

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE  
VALENCIA**  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



**MARCADORES MITOCONDRIALES DE  
ESTRÉS OXIDATIVO Y LIPOTOXICIDAD  
EN DORADA (*Sparus aurata*).**

Memoria presentada por Azucena Bermejo Nogales para  
optar al grado de Doctor

Fdo.: Azucena Bermejo Nogales

Valencia, febrero de 2012

TESIS DIRIGIDA POR:

*Jaume Pérez Sánchez*, Profesor de Investigación del Instituto de  
Acuicultura de Torre de la Sal (Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas)

Fdo.: Jaume Pérez Sánchez



“El monje taoísta, estrechando la mano de su amigo entre las suyas, se echó a reír con ganas. Recitó un breve poema, lleno de gracia, ironía y belleza que expresaba la importancia de la constancia y el coraje, y de conservar el sentido del humor ante la adversidad.”

- El niño de piedra - Thich Nhat Hanh



La realización de una tesis pasa por múltiples etapas, este camino recorrido no hubiese sido posible sin las personas que han hecho que sea de alguna forma inolvidable y a las que quiero expresar todo mi agradecimiento.

En primer lugar, gracias a mi director de tesis, por tener la valentía de darme la oportunidad de pertenecer al Grupo de Nutrigenómica y Endocrinología del Crecimiento de Peces, recorrer este camino juntos es algo que sin duda nunca olvidaré, sin ti no hubiese cumplido este sueño de terminar una tesis, gracias Jaume.

También quiero agradecer a los miembros del grupo su compañerismo, comprensión y ayuda. En especial a Alfonso Saera y Laura Benedito por ser unas personas increíbles con las que siempre estaré encantada de compartir experiencias. A Josep Calduch por su actitud siempre predispuesta y a M<sup>a</sup> Ángeles González por ser una gran profesional. A Pedro Gómez y a los becarios menores Gabriel Ballester y Miriam Borrel por mostrarme una perspectiva diferente.

No puedo olvidar a otros científicos con los que he tenido el honor de coincidir en estos años de andadura. A Lesley MacEvoy con quien empecé mi periplo en la acuicultura y a todos los amigos del North Atlantic Fisheries College. A Juan Carlos Navarro por introducirme en la investigación en España y por esos momentos de buen humor. A Ariadna Sitjà por su ayuda siempre amable e instructiva. A Francisco Hontoria por mostrarme de forma paciente su ayuda con la informática. A Pascal Divanach y Nikos Papandroulakis por sus instrucciones en el cultivo del dentón y enseñarme lo importante de mantener la entereza. A Eduardo Rial por su inestimable aportación y ayuda con la bioenergética mitocondrial.

A todo el personal del IATS, en especial a Charo, Luis, Paco, Rielo, Beatriz y Palmira por sus palabras de apoyo y ayuda con la técnica y la burocracia.

A mis colegas en el IATS, sin duda a Oscar Monroig por ser ese maestro, a Olga Ruiz por esa sonrisa al llegar al despacho, a Elena Viciano por hacerme fluir, a Ana Rocha por ser una chica excelente (y deportista), a Rocío Ureña porque tener esos principios y ese humor que tanto me gusta, a Itziar Estensoro por

---

su “escáner”. A todos los demás, Marta, Stela, Gregorio, Berta, Majo, Raquel, Diana, Oli, Matias, Alexandros, Pedriño a tantos y tantos, por los momentos de distensión sin duda necesarios. A Añiña Felpete porque es sin duda lo mejor que conozco de las tierras gallegas y mallorquinas.

A mis compis de piso a Evita, Catarina y Lourdes, y sobre todo a Begoña por demostrarme lo que es tener begoñina.

A Joselito, mi familia, por todos, todos esos momentos, eres un maestro.

A mis grandes amigos castelloneros, por ser mi familia, a todos gracias por el apoyo, ayuda, comidas, cenas, risas y más risas y momentos de ánimo un abrazo especial para mi Susana, Ana T, Javi P, Ana G, Manu, Alvarito, mi mecenas David Ferris, David y Marian, Javis y demás gente de la colla, un placer.

A mis amigas de siempre, Rosa, Lourdes, por eso, por estar ahí siempre, a mi Marisiña porque eres genial, a Rosi, Cristina y como no al Jex, Patricio, Ruli y los chicos de colme porque sé que me queréis mucho. A Elena, Isa, Nuria e Inés, porque siempre nos veremos allí donde vayamos.

A mi familia, a mi padre, a mis tíos y mis primas por entender que estoy lejos pero que os quiero. A Javi, por mostrarme la luz. A Canelita, por ser tan fiel y estar siempre feliz. A mis hermanas, Yoli y Belina, mis proteínas desacopladoras por reducir mi estrés, porque os quiero un montón y porque sin vosotras la vida sería muy distinta.

A mi madre, Lucia, porque esta tesis va dedicada a ti, por ser esa chaperona que repara el daño, gracias por confiar en mí y apoyarme siempre, para ti.

---

---

1. Introducción general .....	1
1.1. Antecedentes, presente y perspectivas de futuro de la acuicultura.....	3
1.1.1. La acuicultura en España .....	7
1.2. Bienestar animal .....	10
1.2.1 Conceptos básicos y legislación .....	10
1.2.2 Sistemas efectores de estrés.....	18
1.2.2.1 Eje hipotalámico-simpático-cromafín y eje hipotalámico-hipofisario-interrenal .....	20
1.2.2.2 Sistema somatotrópico.....	24
1.2.2.3 Sistema inmunitario .....	28
1.2.2.4 Respuesta celular .....	32
1.3. Las mitocondrias como actores de la respuesta mediada por el estrés .....	41
1.3.1 Origen y estructura .....	43
1.3.2 Transporte mitocondrial de proteínas .....	46
1.3.3 Cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa y proteínas desacopladoras .....	48
1.3.4 Disfunciones mitocondriales .....	52
2. Objetivos y plan de trabajo.....	3
3. Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/ mortalin/ mtHsp70/ PBP74/ HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream ( <i>Sparus aurata</i> L.) .....	63
3.1. Introduction .....	66
3.2. Materials and methods.....	67
3.2.1. Experimental design .....	67
3.2.1.1. Acute confinement exposure .....	67
3.2.1.2. Prolonged confinement exposure (pair-fed study) ...	68
3.2.2. RNA extraction and RT procedure .....	69
3.2.3. PCR amplification and phylogenetic analyses .....	69
3.2.4. Gene expression.....	70
3.2.5. Protein extraction and Western blotting .....	71
3.2.6. Biochemical assays.....	72

---

3.2.7. Statistics.....	73
3.3. Results .....	74
3.3.1. Sequence and phylogenetic analyses .....	74
3.3.2. Acute confinement exposure .....	79
3.3.3. Prolonged confinement exposure (pair-fed study) .....	79
3.4. Discussion .....	84
References .....	89
4. Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex ( <i>Dentex dentex</i> L.) and gilthead sea bream ( <i>Sparus aurata</i> L.) in relation to redox homeostasis .....	95
4.1. Introduction .....	99
4.2. Materials and methods .....	101
4.2.1. Fish rearing and sampling .....	101
4.2.2. Hormone and plasma metabolite assays .....	102
4.2.3. Antioxidant capacity .....	102
4.2.4. ROS production .....	103
4.2.5. RNA extraction and RT procedure .....	103
4.2.6. PCR amplification and sequencing .....	104
4.2.7. Real-time PCR.....	104
4.2.8. Statistics.....	107
4.3. Results .....	108
4.3.1. Growth performance.....	108
4.3.2. Metabolic biomarkers .....	110
4.3.3. Hepatic transcriptome.....	114
4.4. Discussion .....	117
References .....	121
5. Gene expression survey of mitochondrial uncoupling proteins (UCP1/UCP3) in gilthead sea bream ( <i>Sparus aurata</i> L.) .....	127
5.1. Introduction .....	130
5.2. Materials and methods .....	131
5.2.1. Animal care and sampling .....	131
5.2.2. Experimental setup .....	131

---



---

5.2.3. RNA extraction and RT procedure .....	133
5.2.4. RT-PCR approach for UCP3 amplification.....	133
5.2.5. UCP expression analyses .....	134
5.2.6. Statistics .....	135
5.3. Results .....	135
5.3.1. Cloning of gilthead sea bream UCPs.....	135
5.3.2. Gene expression analyses .....	139
5.4. Discussion.....	146
References .....	151
6. Feed restriction up-regulates uncoupling protein 3 (UCP3) gene expression in heart and red muscle tissues of gilthead sea bream ( <i>Sparus aurata</i> L.): New insights in substrate oxidation and energy expenditure .....	157
6.1. Introduction .....	160
6.2. Materials and methods.....	161
6.2.1. Animal care, experimental setup and sampling.....	161
6.2.2. Muscle proximate composition.....	162
6.2.3. Circulating hormone and lipid profiles.....	162
6.2.4. Gene expression.....	163
6.2.6. Enzyme activity assays .....	163
6.2.6. Mitochondrial isolation and respiration.....	164
6.2.7. Chemicals .....	165
6.2.8. Statistical analysis.....	165
6.3. Results .....	166
6.3.1. Fish performance and metabolic condition.....	166
6.3.2. Tissue oxidative capacity.....	168
6.3.3. UCP3 gene expression.....	168
6.3.4. Respiration uncoupling.....	170
6.4. Discussion.....	170
References .....	176
7. Discusión general .....	183
7.1. ¿Por qué la mitocondria? .....	185
7.2. Análisis filogenético .....	190
7.3. Regulación transcripcional .....	196

---

7.3.1 GRP75/mortalina.....	196
7.3.2 UCPs.....	199
7.4 Regulación postranscripcional y respiración mitocondrial .....	203
7.5. Meta-análisis de la respuesta de estrés mitocondrial .....	209
8. Conclusiones .....	215
9. Bibliografía general.....	219
RESÚMENES.....	243

---

Lista de los nombres científicos y comunes de los organismos utilizados en análisis filogenéticos. En el listado de nombres comunes se ha optado por la alternativa dictaminada por la FAO y si no existía nombre en español se ha utilizado el nombre en inglés.

## PECES

### Perciformes

<i>Rhabdosargus sarba</i>	Sargo dorado
<i>Lutjanus sanguineus</i>	Pargo cabezón
<i>Epinephelus coioides</i>	Mero de pintas naranjas
<i>Sparus aurata</i>	Dorada
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Espinoso
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Black sea bream
<i>Siniperca chuatsi</i>	Pez mandarín
<i>Pagrus major</i>	Pargo japonés
<i>Zoarcetes viviparus</i>	Viruela
<i>Thunnus orientalis</i>	Atún de aleta azul
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Pez globo
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia de Mozambique

### Cipriniformes

<i>Danio rerio</i>	Pez cebra
<i>Crassius gibelio</i>	Carpa prusiana
<i>Megalobrama amblycephala</i>	Pez wuchang
<i>Chanodichthys ilishaeformis</i>	-
<i>Carassius auratus</i>	Pez rojo
<i>Tanichthys albonubes</i>	Neón chino
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa
<i>Squalis cephalus</i>	Cacho
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa herbívora
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Carpa cabezona

### Salmoniformes

<i>Salmo salar</i>	Salmón del Atlántico
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arco iris

**Siluriformes**

*Pelteobagrus fulvidraco* Pez gato amarillo

*Silurus meridionalis* Siluro meridional

**Pleuronectiformes**

*Paralichthys olivaceus* Falso halibut del Japón

**Ciprinodontiformes**

*Fundulus heteroclitus macrolepidotus* Fúndulo

*Xiphophorus maculatus* Espadaña sureña

**ANFIBIOS**

*Xenopus laevis* Rana africana

*Rana lessonae* Rana verde

*Xenopus tropicalis* Rana

**REPTILES**

*Eublepharis macularis* Gecko leopardo

*Rhabdophis tigrinus* Serpiente asiática

*Crocodylus porosus* Cocodrilo poroso

**AVES**

*Gallus gallus* Pollo

*Meleagris gallopavo* Pavo

*Eupetomena macroura* Colibrí

**MAMÍFEROS**

**Marsupiales**

*Sminthopsis crassicaudata* Ratón marsupial de cola gruesa

*Antechinus flavipes* Antequino de pies amarillos

**Euterios**

*Homo sapiens* Humano

*Ratus nigroviridis* Rata

*Mus musculus* Ratón

---

# CAPÍTULO 1

## **Introducción general**



## 1.1. Antecedentes, presente y perspectivas de futuro de la acuicultura

El cultivo de peces se remonta a 3.500 años a.c. y ha pasado por diversas etapas de desarrollo según países y culturas, aunque la carpa y los ciprínidos han sido y siguen siendo las especies con una mayor producción. El primer texto de acuicultura, “Classic of fish culture”, se atribuye al político chino Fan Lei y data de alrededor del año 475 a.c. Este estudio es conocido como el “Primer Tratado de Piscicultura” y describe tanto la construcción de estanques como las proporciones de machos y hembras para la optimización del cultivo y comercialización de carpas en China.

La acuicultura empezó a desarrollarse en Europa en el siglo I gracias a los romanos, que cultivaron ostras en el mar Adriático; mientras que en la región sur atlántica española los llamados “corrales” fueron las primeras infraestructuras dedicadas a la piscicultura (**Figura 1.1**) (Vela-Vallejo y González-Posada, 2007). De aquella época data el libro de Columela “Los doce libros de la agricultura” que describe las bases para construir las primeras piscifactorías, haciendo especial hincapié en el tipo de especies que se pueden cultivar en función de factores tales como la calidad del agua, el tipo de sustrato y la etología de la especie.

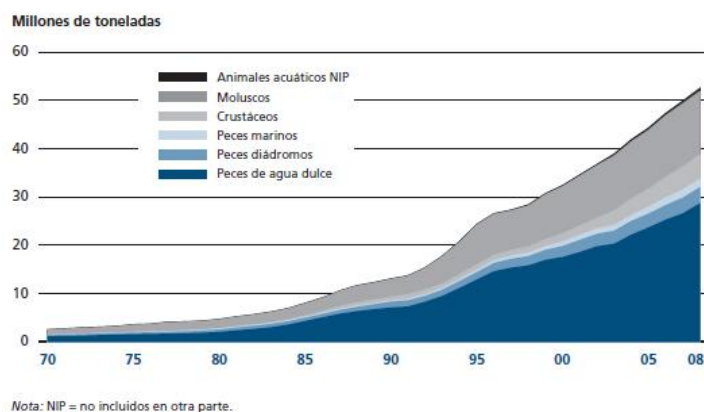
**Figura 1.1.** Fotografías aéreas de piscifactorías romanas datadas del siglo I. (A) Corrales de Rota, Cádiz; (B) Los baños de la reina, Calpe, Alicante (fuente: Googlemaps).



No se tiene documentada ninguna actividad posterior hasta la Edad Media, que es cuando la acuicultura empezó a desarrollarse en abadías y monasterios de Europa Occidental para engordar especies de agua dulce como carpas y lucios. Es más, se tiene que esperar hasta finales del siglo XIX para poder hablar de “ciclo biológico cerrado o piscicultura completa”, ya que hasta entonces no se consiguió la reproducción en cautividad de la trucha arco iris.

Por consiguiente, la acuicultura es una actividad con una larga tradición, aunque sigue siendo un sector joven que ha experimentado un rápido desarrollo en los últimos 50 años. Así pues, la producción mundial del sector ha crecido en las últimas décadas a una tasa media anual del 6,8%, pasando del millón de Tm anuales de los años cincuenta a los 52,5 millones del 2008 (**Figura 1.2**) (FAO, 2010). Esta producción acuícola alcanzó en el mercado un valor de 98.400 millones de dólares estadounidenses. Sin embargo, el valor de este producto varía notablemente según la especie. De hecho, peces de agua dulce y moluscos suman producciones de 28,8 y 13,1 millones de Tm con un precio en el mercado de 40.500 y 13.100 millones. En contraposición, la producción de crustáceos, peces diádromos y peces marinos es del orden de 5, 3,3 y 1,8 millones de Tm, pero alcanza valores en el mercado de 22.700, 13.100 y 6.600 millones según cifras del 2008.

**Figura 1.2.** Tendencias de la producción acuícola mundial por principales grupos de especies (FAO, 2010).

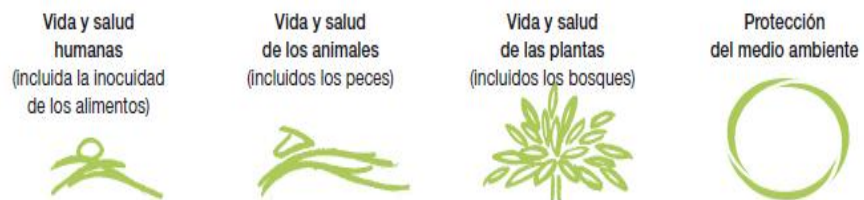




Actualmente, la acuicultura proporciona la mitad (45,7%) del pescado consumido por el conjunto de la población humana (FAO, 2010). No obstante, su crecimiento está ralentizándose a nivel global, a pesar de que las perspectivas son que a corto-medio plazo esta actividad superará a la pesca extractiva. En cualquier caso, la actual situación de los caladeros y la crisis económica mundial plantean la necesidad urgente de abordar los efectos del cambio climático, la pérdida de biodiversidad y la trazabilidad de los productos acuícolas destinados al consumo humano. En este contexto, uno de los objetivos de la FAO es promover políticas sociales que fomenten una explotación sostenible de los recursos pesqueros, a la vez que aseguren la calidad y seguridad alimentaria de los productos de origen marino y acuícola en general.

En estos términos, el concepto de bioseguridad se define como un proceso integrador que engloba marcos reguladores y normativos para analizar y gestionar los riesgos que afectan a la vida y salud humana, animal y vegetal, incluidos los riesgos ambientales conexos (**Figura 1.3**) (FAO, 2007). En el caso de la acuicultura, ello debe acabar promoviendo el desarrollo sostenible de un sector, que incluye como riesgos biológicos la expansión a nivel transnacional de enfermedades y especies invasoras, así como riesgos para la salud derivados del uso indiscriminado de tratamientos veterinarios (Arthur y cols., 2009).

**Figura 1.3.** Objetivos sectoriales de bioseguridad (FAO, 2007).



De hecho, a corto-medio plazo el cambio climático probablemente comportará una mayor incidencia y virulencia de las enfermedades que afectan a los animales en cultivo, a la vez que modificará la fisiología del hospedador aunque la repercusión que ello acabe teniendo está todavía por definir. Por otro lado, también son de esperar cambios en la disponibilidad de

materias primas, con los efectos directos o indirectos que ello conlleva sobre la calidad, seguridad alimentaria y salud-bienestar animal (Cochrane y cols., 2009).

Tradicionalmente, la mejora de los sistemas de producción en acuicultura se ha centrado en diferentes programas de nutrición, salud animal y de mejora genética, aunque también deben hacerse importantes esfuerzos a nivel de ingeniería, impacto medio-ambiental y mejora, en general, de la gobernanza. En este marco, el futuro de la acuicultura debe asentarse en nuevos sistemas productivos cuyas directrices sociales y políticas se basen en la sostenibilidad y la integración de diversos sistemas de producción (Bostock, 2011). Para ello, es importante el desarrollo de procesos que permitan medir un amplio rango de variables para adoptar estándares y sistemas de certificación. Un ejemplo de ello es la “Global Aquaculture Alliance Best Aquaculture Practices standards” que certifica las granjas de gambas, tilapia, bagre de canal y panga en América ([www.aquaculturecertification.org](http://www.aquaculturecertification.org)). A su vez, las directrices tecnológicas e industriales deben centrarse en mitigar el impacto ambiental, mejorar la seguridad alimentaria y promover la sostenibilidad. En este sentido, la Comisión Europea ha creado una Plataforma de Tecnología e Innovación de la Acuicultura Europea ([www.eatip.eu](http://www.eatip.eu)) que trata de definir las prioridades en investigación, a la vez que potenciar programas de colaboración entre los diferentes sectores implicados.

