpf y volvió a aumentar de los 13 a los 18 dpf para posteriormente

mantenerse constante hasta el final del periodo estudiado. El nivel de expresión del neuropéptido Y incrementó de los 3 a los 10 dpf, se mantuvo constante entre los 10 y los 13 dpf, posteriormente volvió a disminuir entre los 13 y los 18 dpf para mantenerse constante hasta los 24 dpf.

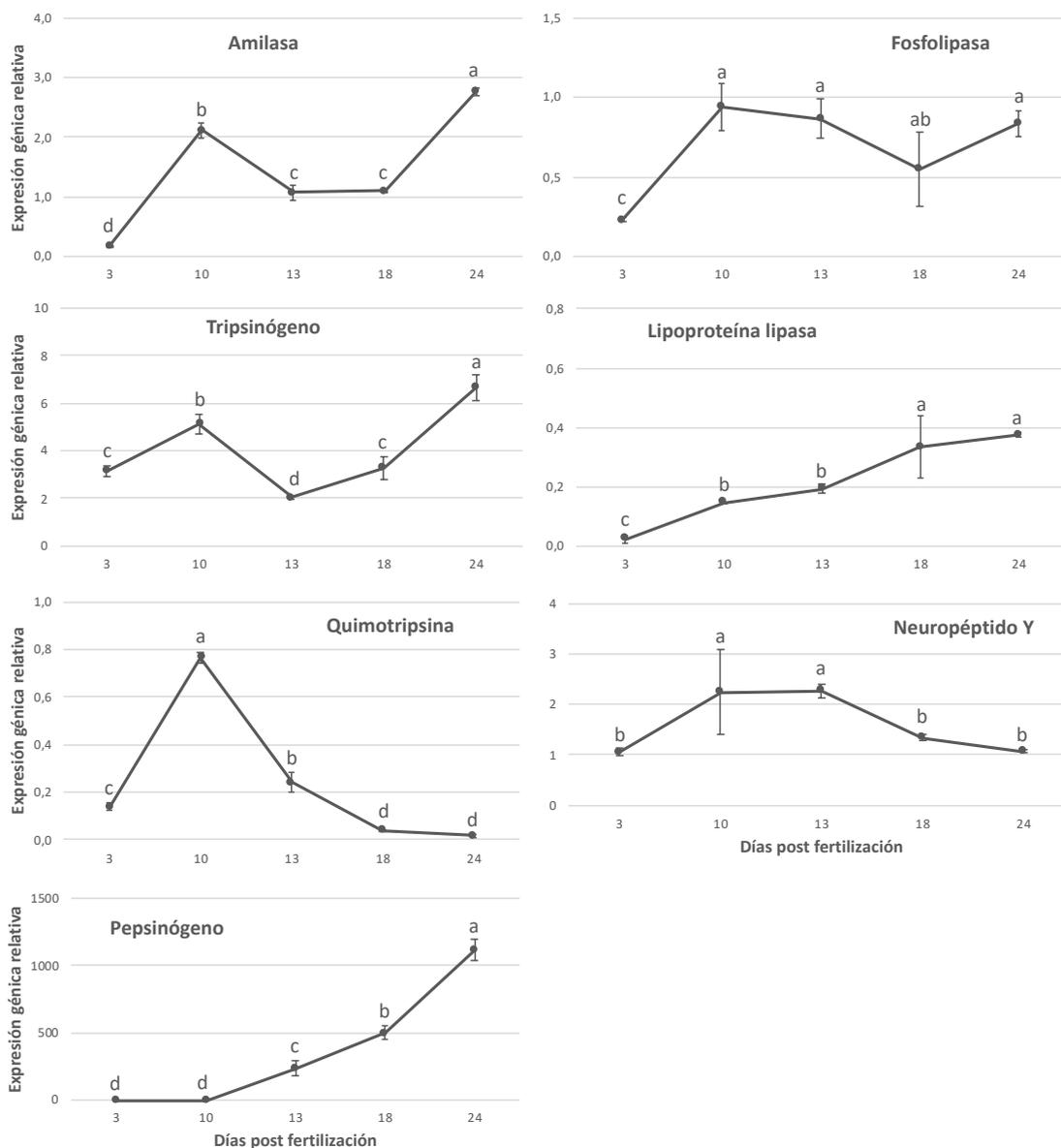


Fig.1 Expresión génica relativa de los genes digestivos estudiados durante la ontogenia de *Pseudoplatystoma punctifer*. Los resultados están expresados como promedio \pm desviación estándar (n=9). Las letras indican diferencias significativas (ANOVA de una vía, $P < 0.05$).

DISCUSIÓN

Este estudio muestra que la transcripción de los diferentes genes digestivos analizados está programada genéticamente, ya que el ARNm fue detectado a los 3 dpf, antes de la primera alimentación exógena (4 dpf). Estos resultados concuerdan con los encontrados para otras especies (Cahu et al., 2004, Darías et al., 2006, 2007a, b). Además, el perfil de expresión de los genes digestivos muestra un patrón común de expresión para peces carnívoros, caracterizado por un nivel elevado de expresión de pepsinógeno en las glándulas gástricas del estómago, responsable, junto con el ácido clorhídrico, de la digestión ácida de proteínas complejas (Darías et al., 2005, 2007b). Sin embargo, la expresión de la amilasa durante la ontogenia no siguió el perfil habitual observado en otras especies, caracterizado por un elevado nivel de expresión al inicio del desarrollo para posteriormente disminuir progresivamente hasta el final de la etapa larvaria (Péres et al., 1998, Cahu et al., 2004, Darías et al., 2006). En el caso de la doncella, la expresión de la amilasa aumentó considerablemente durante el desarrollo larvario para luego disminuir entre los 10 y los 13 dpf, edad a la que se considera finalizada la etapa larvaria en esta especie (Gisbert et al., 2014, Castro-Ruiz et al., 2019). Por otro lado, entre los 18 y los

