

Neuropéptidos estimuladores del crecimiento y sistema inmune innato en organismos acuáticos

✉ Mario P Estrada¹, Juana M Lugo¹, Yamila Carpio¹, Reynold Morales¹, Jannel Acosta¹, Alina Rodríguez¹, Antonio Morales¹, Fidel Herrera¹, Osmany González¹, Luis J González², Vladimir Besada², Aniel Sánchez²

¹ División de Biotecnología Animal. Proyecto de Biotecnología Acuática

² División de Química-Física

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
 Ave. 31 e/ 158 y 190, AP 6162, CP 10600, Cubanacán,
 Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
 E-mail: mario.pablo@cigb.edu.cu

RESUMEN

La manipulación del crecimiento en organismos acuáticos es una tarea fundamental de la biotecnología actual, teniendo en cuenta que uno de los problemas cruciales que afronta la humanidad es el hambre y en específico, la carencia de proteína animal. La estimulación del crecimiento dirigida a disminuir los tiempos de cosecha y las grandes mortalidades en las etapas larvales de los peces, así como el uso de inmunoestimulantes que los preparen para enfrentar cultivos intensivos, son objetivos esenciales de la biotecnología agropecuaria moderna. Recientemente se han obtenido evidencias que demuestran la relación existente entre el sistema inmune y el sistema endocrino en los peces por la acción estimuladora de la hormona de crecimiento sobre varios parámetros de la inmunidad innata, que constituye su respuesta defensiva más importante. Lograr con la utilización de productos biotecnológicos estimular la hormona de crecimiento y a la vez, el sistema inmune innato de los peces constituye una de las principales promesas de éxito que tiene la biotecnología para la acuicultura. En el presente trabajo se estudia la influencia del péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP), del péptido relacionado a PACAP (PRP) de *Clarias gariepinus* y del neuropéptido Y de *Oreochromis* sp sobre el crecimiento y el sistema inmune innato en peces. Los resultados obtenidos muestran que estos neuropeptidos, además de tener actividad promotora del crecimiento y del desarrollo estimulan varios elementos de la inmunidad innata como lisozima, lectinas y óxido nítrico, y de las defensas antioxidantes (actividad de la catalasa, de la superóxido/dismutasa y concentración de glutatión reducido).

Palabras clave: PACAP, PRP, NPY, crecimiento, inmunidad, peces

Introducción

El péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) se aisló por primera vez en el año 1989 a partir de hipotálamo bovino y se demostró su capacidad para estimular la secreción de la hormona del crecimiento (GH) mediante la activación de la enzima adenilato ciclasa (Miyata *et al.*, 1989) [1].

El PACAP y el péptido relacionado con el PACAP (PRP) pertenecen a la superfamilia de péptidos nombrada glucagón/secretina, que incluye además de estos dos, al péptido intestinal vasoactivo, los péptidos similares al glucagón 1 y 2, los dipéptidos histidina/meteonina e histidina/isoleucina, y el péptido insulinoide dependiente de glucosa (Campbell y Scanes, 1992) [2]. De la familia del glucagón, el PRP ha sido el único péptido cuya función todavía no se ha esclarecido completamente (Tam *et al.*, 2007) [3]. Es posible que este péptido desempeñe una función importante en vertebrados inferiores como los peces, y que su función en mamíferos haya desaparecido por la pérdida en el genoma del gen de su receptor (Lee *et al.*, 2007) [4].

Hasta el momento, se han clonado los genes que codifican para el PACAP en varias especies de vertebrados y un protocordado (tunicado). Recientemente, fue aislado y caracterizado el ADN complementario que codifica para el polipéptido PRP/PACAP de *Clarias gariepinus* (Lugo *et al.*, 2008) [5]. El PACAP estimula, la liberación de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) por las células

melanotróficas de la pituitaria anterior (Vaudry *et al.*, 2000) [6]. La primera evidencia que muestra una posible función del PACAP sobre la pigmentación de la piel en peces fue reportada por Lugo *et al.*, 2008 [5].

