

Artículo científico

Datos preliminares de los efectos del medio ambiente en la expresión de genes asociados al estrés, producción y reproducción en paiches *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), criados en cautiverio



Versión en revisión



BIODAMAZ
PERÚ-FINLANDIA

Artículo Científico N° 10

2007

BIODAMAZ, Perú – Finlandia
Proyecto Diversidad Biológica de la Amazonía Peruana

Autor:

Nydia Elespuru Urro

Manuel Sandoval Chacón

Fernando Alcántara Bocanegra

El presente documento ha sido realizado con financiamiento del Ministerio de Relaciones Exteriores de Finlandia y del Gobierno del Perú, a través del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP, en el marco del Convenio de Cooperación Técnica Internacional entre Perú y Finlandia: Proyecto Diversidad Biológica de la Amazonía Peruana – BIODAMAZ.

© 2007. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP
Proyecto Diversidad Biológica de la Amazonía Peruana- BIODAMAZ
Av. Abelardo Quiñónez Km 2.5
Iquitos – Perú
Correo electrónico: biodamaz@iiap.org.pe
<http://www.iiap.org.pe/biodamaz>

Los textos pueden ser utilizados total o parcialmente citando a la fuente.

Hecho en el Perú

Datos preliminares de los efectos del medio ambiente en la expresión de genes asociados al estrés, producción y reproducción en paiches *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), criados en cautiverio

Nydia Eléspuru¹; Manuel Sandoval¹; Fernando Alcántara²
Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana¹, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana².

RESUMEN

El paiche -*Arapaima gigas* es una de las especies más representativas de la ictiofauna amazónica, tanto por el interés científico como por su valor económico. En el comercio regional amazónico goza de un status preferencial por el valor nutricional de su carne, buen sabor del filete y por el alto rendimiento en carcasa. Por esta razón la especie sufre una fuerte presión de pesca que afecta enormemente su stock en los ambientes naturales, razón por la cual se viene impulsando su crianza en cautiverio. Para esto, es preciso conocer las condiciones medioambientales que favorecen su normal desarrollo y reproducción. El propósito de este estudio es conocer la expresión de los genes Metalotionina, Glutathion Peroxidasa y el Factor de Necrosis Tumoral (relacionados a estrés, producción y reproducción) en especímenes de 09 meses, 02 y 05 años que han sido criados en cautiverio. Fueron colectadas muestras de tejidos (hígado, branquias, riñón, intestino, músculo, gónada) de 11 ejemplares de paiche: 3 alevinos, 4 juveniles y 4 adultos; la extracción de RNA se realizó mediante el método Acido Guanidinium Tiocianato-Fenol-Cloroformo y el DNA mediante el método del CTAB; la amplificación del DNA de éstos genes fue realizado vía PCR. En alevinos se extrajo mayor cantidad de RNA en gónadas (3719,33 µg/ml) y una menor en intestino proximal (845,33 µg/ml), en juveniles se fue mayor la cantidad de RNA en branquias (2845,44 µg/ml) y menor en músculo (235,11 µg/ml) y adultos fue en hígado donde se obtuvo mayor cantidad de RNA (2969,50 µg/ml) y en músculo la menor cantidad (282,50µg/ml). Los valores promedios de los parámetros limnológicos evaluados se encuentran dentro de los rangos permisibles para el cultivo del paiche. Actualmente se tiene casi optimizado la temperatura de anelamiento de los primers, una vez logrado se procederá a realizar el análisis de la expresión genética mediante el RT-PCR.

Palabras clave: *Arapaima gigas*, expresión de genes, MT, Gpx, TNFalpha, Beta-actina, RT-PCR

Abstract

Preliminary results of the effects of the environment on gene expression associated with stress, production and reproduction in paiche *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), raised in captivity