Por todo ello, es prioritario e ineludible un desarrollo sostenible de la acuicultura, lo que directa o indirectamente debe fomentar el consumo y una producción respetuosa con el medio ambiente, que además asegure la calidad y trazabilidad de los productos de acuerdo con la normativa vigente de salud y bienestar animal.

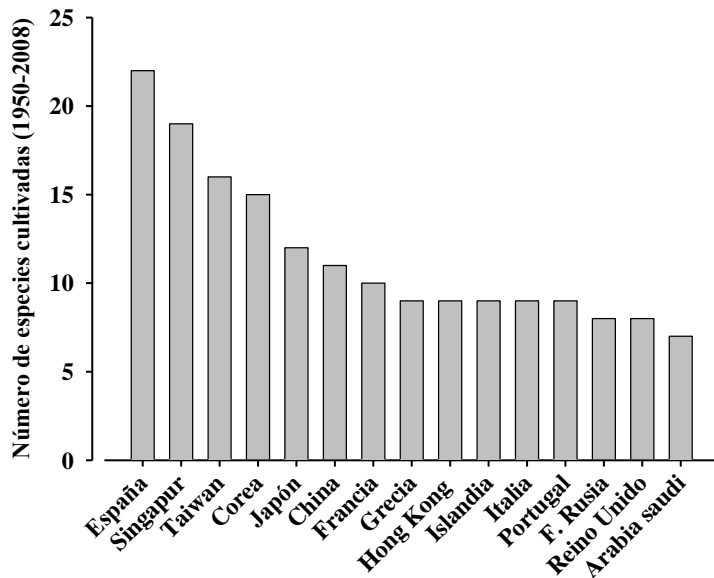
### 1.1.1. La acuicultura en España

España es el estado miembro de la Unión Europea (UE) con una mayor producción en acuicultura. Esta producción se cifró en el 2008 en 249.074 Tm, frente a las 237.868 Tm de Francia y 181.469 Tm de Italia que son los segundos y terceros productores. Sin embargo, el valor de la producción española es de 517 millones de euros (m€), frente a los 954 m€ de Reino Unido, 814 m€ de Francia, 810 m€ de Italia y 544 m€ de Grecia (FAO, 2008). Este menor valor añadido se debe a que el 72,69% de la producción nacional (131 m€) es de mejillón, mientras que en los otros países de la UE el grueso de la producción es de peces marinos y de agua dulce.

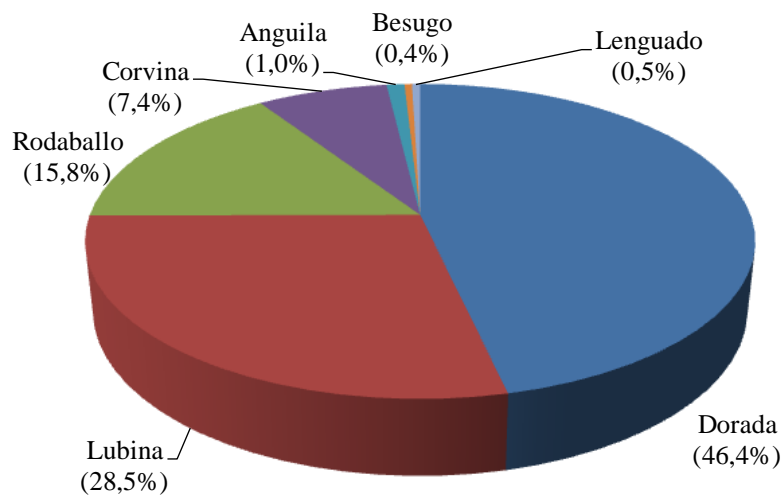
A pesar de todo, España es el tercer país productor de pescado de la UE con 64.200 Tm (10,2% del total de la UE en 2009) y un valor en el mercado de 286 m€; viéndose superada en cantidad y valor por la producción de Reino Unido (147.035 Tm; 474 m€) y Grecia (99.581 Tm; 431 m€) (APROMAR, 2011). En todo caso, España es líder mundial en diversificación con 22 especies de peces cultivados, frente a las 19 de Singapur, 16 de Taiwán y 10 de Francia (**Figura 1.4**) (FAO, 2008).

Un análisis más pormenorizado de la producción nacional indica que la producción piscícola marina alcanzó en el 2010 las 43.888 Tm, siendo la dorada (20.360 Tm), la lubina (12.495 Tm) y el rodaballo (6.910 Tm) las especies con una mayor producción (**Figura 1.5**) (APROMAR, 2011). Es de reseñar que la Comunidad Valenciana encabeza la producción nacional de dorada con un 37% del total, seguida de Murcia (29%), Canarias (15%), Andalucía (12%) y Cataluña (8%). En todo caso, pese a la reducción consecutiva de la producción de dorada y por primera vez en lubina la producción de alevines de ambas especies ha aumentado. Por consiguiente, según datos de APROMAR del 2010 (APROMAR, 2011), el comportamiento desigual en años alternos indica que ambas especies podrían haber alcanzado su techo de producción a nivel nacional.

**Figura 1.4.** Número de especies de peces cultivadas por países en el intervalo 1950-2008 (FAO, 2008).



**Figura 1.5.** Producción de pescados marinos de crianza en España (APROMAR, 2011).



Aunque la actual crisis económica y financiera está afectando severamente a la acuicultura española, el análisis de los datos de mercado sigue siendo positivo, al menos en parte. De hecho, aunque el consumo de pescado fresco ha descendido respecto de 2009 los precios en primera venta compensan de forma ligera los costes de producción (APROMAR, 2011). Es por ello que el sector precisa una re-estructuración que debe ir acompañada de nuevos modos de producción. Así por ejemplo, la acuicultura Mediterránea debería abordar la reducción de los costes de producción de las especies más relevantes, a la vez que potenciar y consolidar el cultivo de especies alternativas, para lo cual deberían aunarse conocimientos zootécnicos con el uso de nuevas tecnologías ómicas (genómica, proteómica, metabolómica). Desde un punto de vista práctico, la aplicación de estas tecnologías al campo de la acuicultura es cada vez más necesaria, dado que el sector demanda con urgencia valores de referencia y/o criterios contrastados que permitan establecer si a corto-medio plazo la explotación de una determinada especie es factible a escala industrial. Asimismo, estas nuevas metodologías deben promover enfoques holísticos, con las implicaciones tanto éticas como económicas que ello conlleva sobre el bienestar animal y la viabilidad y rentabilidad de un determinado sistema de producción.

## 1.2. Bienestar animal

### 1.2.1 Conceptos básicos y legislación

Según la Resolución de la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE), un animal goza de un buen estado de bienestar cuando es capaz de adaptarse adecuadamente a las condiciones en las que vive. Así pues, debe mostrarse saludable, cómodo, bien cuidado, seguro, capaz de expresar su comportamiento innato y no estar sufriendo estados desagradables como dolor, miedo u estrés. Por tanto se requieren instalaciones adecuadas, programas de prevención y tratamiento de enfermedades, así como procedimientos apropiados de gestión, nutrición, manipulación y sacrificio (EFSA, 2009).

Todo ello pone de relieve que para preservar el bienestar animal deben aunarse directrices éticas y productivas. En gran medida, ello es debido a que las condiciones sanitarias, de estabulación y de pautas de alimentación no sólo garantizan el bienestar animal sino que también repercuten, directa o indirectamente, sobre la producción, proporcionando niveles estables y competitivos a medio y largo plazo. De este modo, el estudio del bienestar animal se convierte en una prioridad ante un escenario de cambio global.

La normativa existente sobre bienestar animal regula todas las fases del sistema productivo, incluyendo producción, transporte y sacrificio. El *Farm Animal Welfare Council* (FAWC, [www.defra.gov.uk](http://www.defra.gov.uk)) del Reino Unido dictó en 1979 las primeras directrices de bienestar para animales terrestres, que se conocen como las cinco libertades: i) estar libres de hambre y sed, ii) estar libres de incomodidad, iii) estar libres de dolor, lesiones y enfermedades, iv) libertad de expresar un comportamiento normal y v) estar libres de miedo y angustia.

En la misma línea, la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE, [www.oie.int](http://www.oie.int)) ha elaborado los Códigos Sanitarios

para animales terrestres y acuáticos que contienen disposiciones de diagnóstico, análisis de riesgos, prevención y control de enfermedades, así como medidas y directrices aplicables al comercio y transporte de los animales. En particular, a nivel europeo, existen cinco convenios vinculantes desarrollados por el Consejo de Europa: i) convenio para la protección de los animales en el transporte internacional, ii) convenio para la protección de los animales en explotaciones ganaderas, iii) convenio para la protección de los animales en el sacrificio, iv) convenio para la protección de los animales de compañía y v) convenio para la protección de los animales de experimentación. Además, existen recomendaciones para bovinos, ovejas, cabras, aves domésticas, avestruces, emús y ñandús, pato común y criollo, ocas, pavos, animales de peletería, cerdos y peces de granja.

En cuanto a la normativa nacional, la Ley 32/2007 establece las normas básicas para el cuidado de animales en explotación, así como durante el transporte y sacrificio, estando apoyada por una serie de normas básicas que se resumen en la **Tabla 1.1**. Es de reseñar que las leyes referentes a explotaciones terrestres (vacunas y porcinas) están bastante desarrolladas, de forma que describen el tipo de explotación, las densidades de estabulación de los animales y los rangos físico-químicos que deben cumplir este tipo de explotaciones ganaderas para preservar el bienestar de los animales. Por el contrario, la normativa para explotaciones de acuicultura todavía está en fase de desarrollo, ya que establece los requisitos zoo-sanitarios y las medidas preventivas y de control, pero lo hace de forma muy genérica y poco aplicable a las especies con una mayor producción nacional. Un ejemplo de ello es la Recomendación (CE) 1099/2009, relativa al sacrificio de peces de cultivo, según la cual se precisa de un mayor asesoramiento científico y una evaluación económica más precisa para establecer la normativa más adecuada.

**Tabla 1.1.** Normativa estatal de bienestar animal ([www.marm.es/es/ganaderia/temas/producción-y-mercados-ganaderos/bienestanimal](http://www.marm.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal)).

<b>Normativa</b>	<b>Relativa a</b>
RD 1047/1994	Normas mínimas para la protección de terneros
RD 54/1995	Protección de los animales en el momento de su sacrificio o matanza
RD 1041/1997	Protección de los animales durante su transporte
RD 348/2000	Protección de los animales en las explotaciones ganaderas
RD 441/2001	
RD 3/2002	Protección de las gallinas ponedoras
RD 1135/2002	Protección de cerdos
RD 751/2006	Autorización y registro de transportistas y medios de transporte de animales y por el que se crea el Comité español de bienestar y protección de los animales de producción
RD 731/2007 Reglamento (CE) 1099/2009	Protección de los animales en el momento de la matanza
RD 1201/2005	Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos
RD 1614/2008	Requisitos zoonosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura
RD 1221/2009	Ordenación de explotaciones de ganado porcino extensivo
RD 1089/2010	y explotaciones cunícolas
RD 692/2010	Protección de los pollos destinados a la producción de carne y normas mínimas para la protección de terneros

El Reglamento (EC) 710/2009 para la producción y etiquetado de productos ecológicos establece que la producción ganadera y acuícola debe seguir los sistemas y ciclos naturales, haciendo especial hincapié en que se deben respetar los estándares de bienestar animal, cubrir las necesidades de comportamiento de cada especie y basar la salud animal en la prevención. Este reglamento sí que hace una clara distinción por especies o familias de las condiciones de cultivo, fijando para el caso concreto de la dorada una densidad máxima de 15 Kg/m<sup>3</sup> en jaulas o de 4 Kg/m<sup>3</sup> en estanques, esteros y lagunas costeras. En definitiva, aunque de forma incipiente, el bienestar de los peces en cultivo es una línea de trabajo en alza, con un número cada vez mayor de trabajos científicos y unas temáticas que han



evolucionando a lo largo del tiempo. Así pues, a principios de los 90, las investigaciones en este campo se referían a aspectos relacionados con la salud y los efectos del transporte sobre los animales, mientras que la densidad de cultivo y el desarrollo de diferentes sistemas de crianza se han ido abordando con posterioridad (Huntingford y Kadri, 2009). Ello ha dado sus frutos a nivel normativo y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha tratado aspectos genéricos y específicos de bienestar animal y procedimientos de sacrificio para el salmón del Atlántico, trucha arco iris, anguila, lubina, dorada, carpa, atún y rodaballo, definiendo o estableciendo cinco grandes necesidades:

1. Necesidad de condiciones ambientales físicas y químicas adecuadas
2. Necesidad de interacciones sociales apropiadas.
3. Necesidad de evitar la depredación.
4. Necesidad de alimento para el mantenimiento y el crecimiento.
5. Necesidad de preservar un buen estado de salud.

A partir de ello, se puede definir el estado de conocimiento de los principales factores que afectan al bienestar de los peces y las recomendaciones al respecto, tal y como se muestra para dorada y lubina en la **Tabla 1.2**. Muchas de estas recomendaciones suelen ser de carácter elemental, aunque es un hecho generalizado que en granjas marinas en mar abierto el cultivo de juveniles (2.5-150 g) se da a una densidad de 5-10 Kg/m<sup>3</sup>, aumentando hasta 10-20 Kg/m<sup>3</sup> en animales de talla comercial. En sistemas de circuito cerrado de producción intensiva, los alevines-juveniles son habitualmente cultivados a 5-10 Kg/m<sup>3</sup>, con una densidad máxima al final del pre-engorde de 20-35 Kg/m<sup>3</sup>. Por el contrario, cuando se utilizan métodos tradicionales de cultivo extensivo o semi-extensivo, como en los esteros de Cádiz o en la *vallicultura* de Italia, las densidades de cultivo se aproximan a los valores establecidos para la acuicultura ecológica, lo que es indicativo de una clara confluencia de procesos y sistemas cuando el criterio que prevalece es el de bienestar animal.

**Tabla 1.2.** Recomendaciones de bienestar animal en cultivos de dorada y lubina según el Panel de Salud y Bienestar Animal (EFSA, 2008b).

<b>Factor</b>	<b>Recomendación</b>
<i>Factores abióticos</i>	
Temperatura	Dorada Huevos y larvas: 12-22°C Juveniles y adultos: 8-30°C Síndrome de invierno (estrés agudo 9-15°C) Lubina Huevos y larvas: 10-20°C Juveniles y adultos: 8-28°C
Oxígeno*	>40% saturación en efluente
pH*	6.5-8.5
CO <sub>2</sub> *	Lubina LC <sub>50</sub> (96 h 15°C) = 112.1 m CO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>
Amonio*	Dorada LC <sub>50</sub> (96 h) = 2.6 mg l <sup>-1</sup> UIA-N Lubina LC <sub>50</sub> (96 h) = 1.7 mg l <sup>-1</sup> UIA-N
Salinidad	Eurihalinas. No someter a cambios bruscos
Luz/ Fotoperiodo*	Dorada 1,000-3,000 lux Lubina 100-500 lux Modifica la época de puesta Modifica la proporción de machos
Flujo de agua*	Limitada información en cultivo en tanques Localización y materiales apropiados en jaulas
<i>Factores bióticos</i>	
Densidad de cultivo*	Condiciones en jaulas: Juveniles (2.5 -150 g): 5-10 Kg m <sup>-3</sup> Adultos (>150 g): 10-20 Kg m <sup>-3</sup> Cultivo extensivo: 0.2-2 Kg m <sup>-3</sup>
Agresiones y canibalismo	Acceso continuo al alimento
Depredación	Ajustes de la densidad de cultivo
	Utilización de redes anti-depredadores*
<i>Alimentación</i>	
Piensos y régimen alimentario	Formulación y distribución adecuada Evitar episodios de ayuno
<i>Gestión</i>	
Manipulación	Personal formado
Limpieza	Necesidad de anestésicos y profilácticos autorizados*
Separación por tallas	
Transporte	
<i>Selección genética*</i>	

\* No se conoce la influencia sobre el bienestar, son necesarios más estudios del factor individual y las sinergias con otros factores.

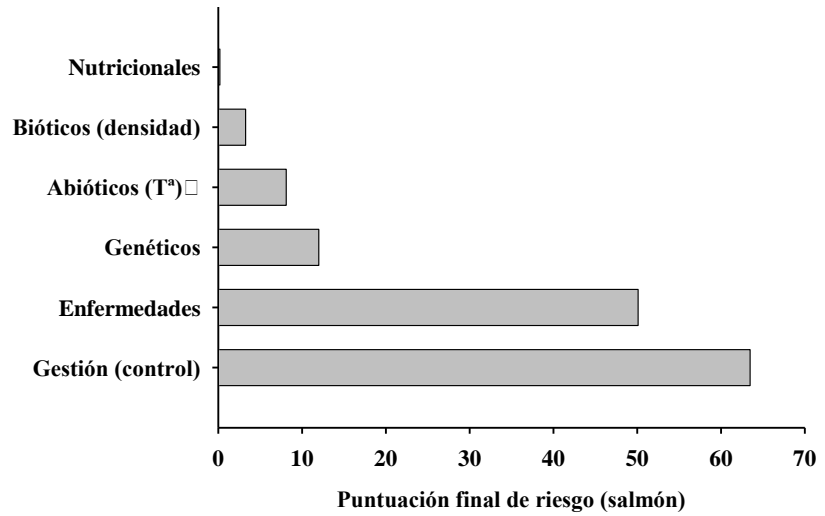
**Tabla 1.2.** (Continuación).

<b>Factor</b>	<b>Recomendación</b>
<i>Enfermedades*</i>	
Nodavirus	Desinfección Descarte de peces moribundos Desarrollo de vacunas
Parásitos Monogenea	Controles profilácticos Desarrollo de drogas antiparasitarias
Síndrome de invierno	Determinación de la temperatura mínima por región de cultivo Preparación nutricional previa al invierno
Vibriosis	Control sanitario y vacunación
Pasteurelisis	Control sanitario y vacunación
Linfocistis	Mejora de las condiciones de cultivo

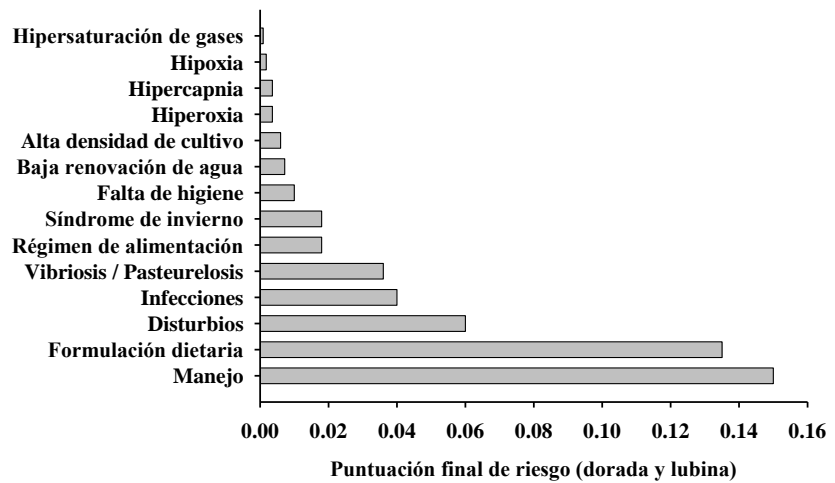
\* No se conoce la influencia sobre el bienestar, son necesarios más estudios del factor individual y las sinergias con otros factores.