En mamíferos está muy bien caracterizada la función del PACAP sobre el sistema inmune y existen varias patentes que describen su uso en humanos como modulador de la respuesta inmunológica. En el 2008 se demostró por primera vez la función del PACAP como inmunoestimulador en peces Lugo *et al.*, 2008 [5].

Recientemente, en Cuba se reportó por primera vez la expresión recombinante del PACAP y del PRP en bacterias y se demostró que el PACAP y el PRP potencian la tasa de crecimiento en larvas de peces [5]. Los resultados obtenidos *in vivo* en tres especies de peces pez gato, *Clarias gariepinus*; tilapia, *Oreochromis niloticus* y carpa, *Cyprinus carpio* mostraron que el PACAP, mucho más que el PRP, desempeña una función primordial en el control del crecimiento en los peces [5]. Desde el punto de vista teórico, estos resultados contribuyen a dilucidar el eje neuroendocrino propuesto en la literatura para explicar la regulación hipotálamica del crecimiento en vertebrados inferiores y evidencian un posible uso del PACAP recombinante como producto biotecnológico para aumentar la productividad en la acuicultura.

Se evaluó además el efecto de la administración mediante baños de inmersión del PACAP y el PRP

1. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;64(1):567-74.

2. Campbell RM and Scanes CG. Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul* 1992;2:175-91.

3. Tam JK, Lee LT, Chow BK. 2007 PACAP-related peptide (PRP)-Molecular evolution and potential functions. *Peptides* 2007;28:1920-9.

4. Lee LT, Siu FK, Tam JK, Lau IT, Wong AO, Lin MC et al. Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in non-mammalian vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2133-8.

5. Lugo JM, Rodríguez A, Helguera Y, Morales R, González O, Acosta J, et al. Recombinant novel pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) from African catfish (*Clarias gariepinus*) authenticates its biological function as a growth promoting factor in low vertebrates. *J Endocrinol* 2008;197:583-97.

recombinantes sobre importantes parámetros de la inmunidad innata y las defensas antioxidantes en larvas de pez gato africano (*C. gariepinus*) y por primera vez se demostró que el PACAP recombinante de *C. gariepinus* no solo promueve el crecimiento, sino también incrementa la actividad de lisozima, la concentración de los metabolitos derivados del óxido nítrico y las defensas antioxidantes en larvas de peces Lugo *et al.*, 2008 [5]. Estos resultados apuntan a una función novedosa del PACAP como importante regulador del sistema inmune en peces teleosteos, además de su función fisiológica en el control del crecimiento [6].

Otro péptido involucrado en la cascada del crecimiento en vertebrados es el neuropéptido Y, molécula de 36 aminoácidos perteneciente a la familia de los péptidos Y, de secuencia bastante conservada desde los peces hasta los mamíferos (Larhammar D, 1996) [7]. Este péptido se encuentra ampliamente distribuido en varias estructuras del sistema nervioso central de los vertebrados, incluidos los peces teleosteos (McDonald, 1988) [8].

Se ha observado que la inyección intracerebroventricular de NPY en *goldfish* influye en el apetito y por tanto, en el consumo de alimentos. Además, la restricción dietética y la privación de alimento incrementan significativamente la hormona de crecimiento en el suero de estos organismos, correlacionado con un incremento en la expresión del gen NPY (Narnaware *et al.*, 2000) [9]. Estos resultados indican que el NPY está involucrado de forma dinámica en el consumo diario de alimentos en peces, lo que apoya la tesis de que es un neuropéptido orexigénico importante.

También se obtuvo el NPY por vía recombinante, lo cual contribuirá al conocimiento básico de la fisiología de peces. Se determinó el efecto del péptido sobre la ingestión del alimento y el crecimiento en tilapia, con el objetivo de evaluar su posible aplicación en la acuicultura.

PACAP y PRP de *Clarias gariepinus*

Aislamiento del ADNc de PACAP/PRP mediante transcripción reversa/reacción en cadena de la polimerasa

El ADN complementario (ADNc) que codifica para el PRP/PACAP de *C. gariepinus* se obtuvo por transcripción reversa/reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), a partir de ARN total de cerebro de *C. gariepinus* y se utilizó un par de cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el PRP/PACAP del pez gato *Ictalurus punctatus*. Se amplificó desde la región del péptido señal hasta el extremo 3' no traducido (Figura 2 de la referencia [5]). El ADNc del PRP/PACAP de *C. gariepinus* se clonó en un vector T y se obtuvo el plásmido pPRP-PACAP. La secuencia nucleotídica completa del ADNc correspondiente al PRP/PACAP de *C. gariepinus* se muestra en la figura 2 de la referencia [5].