Due to its scientific and economic value, the paiche *Arapaima gigas* is one of the more representative species of the Amazonian fish fauna. This fish possess an important position in the local markets due to its nutritional value, good taste of its fillet, and for the high performance of its carcass. For this reason, the paiche suffers a strong fishing pressure which affects its natural stocks in the Amazon Basin, therefore, its culture in captivity has been recommended in order to reduce the pressure on this species. The aim of this study is to know the gene expression of Metallothionein, Glutathione Peroxidase, and Tumor of Necrosis Factorial alpha (three genes associated with stress, production and reproduction) in fish of 9, 24 and 60 months old raised in captivity. Samples of liver, gills, kidney, intestine, muscles and gonads of 11 specimens of paiche were collected (3 fingerlings, 4 juveniles and 4 adults). For RNA's extraction we used the Acid Guanidine Thiocyanate-Phenol-Chloroforme method, for DNA's extraction the CTAB method and for DNA's amplification of the genes PCR was performed. Preliminary data obtained from the tissues collected indicate that for fingerlings, gonads yielded more amount of RNA (3719,33 µg/ml) than intestine (845,33 µg/ml), meanwhile in juveniles gills yielded more RNA (2845,44 µg/ml) than muscle (235,11 µg/ml), and finally in adults, the liver yielded more RNA (2969,50 µg/ml) than muscle (282,50µg/ml). Water quality values evaluated during the study were inside the normal ranges for paiche culture. Currently, we are adjusting the annealing temperature of the primers, which is almost optimized. Once it is achieved, we will proceed analyzing the gene expression using RT-PCR.

Keywords: *Arapaima gigas*, gene expression, Metallothionein, Glutathione peroxidase, Tumor of Necrosis Factorial alpha, β -Actin, RT-PCR

RESUMEN

El paiche -*Arapaima gigas* es una de las especies más representativas de la ictiofauna amazónica, tanto por el interés científico como por su valor económico. En el comercio regional amazónico goza de un status preferencial por el valor nutricional de su carne, buen sabor del filete y por el alto rendimiento en carcasa. Por esta razón la especie sufre una fuerte presión de pesca que afecta enormemente su stock en los ambientes naturales, razón por la cual se viene impulsando su crianza en cautiverio. Para esto, es preciso conocer las condiciones medioambientales que favorecen su normal desarrollo y reproducción. El propósito de este estudio es conocer la expresión de los genes Metalotionina, Glutathion Peroxidasa y el Factor de Necrosis Tumoral (relacionados a estrés, producción y reproducción) en especímenes de 09 meses, 02 y 05 años que han sido criados en cautiverio. Fueron colectados muestras de tejidos (hígado, branquias, riñón, intestino, músculo, gónada) de 11 ejemplares de paiche: 3 alevinos, 4 juveniles y 4 adultos; la extracción de RNA se realizó mediante el método Acido Guanidinium Tiocianato-Fenol-Cloroformo y el DNA mediante el método del CTAB; la amplificación del DNA de éstos genes fue realizado vía PCR. En alevinos se extrajo mayor cantidad de RNA en gónadas (3719,33 µg/ml) y una menor en intestino proximal (845,33 µg/ml), en juveniles se fue mayor la cantidad de RNA en branquias (2845,44 µg/ml) y menor en músculo (235,11 µg/ml) y adultos fue en hígado donde se obtuvo mayor cantidad de RNA (2969,50 µg/ml) y en músculo la menor cantidad (282,50µg/ml). Los valores promedios de los parámetros limnológicos evaluados se encuentran dentro de los rangos permisibles para el cultivo del paiche. Actualmente se tiene casi optimizado la temperatura de anelamiento de los primers, una vez logrado se procederá a realizar el análisis de la expresión genética mediante el RT-PCR.

Palabras claves: *Arapaima gigas*, expresión de genes, MT, Gpx, TNFalpha, Beta-actina, RT-PCR

INTRODUCCIÓN

El paiche se distribuye en todo el área de inundación de la cuenca del río Amazonas, siendo su principal hábitat los ecosistemas de aguas lénticas (varzea, igapó, y caños) y los ríos con poca corriente (Pinto, 1999). Es una especie de alta potencialidad científica y económica que ha soportado una intensa presión de pesca y como consecuencia sus poblaciones se han visto reducidas drásticamente (a excepción de la Reserva Nacional Pacaya – Samiria la cual alberga algunos de los stock más importantes de paiche en la región. (Montreuil, 2003)), por lo que su cultivo en ambientes controlados viene siendo impulsado de manera complementaria para efectivizar su aprovechamiento y conservación (Rebaza *et al*, 1999).

Para optimizar su crianza en cautiverio, garantizar su conservación e incrementar su producción, es preciso formular una dieta que contenga el porcentaje necesario de proteína con minerales, oligoelementos y micronutrientes esenciales, que garanticen una buena conversión alimenticia y el mantenimiento de la salud y la reproducción.