De las recomendaciones de la **Tabla 1.2**, también se deriva el correspondiente análisis de riesgos que puede variar según la especie y fase de desarrollo del cultivo. De hecho, para juveniles de salmón, el factor de riesgo más importante es la gestión o gobernanza de la producción (**Figura 1.6**) (EFSA, 2008a); mientras que para juveniles de dorada y lubina es el manejo y la formulación dietaria (**Figura 1.7**) (EFSA, 2008b). Por todo ello, varios autores indican que los marcadores de bienestar animal tienen que cubrir un amplio espectro de variables o parámetros tanto de comportamiento como fisiológicos (Ashley, 2007; Huntingford y cols., 2006). En la práctica, esto deberá traducirse en el uso de paneles de marcadores bioquímicos y moleculares de bienestar, debidamente contrastados y validados para evaluar el grado de adaptación de los animales en cultivo a un medio hostil dentro de un contexto de cambio global (EFSA, 2009).

**Figura 1.6.** Puntuaciones finales en el análisis de riesgos del cultivo del salmón del Atlántico (EFSA, 2008a).



**Figura 1.7.** Puntuaciones finales en el análisis de riesgos del cultivo de dorada y lubina (EFSA, 2008b).



### 1.2.2 Sistemas efectores de estrés

El concepto de estrés fue introducido en 1936 por Hans Selye (Selye, 1936) para referirse a la respuesta no específica del organismo frente un estado o situación de riesgo de carácter inespecífico. Por tanto, la respuesta al estrés se considera como un mecanismo adaptativo que tiene como fin último preservar la homeostasis del animal a lo largo de un proceso en el que pueden distinguirse tres etapas. La primera de ellas o respuesta primaria es la “señal de alarma”, a partir de la cual el organismo se prepara para “la defensa o la huida”. La segunda etapa es la de “resistencia o reajuste”, puesto que ningún organismo puede mantener la condición de alarma indefinidamente. Finalmente, si la duración de la condición de estrés es suficientemente prolongada, el organismo entra en una fase de "agotamiento" o respuesta terciaria que se da como reacción ante un deterioro general que acaba comprometiendo la propia supervivencia (**Tabla 1.3**) (Barton, 2002).

Por consiguiente, el nivel de estrés, tanto de carácter agudo (agente estresante de duración corta pero intensa) como crónico (agente estresante de intensidad media-baja pero persistente en el tiempo), tiene implicaciones directas sobre la salud y el bienestar animal, por lo que a nivel productivo acaba jugando un papel crucial en la viabilidad del cultivo y/o explotación. En todo caso, la complejidad de los sistemas efectores ante un determinado agente estresante es enorme, describiéndose brevemente en los apartados siguientes varios de los sistemas que actúan a nivel neuroendocrino, sistémico y celular.

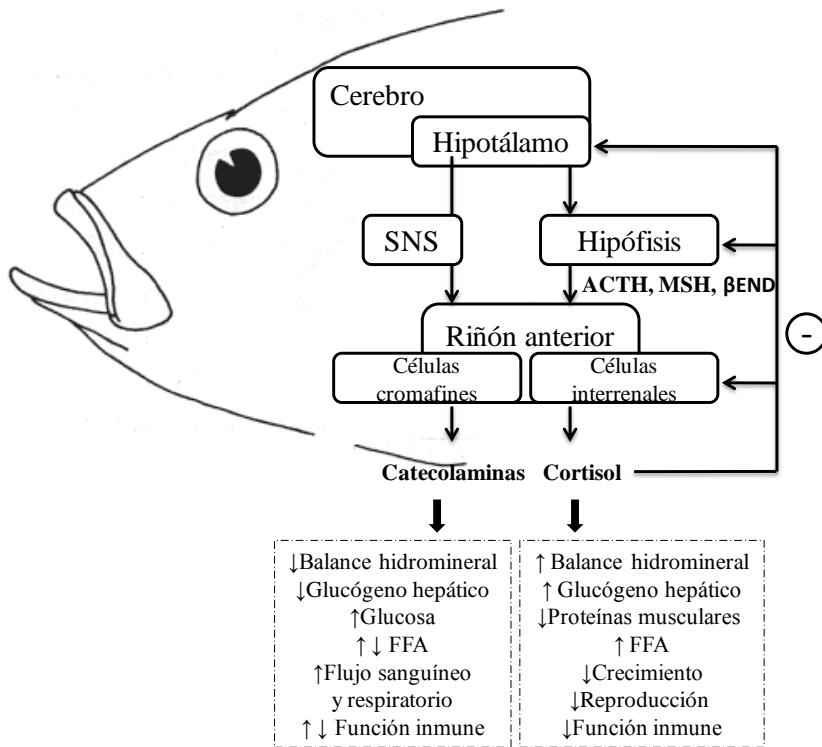
**Tabla 1.3.** Marcadores clásicos de respuesta primaria, secundaria y terciaria de estrés en peces (Barton, 2002).

	<b>MARCADOR</b>
<b>Respuesta primaria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Catecolaminas</li> <li>↑ Cortisol</li> </ul>
<b>Respuesta secundaria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cambios metabólicos:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Glucosa</li> <li>• ↑ Lactato</li> </ul> </li> <li>Cambios celulares:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Chaperonas</li> </ul> </li> <li>Cambios osmóticos:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Cl, Na, K</li> </ul> </li> <li>Cambios hematológicos:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Hematocrito</li> <li>• ↓ Leucocrito</li> <li>• ↑ Hemoglobina</li> </ul> </li> <li>Cambios en la función inmune:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Actividad lisozima</li> <li>• ↓ Producción de anticuerpos</li> </ul> </li> </ul>
<b>Respuesta terciaria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cambios en el desarrollo:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Crecimiento</li> <li>• ↓ Capacidad natatoria</li> <li>• ↓ Resistencia a enfermedades</li> </ul> </li> <li>Cambios de comportamiento:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Agresividad</li> <li>• ↓ Pauta alimentaria</li> </ul> </li> </ul>

1.2.2.1 Eje hipotalámico-simpático-cromafin y eje hipotalámico-hipofisario-interrenal

En peces, como en otros vertebrados, las señales inducidas por diferentes factores estresantes son integradas por el cerebro, lo que acaba desencadenando una compleja respuesta del sistema neuroendocrino, tal y como se muestra en la **Figura 1.8** (Wendelaar-Bonga, 1997).

**Figura 1.8.** Diagrama genérico de la respuesta al estrés en peces. Eje hipotalámico-simpático-cromafin (HSC) y eje hipotalámico-hipofisario-interrenal (HPI). SNS, sistema nervioso simpático; ACTH, hormona corticotropa; MSH, hormona estimulante de melanóforos;  $\beta$ END,  $\beta$ -endorfina. (Wendelaar-Bonga, 1997).





A través de las fibras nerviosas que inervan las células cromafines del riñón anterior, el eje hipotalámico-simpático-cromafin (HSC) desencadena la liberación de varias catecolaminas (norepinefrina, epinefrina y dopamina), cuya acción hiperglucemiante prepara al organismo frente a una mayor demanda energética. En paralelo, la activación de la cascada del eje hipotalámico-hipofisario-interrenal (HPI) se inicia con la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula la secreción hipofisaria de la hormona corticotropa (ACTH), la hormona estimulante de melanóforos (MSH) y la  $\beta$ -endorfina ( $\beta$ END), que una vez vertidas al torrente circulatorio estimulan la síntesis y secreción de cortisol por parte de las células interrenales del riñón anterior.

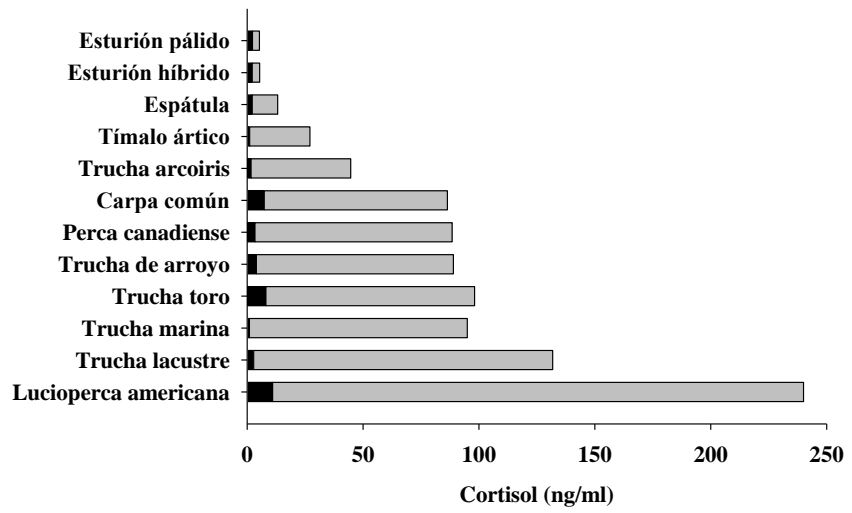
El cortisol es la hormona esteroidea más importante de peces, actúa como mineralocorticoide y glucocorticoide de forma que regula el balance hidromineral y el metabolismo energético (revisado en Ashley, 2007; Barton, 2002; Wendelaar-Bonga, 1997). En situaciones de estrés la liberación de catecolaminas sucede de forma inmediata, mientras que la respuesta del cortisol es más tardía, requiriéndose de un espacio de tiempo de varios minutos antes de que aumente la concentración circulante en animales estresados (Wedemeyer y cols., 1990; Gamperl y cols., 1994). En la práctica, esta diferente cinética comporta menos problemas metodológicos a la hora de muestrear/manejar los animales objeto de estudio, por lo que el cortisol se ha utilizado como el marcador de estrés por excelencia de un amplio rango de especies (Barton y Iwama, 1991; Pankhurst, 2011). Es más, estudios recientes demuestran que existe una correlación positiva entre los niveles circulantes de cortisol y los excretados a través de las branquias al agua del tanque de cultivo (Fanouraki y cols., 2011; Scott y Ellis, 2007), lo que a corto-medio plazo puede suponer una auténtica revolución, ya que no se requeriría la manipulación de animales para la toma de muestras.

Es importante reseñar que los niveles basales de cortisol en sangre varían notablemente de una especie a otra, aunque por lo general la concentración detectada está por debajo de los 10 ng/ml (Barton y Iwama, 1991). Ejemplo de ello son la trucha lacustre y la lucioperca americana (1 y 11 ng/ml) (Barton, 2002),

así como especies marinas como la dorada (5-10 ng/ml) (Rotllant y cols., 2000a; 2000b; Saera-Vila y cols., 2009b) y el lenguado senegalés (5-10 ng/ml) (Costas y cols., 2007; Tintos y cols., 2006). No obstante, se han detectado concentraciones claramente más altas en algunas especies de salmónidos (Barton y Iwama, 1991), tilapia del Nilo (25-30 ng/ml) (Vijayan y cols., 1997) y lubina (25-30 ng/ml) (Di Marco y cols., 2008; Tintos y cols., 2006).

Como se muestra en la **Figura 1.9**, la respuesta del cortisol también depende del agente estresante. Así por ejemplo, 30 segundos de estrés por manejo duplican los niveles circulantes de cortisol en el esturión, siendo este incremento de 20 a 40 veces en la trucha lacustre y la lucioperca americana donde se detectan niveles de 130-230 ng/ml (Barton, 2002). Estos incrementos son del orden de 15 veces cuando se confinan lubinas a 60 Kg/m<sup>3</sup> durante 48 h, midiéndose concentraciones de 500 ng /ml (Vazzana y cols., 2002). Una respuesta más acusada se ha descrito en dorada tras 1 h de confinamiento a 200 Kg/m<sup>3</sup> (Rotllant y cols., 2001), lo que supone un incremento de los niveles basales del orden de 40 veces. En todo caso, y con independencia del agente estresante, los niveles circulantes de cortisol están sujetos a una retro-alimentación negativa que afecta tanto a la producción de ACTH y CRH (Wendelaar-Bonga, 1997) como a la respuesta de los tejidos diana a la acción del cortisol (Prunet y cols., 2006; Schoonheim y cols., 2010), con conocidos efectos supresores sobre el crecimiento (Kajimura y cols., 2003; Peterson y Small, 2005) y la respuesta inmune (Engelsma y cols., 2002; Stolte y cols., 2008).

**Figura 1.9.** Concentraciones de cortisol en juveniles de peces de agua dulce antes (barra negra) y 1 h después (barra gris) de ser sometidos a 30 segundos de estrés por manejo (Barton, 2002)



### 1.2.2.2 Sistema somatotrópico

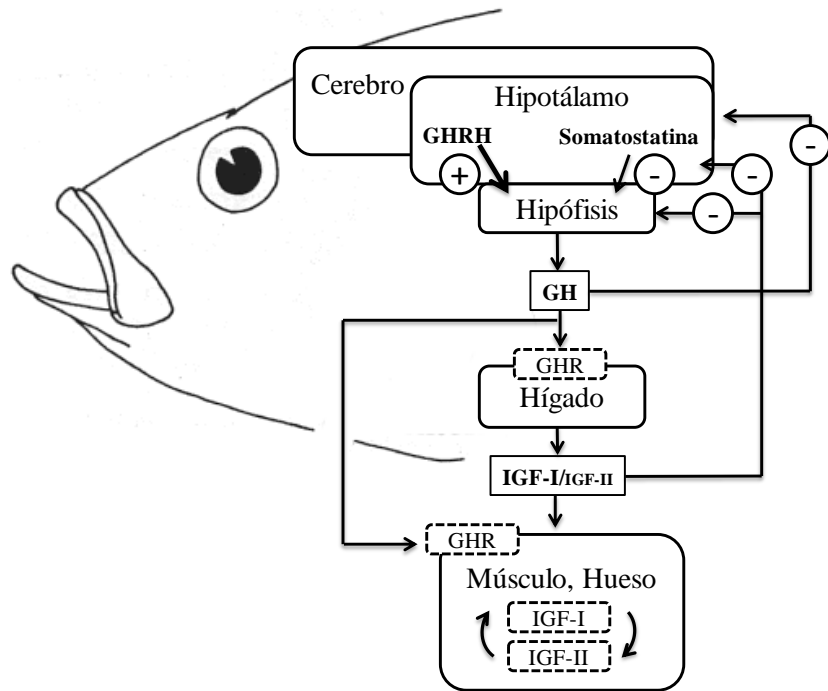
Como se ha comentado anteriormente, el bienestar animal está estrechamente asociado al potencial de crecimiento. Es por ello que también lo está el bienestar animal con el sistema somatotrópico. De hecho, en todos los vertebrados, incluidos los peces, el eje somatotrópico juega un papel fundamental en la regulación endocrina del crecimiento, representado en primera instancia por la hormona del crecimiento (GH) (Björnsson y cols., 2002; Pérez-Sánchez y cols., 2002).

Tal y como se representa de forma esquemática en la **Figura 1.10**, la secreción hipofisaria de GH está básicamente regulada por dos neuropéptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de GH (GHRH, acción estimuladora) y la somatostatina (SRIH, acción inhibidora). Una vez liberada al torrente circulatorio, la GH se une a receptores específicos (GHR) en los tejidos diana. Estos receptores están localizados en la membrana citoplasmática y tras la unión del ligando con el receptor se forman dímeros que acaban desencadenando una respuesta intracelular de carácter marcadamente pleiotrópico (Pérez-Sánchez y cols., 2002).

Es un hecho bien conocido, que la acción anabólica de la GH está mediada, al menos en parte, por las somatomedinas (IGF) que son sintetizadas tanto a nivel hepático (acción sistémica) como extrahepático (acción local). En peces, al igual que en mamíferos, existen dos genes con procesamiento alternativo que codifican para las IGFs, aunque la contribución relativa de IGF-I e IGF-II a la acción anabólica de la GH puede variar con la especie, estado de desarrollo y condición nutricional. En este sentido, es de reseñar que niveles altos de IGF-II no son capaces de revertir un fenotipo de enanismo asociado a deficiencias de IGF-I en ratón (Moerth y cols., 2007). Es más, en el fenotipo salvaje, la expresión de IGF-II disminuye rápidamente a lo largo del desarrollo post-natal de ratones y ratas (Rotwein, 1991). Por el contrario, tanto en humanos como en peces, la expresión de IGF-I y de IGF-II se mantiene relativamente elevada a lo largo de todo el ciclo biológico (Saera-Vila y cols., 2007). En todo caso la IGF-I es la forma

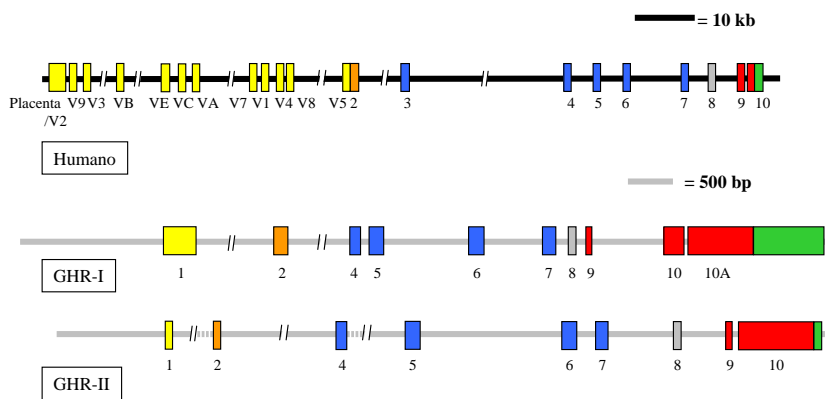
mayoritaria en hígado, mientras que en músculo y otros tejidos periféricos la IGF-II es la forma más abundante.

**Figura 1.10.** Secreción y modos de acción de la hormona del crecimiento (GH). La somatostatina y la hormona liberadora de GH (GHRH) se sintetizan en el hipotálamo y controlan la secreción hipofisaria de GH. La GH circulante puede unirse a sus receptores de membrana (GHR-I y GHR-II) en tejidos diana como el hígado, músculo o tejido óseo, lo que se traduce en un aumento de la producción local y sistémica de IGFs que inhiben la secreción de GH a nivel hipofisario.



En los mamíferos, existe un único GHR con múltiples isoformas dependiendo del tejido y estado de desarrollo (Goodyer y cols., 2001; Wei y cols., 2006). Como resultado, el promotor o región reguladora de los GHRs de mamíferos es enormemente complejo. En el caso de los peces, el Grupo de Nutrigenómica y Endocrinología del Crecimiento de Peces del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) ha realizado estudios pioneros llevados a cabo en rodaballo (Calduch-Giner y cols., 2001), trucha arco iris (Gómez-Requeni y cols., 2005) y dorada (Calduch-Giner y cols., 2003; Pérez-Sánchez y cols., 2002; Saera-Vila y cols., 2005) en los que se ha evidenciado la existencia de dos genes diferentes de GHRs (**Figura 1.11**), que en el caso de los salmónidos (tetraploides recientes) pasan a ser cuatro. Por tanto, según la teoría de subfuncionalización, las isoformas de GHRs de peces han adquirido funciones diferentes sin descartar cierto grado de solapamiento. De acuerdo con ello, el análisis *in silico* del promotor de los GHRs de dorada muestra una estructura mucho menos compleja que la descrita en mamíferos, lo que es especialmente evidente en el caso del GHR-II (Saera-Vila, y cols., 2007).