A partir del plásmido pPRP-PACAP se amplificaron los ADNc que codifican para los péptidos PRP y PACAP maduros. En la figura 1, carrilera P, se muestra el resultado de la amplificación del ADNc que codifica para el PACAP de *C. gariepinus*.

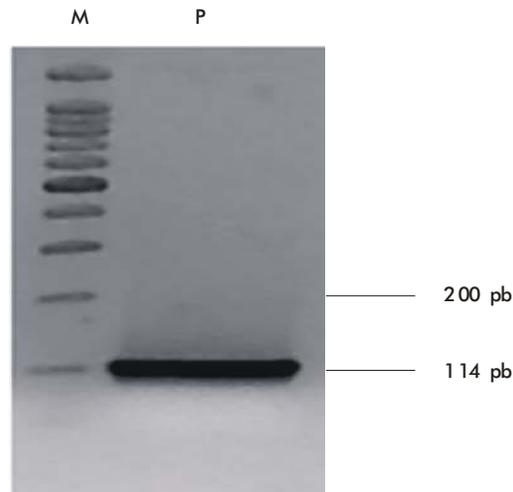


Figura 1. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2% [p/v] que muestra los resultados de las reacciones de RT-PCR realizadas para amplificar el ADNc que codifica para el PACAP de *C. gariepinus*. M, marcador de pesos moleculares de 100 pb DNA Ladder (Promega, cat. # G6951); P, fragmento de ADN correspondiente al PACAP.

Utilizando el mismo procedimiento se amplificó el ADNc que codifica para el PRP de *C. gariepinus* (Figura 2).

Subclonaje de los ADNc correspondientes a PACAP y PRP en un vector de expresión en *E. coli*

Con el objetivo de obtener altos niveles de expresión de los péptidos PRP y el PACAP en *E. coli*, se diseñó una estrategia para el subclonaje de los ADNc correspondientes al PRP y al PACAP, bajo el promotor T7 en el vector pTYB1 del juego de reactivos del sistema IMPACT-CN (New England Biolabs, cat. # E6900S). Esta metodología permitió establecer un protocolo para purificar estos péptidos con actividad biológica, alto grado de pureza y en cantidades suficientes para su utilización en ensayos biológicos *in vivo*.

A partir de la secuencia nucleotídica que codifica para el neuropéptido PRP/PACAP del pez gato *C. gariepinus*, aislada por RT-PCR y clonada en un vector T comercial (plásmido pPRP-PACAP) se amplificaron por la técnica de PCR los fragmentos de ADN de 114 y 145 pb, correspondientes al PACAP y al PRP, respectivamente (Figuras 1 y 2). Los cebadores fueron diseñados de tal forma, que los que complementan con el extremo 5' de cada gen originan un sitio de restricción para la enzima *Nde* I y un codón de inicio de la traducción, y los que complementan con el extremo 3' crean un sitio de restricción para la enzima *Sap* I. Este diseño facilitó el posterior clonaje de los ADNc en el vector de expresión en bacterias.

Los plásmidos recombinantes seleccionados de cada clonaje (nombrados pTYB1-PACAP y pTYB1-PRP) fueron secuenciados de forma automática empleando el cebador universal T7.

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blastx>). Los clones mostraron altos valores de homología nucleotídica con las secuencias nucleotídicas

6. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000;52:269-324.

7. Larhammar, D. Evolution of neuro-peptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept Lett* 2000;62:1-11.

8. McDonald JK. NPY and related substances. *Crit Rev Neurobiol* 1988;4:97-135.

9. Narnaware YK, Peyon PP, Lin X, Peter RE. Regulation of food intake by neuro-peptide Y in goldfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:1025-34.