En la piscicultura intensiva, la alimentación del paiche con raciones de mala calidad o mal balanceadas que no atienden las exigencias nutricionales de la especie, resulta en

una deficiencia en la respuesta inmunológica del pez, aumentando la probabilidad de incidencia de enfermedades y parásitos. De igual manera el acumulo del material orgánico proveniente de los residuos del alimento y de las heces, también puede causar alteraciones en el agua y afectar el crecimiento de los peces (**Banzatto et al., 1989**).

Los nuevos avances científicos en biología molecular y biotecnología en la amazonía peruana, han hecho posible realizar trabajos a nivel molecular empleando eficientes técnicas para la extracción del material genómico (DNA y RNA), a partir de pequeñas cantidades de tejidos o células, haciendo esto conveniente para estudios de la expresión de genes en la cual solamente una cantidad limitada del material biológico está disponible y permitiendo a la vez el simultáneo procesamiento de un largo número de muestras (**Chomczynski, 1987**).

La RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*; Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), es una técnica que permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado. De esta forma, se puede medir la expresión génica mediante una técnica alternativa al Northern blot o Dot Blot, ensayos de protección de RNasa, hibridación in situ, y ensayos de nucleasa S1. La RT-PCR es más sensible que estas técnicas, y requiere menos RNA.

El presente estudio proveerá datos para el cultivo del paiche y permitirá conocer los mecanismos de respuestas de esta especie en crianzas intensivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los ejemplares de paiche en sus tres estadios: alevino, juvenil y adulto, fueron proporcionados por el Centro de Investigaciones Acuícolas de Quistococha del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP. Estos ejemplares procedían de diferentes ambientes de cultivo y habían recibido diferentes dietas alimenticias; los alevinos estaban siendo criados en jaula flotante y alimentados con dieta extruida, los juveniles criados en estanque de cemento y los adultos en estanque de tierra y ambos recibieron como dieta pez forraje.

Colecta de muestras

Se colectó aproximadamente 1g de tejido. Para la extracción de DNA las muestras fueron depositadas en tubos de 2ml conteniendo 1ml de alcohol al 96°, mientras que las muestras a utilizar para la extracción de RNA fueron remojadas en agua DEPC, para desprender rastros de sangre y mantener la pureza del material colectado, luego se desmenuzó el tejido para depositarlos en tubos de 2ml conteniendo 1ml de GTC buffer, conservados todos éstos en cubetas de hielo, hasta ser guardados en el congelador a -70°C.

Parámetros limnológicos

Los datos limnológicos se obtuvo mediante la utilización de diferentes equipos y materiales. Para la medición de la dureza, amonio, CO₂ y nitritos, se utilizó kits colorimétricos del equipo de análisis de LAMOTTE (Washington, U.S.A.); para la

Temperatura y O₂ se empleó un Oxímetro (YSI MODEL 57) con termómetro incorporado; para el Potencial Hidrogeno (Ph) se utilizó un potenciómetro marca HANNA y para la medición de la Conductividad eléctrica se contó con la ayuda de un Conductivímetro (Modelo CO 150), con una sensibilidad de 0.01 Ms. Los datos de las diferentes evaluaciones limnológicas de los ambientes de cultivo fueron proporcionados por los responsables de la crianza de los ejemplares de paiche.

Obtención del material genómico

Los tejidos colectados (hígado, branquias, riñón, intestinos, músculo, gónadas) fueron analizados con el Método CTAB para la obtención de DNA y el Método Ácido Guanidinium Thiocyanate – Phenol – Cloroformo para RNA. La pureza y la concentración del DNA y RNA se determinaron por espectrofotometría (260 nm y 280 nm). Se escaneó la muestra para evaluar la calidad de la extracción, en el que el rango aceptable de pureza es: 1.7 – 2.2 (A_{260}/A_{280}). Finalmente se determinó la concentración de DNA multiplicando: [$A_{260} \times \text{FD} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$] y para RNA: [$A_{260} \times \text{FD} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$]. La calidad de la extracción del material genómico se verificó por corrida electroforética a 100V en gel de agarosa al 1% (DNA) y a 70V en gel desnaturalizado de agarosa (RNA)

Regulación y expresión genética

La secuencia de los primers se obtuvieron del Gen Bank correspondiendo al de trucha *Rainbow trout* (MT, TNF α , β -actina) y a de ratón *mus musculus/mouse* (Gpx) y dichas secuencias son:

Metalotioneína:

Sense: (5'-ATGGATCCTTGTGAATGCTC-3')

Antisense: (5'-CCTCACTGACAACAGCTGGT-3');

Glutaciona peroxidasa:

Sense: (5'- CCTCACTGACAACAGCTGGT-3')

Antisense: (5'- ACACCGGAGACCAAATGATGTACT

TNF alpha:

Sense: (5'- CAAGAGTTTGAACCTTGTTCAA-3')

Antisense: (5'- GCTGCTGCCGCACATAGAC-3')

Beta-actina:

Sense: (5'- ATGGAAGGTGAAATCGCC3')

Antisense: (5'- TGCCAGATCTTCTCCATG-3')

Para el análisis de la expresión genética se empleará el método de RT-PCR utilizando el kit de Thermo Script™ RT-PCR System, pero un paso previo a esto es la optimización de la temperatura de anelamiento de los primers a través de un PCR convencional el cual tuvo las siguientes condiciones:

Condiciones de PCR con gradiente de temperatura:

Componentes	Muestras (µl)
H ₂ O PCR	12.3
Buffer 10X	2.5
Cl ₂ Mg	1
dNTPs mix	2.5
Primer 1F	1.25
Primer 2R	1.25
Taq- Polimerasa	0.2
DNA (100ng/µl)	4
Premix	21
TOTAL	25

Perfil de temperatura programado en le termociclador:

PRE-PCR	PCR	POST-PCR
<p>94°C 2 min</p>	<p>94°C 1 min</p> <p>Tm/Gradiente T° 1 min</p> <p>72°C 1 min</p>	<p>72°C 5 min</p>
1 Ciclo	35 Ciclos	1 Ciclo

RESULTADOS PRELIMINARES

De la extracción de RNA

En total se sacrificaron 11 ejemplares de paiche: 3 alevinos, 4 juveniles y 4 adultos; de los cuales se colectó muestras de tejidos (hígado, branquias, riñón, intestinos, músculo, gónada) para extraer RNA. En alevinos se logró extraer una mayor cantidad de RNA en gónadas (3719,33 µg/ml) y una menor cantidad en intestino proximal (845,33 µg/ml), en juveniles se obtuvo mayor cantidad de RNA en branquias (2845,44 µg/ml) y menor en músculo (235,11 µg/ml) y adultos fue en hígado donde se obtuvo mayor cantidad de RNA (2969,50 µg/ml) y en músculo la menor cantidad (282,50µg/ml).

La cantidad promedio obtenida de la extracción de RNA en los diferentes tejidos se muestra en las **Tablas I, II y III.**

Tabla I: Cantidad promedio de RNA obtenida en ejemplares alevinos de paiche

Tejido	[RNA] µg/ml		
	— x	SD	SE
HIGADO	2,402,000	1,099,244	448,765
BRANQUIAS	1,028,000	639,750	261,177
I. PROXIMAL	845,333	499,406	203,881
GONADA	3,719,333	2,826,201	1,153,792

Tabla II: Cantidad promedio de RNA obtenida en ejemplares juveniles de paiche

Tejido	[RNA] µg/ml		
	— x	SD	SE
HIGADO	2,637,913	987,500	205,908
BRANQUIAS	2,845,440	2,799,855	559,971
I. PROXIMAL	2,076,000	1,692,982	338,596
GONADA	2,753,697	2,757,470	480,014
RIÑON	1,422,000	942,161	251,803
MUSCULO	235,111	83,653	19,717

Tabla III: Cantidad promedio de RNA obtenida en ejemplares adultos de paiche

Tejido	[RNA] µg/ml		
	— x	SD	SE
HIGADO	2,969,500	1,592,718	563,111
BRANQUIAS	522,000	211,649	74,829
I. PROXIMAL	2,080,500	583,736	206,382
GONADA	1,129,000	906,691	320,564
RIÑON	897,500	405,550	143,383
MUSCULO	282,500	99,552	35,197

De los datos limnológicos:

Los análisis fisicoquímicos de temperatura, Ph, conductividad, sólidos en suspensión y oxígeno, no muestran diferencias, cuyos rangos están dentro de los límites aceptables para el desarrollo del paiche.

En lo que se refiere a los valores promedio de Amonio (ppm), Alcalinidad (ppm), Dureza total (ppm) y CO₂ (ppm), estos se encuentran dentro de los rangos aceptables para el cultivo del paiche.