**Figura 1.11.** Esquema de la estructura exón-intrón del GHR-I y II de dorada y el GHR humano. Amarillo, 5'UTR. Naranja, péptido señal. Azul, dominio extracelular. Gris, dominio transmembrana. Rojo, dominio intracelular. Verde, 5'UTR (Saera-Vila, 2009c).



Estudios de co-expresión de IGFs y GHRs indican una elevada correlación positiva de los niveles de expresión hepática de IGF-I y GHR-I con variaciones del crecimiento, asociados a la edad, estación y condición nutricional, siendo especialmente interesante la acción compensatoria del sistema somatotrópico con los cambios relacionados con la composición de la dieta. Así por ejemplo, la sustitución progresiva de aceites de pescado por aceites vegetales está asociada a una menor síntesis hepática de IGF-I que es compensada a nivel muscular por una mayor expresión del GHR-II que al no ir asociada a una mayor expresión de IGFs, sugiere una acción anabólica de la GH independiente de la producción local de IGFs (Benedito-Palos y cols., 2007).

También es un hecho generalmente aceptado que el estrés por manejo y confinamiento disminuye la concentración circulante de GH en especies como la trucha arco iris (Pickering y cols., 1991), la dorada (Rotllant y cols., 2001; Rotllant y cols., 2000a) y el salmón del Atlántico (Wilkinson y cols., 2006), posiblemente como consecuencia de una acción inhibitoria de los agentes estresantes a nivel hipofisario-hipotalámico. A su vez, hay evidencias experimentales de que el estrés por confinamiento inhibe en juveniles de dorada la expresión hepática de IGF-I e IGF-II (Saera-Vila, y cols., 2009b). En este mismo trabajo, la menor expresión de IGFs está altamente correlacionada con los niveles de mensajero que codifican para el GHR-II. Ello sugiere que el GHR-II está especialmente adaptado a preservar la viabilidad celular en condiciones adversas para el organismo. De acuerdo con ello, y en contra de lo que cabría esperar en un principio, la expresión del GHR-II está aumentada en el músculo esquelético de doradas ayunadas (Saera-Vila y cols., 2005).

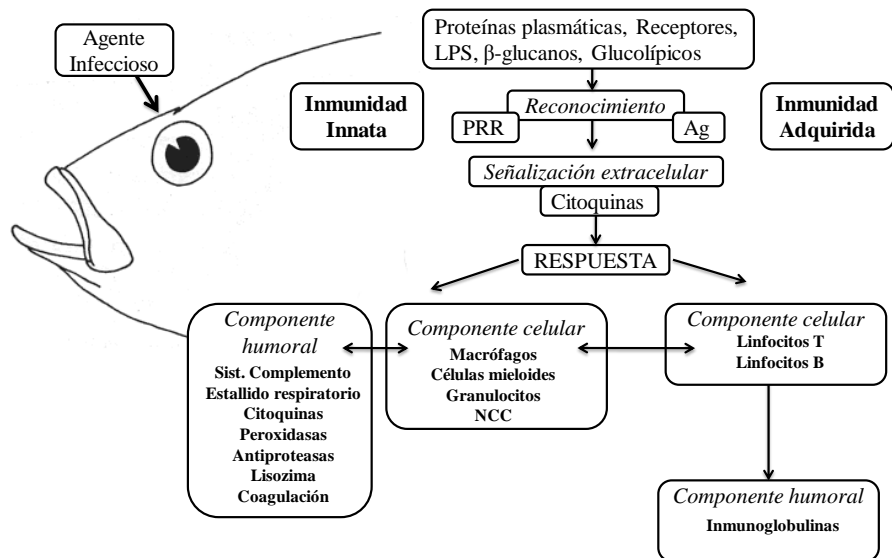
### 1.2.2.3 Sistema inmunitario

El estrés influye en la capacidad de resistencia del animal frente a procesos infecciosos al modular de forma directa o indirecta varios componentes del sistema inmunitario (Iwama y Nakanishi, 1997). En los teleósteos, como en vertebrados tetrápodos, la respuesta del sistema inmunitario tiene una componente innata y otra adquirida (**Figura 1.12**). La respuesta innata constituye la primera línea de defensa, cuya activación está mediada por receptores de reconocimiento a patógenos (PPR), como los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores tipo NOD (NLRs), las proteínas tipo gen I inducible del ácido retinoico (RLRs) y los receptores de lectinas tipo C (CLRs). Todos ellos están implicados en la activación de macrófagos, monocitos y granulocitos, lo que comporta la liberación de enzimas líticas así como la inducción de procesos tales como el estallido respiratorio que elimina y dificulta la expansión y multiplicación del agente patógeno. En este contexto, es de reseñar que la comunicación del tipo y severidad de la infección se realiza mediante la liberación de diferentes citoquinas y moléculas pro-inflamatorias como las prostaglandinas (Alvarez-Pellitero, 2008; Verburg-Van Kemenade y cols., 2009).

La respuesta adquirida es de carácter más específico y en ella juegan un papel relevante los linfocitos T y B. Los linfocitos T reconocen antígenos específicos una vez son procesados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de clase I para los linfocitos T-cooperadores (receptor CD4) y de clase II para los linfocitos T-citotóxicos (receptor CD8). Los linfocitos B no necesitan presentación antigénica puesto que reconocen al antígeno en su forma nativa. En peces teleósteos se ha demostrado la presencia de ambos tipos de linfocitos, aunque el análisis de los diferentes subtipos está todavía en sus inicios (Fischer y cols., 2006).



**Figura 1.12.** Diagrama simplificado de la respuesta del sistema inmunitario de peces. Ag, antígeno; NCC, células citotóxicas no específicas; PRR, receptores de reconocimiento a patógenos.



El riñón anterior de los peces es equivalente a la médula ósea de los mamíferos, por lo que en este órgano se localizan las células hematopoyéticas que dan lugar a las células linfoides y mieloides y es donde se produce la presentación de antígenos. No obstante, el bazo, el timo y las mucosas (piel, branquias y tejido linfoide asociado al intestino) conservan sus funciones como órganos de presentación antigénica, maduración de linfocitos T y de barrera frente a agentes infecciosos (Iwama y Nakanishi, 1997).

Son múltiples los estudios que relacionan las condiciones de producción (densidad de cultivo, manejo de animales, alimentación) con cambios en el estado de inmunocompetencia. Así por ejemplo, disminuyen las mediciones de hemoconcentración y de la vía alternativa del complemento durante la exposición prolongada de doradas a altas densidades de cultivo (40 kg/m<sup>3</sup>) (Montero y cols., 1999). Cuando las doradas se cultivan a densidades moderadas (22 kg/m<sup>3</sup>), se ha observado un patrón de inmunodepresión temporal, de forma que

a los cinco días está inhibida la vía alternativa del complemento con una recuperación de los niveles basales a los nueve días (Tort y cols., 1996). De modo similar, se produce linfocitopenia, disminución de la actividad hemolítica, capacidad de aglutinación o depresión del sistema del complemento cuando se someten a doradas en cultivo a ocho minutos de persecución diaria durante 16 días (Sunyer y cols., 1995). La inmunodepresión temporal también se ha descrito en otras especies de espáridos como el pargo, por lo que densidades de cultivo intermedias inhiben transitoriamente la vía del complemento y disminuyen el número de linfocitos circulantes (Rotllant y cols., 1997). Por consiguiente, éste es un hecho generalizado y en los casos en los que no se da el adecuado reajuste, acaba produciéndose una inmunodepresión crónica con las consecuencias negativas que ello conlleva.

También es un hecho conocido que dietas de alto contenido lipídico tienen un efecto inmunodepresor en lubina, lo que va asociado a un aumento de la prevalencia de infección del mixosporidio *Ceratomyxa spp.* (Sitjà-Bobadilla y Pérez-Sánchez, 1999). En esta misma especie, varios parámetros de la respuesta celular se ven afectados por el uso de diferentes fuentes lipídicas en la dieta (Mourente y cols., 2007). Resultados similares se han descrito en dorada, habiéndose observado cómo varios marcadores pro-inflamatorios aumentan con la sustitución del aceite de pescado por mezclas de aceites vegetales, lo que se ha interpretado como un menor riesgo de estrés oxidativo con la disminución del grado de insaturación de los ácidos grasos de la dieta (Saera-Vila y cols., 2009a). No obstante, los efectos del historial nutricional sobre la respuesta inmunológica son enormemente complejos y es un hecho cada vez más aceptado que los requerimientos nutricionales de crecimiento no tienen por qué ser los mismos que los del sistema inmunitario. Como ejemplo de ello gran parte de las materias primas de origen marino se pueden sustituir por ingredientes vegetales en dietas de engorde de dorada sin producir efectos negativos sobre el crecimiento (Benedito-Palos y cols., 2007; 2008; 2009). Sin embargo, la progresión de la infección del parásito intestinal *Enteromyxum leii* es más rápida en peces alimentados con dietas basadas en aceites vegetales (Estensoro y cols., 2011). Es más,

no es evidente cuál es el mecanismo(s) responsable(s) de este fenotipo, ya que cuando se analiza el transcriptoma del intestino de animales sanos con un microarray específico de dorada, son anecdóticos los cambios inducidos por la dieta; mientras que más de 2000 genes cambian su patrón de expresión a medida que progresa la infección con independencia del régimen de alimentación (Calduch-Giner y cols., datos no publicados).

### 1.2.2.4 Respuesta celular

#### Chaperonas moleculares

La familia de las proteínas de estrés térmico (HSPs) es un claro ejemplo de efectores celulares de la respuesta mediada por el estrés. Estas chaperonas moleculares fueron descritas por primera vez por Ritossa (1962) como genes de respuesta al estrés térmico en las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Con posterioridad, respuestas similares se han descrito tanto en vertebrados no tetrápodos (Koban y cols., 1991) como tetrápodos (Welch y Feramisco, 1982). Además, se ha comprobado que estas proteínas también responden a otros estímulos, por lo que tienen una contribución relevante en un amplio rango de procesos adaptativos en respuesta al estrés oxidativo, exposición a tóxicos, infecciones virales e hipoxia (Iwama y cols., 1998; Lindquist y Craig, 1988).

Los efectos citoprotectores de las HSPs se deben al papel que juegan durante el plegamiento de proteínas recientemente sintetizadas y/o renaturalización de proteínas desplegadas o parcialmente desnaturalizadas. Por consiguiente, son proteínas con un papel importante a lo largo de todo el ciclo celular, por lo que algunas de ellas son de expresión ubicua y, en general, están altamente conservadas a lo largo de la evolución.

En base al peso molecular, se han definido varias familias de HSPs: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y sHSPs de peso molecular inferior a 40KDa (**Tabla 1.4**) (revisado en Lindquist y Craig, 1988; Minowada y Welch, 1995; Roberts y cols., 2010; Welch, 1992). La familia de las HSP70 es la más ampliamente estudiada y en humanos se han descrito hasta 10 isoformas con un alto grado de homología (**Tabla 1.5**) (Daugaard y cols., 2007; Tavaría y cols., 1996). Como en otras familias de HSPs, los miembros de la familia de las HSP70 se diferencian en su distribución subcelular, así como en los niveles de expresión en condiciones normales y de estrés. Las formas inducibles más importantes son la HSP70-1 y la HSP70-2. Estas proteínas se expresan a niveles muy bajos o casi indetectables en la mayoría

de células. Sin embargo, en respuesta al estrés, su expresión se incrementa de forma dramática. La HSPA6 y la HSPA7 son también formas inducibles, aunque sólo en condiciones extremas. La HSPA8, también conocida por HSC70, se expresa constitutivamente y de forma ubicua en todos los tipos celulares descritos y se cree que es responsable del mantenimiento normal del funcionamiento celular. Otros dos miembros de la familia son las proteínas reguladas por la glucosa, GRP78 y GRP75/mortalina. La GRP78 juega un papel fundamental en la respuesta al estrés asociada al retículo endoplasmático, mientras que la GRP75/mortalina (también conocida como mtHSP70) está implicada en el mantenimiento de la función mitocondrial.

**Tabla 1.4.** Sub-tipos de la familia de las proteínas de estrés térmico (HSPs) (Roberts y cols., 2010).

<b>Familia</b>	<b>Miembro</b>	<b>PM (KDa)</b>	<b>Localización celular</b>	<b>Función</b>
HSP100	ClpA, ClpB, ClpC, HSP104	80-110	Citoplasma, núcleo, nucléolo, cloroplasto	Tolerancia a la temperatura, etanol, viabilidad a largo plazo de esporas
HSP90	Hsp82, Grp94, HtpG	82-96	Citoplasma, núcleo	Viabilidad, crecimiento a altas temperaturas
HSP70	DnaK, GRP78, HSC70, BiP, Kar2, ssa, ssb, ssc, ssd	67-76	Citoplasma, núcleo, mitocondria, cloroplastos, retículo endoplasmático	Ensamblaje, secreción, transporte hacia los orgánulos, crecimiento a altas temperaturas
HSP60	GroEl, HSP65, cnp60	58-65	Mitocondria, cloroplastos	Ensamblaje y unión de proteínas monoméricas, crecimiento a altas temperaturas
sHSPs	Varias	18-40	Citoplasma, núcleo	Protección al estrés, inhibición de la apoptosis

**Tabla 1.5.** Familia de las HSP70 en humanos (Daugaard y cols., 2007; Tavaría y cols., 1996)

<b>Símbolo del locus</b>	<b>Nombre alternativo</b>	<b>Localización celular</b>	<b>Tipo de expresión</b>
HSPA1A	HSP72, HSPA1, HASPA1B, HSP70-1	Núcleo, citoplasma, lisosomas	Inducible
HSPA1B	HSP70-2	Núcleo, citoplasma, lisosomas	Inducible
HSPA1L	Hum70t, HSP70-HOM	Citoplasma	
HSPA2		Núcleo	
HSPA4	RY, APG-2, Hsp70, Hsp70RY, HS24/P52, MGCI131852	Aparato de Golgi	
HSPA5	BIP, MIF2, GRP78, FLJ26106	Retículo endoplasmático	Constitutiva
HSPA6	HSP70B'	Citoplasma	Inducible
HSPA7	HSP70B	?	Inducible
HSPA8	LAPI, HSC54, HSC70, HSC71, HSP71, HSP73, NIP71, HSPA10, MGC29929, MGCI31511	Núcleo, citoplasma	Constitutiva
HSPA9B	CSA, MOT, MOT2, GRP75, HSPA9, PBP74, Mot-2, MGC4500, mtHSP75	Mitocondria	Constitutiva

En peces, se han descrito seis miembros de la familia de las HSP70, inicialmente anotados como HSP70-1, HSP70-2, HSC70-1, HSC70-2, GRP78 y GRP75/mortalina. No obstante, la HSP70-1 y la HSP70-2 son el producto de duplicaciones génicas y tienen como verdadero ortólogo a la HSP70B' (HSPA6) de humanos. De forma similar, el verdadero ortólogo de la HSC70-1 y la HSC70-2 es la HSC70 (HSPA8). Por el contrario, tanto la GRP78 como la GRP75 de pez cebra y fugu sí que están correctamente anotadas desde un principio (**Tabla 1.6**) (Yamashita y cols., 2004).

**Tabla 1.6.** Miembros de la familia de las HSP70 en peces (Yamashita y cols., 2004).

HSP70	Expresión	Localización cromosómica		Ortólogo humano
		Pez cebra Cromosoma	Fugu <i>Scaffold</i>	
HSP70-1	Inducible	8 (17.3 Mb)	1502	HSP70B'
HSP70-2	Inducible	16 (9.3 Mb)	482	HSP70B'
HSC70-1	Constitutiva	(ctg12323)	1877	HSC70
HSC70-2	Constitutiva	15 (9.5 Mb)	124	HSC70
GRP78	Constitutiva	11 (6.6 Mb)	735	GRP78
GRP75	Constitutiva	6 (18.4 Mb)	1599	GRP75

Revisiones recientes han puesto de relieve que el nivel de expresión de estas proteínas refleja el grado de estrés al que están sometidos los peces en cultivo y en el medio salvaje (Roberts y cols., 2010; Sung y cols., 2011). Así por ejemplo, en trucha arco iris (Lund y Trufts, 2003) y sargo (Deane y Woo, 2005), el factor más importante que induce la expresión de HSP70 y HSC70 es el estrés térmico. El estrés osmótico y la hipoxia también inducen la expresión de la HSP70 en *black sea bream* (Deane y cols., 2002) y tilapia del Nilo (Delaney y Klesius, 2004). El estrés por inanición estimula la expresión de la HSP70 en larvas de dorada y trucha arco iris (Cara y cols., 2005). Asimismo, el estrés por confinamiento induce la expresión de HSP70 en el hígado y cerebro de doradas con densidades de cultivo de 100 kg/m<sup>3</sup> (Gornati y cols., 2004). No obstante, otros autores indican que la respuesta desencadenada no suele ser dosis-dependiente, por lo que han sugerido que la HSP70 no es un marcador suficiente sensible como para detectar diferentes condiciones de estrés. Un ejemplo de ello es el salmón del Atlántico (Zarate y Bradley, 2003), por lo que Iwama y cols. (2004) han sugerido que el uso de estos marcadores debe hacerse de forma específica para cada tipo de estrés, tejido y especie.

La expresión de GRP78 se ha estudiado en líneas celulares de fibroblastos de espadaña sureña (Yamashita y cols., 2004) y trucha arco iris (Ojima y cols., 2005). Estos trabajos muestran que la GRP78 tiene una expresión constitutiva, refractaria al aumento de la temperatura e inducible cuando las células se exponen a productos que afectan al plegamiento y

conformación de proteínas como la tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilación a nivel del retículo endoplasmático) y la azetidina (aminoácido homólogo de la prolina).

Los estudios de regulación de la GRP75/mortalina son si cabe más escasos, aunque se ha observado que mutantes de pez cebra deficientes en GRP75/mortalina muestran serios defectos hematopoyéticos (Craven y cols., 2005). Además, estudios *in vivo* de toxicogenómica (publicados al inicio de la presente Tesis Doctoral) indican que la expresión de la GRP75/mortalina se induce de dos a tres veces en el hígado de peces expuestos a concentraciones sub-letales de arsénico (Lam y cols., 2006).