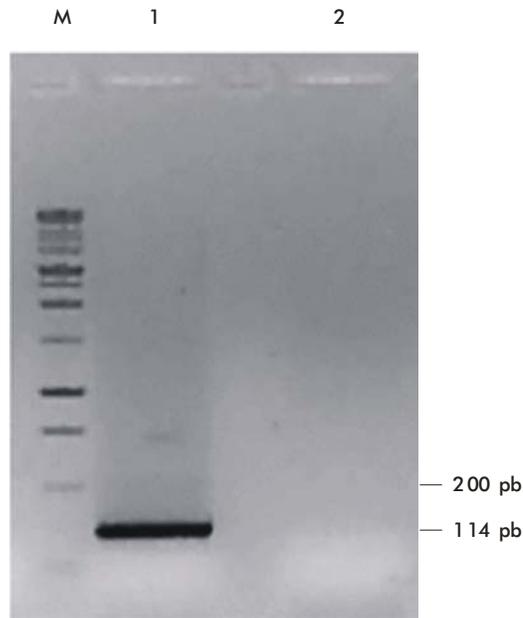


Figura 2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2% [p/v] que muestra los resultados de las reacciones de RT-PCR realizadas para amplificar el ADNc que codifica para el PRP de *C. gariepinus*. M, marcador de pesos moleculares 100 pb DNA Ladder (Promega, cat. # G6951); carrilera 1, amplificación del ADNc que codifica para el PRP de *C. gariepinus*; carrilera 2, control negativo (PCR sin ADN molde).

correspondientes reportadas en la literatura para las diferentes especies.

Inducción de la expresión de los genes en *E. coli*

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con los plásmidos pTYB1-PACAP y pTYB1-PRP para inducir la expresión bajo el control del promotor T7 de los genes que codifican para los péptidos PACAP y PRP. Los ADNc correspondientes al PRP y al PACAP se clonaron en el vector de expresión pTYB1 sin señal de secreción, por lo que una vez inducida la expresión de la proteína, esta podía quedar libre en el citoplasma o formar cuerpos de inclusión. Para determinar la localización citoplasmática específica de la proteína de interés, una vez inducida su expresión, las células de *E. coli* se lisaron de forma mecánica en prensa francesa. Se separó la fracción soluble (sobrenadante de lisis) de la insoluble (precipitado de lisis) por centrifugación y ambas se analizaron por electroforesis de proteínas y por *Western blot* (Figura 4 en la referencia [5]).

Los péptidos PRP y PACAP expresados en *E. coli* fueron analizados por espectrometría de masas. En la

PACAP MHSDGIFTDSYRKQMAVKKYLAAVLGRRYRQFRNK
 PRP MHADGLLDRALRDILVQLSARKYLHLSLTAVRVGEFEDEEEDSEPLS

Figura 3. Secuencias de los péptidos correspondientes al PACAP y PRP de *C. gariepinus*, expresados en *E. coli* y determinadas por espectrometría de masas. Las zonas de los péptidos identificadas se encuentran subrayadas. M es la metionina adicionada como resultado de la expresión de los péptidos en bacterias

figura 3 se muestran los péptidos secuenciados correspondientes a el PRP y al PACAP recombinantes.

Efectos de PACAP y PRP sobre el crecimiento en larvas de *C. gariepinus*

Para evaluar el efecto de los neuropéptidos PACAP y PRP sobre el crecimiento en larvas de *C. gariepinus*, se midió el peso corporal y la longitud. A los 8 días de iniciado el experimento, los animales tratados con el sobrenadante de lisis de la cepa *E. coli* BL21 (D3), transformada con los respectivos vectores de expresión, incrementaron significativamente el peso corporal con respecto a los animales tratados con el sobrenadante de lisis de la cepa *E. coli* BL21 (D3), transformada con el vector de expresión vacío (grupo BL21), y al grupo no tratado (CN) (Figura 6 en la referencia [5]). Estas diferencias se mantuvieron a los 15 y 21 días de iniciado el experimento (Figura 6 en la referencia [5]).

En la figura 4 se muestran las diferencias en el peso de las larvas de clarias de los diferentes tratamientos a los 21 días de iniciado el experimento.