Tabla IV: Valores promedios de los parámetros limnológicos evaluados en los diferentes ambientes de cultivo de los ejemplares de paiche

Parámetros limnológicos	AMBIENTE DE CULTIVO		
	Jaula (Alevinos)	Estanque de cemento (Juveniles)	Estanque de tierra (Adultos)
Ph	5,7 ± 0,07	6.8±0.04	5.53 ± 0.15
Temperatura (°C)	28,56 ± 1,91	24.9±0.10	28.36 ± 0.86
Conductividad eléctrica (µS)	45,67 ± 4,04	126.2±20.6	20.88 ± 2.07
Sólidos totales disueltos (ppm)	25,67 ± 4,04	62.7±10.3	10.36 ± 1.08
Oxígeno disuelto (mg/l)	3,25 ± 0,85	4.2±0.29	2.33 ± 0.43
Alcalinidad ppm	32,33 ± 2,52	55.3±4.37	18 ± 2.83
Amonio ppm	0,2 ± 0,00	0.7±0.08	0.77 ± 0.25
CO2 ppm	13,33 ± 1,53	24.3±3.48	24 ± 5.66
Dureza	32,33 ± 2,52	21.3±1.33	12 ± 0.000

Del PCR y optimización de la temperatura de anelamiento de los primers

Se amplificaron los genes de metalotioneina, Glutaciona peroxidasa, TNF α vía PCR testando diferentes gradientes de temperaturas de anelamiento hasta encontrar la óptima a emplear durante el proceso de RT-PCR.

Siguiendo las condiciones de PCR, se obtuvo las siguientes bandas:

Figura 1: PCR con gradiente de temperatura para el primer de MT

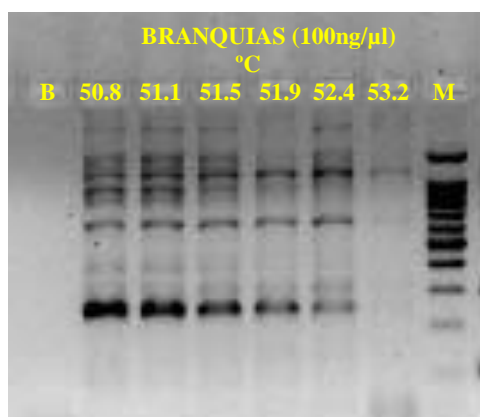
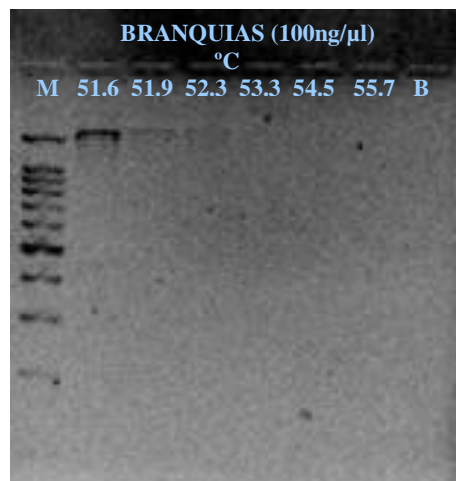


Figura 2: PCR con gradiente de temperatura para el primer de Gpx



Figura 3: PCR con gradiente de temperatura para el primer de TNFα



Literaturas citadas

- BANZATTO, D.A. & KRONKA, S. DO N. 1989. Experimentação agrícola. Departamento de Ciências Exatas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias -UNESP. Jaboticabal. SP. 247 pp.
- CHOMCZYNSKI, P. & N. SACCHI. 1987. Single step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate- Phenol-Chloroform Extration. In Analytical Biochemistry, 156-159.
- MONTREUIL, V. 2003. Manejo de poblaciones naturales de paiche. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Programa de Ecosistemas Acuáticos. Iquitos-Perú. 60 pp.
- PINTO, C. A. 1999. Pirarucú (*Arapaima gigas*) especie promisoría para la Amazonia. Manejo, producción y conservación. Centro Experimental Amazónico c.e.a. –sede Leticia Corpoamazonía. Leticia – Amazonas.
- REBASA, A.; ALCANTARA, F; VALDIVIESO, M. 1999. Manual de Piscicultura del paiche *Arapaima gigas* Cuvier. SPT – TCA. IIAP. Edit. Manatí Grafico S.A. Caracas, Venezuela, 247p.