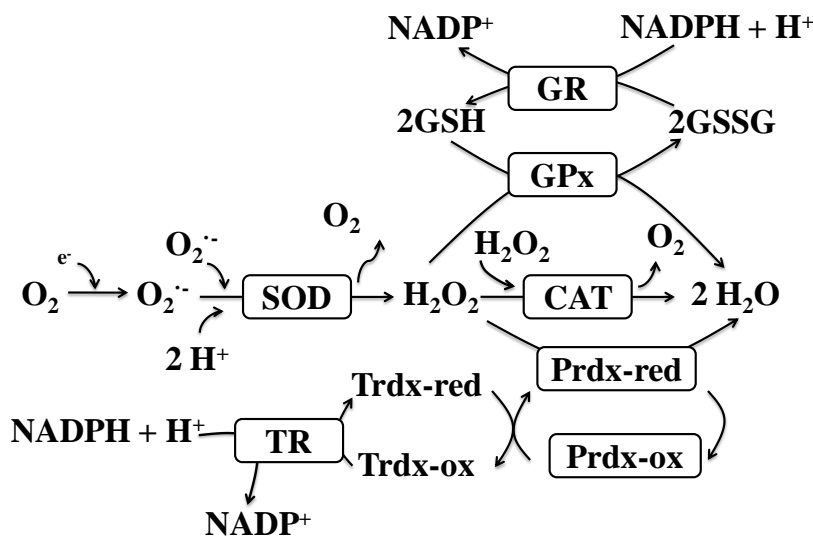
## Sistemas antioxidantes

Los peces, al igual que los vertebrados tetrápodos, poseen sistemas tanto enzimáticos como no enzimáticos (vitaminas C, E y K, flavonoides, carotenoides, glutatión y el ácido úrico) de protección frente a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Martínez-Álvarez y cols., 2005). Las principales enzimas antioxidantes actúan al principio de la cascada de formación de ROS (**Figura 1.13**). La superóxido dismutasa (SOD) facilita la dismutación de radicales superóxido para formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que reduce la catalasa (CAT) para formar agua. La glutatión peroxidasa (GPx) es una proteína dependiente de selenio que cataliza la reducción del  $H_2O_2$  y otros peróxidos orgánicos. Esta proteína actúa acoplada a la glutatión reductasa (GR), que es una flavoproteína que utiliza el NADPH para reducir el glutatión oxidado. Las tioredoxinas peroxidadas (TPx) utilizan la tioredoxina (que posee un centro redox ditiol/disulfuro) para reducir el  $H_2O_2$  y lo hace de forma acoplada a la tioredoxina reductasa. Las peroxiredoxinas (PRDX) son una nueva familia de enzimas no dependientes de selenio de expresión ubicua y que catalizan la reducción de peróxidos y peróxidos orgánicos a expensas de glutatión o tioredoxina (Rhee y cols., 2005). En mamíferos se han descrito seis isoformas de PRDXs, habiéndose identificado de forma fragmentaria los correspondientes ortólogos en varias especies de peces. No obstante, un estudio reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio ha descrito y caracterizado molecularmente las seis isoformas en una única especie de pez, concretamente en la dorada (Pérez-Sánchez y cols., 2011).

El alineamiento de las PRDXs de dorada muestra una clara conservación de todos los motivos estructurales, en base a lo cual se han identificado las tres sub-familias propias de otros vertebrados. La primera de ellas, la sub-familia 2-Cys típica, incluye la PRDX1, 2, 3, y 4; la sub-familia 2-Cys atípica incluye la PRDX5 y la sub-familia 1-Cys está representada por la PRDX6. Para todos los miembros de la familia el ciclo catalítico consiste en dos pasos, el primer paso es común a las tres sub-familias y supone la oxidación de una cisteína activa a un ácido sulfénico por el sustrato peroxidado. El segundo paso de la

reacción consiste en la regeneración del ácido sulfénico por una segunda cisteína finalizadora. En el caso de sub-familia 2-Cys típica, esta cisteína se localiza en el extremo C-terminal de la segunda subunidad y al oxidarse forma un enlace disulfuro intermolecular; mientras que en las formas atípicas se forma un enlace disulfuro intracatenario que es reducido por una molécula reductora específica (tioredoxina, glutatión) para completar el ciclo catalítico. La PRDX6 (sub-familia 1-Cys) sólo posee una cisteína activa que es reducida directamente por una molécula reductora (ácido ascórbico, glutatión) (Monteiro y cols., 2007).

**Figura 1.13.** Esquema básico de eliminación de radicales libres por los sistemas antioxidantes enzimáticos. CAT, catalasa; GPx glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG glutatión oxidado; Prdx-ox, peroxiredoxina oxidada; Prdx-red, peroxiredoxina reducida; SOD, superóxido dismutasa; TR, tioredoxina reductasa; Trdx-ox, tioredoxina oxidada; Trdx-red, tioredoxina reducida. (Andreyev y cols., 2005; Kelly y cols., 1998).



Tradicionalmente, la actividad de las enzimas antioxidantes en peces se ha utilizado ampliamente para determinar los efectos de diferentes niveles de contaminación (Peña-Llopis y cols., 2003; Valavanidis y cols., 2006; Zhang y cols., 2004), aunque hay que tener en cuenta que existen diferencias en función de la especie, tejido y estación (Wdzięczak y cols., 1982). Así, en carpines (*Carasius auratus*) se ha observado que las actividades de SOD y GR están elevadas en tejidos con una alta actividad metabólica como hígado, cerebro y riñón y no presentan cambios cuando se someten a los peces a un aumento de la temperatura de 3 a 23° C (Bagnyukova y cols., 2007). Sin embargo, la respuesta de la CAT es tejido-dependiente de modo que el incremento agudo de la temperatura comporta un aumento de la actividad enzimática en cerebro y disminución en hígado, mientras que no produce efectos significativos en riñón. Por el contrario, la actividad de la GPx, a pesar de las diferentes actividades tisulares, aumenta inicialmente para volver al poco tiempo a sus niveles basales en todos los casos.

Estudios dietarios también muestran la dependencia entre la actividad de los sistemas antioxidantes y el estado nutricional, de forma que la actividad hepática de SOD, GPx y CAT es inversamente proporcional a la concentración de vitamina E en la dieta (Tocher y cols., 2002). En el caso de la dorada, también hay evidencias experimentales de que los niveles hepáticos de glutatión y la actividad de GR aumentan con la inclusión de proteína vegetal en la dieta (Sitjà-Bobadilla y cols., 2005). La interacción dieta x estadio de desarrollo es otro factor a tener en cuenta, puesto que en larvas de dentón ayunadas aumenta la actividad de algunos enzimas antioxidantes (SOD, GR y glutatión-S-transferasa) mientras que disminuye la de otros (CAT y GPx) (Mourente y cols., 1999).

El estrés producido por las diferentes condiciones de cultivo (densidad, manejo de animales, calidad del agua) también conlleva respuestas aparentemente contradictorias. Así por ejemplo, la actividad plasmática de GPx disminuye en lubinas sometidas a 40 minutos de hipoxia (Guerriero y cols., 2002). Protocolos de estrés repetido también disminuyen la actividad

hepática de GR, GST, GPx y CAT en el dorado (*Salminus brasiliensis*) (Braun y cols., 2010). El estrés por confinamiento ( $100 \text{ kg/m}^3$ ) también puede desencadenar respuestas opuestas, de forma que en el bacalao del Atlántico la expresión de SOD en células sanguíneas se mantiene elevada hasta las 72 horas; mientras que la expresión de CAT y de la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa aumentan sólo inicialmente (Caipang y cols., 2008). Otros estudios muestran que la actividad de las enzimas antioxidantes se reduce o no cambia durante el estrés crónico por confinamiento, de forma que la actividad de la SOD disminuye en glóbulos rojos de truchas arco iris sometidas a densidades de  $100 \text{ kg/m}^3$  durante 42 días sin que se modifique la actividad de CAT y GPx (Trenzado y cols., 2009). De forma similar, la actividad de GR disminuye en hígado, músculo y branquias de truchas arco iris cultivadas a  $30 \text{ kg/m}^3$  durante dos meses, mientras que no cambia su actividad en riñón (Aksakal y cols., 2011). Por consiguiente, el reajuste del estado oxidativo por las enzimas antioxidantes varía en función del tejido, estado nutricional y condiciones de cultivo.

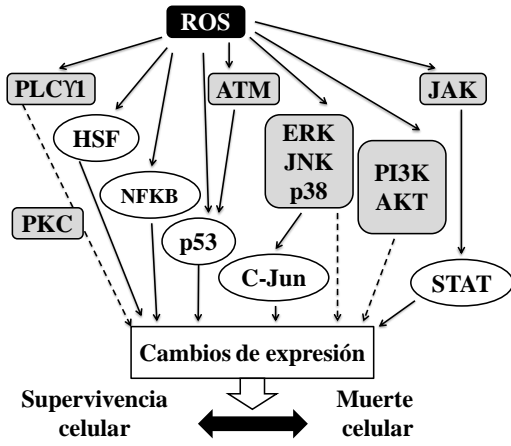
### 1.3. Las mitocondrias como actores de la respuesta mediada por el estrés

Con independencia de los sistemas efectores implicados en la respuesta mediada por el estrés, las mitocondrias acaban siendo actores principales de la misma. Estos orgánulos citoplasmáticos son los encargados de la producción de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Ahora bien, como subproducto de esta actividad aeróbica, más del 2% del oxígeno consumido por las mitocondrias da como resultado la producción de ROS (Chance y cols., 1979), lo que puede desencadenar la apoptosis celular si no se establecen las medidas correctoras adecuadas. Por consiguiente, el estrés oxidativo es un riesgo al que está sometido todo organismo aeróbico, definiéndose como tal un desequilibrio entre procesos oxidativos y antioxidativos que también incluye, como se muestra en los apartados siguientes, el desacople de la cadena de transporte de electrones.

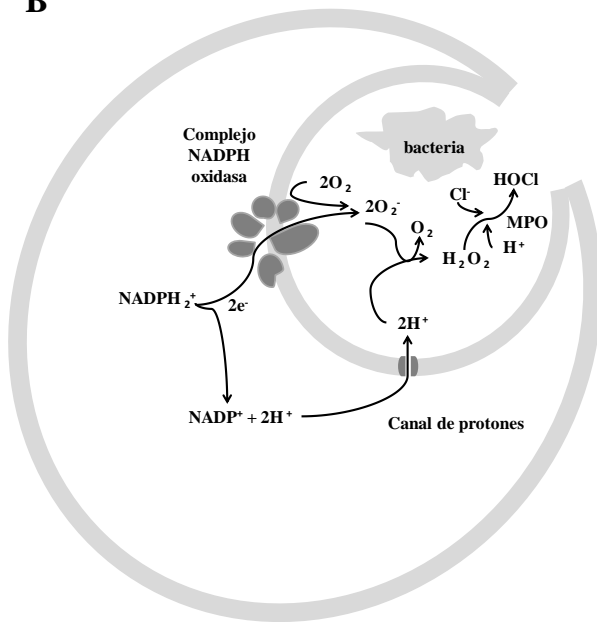
Los estados crónicos de estrés oxidativo aceleran los procesos de envejecimiento y daño neuronal asociados a procesos degenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Dumont y Beal, 2011). Es más, los tejidos con mayor actividad metabólica son los que acumulan un mayor daño oxidativo (Gallagher y cols., 1998; Tian y cols., 1998), aunque niveles bajos de ROS no sólo no son perjudiciales si no que también están considerados esenciales para la vida, al formar parte de diferentes vías de señalización intracelular (**Figura 1.14A**) (Martindale y Holbrook, 2002). En esta misma línea, estudios recientes con ratones knockout de PRDX3 (Li y cols., 2007) o con deficiencias en PRDX2 (Moon y cols., 2006) demuestran que niveles altos de peroxidasas conllevan el *turn-off* de la respuesta del sistema inmunitario ante un posible reto infeccioso, lo que es independiente de la producción de ROS mediada a nivel de fagocitos por la vía de la NADPH oxidasa (**Figura 1.14B**) (Forman y Torres, 2002).

**Figura 1.14.** (A) Esquema básico de las principales vías de señalización de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Martindale y Holbrook, 2002). (B) producción de ROS por la NADPH oxidasa en fagocitos (DeCoursey y cols., 2002).

**A**



**B**

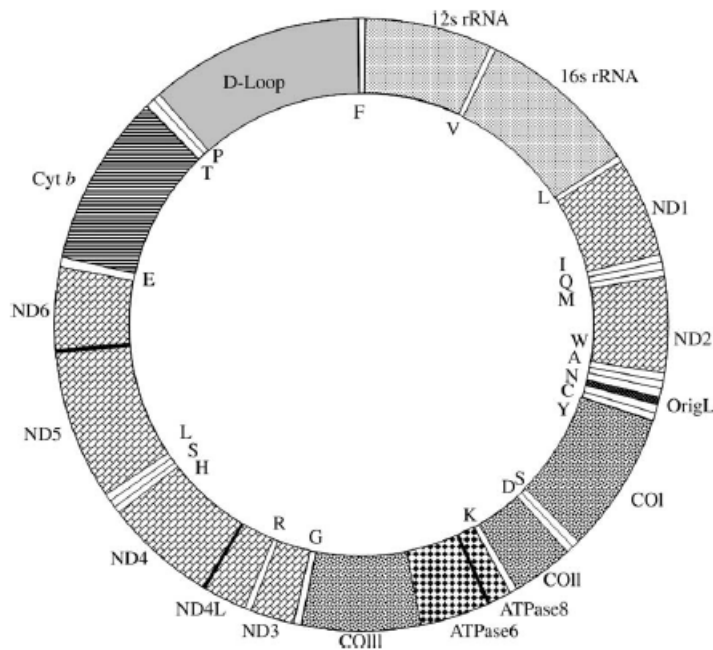


### 1.3.1 Origen y estructura

Las mitocondrias se han convertido en componentes de las células eucariotas a través de la asociación simbiótica entre una célula nucleada y una  $\alpha$ -proteo-bacteria, bacteria oxidativa tipo-*Rickettsia* (Andersson y cols., 1998; Margulis, 1996). Posiblemente, estas bacterias ancestrales eran capaces de generar energía en forma de ATP mediante la OXPHOS, de modo que la hipótesis más aceptada es que la proto-mitocondria protegía a la célula hospedadora de la creciente toxicidad de una atmósfera rica en oxígeno, producida por la actividad fotosintética de las cianobacterias. Con posterioridad, la célula hospedadora debió ser capaz de importar el ATP mitocondrial a expensas del ADP citosólico, estableciéndose una estrecha relación bioenergética entre el simbiote y el hospedador, que a su vez proporciona al primero un medio estable y rico en nutrientes (Wallace, 2004).

Como resultado de esta relación de simbiosis, la mayoría del genoma original de la bacteria se debió perder o transferir al ADN nuclear (ADNn) (Andersson y cols., 2003). Así pues, el ADN mitocondrial (ADNmt) de los vertebrados actuales es un ADN circular que codifica para 37 genes, 22 de los cuales codifican para ARNs de transferencia (ARNt), dos codifican para ARN ribosómico (ARNr) y los 13 restantes para componentes de la cadena respiratoria o subunidades de la ATP sintasa (**Figura 1.15**) (Brown, 2008). En este último grupo están incluidos los polipéptidos de la cadena de respiración ND1, 2, 3, 4L, 5 y 6 del complejo I, una subunidad (cytb) del complejo III (complejo bc<sub>1</sub>), dos o tres subunidades (COI, COII, COIII) de la citocromo oxidasa (COX o complejo IV) y una o más subunidades (ATP6, ATP8, ATP9) del complejo V (ATP sintasa) (Brown, 2008; Wallace, 2004). El resto de componentes de la mitocondria, tanto de la OXPHOS como de otras vías o procesos, están codificados por genes nucleares y han de ser transportados desde el citoplasma hasta la mitocondria.

**Figura 1.15.** Genoma mitocondrial de vertebrados. Los nombres situados fuera del anillo indican los dos ARNr, los 13 polipéptidos mitocondriales que codifican para la OXPHOS y el origen de la cadena ligera. Las letras en el interior del anillo indican la localización de las secuencias que codifican para el ARNt (Brown, 2008).



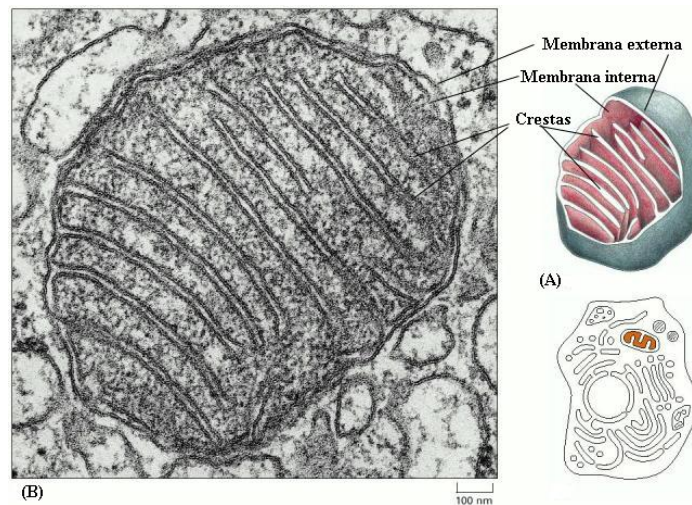
En general, la estructura de las mitocondrias se ha conservado notablemente a lo largo de la evolución, de modo que en vertebrados tetápodos y no tetrápodos ha llegado a nuestros días como un orgánulo que consta de dos membranas fosfolipídicas (membrana externa y membrana interna) que delimitan el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (**Figura 1.16**). La membrana externa contiene varios enzimas implicados en el metabolismo lipídico (carnitina palmitoiltransferasa I, translocasa de ácidos grasos FAT/CD36 o glicerol 3-fosfato aciltransferasa), así como las denominadas porinas que son unas proteínas que forman poros no específicos y que proporcionan una alta permeabilidad a la mitocondria (Shoshan-Barmatz y Gincel, 2003). Por su parte, la membrana



interna forma invaginaciones o pliegues llamados crestas mitocondriales que aumentan considerablemente su superficie. Esta membrana es altamente selectiva y contiene proteínas específicas de este orgánulo. De hecho, en la membrana interna se localizan muchos complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembrana implicados en la translocación de moléculas como los complejos de la cadena de transporte de electrones, la ATP sintasa, la adenina nucleótido translocasa (ANT) y la fosfato translocasa.

El espacio intermembrana delimitado por las membranas externa e interna tiene pH ácido y contiene enzimas implicadas en la transferencia del enlace de alta energía del ATP (creatina quinasa y adenilato quinasa). En la matriz mitocondrial es donde tienen lugar algunas de las reacciones enzimáticas más importantes de la célula, como el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, la oxidación de aminoácidos y la síntesis de urea y grupos hemo. Además, es donde se encuentra el ADNmt y la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas mitocondriales.

**Figura 1.16.** (A) Dibujo interpretativo y (B) micrografía electrónica de una mitocondria (Alberts y cols., 2002).



### 1.3.2 Transporte mitocondrial de proteínas

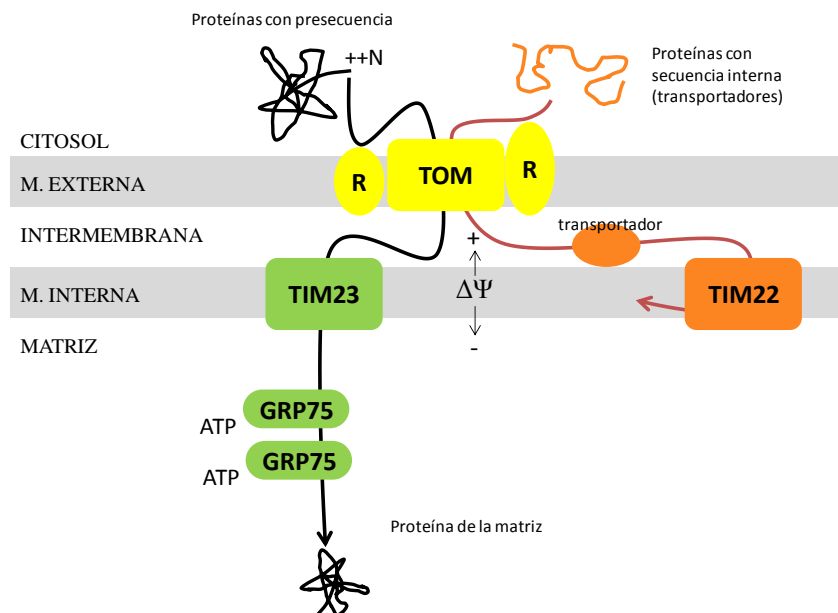
Los péptidos codificados por genes nucleares y sintetizados en el citoplasma son importados a la mitocondria por vías específicas para acabar formando proteínas funcionales. La localización final de las proteínas en la membrana externa, espacio intermembrana o matriz mitocondrial depende de un modelo genérico de transporte mitocondrial que está dirigido por secuencias diana de las proteínas (**Figura 1.17**) (Truscott y cols., 2003).