Efectos de PACAP y PRP sobre el crecimiento en larvas de *Oreochromis niloticus*

El PACAP es el miembro más conservado de la superfamilia del glucagón (Sherwood *et al.*, 2000) [10]. Las secuencias aminoacídicas del PACAP de las especies de peces reportadas hasta la fecha exhiben un alto porcentaje de homología, por ejemplo, las secuencias aminoacídicas de pez gato y salmón muestran 94.7% de identidad (Fradinger y Sherwood, 2000) [11].

Teniendo en cuenta la característica señalada, se realizaron varios experimentos *in vivo* para evaluar el efecto del PACAP de *C. gariepinus* sobre el crecimiento de larvas de tilapia de la especie *Oreochromis niloticus*. Las variables medidas fueron el peso corporal y la longitud de los animales.

A los 8 días de iniciado los tratamientos, el peso promedio de las larvas tratadas con el PACAP y el de las larvas tratadas con el PRP fueron estadísticamente superiores con respecto al grupo CN. Estas diferencias

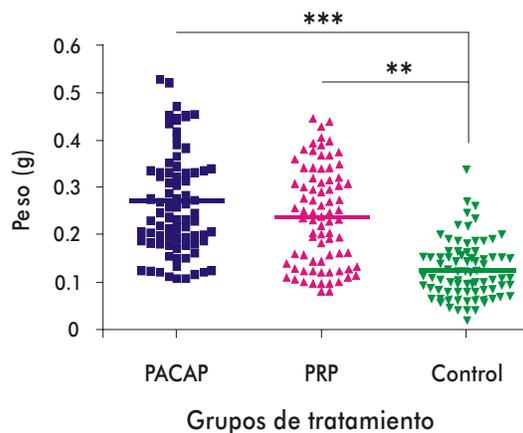


Figura 4. Efecto de los péptidos PACAP y PRP sobre el crecimiento en larvas de *Clarias gariepinus*, a los 21 días de iniciados los tratamientos mediante baños de inmersión con la dosis de 200 µg/L de agua. Los grupos (n=80) se analizaron mediante prueba de ANOVA y Newman-Keuls (***- P < 0.001, **- P < 0.01)

10. Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev* 2000;21(6):619-70.

11. Fradinger EA, Sherwood NM. Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the zebrafish. *Mol Cell Endocrinol* 2000;165 (1-2):211-9.

se mantuvieron hasta el día 21 después de iniciado el experimento (Figura 7 en la referencia [5]). En la figura 5 se muestran las diferencias en el peso de las larvas de tilapia de los diferentes tratamientos a los 30 días de iniciado el experimento.

Efecto del PACAP y el PRP sobre el crecimiento en larvas de *Cyprinus carpio*

Para evaluar el efecto de los neuropéptidos PACAP y PRP sobre el crecimiento en las larvas de carpas, se midió el peso corporal (g) y la longitud (cm). Ocho días después de iniciado el experimento, los animales tratados con el sobrenadante de lisis de la cepa *E. coli* BL21(D3), que expresa los péptidos PACAP y PRP, mostraron un incremento significativo del peso corporal respecto a los animales tratados con el sobrenadante de lisis de la misma cepa transformada con el vector vacío (grupo CN). Este resultado se repitió a los 15 y 27 días de iniciado el experimento (Figura 8 en la referencia [5]). En la figura 6 se muestran las diferencias en el peso de las larvas de carpa con los diferentes tratamientos, a los 27 días de iniciado el experimento.

En el experimento se observó además que los péptidos PACAP y PRP estimularon el desarrollo de coloración en la piel (Tabla 4 en la referencia [5]), parámetro muy importante en la industria de peces ornamentales.