24 dpf se produjo un aumento de la expresión de la amilasa en respuesta al cambio de régimen alimenticio (paso de artemia a alimento balanceado) y, por tanto, para adaptar la actividad enzimática al contenido en carbohidratos de la nueva dieta suministrada. Este cambio en la expresión de la amilasa, se tradujo en un cambio en la actividad de dicha enzima (Castro-Ruiz et al., 20019), mostrando que en esta especie se produce una modulación de la actividad de la amilasa a nivel transcripcional durante la etapa juvenil. Los resultados de expresión de la amilasa sugieren que esta especie posee potencial para digerir un alto contenido en carbohidratos, lo que supone una ventaja, ya que permitiría ahorrar proteínas en la formulación de alimento balanceado para esta especie, tal y como han sugerido los resultados obtenidos de estudios nutricionales realizados en esta especie (Darias et al., 2015). El tripsinógeno, precursor de la tripsina, enzima responsable de la digestión básica de proteínas poco complejas en el intestino anterior (Darias et al., 2007a), siguió el perfil de expresión esperado durante la ontogenia, es decir, un aumento de su expresión hasta la completa formación y funcionalidad del estómago entre los 10 y los 12 dpf (Gisbert et al., 2014, Castro-Ruiz et al., 2019). A partir de ese momento, la expresión del tripsinógeno disminuyó para dar paso a la digestión proteica ácida, mediante el consecuente aumento de la expresión del pepsinógeno, precursor de la pepsina, que se sintetiza y excreta en las glándulas gástricas del estómago (Darias et al., 2005, 2007b). Una vez finalizada la ontogenia digestiva, la expresión del tripsinógeno fue modulada por el cambio de dieta para adaptarse al nuevo contenido proteico (de los 18 a los 24 dpf). Este resultado coincide con el perfil de actividad observado para la tripsina (Castro-Ruiz et al., 2019), lo que indica que el paso de artemia al alimento balanceado indujo una modulación de la actividad de esta enzima a nivel transcripcional, como también ha sido observado en otras especies (Péres et al., 1998). El perfil de expresión del precursor de la quimotripsina, enzima proteolítica secretada por el páncreas al igual que la tripsina, siguió el mismo perfil de expresión del tripsinógeno durante la ontogenia digestiva de la doncella. Por el contrario, durante la fase juvenil el perfil de expresión disminuyó progresivamente a partir de los 13 dpf hasta el final del periodo estudiado, a diferencia de lo observado para el tripsinógeno. Sin embargo, durante este mismo periodo se observó un aumento de la actividad de la quimotripsina (Castro-Ruiz et al., 2019) indicando que la actividad de esta enzima fue regulada a nivel post-transcripcional. La expresión del pepsinógeno aumentó significativamente entre los 10 y los 13 dpf, indicando el fin de la maduración funcional de las glándulas gástricas del estómago. Estos resultados coinciden con los previamente observados a nivel histológico y de actividad enzimática (Gisbert et al., 2014, Castro-Ruiz et al., 2019). A partir de los 13 dpf se produjo un aumento exponencial de la expresión del pepsinógeno, en línea con el mayor desarrollo en número de glándulas gástricas y tamaño del estómago observado histológicamente (Gisbert et al., 2014). En cuanto a los genes relacionados con la digestión lipídica, tanto la fosfolipasa como la lipoproteína lipasa mostraron un aumento de la expresión entre los 3 y los 10 dpf, coincidiendo con la maduración completa del intestino (Gisbert et al., 2014, Castro-Ruiz et al., 2019). Posteriormente, los niveles de expresión se mantuvieron constantes a lo largo del desarrollo larvario. El cambio de dieta durante el destete no pareció influir en la expresión de estas enzimas. Por último, el nivel de expresión del neuropeptido Y aumentó durante el desarrollo larvario para luego volver a disminuir durante el periodo juvenil. El cambio de dieta durante el destete no tuvo ningún efecto sobre el apetito, al menos a nivel transcripcional. El hecho de que exista una regulación transcripcional de la actividad de los enzimas digestivos en función de la dieta suministrada permite usar el estudio de la expresión génica de los genes digestivos como indicador de condición en estudios nutricionales dirigidos a establecer la composición nutricional óptima para esta especie.

CONCLUSIONES

Los resultados de expresión de los genes implicados en la digestión analizados durante su desarrollo larvario y fase juvenil temprana de la doncella siguieron el perfil de expresión típico de una especie carnívora. Los resultados mostraron que la maquinaria enzimática de la doncella se encuentra completamente preparada para la alimentación exógena (4 dpf), alcanzando su máxima madurez a los 10 dpf. Según estos resultados, las larvas de doncella poseen a los 10 dpf un sistema digestivo característico de un adulto y, por tanto, están preparadas para ser alimentadas a partir de ese momento con dietas más complejas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Cahu, C.L., Rønnestad, I., Grangier, V. y Zambonino Infante, J.L. (2004). Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolysed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238, 295–308.
- Castro-Ruiz, D., Torfi-Mozanzadeh, M., Fernández-Méndez, Andree K., García-Dávila, C., Cahu, C.,...Darias, M. (2019). Ontogeny of the digestive enzyme activity of the Amazonian pimelodid catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855). *Aquaculture* 504, 210-218.
- Darias, M.J., Murray, H.M., Martínez-Rodríguez, G., Cárdenas, S. y Yúfera, M. (2005). Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248, 245–252.