Independientemente de la localización final todas las proteínas tienen que atravesar la membrana externa a través del complejo TOM que consta de tres receptores y un gran canal denominado poro general de importación (GIP). Las pre-proteínas integrales de la membrana interna poseen secuencias internas que son reconocidas como motivos diana. Inicialmente se unen al receptor TOM70, atraviesan el GIP y alcanzan el espacio intermembrana. La inserción en la membrana es dependiente del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) y está mediado por el complejo TIM22. Las pre-proteínas integrales de la membrana interna incluyen transportadores como el ANT o el transportador de fosfato. Además, las subunidades nucleares de los complejos de la cadena de transporte de electrones, que contienen subunidades mitocondriales (complejo I, II, IV, y ATP sintasa), son importadas a la matriz e insertadas a la membrana interna junto con las subunidades mitocondriales por un cuarto complejo de translocasas, el OXA1.

Aquellas proteínas cuyo destino es la matriz mitocondrial poseen una secuencia diana cargada positivamente en su extremo amino terminal y su translocación es dependiente del  $\Delta\Psi_m$ . En este caso, el complejo TOM20 interacciona con el complejo de translocasas de la membrana interna TIM23. Una vez que la proteína emerge en la matriz es reconocida por la chaperona mitocondrial GRP75/mortalina, que se encuentra asociada al complejo TIM23. La GRP75 es una chaperona que contiene un dominio ATPasa con un sitio de unión a péptidos (*peptide binding pocket*) que se encuentra abierto en su conformación unida a ATP, mientras que está fuertemente cerrado después de la hidrólisis del ATP a ADP. Otra proteína de la matriz, la

Mge1p, libera la GRP75/mortalina del complejo TIM23, permitiendo que se difunda hacia la matriz y se complete la importación de la proteína a través del TIM23 (Koehler, 2000; Rassow y Pfanner, 2000).

**Figura 1.17.** Modelo simplificado de importación mitocondrial de proteínas. Las proteínas integrales de la membrana interna poseen motivos diana internos que son reconocidos por los receptores (R) del complejo TOM de forma que son translocadas hacia el espacio intermembrana y su inserción en la membrana interna está mediada por el complejo TIM22 y es dependiente del potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ). Las proteínas de la matriz mitocondrial poseen una secuencia diana cargada positivamente en su extremo amino terminal, que es reconocida por el receptor del complejo TOM, de forma que atraviesan la membrana externa y se unen al complejo TIM23. La translocación en la membrana interna es dependiente del  $\Delta\Psi$  y requiere de la presencia de la GRP75/mtHSP70 que sirve como motor dependiente de ATP para el transporte de las proteínas (Truscott y cols., 2003).



### 1.3.3 Cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa y proteínas desacopladoras

En último término, la actividad mitocondrial conlleva la producción de ATP por la ATP sintasa. Este proceso implica la oxidación de diferentes sustratos en el ciclo de Krebs, lo que genera la producción de NADPH y FADH<sub>2</sub>. Estos equivalentes reductores son donantes de electrones a la cadena de transporte, que está formada por cinco complejos enzimáticos (**Figura 1.18**). La transferencia de electrones está dirigida por el potencial redox de los componentes individuales de la cadena de transporte, lo que permite la transferencia de electrones desde una pareja redox a otra pareja de potencial de reducción mayor. Los protones se translocan a través de la membrana interna mitocondrial por los complejos I, III y IV que funcionan como bombas de protones. Los electrones son transferidos a una molécula de oxígeno y tras la transferencia secuencial de cuatro electrones al complejo IV se genera una molécula de agua.

La caída en el potencial de membrana durante la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte genera la fuerza protón motriz (pmf o  $\Delta p = \Delta\mu H^+/F$ , siendo  $\Delta\mu H^+$  el gradiente electroquímico de protones y F la constante de Faraday) que conduce a la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Según Mitchell (1966), la pmf tiene dos componentes: una de carga, potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y otra de concentración, gradiente de pH ( $\Delta pH$ ). Sin embargo, en la mayoría de casos, el  $\Delta\Psi_m$  es el factor directriz, por lo que es considerado un parámetro clave a la hora de estimar la competencia bioenergética de la mitocondria (Adam-Vizi y Chinopoulos, 2006).

La ATP sintasa acopla la difusión a favor de gradiente de los protones a la síntesis de ATP. Este fenómeno, denominado acoplamiento de la OXPHOS a la oxidación de sustratos metabólicos refleja la dependencia de la síntesis de ATP con respecto al flujo continuo de electrones a lo largo de la cadena de transporte mitocondrial. Sin embargo, este acoplamiento no es

perfecto, puesto que los protones pueden volver a la matriz mitocondrial evitando la ATP sintasa.

El desacoplamiento respiratorio puede deberse al goteo de protones (*proton leak*) como consecuencia de la difusión de los mismos a través de la membrana interna o a la variación de la estequiometría de reacción de los complejos de la cadena respiratoria, lo que se denomina *slip* (Brand y cols., 1994). Este desacoplamiento supone un despilfarro energético de escaso valor adaptativo. No obstante, en determinadas circunstancias puede resultar metabólicamente ventajoso. Así por ejemplo, en mamíferos el aumento del desacoplamiento en hígado y músculo contribuye a la tasa metabólica estándar en condiciones de exceso de energía (Rolfe y cols., 1999), mientras que en el tejido adiposo marrón está asociado a la producción de calor (Nicholls y Locke, 1984). Por otro lado, el desacoplamiento respiratorio disminuye notablemente durante procesos de hibernación de ranas (St Pierre y cols., 2000) y caracoles (Bishop y Brand, 2000). En la misma línea, hay evidencias experimentales que asocian en hámsteres la disminución del desacoplamiento respiratorio con la hibernación temporal (*torpor*) (Brown y cols., 2007) y la menor producción de ROS (Brown y Staples, 2011).

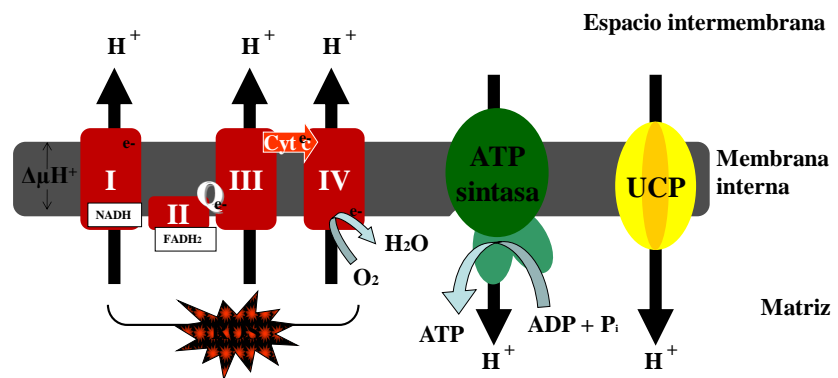
El goteo de protones asociado al desacoplamiento respiratorio está en gran parte mediado por las llamadas proteínas desacopladoras mitocondriales (UCPs), localizadas en la membrana mitocondrial interna (**Figura 1.18**) (Krauss y cols., 2005). En mamíferos, la primera proteína de la familia en describirse fue la UCP1 o termogenina, que se consideró como una adquisición evolutiva tardía. Dicha proteína se expresa en el tejido adiposo marrón y está implicada en la tolerancia al frío, siendo responsable de la denominada termogénesis adaptativa (Nicholls y Locke, 1984). Posteriormente, se han descrito otros miembros de la familia, como la UCP2 considerada una proteína de expresión ubicua (Fleury y cols., 1997), y la UCP3 que se expresa principalmente en músculo y tejido adiposo marrón (Boss y cols., 1997; Vidal-Puig y cols., 1997).

En peces, la primera proteína en caracterizarse fue la UCP2 de pez cebra (Stuart y cols., 1999), aunque según la

revisión de Stuart y cols. (2001) ya existían con anterioridad varias secuencias homólogas en las bases de datos públicas. La descripción de estas proteínas en ectotermos abrió el debate sobre la función ancestral de las mismas y su relación con la termogénesis a lo largo de la evolución de los vertebrados. Otro hito importante, en relación a las UCPs de peces, son los trabajos de Jastroch y cols. (2005) a partir de los cuales se conoce la secuencia parcial de UCP3 y la completa de UCP1 y UCP2 de carpa, habiéndose demostrado la expresión ubicua de UCP2, mientras que la UCP1 queda relegada al hígado, cerebro, riñón e intestino y la UCP3 a músculo blanco y músculo rojo. El análisis de la expresión de ARNm también mostró la disminución de la UCP1 hepática con la exposición al frío, mientras que la de UCP3 aumentó en músculo blanco en respuesta al ayuno, descartando un posible papel termorregulador de las UCPs de carpa. No obstante, en un trabajo posterior los mismos autores (Jastroch y cols., 2007) demostraron que la UCP1 se comporta en cierta medida como la UCP1 de mamíferos, sugiriéndose un rol termorregulador en el cerebro. En otras especies, la expresión en hígado y músculo de UCP2 se ha relacionado con la adaptación a temperaturas extremas como es el del *eelpout* Antártico (*Pachycara brachycephalum*) y de la viruela (*Zoarces viviparus*) (Mark y cols., 2006).

Otros trabajos han mostrado la existencia de una duplicación genómica de la UCP2 en trucha arco iris, de forma que tanto la UCP2A como la UCP2B tienen una distribución ubicua mientras que muestran una regulación diferencial en músculo, con un aumento de la UCP2A durante el ayuno y disminución durante la realimentación, al contrario que la UCP2B (Coulibaly y cols., 2006). Asimismo, la expresión de UCP2 hepática se ha relacionado con los hábitos alimenticios de cinco especies de carpas, de forma que existen mayores niveles de expresión en especies detritívoras que en las especies hervíboras (Liao y cols., 2006). Por tanto la información que se dispone de las UCPs empieza a ser relevante, pero sigue siendo parcial y reducida a unas pocas especies. Además, existen problemas de nomenclatura derivados de una anotación errónea de algunas de las secuencias de UCPs publicadas y/o depositadas en GenBank.

**Figura 1.18.** Cadena de transporte de electrones. Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (Ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa) y complejo IV (citocromo oxidasa). La ubiquinona (Q) conduce los electrones del complejo I y II al complejo III, mientras que el citocromo c (Cyt c) conduce los electrones del complejo III al complejo IV. El NADH es oxidado por el complejo I y el  $\text{FADH}_2$  por el complejo II, de forma que los electrones son transferidos a través de la cadena de transporte hasta el  $\text{O}_2$  mientras los complejos I, III y IV bombean  $\text{H}^+$  generando un gradiente electroquímico ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) a través de la membrana interna mitocondrial. Este gradiente genera la fuerza para producir la síntesis de ATP por la ATP sintasa. El goteo de protones a través de la membrana interna mediado por las proteínas desacopladoras mitocondriales (UCP) produce la entrada de  $\text{H}^+$  en la matriz mitocondrial por mecanismos no acoplados a la síntesis de ATP (Boss y cols., 2000).



### 1.3.4 Disfunciones mitocondriales

La mayor parte de las disfunciones mitocondriales que se conocen son debidas a mutaciones de genes mitocondriales y los estudios clínicos han demostrado los graves efectos que tienen dichas disfunciones sobre la salud humana. Éstas se manifiestan como enfermedades que afectan al sistema nervioso central, muscular y cardíaco, así como al sistema endocrino y renal, (Adam-Vizi y Chinopoulos, 2006; Pagel-Langenickel y cols., 2010; Stark y Roden, 2007). Además, estas alteraciones funcionales están relacionadas con niveles crecientes de estrés oxidativo y un metabolismo energético deficiente que no es capaz de cubrir la demanda energética del organismo en condiciones normales (DiMauro, 2004).

Las disfunciones mitocondriales también comportan el colapso de la red de chaperonas mitocondriales que tienen como objetivo el transporte, ordenación y mantenimiento de la integridad de las proteínas mitocondriales, actuando como tampones de las proteínas envejecidas o dañadas en un ambiente rico en ROS (Deocaris y cols., 2008). En este sistema de chaperonas, se ha propuesto que la GRP75/mortalina podría estabilizar los componentes de la cadena de transporte limitando la acumulación de ROS o interaccionando con las enzimas antioxidantes (Liu y cols., 2005). En esta línea, diferentes trabajos de proteómica han relacionado la GRP75/mortalina en su forma oxidada con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Choi y cols., 2004; Jin y cols., 2006).

Además de reparar el daño oxidativo, los sistemas celulares también pueden reducir la producción de ROS, actuando directamente sobre la cadena de transporte de electrones. En este sentido, las UCPs son importantes dianas en el tratamiento contra el envejecimiento, enfermedades degenerativas, diabetes y algunos casos de obesidad (Brand y Esteves, 2005). Estas enfermedades están asociadas a disfunciones del metabolismo lipídico, que en ocasiones suponen un incremento crónico de los niveles circulantes de ácidos grasos libres, que son altamente tóxicos si una vez dentro de la mitocondria no se almacenan en forma de triglicéridos o se



oxidan rápidamente (Alberici y cols., 2011). Por consiguiente, la lipotoxicidad se define como el daño oxidativo que se produce cuando la capacidad de almacenamiento en forma de triglicéridos y/o oxidación de ácidos grasos libres supera la demanda de un tejido en particular (Unger y Zhou, 2001). Es por ello que aunque resulte paradójico, el riesgo de daño oxidativo como consecuencia de una disfunción u alteración del metabolismo lipídico puede ser mayor en un tejido anaeróbico que en otro altamente vascularizado (Schaffer, 2003).

A la vista de todo ello son varios los factores que afectan al bienestar animal, entendido como un todo, de forma que retos de origen biótico o abiótico pueden acabar comprometiendo la capacidad de adaptación del organismo y las consecuentes repercusiones sobre el crecimiento, la capacidad reproductora y de defensa. Es por ello, que a corto-medio plazo, gran parte de los esfuerzos de investigación en acuicultura deberían centrarse en la búsqueda y/o validación de biomarcadores con un claro valor predictivo de la capacidad de respuesta y/o adaptación del animal a un medio hostil, como son los sistemas de producción intensivos y semi-intensivos. De hecho, el desarrollo de paneles de marcadores que evalúen los sistemas de producción de especies mediterráneas puede incrementar el control y la calidad de las explotaciones y abrir nuevos mercados. En este sentido, los actores de la respuesta antioxidante y, en particular, chaperonas y UCPs mitocondriales se postulan como centinelas del bienestar animal, por su papel en la reparación del daño oxidativo y la reducción del riesgo de lipotoxicidad y la producción de ROS a nivel mitocondrial. Ello ha constituido la hipótesis de trabajo de la presente Tesis Doctoral, en la que se contemplan varios modelos experimentales de interés en acuicultura, en especial para la acuicultura mediterránea.



## CAPÍTULO 2

### Objetivos y plan de trabajo



La aplicación del nuevo enfoque de bienestar animal en la acuicultura necesita de la validación de biomarcadores con un claro valor predictivo de la capacidad de respuesta y/o adaptación del animal a los sistemas de producción. De hecho, el desarrollo de paneles de marcadores que diagnostiquen los riesgos de producción de especies mediterráneas puede proporcionar una valiosa herramienta de evaluación de la calidad y control sobre las explotaciones. Por tanto, la presente Tesis Doctoral ha tenido **como objetivo general** caracterizar y validar nuevos marcadores mitocondriales de estrés oxidativo y lipotoxicidad en dorada, como especie de referencia y de claro valor económico para la acuicultura mediterránea.

Los trabajos conducentes a cumplir el objetivo planteado se han enmarcado en proyectos nacionales (AQUAGENOMICS) y europeos del VI Programa Marco de la UE (AQUAFIRST, AQUAMAX). El Grupo de Nutrigenómica y Endocrinología del Crecimiento de Peces del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) ha participado activamente en estos proyectos para desarrollar nuevas herramientas genómicas y moleculares para un mejor fenotipado de peces en cultivo y selección de caracteres de interés relacionados con crecimiento y resistencia a retos infecciosos y de estrés por confinamiento. Para abordar estos objetivos se ha contado en el marco de esta Tesis Doctoral con la colaboración de los grupos de Patología de Peces y de Especies Auxiliares en Acuicultura, Larvicultura y Ecotoxicología del Departamento de Biología, Cultivo y Patología de Especies Marinas del IATS.

*Nota: proyectos vinculados a la presente Tesis Doctoral.*

- *AQUAFIRST (2004-2008; SSP98-CT-2004-513692): Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance marker assisted selection in fish and shellfish.*
- *AQUAMAX (2006-2010; FOOD-CT-2006-16249): Sustainable aquafeeds to maximise the health and benefits of farmed fish for consumers.*
- *AQUAGENOMICS (2007-2012; Programa Consolider-Ingenio-2010): Improvement of aquaculture production by the use of biotechnological tools.*

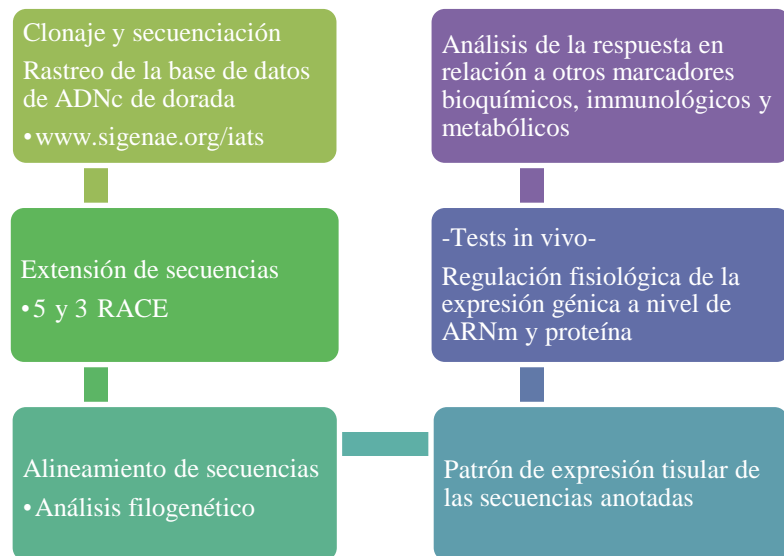
El enfoque de la presente Tesis Doctoral es por consiguiente claramente multidisciplinar y ha permitido a la doctoranda adquirir una sólida formación zootécnica que va desde la cría larvaria hasta el manejo y estabulación de peces en cultivo a lo largo de todo el ciclo productivo. La doctoranda también se ha familiarizado con el manejo de bases de datos de ADN y técnicas de clonaje, secuenciación y expresión génica mediante PCRs en tiempo real. Además, ha puesto a punto varios ensayos de *Western blot*, actividad enzimática y respiración mitocondrial.