Efectos sobre la inmunidad innata en larvas de *C. gariepinus*

Existen numerosos ejemplos sobre la influencia que ejercen el PACAP y el PRP sobre el sistema inmune en los vertebrados superiores. Por ello, se investigó el efecto de los tratamientos con PACAP y PRP sobre tres parámetros inmunológicos en larvas peces: la actividad de lisozima, lectinas y NO. La lisozima es uno de los parámetros de la inmunidad innata más importantes en peces, buen indicador del estado inmunológico al igual que las lectinas, aglutininas solubles que son fácilmente detectables mediante un

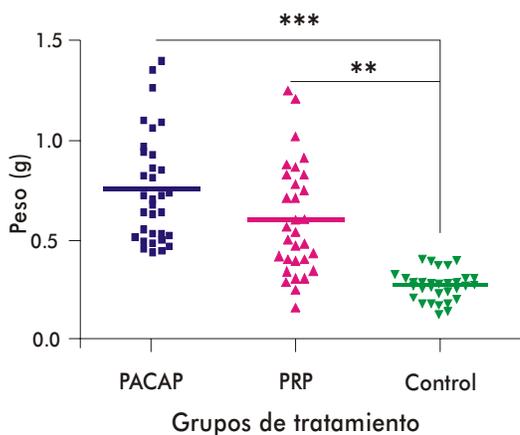


Figura 5. Efecto de los péptidos PACAP y PRP sobre el crecimiento en larvas de *Oreochromis niloticus*, a los 30 días de iniciados los tratamientos por baño de inmersión a la dosis de 200 µg/L de agua. Los grupos (n=30) se analizaron mediante prueba de ANOVA y Newman-Keuls (**- P < 0.001, ***- P < 0.01)

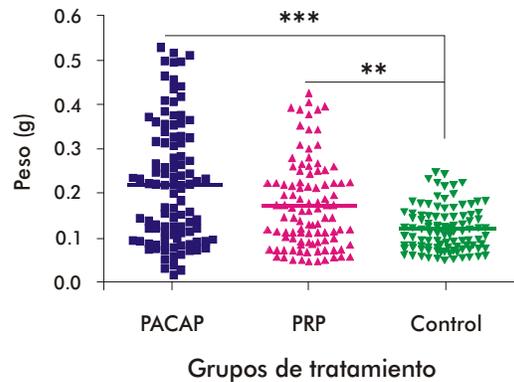


Figura 6. Efecto de los péptidos PACAP y PRP sobre el crecimiento en larvas de *Cyprinus carpio* a los 27 días de iniciados los tratamientos, por baño de inmersión a la dosis de 200 µg/L de agua. Los grupos (n=150) se analizaron mediante prueba de ANOVA y Newman-Keuls (**- P < 0.001, ***- P < 0.01)

ensayo de hemaglutinación. Por otra parte, el NO es una especie reactiva de nitrógeno, generada durante el estallido respiratorio de los macrófagos de potente acción antimicrobiana. Este compuesto se descompone rápidamente en NO₂ y NO₃, que son más estables y poco volátiles.

Se observó que a los 21 días de tratamiento con PACAP, la actividad de la lisozima en las larvas de peces aumentó significativamente, respecto a los controles negativos y al grupo tratado con el PRP (Figura 2 en la referencia [5]).

En la determinación de lectinas en los homogenados de larvas de *C. gariepinus*, se tomó como control negativo una suspensión de eritrocitos al 2% en PBS 1X, en la cual no se observó hemaglutinación. A los 15 días de comenzado el experimento el grupo tratado con PACAP aumentó significativamente los títulos de lectina con respecto al grupo control negativo (BL21) y al grupo tratado con PRP. A los 21 días de iniciado el experimento, el grupo tratado con el PRP mostró títulos de lectinas significativamente superiores a los del grupo BL21 (Figura 3 en la referencia [12]).

Para estimar las cantidades de NO en los homogenados de clarias se determinaron las concentraciones de NO₂ totales mediante un patrón de NaNO₂. A los 21 días de iniciado el experimento, el grupo tratado con el PACAP mostró un valor de concentración de NO₂ significativamente mayor con respecto a los restantes grupos, que no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 4 en la referencia [12]).

Efectos sobre las defensas antioxidantes en larvas de *C. gariepinus*

Se evaluó la actividad de la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la concentración de glutatión reducido (GSH), como moléculas que intervienen en los mecanismos antioxidantes de los organismos ante un estrés oxidativo y evitando el daño celular.

La actividad CAT en larvas de clarias tratadas con PACAP aumentó significativamente a los 21 días de administración del péptido por inmersión, (Figura 5a en la referencia [12]).