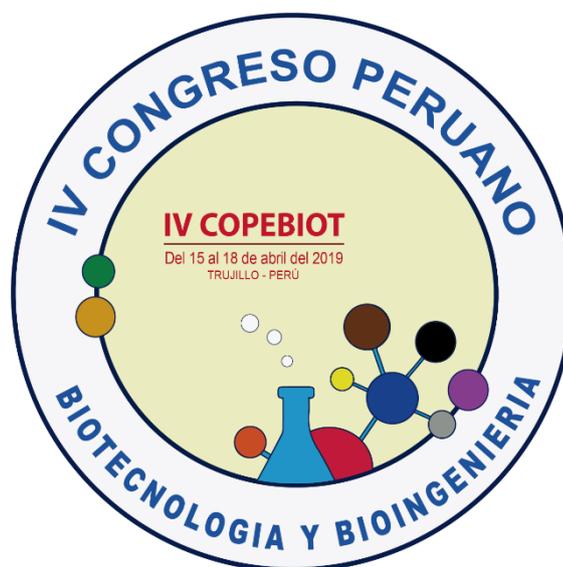
- Darias M.J., Murray H.M., Gallant J.W., Astola A., Douglas S.E., Yúfera M. y Martínez-Rodríguez G. (2006). Characterization of a partial alpha-amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): expression during larval development. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 143, 209-218.
- Darias M.J., Murray H.M., Gallant J.W., Douglas S.E., Yúfera M. y Martínez-Rodríguez G. (2007a). The spatiotemporal expression pattern of trypsinogen and bile salt-activated lipase during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*, Pisces, Sparidae). *Mar. Biol.* 152, 109-118.
- Darias M.J., Murray H.M., Gallant J.W., Douglas S.E., Yúfera M. y Martínez-Rodríguez G. (2007b). Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): Determination of stomach functionality. *Aquaculture* 270, 369-378.
- Darias, M.J., Castro-Ruiz, D., Estivals, G., Quazuguel, P., Fernández-Méndez, C., Núñez-Rodríguez, J., ... Cahu, C., (2015). Influence of dietary protein and lipid levels on growth performance and the incidence of cannibalism in *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) larvae and early juveniles. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 74–82.
- Fernández-Méndez, C., David, F., Darias, M.J., Castro-Ruiz, D. y Núñez-Rodríguez, J., (2015). Larval rearing of the Amazon catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855): weaning with dry and moist diets. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 83–87.
- Gisbert, E., Moreira, C., Castro-Ruiz, D., Ozturk, S., Fernández, C., Gilles, S.,... Darias, M.J., (2014). Histological development of the digestive system of the Amazonian pimelodid catfish *Pseudoplatystoma punctifer*. *Animal* 8, 1765–1776.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Péres, A., Zambonino Infante, J.L. y Cahu, C.L. (1998). Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish. Physiol. Biochem.* 19, 145–152.

IV COPEBIOT 2019

LIBRO DE RESÚMENES

IV CONGRESO PERUANO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERÍA

IV COPEBIOT 2019



*Publicación del Colegio de Biólogos del Perú,
Consejo Regional IV La Libertad
en colaboración con la Sociedad Peruana de Biotecnología*

TRUJILLO - PERÚ
15-18 de abril, 2019

Cita bibliográfica: Elías Silupú Jorge (Editor) & Miranda Chavez Helí (Coeditor) 2019. IV Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Libro de Resúmenes. Colegio de Biólogos del Perú - Consejo Regional IV La Libertad y Sociedad Peruana de Biotecnología. 289 p.

IV CONGRESO PERUANO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA COPEBIOT 2019

Libro de Resúmenes

Comité Organizador del IV COPEBIOT 2019

Presidente:

Dr. Alcibíades Helí Miranda Chávez

Vicepresidente:

Dr. Heber Max Robles Castillo

Secretaria de Economía:

Ms. C. Edelmira Díaz Carranza

Secretaría del Comité Científico:

Dra. Nélide Milly Esther Otiniano García

Secretario de Logística:

Dr. José Luis Silva Villanueva

Secretaria de Inscripciones:

Dra. Bertha Soriano Bernilla

Secretario de Coordinación Nacional:

Dr. Miguel Barrena Gurbillón

Secretario de Programación:

Dr. Victor Vásquez Villalobos

Secretaria de Auspicios:

Blgo. Mblgo. Vilma Montero Celestino

Dirección: Calle Manuel Encinas Mz. S – Lote 27
Urb. Miraflores. Trujillo. Perú

Contactos: 044-244142
informes.cbpll@gmail.com