Por tanto, la bondad de las chaperonas y UCPs mitocondriales se aborda en los **objetivos específicos** de la presente Tesis Doctoral:

1. Identificación y caracterización molecular de la GRP75/mortalina de dorada como una chaperona mitocondrial de la familia de las HSP70.
2. Validación funcional de la GRP75/mortalina como marcador de estrés oxidativo en peces.
3. Identificación y caracterización molecular de la familia de las proteínas desacopladoras de dorada.
4. Validación funcional de la UCP1 y UCP3 como marcadores de lipotoxicidad y estrés oxidativo en peces.

El **plan de trabajo** propuesto se resume en la **Figura 2.1**. De acuerdo con ello, tras un rastreo exhaustivo de las bases de datos de ADNc de dorada, derivadas de los proyectos europeos AQUAFIRST y AQUAMAX ([www.siginae.org/iats](http://www.siginae.org/iats)), se aborda el clonaje y secuenciación y si es necesario se completan las secuencias anotadas mediante técnicas de 5' y 3' RACE. Tras lo cual se acomete el análisis de las secuencias así obtenidas, lo que incluye alineamiento de secuencias y construcción de árboles filogenéticos. El análisis funcional es la etapa final y ésta se aborda con diferentes tests *in vivo*, en los que se analiza, en relación a otros parámetros bioquímicos y/o inmunológicos, la expresión a nivel de ARNm y, en su caso, de proteína de los genes diana objeto de estudio. En el caso de las UCPs, dichos estudios se han completado con medidas de respiración mitocondrial en muestras frescas de tejidos.

**Figura 2.1.** Representación diagramática del plan de trabajo para la caracterización molecular y validación funcional de un determinado biomarcador.



En cada caso, los detalles del diseño experimental, resultados y discusión *ad hoc* se muestran en los capítulos 3-6:

En el **capítulo 3** se describe la caracterización molecular de la GRP75/mortalina de dorada y los efectos del estrés crónico y agudo sobre la expresión génica de esta chaperona de la familia HSP70. Como modelo experimental se utilizó un diseño de estrés por confinamiento con densidades de 45 y 120 Kg/m<sup>3</sup>. Como tejidos diana se utilizaron muestras de hígado, cerebro, riñón anterior y branquias. El estudio se completó con medidas de otros parámetros bioquímicos e inmunológicos.

En el **capítulo 4** se analizan los patrones de crecimiento de la dorada y dentón, espárido con un notable potencial de crecimiento pero con signos evidentes de una adaptación deficiente a las condiciones de cautividad. El diferente patrón de crecimiento se analiza en relación a varios marcadores moleculares y bioquímicos de crecimiento, estado inflamatorio y de estrés oxidativo, entre los que se incluyen la GRP75/mortalina.

En el **capítulo 5** se describe la caracterización molecular y filogenética de dos UCPs de dorada, anotadas de forma inequívoca como UCP1 y UCP3. Mediante PCRs en tiempo real se analiza el diferente patrón de expresión tisular, centrándose en la respuesta del hígado y musculo esquelético blanco ante diferentes factores bióticos y abióticos (edad, estación, dieta deficitaria en ácidos grasos y estrés por confinamiento).

En el **capítulo 6** se muestra la diferente regulación transcripcional de la UCP3 muscular (corazón y músculo esquelético blanco, músculo esquelético rojo) en respuesta a diferentes niveles de ración. El estudio también incluye medidas de respiración mitocondrial que se completan con actividades enzimáticas y de niveles circulantes de ácidos grasos libres y factores de crecimiento.



Los capítulos 3-6 se corresponden con las cuatro publicaciones SCI que han constituido la base de la presente Tesis Doctoral:

- **Capítulo 3: Bermejo-Nogales, A.,** Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., (2008). Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/mortalin/mtHsp70/PBP74/HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology 149, 428-438.
- **Capítulo 4: Bermejo-Nogales, A.,** Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Navarro, J.C., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., (2007). Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in relation to redox homeostasis. Aquaculture 267, 213-224
- **Capítulo 5: Bermejo-Nogales, A.,** Calduch-Giner, J., Pérez-Sánchez, J., (2010). Gene expression survey of mitochondrial uncoupling proteins (UCP1/UCP3) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Journal of Comparative Physiology -Part B: Biochemical, Systems, and Environmental Physiology 180, 685-694.
- **Capítulo 6: Bermejo-Nogales, A.,** Benedito-Palos, L., Calduch-Giner, J., Pérez-Sánchez, J., (2011) Feed restriction up-regulates uncoupling protein 3 (UCP3) gene expression in heart and red muscle tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): New insights in substrate oxidation and energy expenditure. Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology 159, 296-302.

El **capítulo 7** incluye una discusión general en la que se abordan globalmente las cuestiones más relevantes planteadas a lo largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

*Nota: los capítulos 3-6 mantienen los requisitos de las revistas en las que se publicaron, aunque se han editado para facilitar su lectura y adaptarlos al formato de la presente Tesis Doctoral.*

Durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, la doctoranda ha participado **en otros trabajos** que han dado lugar a otras tantas publicaciones SCI:

- Monroig, O., Navarro, J.C., Amat, F., González, P., **Bermejo, A.**, Hontoria, F., (2006). Enrichment of *Artemia* nauplii in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 251, 491-508.
- Sitjà-Bobadilla, A., Pujalte, M.J., **Bermejo, A.**, Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2007. Bacteria associated with winter mortalities in laboratory-reared common dentex (*Dentex dentex* L.). *Aquaculture Research* 38, 733-739.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., **Bermejo-Nogales, A.**, Saera-Vila, A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., (2008). The time course of fish oil wash-out follows a simple dilution model in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of vegetable oils. *Aquaculture* 288, 98-105.
- Benedito-Palos, L., **Bermejo-Nogales, A.**, Karampatos, A.I., Ballester-Lozano, G.F., Navarro, J.C., Diez, A., Bautista, J.M., Bell, J.G., Tocher, D.R., Obach, A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., (2011). Modelling the predictable effects of dietary lipid sources on the fillet fatty acid composition of one-year-old gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Food Chemistry* 124, 538-544.
- Pérez-Sánchez, J., **Bermejo-Nogales, A.**, Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Sitjà-Bobadilla, A. (2011) Molecular characterization and expression analysis of six peroxiredoxin paralogous genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Insights from fish exposed to dietary, pathogen and confinement stressors. *Fish and Shellfish Immunology* 31 (2), 294-302.

### **Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/ mortalin/ mtHsp70/ PBP74/ HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)**

Azucena Bermejo-Nogales <sup>a</sup>, Laura Benedito-Palos <sup>a</sup>, Alfonso Saera-Vila <sup>a</sup>, Josep Alvar Caldach-Giner <sup>a</sup>, Ariadna Sitjà-Bobadilla <sup>b</sup>, Jaume Pérez-Sánchez <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Fish Nutrition and Growth Endocrinology Group, Department of Biology, Culture and Pathology of Marine Fish Species, Institute of Aquaculture Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

<sup>b</sup>Fish Pathology Group, Department of Biology, Culture and Pathology of Marine Fish Species, Institute of Aquaculture Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

**Comparative Biochemistry and Physiology Part B (2008)  
149: 428–438**



**ABSTRACT**

Glucose regulated protein 75 (GRP75/ mortalin/ mtHsp70/ PBP74/HSPA9B) is a molecular chaperone that was partially cloned and sequenced in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) using a RT-PCR and 3'RACE approach. The deduced amino acid sequence supported the early vertebrate divergence of the heat shock protein 70 family into cytoplasmic Hsp70/Hsc70 group, endoplasmic reticulum-resident group and the mitochondrial type group of GRP75. The tissue-specific regulation of GRP75 was analyzed by real-time PCR and Western blot after acute (24 h, 120 kg/m<sup>3</sup>) and prolonged confinement exposure (3 weeks-trial, 45–50 kg/m<sup>3</sup>). In both experiments, GRP75 gene expression was not significantly altered in brain, head kidney and gills. By contrast, hepatic transcripts of GRP75 were up-regulated and the magnitude of the response was dependent on the intensity of stressor. Furthermore, similar increments in hepatic transcripts and protein levels of GRP75 were found after prolonged confinement exposure. In addition, these stressed animals exhibited a 10% reduction in feed efficiency, significantly increased glycaemia and plasma peroxidases, and their plasma transaminases and respiratory burst of circulating leucocytes were significantly decreased. This stress-mediated response may act in concert with the increased production of hepatic GRP75 to protect metabolically active tissues against oxidative damage.

*Keywords:* Fish; Heat shock proteins; Redox homeostasis; Stress

### 3.1. Introduction

Heat shock proteins (Hsp) play a pivotal role in the cellular stress response, and according to their molecular weight they are classified into Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60 and low molecular weight Hsp (<40KDa) families (Welch, 1992; Minowada and Welch, 1995; Prohászka and Füst, 2004). Members of the Hsp70 family are the most extensively studied and their cytoprotective properties as molecular chaperones assist a wide range of processes, including the folding and assembly of newly synthesized proteins, refolding of misfolded and aggregated proteins, and membrane translocation of organellar and secretory proteins (Zylicz and Wawrzynow, 2001; Mayer and Bukau, 2005). These proteins have, thus, housekeeping functions and are differently distributed on subcellular compartments. Hsp70 and Hsc70 isoforms are of cytoplasmic origin, whereas glucose regulated protein 78 (GRP78) resides in the endoplasmic reticulum (ER) mediating the folding assembly of newly synthesized proteins (Kaufman, 1999; Rao et al., 2002; Schröder and Kaufman, 2005). By contrast, glucose regulated protein 75 (GRP75/ mortalin/ mtHsp70/ PBP74/ HSPA9B) is primarily of mitochondrial origin, though it is also found in ER, cytosol and cytoplasmic vesicles (Bhattacharyya et al., 1995; Ran et al., 2000). Of note, GRP75 is triggered by glucose deprivation, oxidative injury, ionizing radiation, calcium ionophores and hyperthyroidism (Wadhwa, 2002; Wadhwa et al., 2002). It performs a broad spectrum of cellular functions ranging from stress response, intracellular trafficking, antigen processing, and cell differentiation and proliferation that makes GRP75 and its yeast homologue (SSC1p) life-essential (Craig et al., 1989; Kaul et al., 2007). Indeed, GRP75-deficient mutant zebrafish have a serious blood developmental defect that results in anemia, dysplasia, increased blood cell apoptosis, and multilineage cytopenia (Craven et al., 2005).

The key role of Hsp70 and Hsp90 families on development has been evidenced during zebrafish embryogenesis (Krone et al., 2003), and even it is known that

most hepatic Hsp including GRP75 are up-regulated in zebrafish toxicogenomic models (Lam et al., 2006). Extensive studies have also revealed that the production of Hsp is induced by common aquaculture stressors (e.g. pollutants, hypoxia, feed deprivation, stress capture, crowding stress, heat shock, osmotic shock) in a wide variety of fish species, including Atlantic salmon (Smith et al., 1999), tilapia (Molina et al., 2000), European sea bass (Gornati et al., 2004), silver sea bream (Fulladosa et al., 2006) and gilthead sea bream (Cara et al., 2005; Varó et al., 2007). Fish Hsp proteins have also been recognized as suitable thermal stress biomarkers in ecological studies (Dahlhoff, 2004), but often no consistent responses are achieved under different physiological and environmental conditions. Thus, Hsp30, Hsp70 and Hsp90 are not sensitive enough to be indicators of hatchery stress in Atlantic salmon (Zarate and Bradley, 2003), and several authors have indicated that the use of Hsp chaperones as biological fish markers is still premature and should be done in a stressor, tissue and species-specific manner (Iwama et al., 2004). In this line, the aim of this study was to explore the tissue-specific regulation of GRP75 after acute and prolonged confinement exposure to better understand the stress-mediated response of gilthead sea bream under intensive aquaculture practice. To pursue this issue in a high valuable Mediterranean fish, GRP75 was first cloned and sequenced using a RT-PCR approach complemented by rapid amplification of the 3' end. Secondly, the tissue-specific regulation of GRP75 was monitored by real-time PCR and Western blot.

## **3.2. Materials and methods**

### **3.2.1. Experimental design**

#### **3.2.1.1. Acute confinement exposure**

Juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) of 10–15 g initial body weight were randomly distributed in four 500-L tanks in a seawater re-circulatory system equipped with physical and biological filters, and a heat-unit system that

maintained water temperature above 18–19 °C. Fish were fed with commercial pellets (47% protein, 21% lipid; Proaqua, Palencia, Spain) and grew at a low density (8–10 kg/m<sup>3</sup>) from June to December (temperature range; 18–24 °C) with an overall daily growth index [DGI=100×(final fish wt.<sup>1/3</sup>–initial fish wt.<sup>1/3</sup>) / days] of 1.9±0.01. Feeding was stopped the day of confinement exposure, and then duplicate batches of 10 fish were transferred from 500-L tanks to cylinder net baskets of 10-L volume (117–123 kg/m<sup>3</sup>), suspended each one in 90-L tanks with a high flow of seawater (10 L/min) to avoid water deterioration (Oxygen >5 ppm; unionised ammonia < 0.02 mg/L). Fish from two additional 500-L tanks were established as control groups, and they remained undisturbed until the fixed sampling time (24 h after confinement exposure). For tissue sampling, fish from confinement (90-L) and control (500-L) tanks were netted into a bucket to be anaesthetized with 0.1 g/L 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222) (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Fish were killed by cervical section and target tissues (brain, head kidney, gills and liver) were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at –80 °C until RNA extraction.

### **3.2.1.2. Prolonged confinement exposure (pair-fed study)**

Juvenile fish of 16–20 g initial body mass were randomly allocated into nine 90 L-tanks and kept under natural light (August) and water temperature conditions (40° 5' N; 0° 10' E) with a high seawater flow (10–15 L/min). Three groups were established: one triplicate group was reared at high density (HD) (45–50 kg/m<sup>3</sup>, 80 fish per tank) and fed at visual satiety; two triplicate groups were reared at low density (8–10 kg/m<sup>3</sup>; 20 fish per tank), one fed at visual satiety (LD) and another fed at the same ration (g feed /fish) than HD group (pair-fed group, LD-PF). During the trial (3 weeks) all fish were fed with commercial pellets (Proaqua) twice per day.

At the end of the trial and following overnight fasting, five fish per tank (15 animals per rearing density) were netted into a bucket with MS-222 (0.1 g/L). Blood was taken with



heparinized syringes from caudal vessels. One blood aliquot was immediately used to measure the respiratory burst activity of circulating leucocytes. The remaining blood was centrifuged (20 min, 3000 g, 4 °C), and plasma aliquots were stored at -80 °C. Fish were killed by cervical section and tissue samples were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until Western blot and RNA extraction.

### **3.2.2. RNA extraction and RT procedure**

Total RNA extraction from target tissues was performed with the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, tissue samples were homogenized at a ratio of 25 mg/mL with a guanidine-detergent lysis reagent. The reaction mixture was treated with protease K, and RNA purification was achieved by passing the tissue lysate (0.4–0.5 mL) through a purification tray containing an application-specific membrane. Wash solutions containing DNase were applied, and total RNA was eluted into a 96-well PCR plate. The RNA yield was 30–50 µg with absorbance measures ( $A_{260/280}$ ) of 1.9–2.1. Reverse transcription (RT) with random decamers was performed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For this purpose, 500 ng total RNA were reverse transcribed in a final volume of 100 µL. RT reactions were incubated 10 min at 25 °C and 2 h at 37 °C. Negative control reactions were run without reverse transcriptase.

### **3.2.3. PCR amplification and phylogenetic analyses**

Degenerated primers based on available sequences of human, cattle, chicken and zebrafish GRP75 were designed. Forward primer (F1: 5'-GCG TCA TTA TGC VTC AGA RGC WAT) was located 10 nucleotides upstream the mature protein start; reverse primer (R1: 5'-TCD GAT GCC ATC TTY TTR TAT GCC AT) was located 105 nucleotides upstream the stop codon. PCR amplification was done with 2 µL of hepatic RT reactions in a total volume of 50 µL and 2 units of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA). Thirty five cycles were carried out with denaturation at 94 °C

for 45 s, annealing at 53 °C for 60 s, and extension at 72 °C for 2 min.

Rapid amplification of the 3' end (3'RACE) was made according to the manufacturer's instructions (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Briefly, 500 ng of total RNA were reverse transcribed with oligo (dT)<sub>30</sub> coupled to an anchor cDNA sequence. Amplification was done with a specific forward primer (F2: 5'-TGG CCG AGG GCATCG TTC ATG ACA CAG); the reverse primer corresponded to the anchor sequence. This PCR consisted of 30 cycles of 60 s at 94 °C, 90 s at 62 °C and 3 min at 72 °C. A nested PCR (35 cycles of 45 s at 94 °C, 90 s at 60 °C and 3 min at 72 °C) was performed with an inner forward primer (F3: 5'-GAG AGA ACATCA AGC AGG CGG CCA CCA C) and 1 µL of the first PCR reaction.

Amplified PCR-products were gel-extracted and sequenced by the deoxy chain termination method (ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing kit, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). A BLAST search strategy was used to corroborate the identity of amplified products. Multiple sequence alignments were carried out with ClustalW. A phylogenetic tree was constructed on the basis of amino acid differences (p-distance) with the UPGMA algorithm (pairwise deletion) in MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004). Reliability of the tree was assessed by bootstrapping, using 1000 bootstrap replications.

#### **3.2.4. Gene expression**

Real-time PCR was performed using an iCycler IQ Real-time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as previously described (Calduch-Giner et al., 2003). Briefly, diluted RT reactions were conveniently used for PCR reactions in 25-µL volume. Each PCR-well for GRP75 contained a SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) and specific primers (F4: 5' – TCC GGT GTG GAT CTG ACC AAA GAC; R2: 5' – TGT TTA GGC CCA GAA GCATCC ATG) at a final concentration of 0.9 µM to obtain an amplicon of 96 bp in length.

$\beta$ -Actin was used as housekeeping gene and the efficiency of PCR reactions for the target and the reference gene varied between 95% and 98%, respectively. The dynamic range of standard curves (serial dilutions of RT-PCR reactions) spanned five orders of magnitude, and the amount of product in a particular sample was determined by interpolation of the cycle threshold (Ct) value. The specificity of reaction was verified by analysis of melting curves and by electrophoresis and sequencing of PCR-amplified products. Reactions were performed in triplicate and the fluorescence data acquired during the extension phase were normalized to  $\beta$ -actin by the delta–delta method (Livak and Schmittgen, 2001). No changes in  $\beta$ -actin expression were found in response to confinement exposure.