12. Carpio Y, Lugo JM, León K, Morales R, Estrada MP. Novel function of recombinant pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide as stimulator of innate immunity in African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. Fish Shellfish Immunol 2008;25(4) 439-45.

La actividad enzimática SOD no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales a los 21 días de tratamiento (Figura 5c en la referencia [12]). La concentración de glutatión reducido en larvas de clarias tratadas con los péptidos fue significativamente mayor en el grupo tratado con PACAP en comparación con el grupo tratado con PRP y el grupo control negativo, tras 21 días de tratamiento (Figura 5b en la referencia [12]).

Los resultados mostrados con respecto a PACAP y PRP) son de gran valor práctico, por su potencial aplicación en la acuicultura para mejorar el crecimiento y la supervivencia de los peces en estadios larvales. Desde el punto de vista científico, se demostró por primera vez el efecto del PACAP como un posible inmunomodulador en organismos acuáticos. Además, se profundizó en el estudio de la función biológica del PRP, hasta ahora desconocida en organismos acuáticos.

Neuropéptido y de tilapia

Aislamiento del ADN complementario

Se aisló mediante la técnica de RT-PCR un fragmento de ADN de 192 pb a partir del cerebro de tilapia roja (*Oreochromis* sp.), que comprende a las secuencias que codifican para el péptido señal y la secuencia codificante del péptido NPY de 36 aminoácidos. El diseño de los cebadores se basó en las secuencias de European sea bass y Bastard halibut que pertenecen al mismo género (*Percomorpha*) y son altamente conservadas en los extremos 5' y 3'. La secuencia nucleotídica obtenida (GenBank accession Nr. AY779047) fue altamente homóloga a todas las anteriormente caracterizadas, incluidos mamíferos y aves, figura 1 en la referencia [13].

Expresión recombinante y purificación del neuropéptido Y maduro

Basado en la secuencia aislada, para el NPY de tilapia, se amplificó y clonó el péptido NPY sin péptido señal en el vector comercial pTYB1 de expresión en bacterias. Después de la inducción con IPTG se observó en una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) una banda de aproximadamente 60 kDa, correspondiente al NPY fusionado con la íntera. La máxima expresión de la proteína se obtuvo 6 h después de la inducción con IPTG. El péptido maduro se generó con 80% de pureza después de incubar con DTT a 4 °C durante 16 h, con un peso molecular de aproximadamente 4.4 kDa, según lo predicho a partir de la secuencia del ADNc aislado. La masa molecular del NPY se calculó por espectrometría de masas. Las señales de los iones multicargados se correspondieron con una molécula de 4395.21 Da, acorde con la masa esperada para el NPY. Se secuenciaron dos péptidos, uno de ellos correspondiente a los 20 aminoácidos del extremo N-terminal y se confirmó que la proteína purificada se correspondía con el NPY de tilapia figura 4 en la referencia [13].

Experimento de ingestión del alimento para medir apetito y actividad promotora del crecimiento en larvas de tilapia

La administración de NPY incrementó la ingestión de alimentos en tilapias juveniles (37 ± 3 g) inyectadas intraperitonealmente en un plazo de 24 h, en

comparación con los controles negativos figura 5 en la referencia [13].

En el experimento de crecimiento se emplearon 12 animales de 0.8 ± 0.1 g de peso en cada grupo, los que se mantuvieron en tanques de 250 L a 28 °C bajo un régimen de 12 h luz/ 12 h oscuridad y fueron alimentados con pienso comercial (CENPALAB) hasta la saciedad 2 veces al día. El NPY recombinante fue inyectado por vía intraperitoneal dos veces por semana, durante 5 semanas. Se inyectó un grupo con una dosis de 1 µg/g de peso, otro grupo con una dosis de 0.1 µg/g de peso y el grupo control con PBS 1X. Al término del experimento se colectaron y pesaron los hígados para determinar el índice hepatosomático (HSI), que es la relación del peso del hígado respecto al peso corporal. Se calculó además el contenido de proteínas y humedad del músculo.

El tratamiento con NPY estimuló el crecimiento de los animales inyectados a las 4 semanas de recibir la dosis de 1 µg/g de peso figura 6 en la referencia [13]. No se encontraron diferencias entre el HSI de los animales tratados y el control. El contenido de proteínas en el músculo se incrementó significativamente ($p < 0.05$), pero no fue así con el contenido de agua figura 6 y tabla 1 en la referencia [13].

Se aisló por primera vez, el ADNc que codifica para el péptido señal-NPY maduro de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Se observó que la secuencia de aminoácidos fue altamente conservada, en comparación con secuencias previamente reportadas de peces, anfibios, aves y mamíferos. El péptido biológicamente activo puede ser obtenido en el sobrenadante de lisis de *E. coli* mediante el sistema IMPACT-CN. El péptido recombinante purificado estimula el apetito al ser administrado a tilapias juveniles. Se mostró además, que la inyección intraperitoneal de NPY promovió el crecimiento y la concentración de proteínas del músculo en dependencia de la dosis administrada [13].

Efecto sobre el crecimiento y el sistema inmune innato en larvas de *C. gariepinus*

Se ha descrito que las hormonas modulan las actividades antioxidantes en mamíferos (Hauck y Bartke, 2000) [14]. Por ello, se investigó el efecto del péptido de referencia sobre estas propiedades. El experimento se realizó con larvas de clarias de 0.0072 ± 0.0001 g de peso y 9.3 ± 0.2 mm de longitud.

El peso corporal de los animales tratados con el NPY fue mayor a los 15 y 30 días del inicio del experimento, comparado con el grupo control negativo. El porcentaje de incremento en peso del grupo tratado con NPY fue de 87% y 64% mayor que en el grupo control en los días 15 y 30 respectivamente. La longitud de los peces fue también mayor en el grupo tratado con NPY en el día 15 y 30, comparado con el control negativo, hubo incrementos de 27% y 16% en ambos tiempos respectivamente figura 1 en la referencia [15].

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas, la actividad de la lisozima y en el título de lectinas a los 15 días del experimento. A los 30 días se observó incremento de la actividad SOD y en la concentración de glutatión reducido en los homogenados de las larvas tratadas con el NPY. No se encontraron diferencias en la actividad CAT entre los grupos experimentales tabla 1 en la referencia [15].

13. Carpio Y, Acosta J, Morales A, Herrera F, González LJ, Estrada MP. Cloning, expression and growth promoting action of red tilapia (*Oreochromis* sp) neuropeptide Y. *Peptides* 2006;27(4):710-8.

14. Hauck SJ and Bartke A. Effects of growth hormone on hypothalamic catalase and Cu/Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2000;28(6):970-8.

15. Carpio Y, León K, Acosta J, Morales R, Estrada MP. Recombinant tilapia Neuropeptide Y promotes growth and antioxidant defenses in African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquaculture* 2007;272:649-55.

Lo anteriormente expuesto es la primera demostración del incremento en la tasa de crecimiento en peces (larvas de *Clarias gariepinus*) al administrar por inmersión el péptido NPY recombinante obtenido en *E. coli*, lo cual confirmó que sus funciones biológicas están muy conservadas y que es un potente factor orexigénico en peces. Además este péptido parece modular los mecanismos de defensa antioxidantes como lo mostró el incremento observado en SOD y GSH figura 2 en la referencia [15].

Conclusiones

Se aislaron y clonaron por primera vez los genes PACAP y PRP de pez gato africano (*Clarias gariepinus*) y el

gen del neuropéptido Y de tilapia (*Oreochromis sp.*). Se mostró su acción potenciadora del crecimiento y el aumento de la supervivencia al obtenerse por vía recombinante y administrarse a diversas especies de peces en diferentes estadios del desarrollo, en cultivos intensivos. Además, en el estudio en peces de la relación existente entre estos péptidos y parámetros importantes de la inmunidad innata se obtuvieron las primeras evidencias de la posible función inmunomoduladora del PACAP, adicionalmente se mostró la acción reguladora del apetito de NPY y también evidencias de las funciones del PACAP como factor hipofisiotrópico principal, regulador de la secreción de hormona de crecimiento.