### **3.2.5. Protein extraction and Western blotting**

Tissue samples for Western blotting were prepared by homogenizing 100 mg of frozen liver, using a Polytron homogenizer and 1 mL of protein extraction buffer containing 5.5% SDS, 4 M urea, 2 mM PMSF and 10 mM EDTA. Samples were sonicated for 100 s and centrifuged at 10,000 *g* for 10 min. The supernatant was decanted and the amount of protein was determined using the Bio-Rad protein assay with bovine serum albumin as standard. Protein extracts were diluted 1:20 v/v with SDS-PAGE sample buffer (10% glycerol, 12.5% Tris base, 2% SDS, 0.05% bromophenol blue and 5% mercaptoethanol), boiled and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Equal amounts of protein (4  $\mu\text{g}$ ) were layered on 12% SDS polyacrylamide gels covered with a 5% stacking and separated at 200 W for 1 h using Mini-Protean III (Bio-Rad). Proteins were then electroblotted into PVDF membranes (Invitrogen) by wet transfer at 100 W for 1 h with a pre-chilled solution containing 25 mM Tris base, 192 mM glycine and 20% methanol (pH 8.1–8.5). After transfer, membranes were blocked overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with Tris buffered saline (TBS, pH 7.5) containing 20mM Tris base, 500mM NaCl and 5% non-fat milk. Membranes were washed several times with TBS containing 0.1% Tween-20 (TTBS). Blots were then incubated for 2 h at room temperature with a polyclonal rabbit antiserum against human GRP75 (GR-02;

Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA) diluted 1:500 v/v with the probe buffer (1% bovine serum albumin in TTBS). Membranes were rinsed again with TTBS before incubation for 2 h with 1:9000 v/v dilution of the secondary antibody, goat-anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (A-9169, Sigma). Detection of signal was done using an enhanced chemiluminiscence (ECL) system (Santacruz Biotechnologies, CA, USA) and a VersaDoc Model 5000 imaging system (Bio-Rad). The resulting image was analyzed with the Quantity-One 1-D software version 4.4 (Bio-Rad). Prestained markers (Fermentas, Burlington, Canada) were used to estimate the size and position of proteins in the gel. Human GRP75 (Oxford Biomedical Research) was used as a positive control of the immunoblot reaction.

### 3.2.6. Biochemical assays

Total plasma protein levels were measured using the Bio-Rad protein assay with bovine serum albumin as standard. Plasma activities of alanine aminotransferase (ALAT; EC 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase (ASAT; EC 2.6.1.1) were measured using commercially available kits (Enzyline, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). Plasma glucose levels were measured by the glucose oxidase method (Thermo Electron, Louisville, CO, USA).

Plasma cortisol levels were assayed by an enzyme immunoassay kit (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) based on the competition between unlabelled cortisol and cortisol-horseradish peroxidase for a fixed number of antibody binding sites. Tetramethylbenzidine was used as a chromogen solution and the sensitivity of the assay was 1 ng/mL.

Total antioxidant capacity was measured in plasma samples with a commercial kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) adapted to 96-well microplates. The assay relies on the ability of antioxidants in the sample to inhibit the oxidation of ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) to ABTS radical cation by metamyoglobin, a derivatized form of myoglobin. The capacity of the sample to

prevent ABTS oxidation is compared with that of Trolox (water-soluble tocopherol analogue), and it is quantified as millimolar Trolox equivalents.

Total plasma peroxidases (PO) were chosen as a measure of the oxidizing capacity of the plasma, because of their involvement in the production of reactive oxygen species (ROS). They were measured following the procedure described in Sitjà-Bobadilla et al. (2005). Briefly, plasma was mixed in flat-bottomed well plates with HBSS-plus (Hanks' Balanced Salt Solution pH 7.4, without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , 0.1% NaCl, antimycotic/antibiotic mixture and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride, TMB). After 2 min of incubation, the reaction was stopped with 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and the optical density was read at 450 nm. Wells in which no plasma was added were run as blanks.

Induction of the respiratory burst (RB) activity in blood leucocytes was measured directly from heparinized blood, following the method described by Nikoskelainen et al. (2005) with some modifications. Briefly, blood was diluted (1:25; v/v) in HBSS, dispensed in white flat-bottomed 96-wells, and incubated with a freshly prepared luminol suspension (2 mM luminol in 0.2 M borate buffer pH 9 with 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  phorbol myristate acetate, PMA) for 1 h at 24–25 °C. Luminol-amplified chemiluminescence was measured every 3 min with a plate luminescence reader and kinetic curves were generated. Each sample was run by duplicate and read against a blank in which no blood was added. The integral luminescence in relative light units (IRLU) was calculated.

### 3.2.7. Statistics

Statistical analyses were made with the SPSS 13.0 program (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA), and data on growth performance, biochemical analyses and gene expression are represented as the mean  $\pm$  SEM. In both stress experiments, the possible differences in the regulation of GRP75 transcripts between fish groups and tissues were analyzed by one-way ANOVA followed by Student–Newman Keuls test. Differences in growth performance, Western blotting (liver)

and biochemical parameters between stressed (HD) and control (LD-PF) fish were analyzed by Student t-test or Mann–Whitney rank sum test when normality test failed. In all cases, the significance level was set at  $P < 0.05$ .

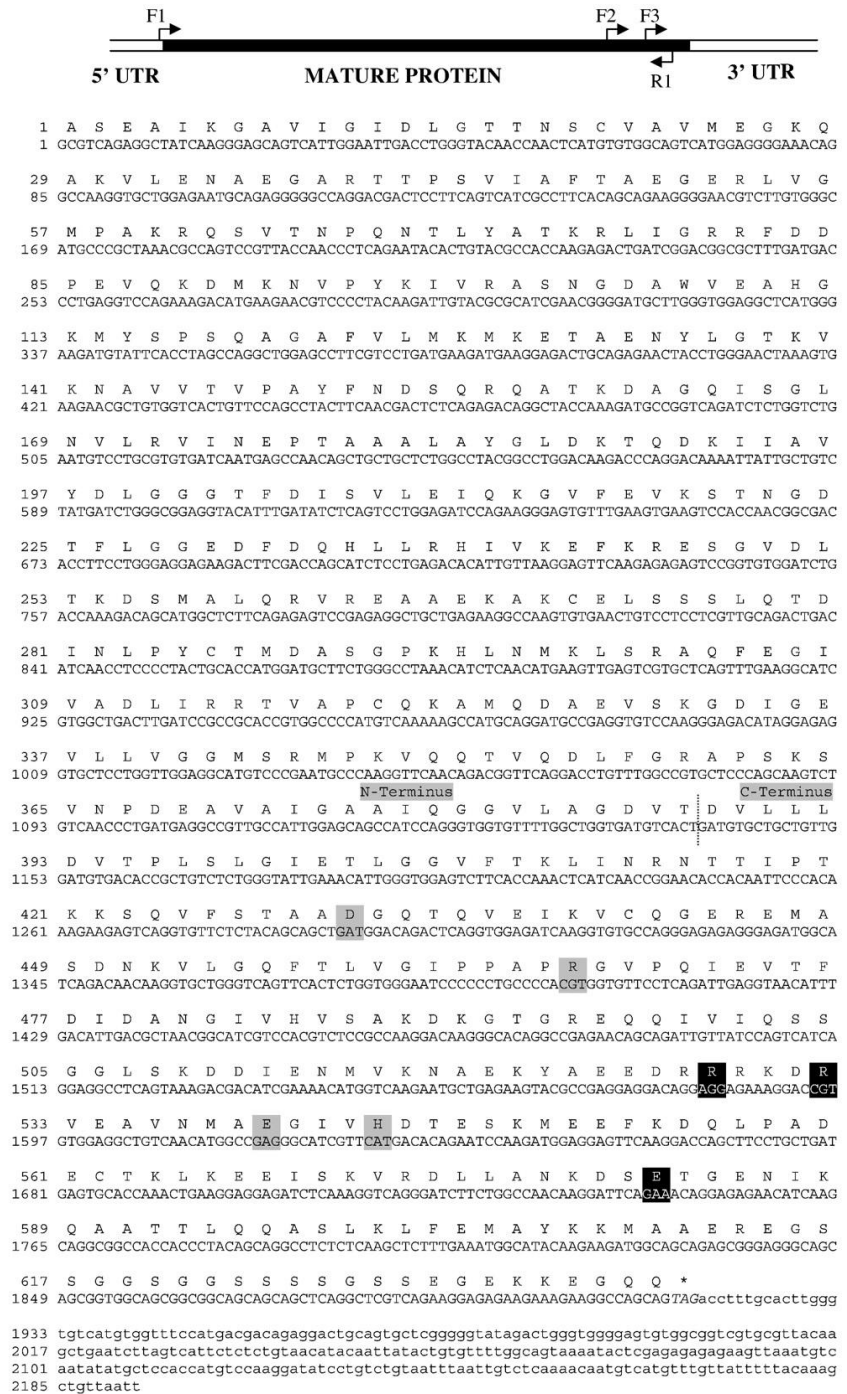
### 3.3. Results

#### 3.3.1. Sequence and phylogenetic analyses

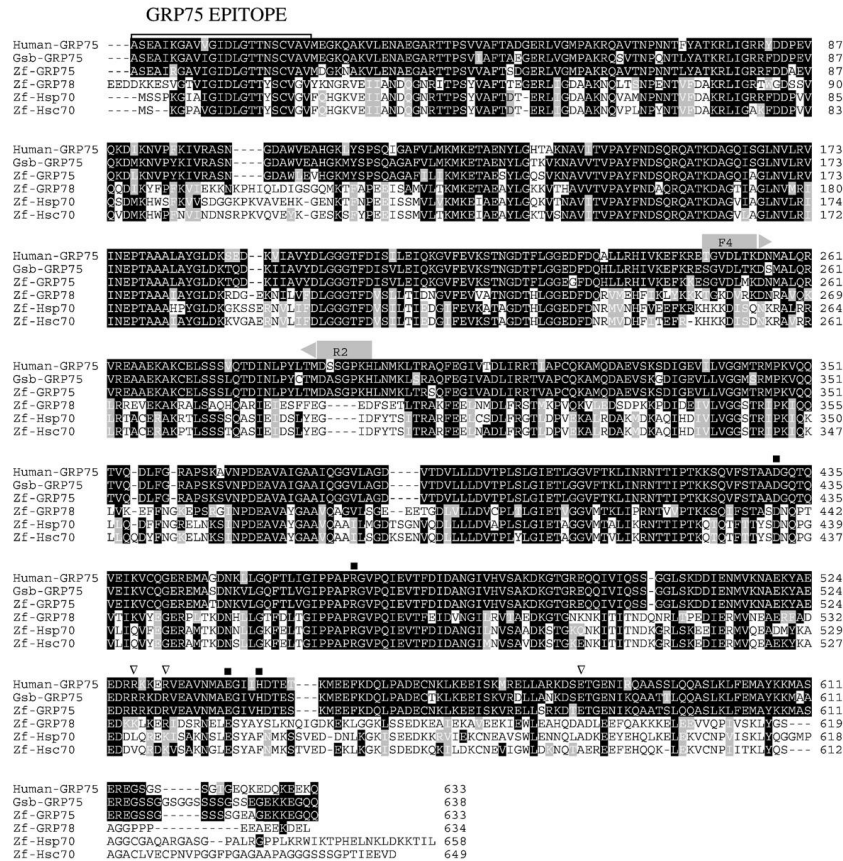
Degenerated primers designed on the basis of available sequences in public data bases yielded a PCR product of expected size (1830 bp) in the liver of gilthead sea bream. This nucleotide sequence was completed by means of the 3' RACE assay, and a DNA fragment of 2193 bp in length with an open reading frame of 638 amino acids (complete mature protein sequence) and a 3' UTR of 276 bp was obtained, and introduced in GenBank with the accession number DQ524993. At the C-terminus, a specific latch, consisting of Arg528, Arg532 and Glu582 (numbers referred to gilthead sea bream sequence), was retrieved in the gilthead sea bream sequence. An additional latch (Asp431, Arg467, Glu540, His544), in common with other member of the Hsp70 family, was also found in the GRP75 sequence of gilthead sea bream (see **Fig. 1**).

---

**Fig. 1.** Schematic representation of RT-PCR strategy for gilthead sea bream GRP75. Nucleotides and deduced amino acids are positively numbered from the first base encoding the mature protein. Dotted line delineates N-terminus and C-terminus domains. Amino acids of Hsp70 and mortalin-specific “latches” are highlighted in grey and black, respectively. Stop codon is in italics. Accession number to GenBank **DQ524993**.



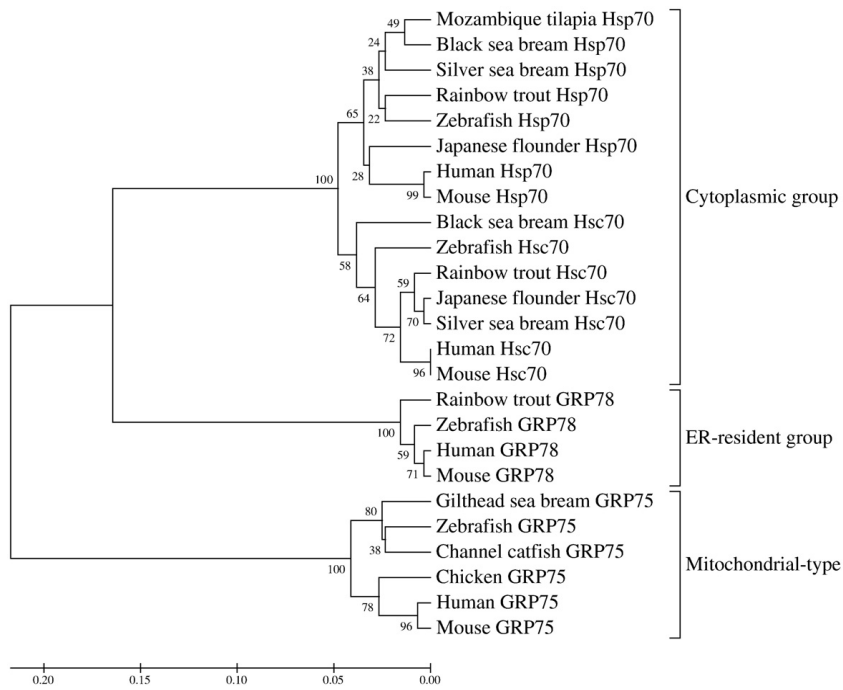
As shown in **Fig. 2**, amino acid sequence alignments revealed a high degree of amino acid identity (89–93%) and similarity (96%) among GRP75 of human, zebrafish and gilthead sea bream. At the N-terminus, a conserved antigenic epitope was also evidenced, and comparisons between gilthead sea bream GRP75 and other members of the zebrafish Hsp70 family (Hsp70, Hsc70, GRP78) showed amino acid identities and similarities of 45% and 62%, respectively.



**Fig. 2.** Amino acid alignment of human GRP75, gilthead sea bream GRP75 (Gsb GRP75), zebrafish GRP75 (Zf GRP75), zebrafish GRP78 (Zf GRP78), zebrafish Hsp70 (Zf Hsp70) and zebrafish Hsc70 (Zf Hsc70). Identical and homologous amino acids to GRP75 consensus sequence are in black and grey, respectively. Forward (F4) and reverse (R2) primers for real-time PCR are indicated. The epitope of the human GRP75 antibody used in Western blot is boxed. Specific-latches of GRP75 (∇) and Hsp70s (•) are indicated.



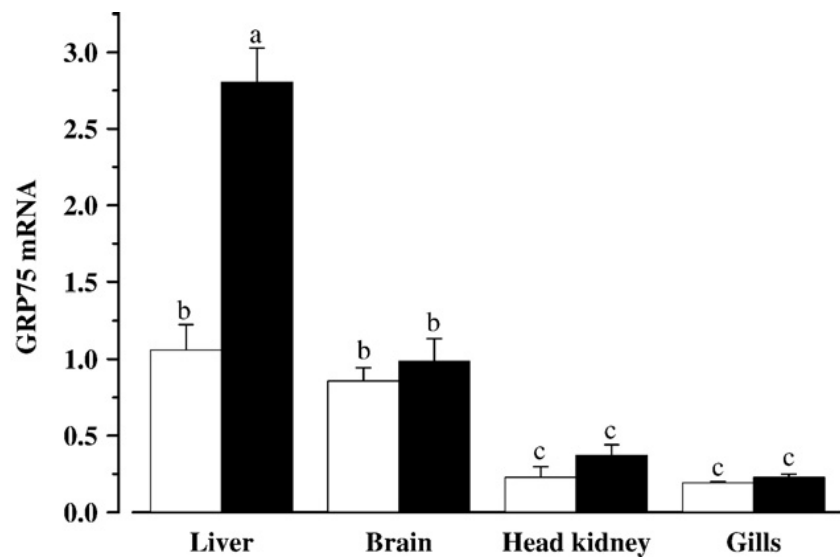
Phylogenetic analyses supported the early divergence of the Hsp 70 family into three major clades corresponding to the cytoplasmic Hsp70/Hsc70 group, the ER-resident group of GRP78 and the mitochondrial-type group of GRP75 (**Fig. 3**). Data analyses also indicated that vertebrate Hsp70/Hsc70 group and ER-resident group are more similar to each other than to mitochondrial GRP75 (bootstrap value of 100%). Furthermore, the GRP75 branch reflected the phylogeny of analyzed taxa (fish, avian and mammals), and clustered together the deduced amino acid sequences of gilthead sea bream, zebrafish and channel catfish (partial protein sequence).



**Fig. 3.** Phylogenetic tree of Hsp70 family using the Mega2 software version 3.1. BOOTSTRAP support values are indicated at the nodes. Scale is indicative of the amino acid p-distance. GenBank accession numbers for Hsp70s: Mozambique tilapia ([AJ001312](#)), black sea bream ([AY762970](#)), silver sea bream ([AY436787](#)), rainbow trout ([AB176854](#)), zebrafish ([AF210640](#)), Japanese flounder ([AB010871](#)), human ([AAA63227](#)) and mouse ([NM\\_010478](#)). Accession numbers for Hsc70s: black sea bream ([AY929160](#)), zebrafish ([Y11413](#)), rainbow trout ([AB196460](#)), Japanese flounder ([AB006814](#)), silver sea bream ([AY436786](#)), human ([AF352832](#)) and mouse ([NM\\_031165](#)). Accession numbers for GRP78: rainbow trout ([AB196459](#)), zebrafish ([NM\\_213058](#)), human ([NM\\_005347](#)) and mouse ([NM\\_022310](#)). Accession numbers for GRP75: zebrafish ([NM\\_201326](#)), channel catfish ([DQ399491](#)), chicken ([NM\\_001006147](#)), human ([NP\\_004125](#)) and mouse ([AAB28640](#)).

### 3.3.2. Acute confinement exposure

The tissue-specific regulation of GRP75 was analyzed after 24 h of exposure to an acute stressor ( $120 \text{ kg/m}^3$ ) (**Fig. 4**). In control fish, the highest expression was found in liver, followed by brain, head kidney and gills. Confined fish exhibited a 2–3 fold increase in hepatic GRP75 mRNA levels. Head kidney expression was also slightly increased, though non significant changes were found between stressed and control fish. In brain and gills, acute confinement exposure did not induce any effect in the GRP75 gene expression.



**Fig. 4.** Transcript levels of GRP75 at 24 h after acute confinement exposure. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n=5–6). Control fish ( $10 \text{ kg/m}^3$ ), white bars; stressed fish ( $120 \text{ kg/m}^3$ ), black bars. Data in the liver of control fish were used as reference values in the normalization procedure. Different letters above each bar indicate statistically significant differences among tissues and treatments ( $P < 0.05$ , Student–Newman Keuls).

### 3.3.3. Prolonged confinement exposure (pair-fed study)

As no differences in growth and voluntary feed intake were registered between LD and LD-PF fish, all biometric and analytical measurements in HD fish ( $45\text{--}50 \text{ kg/m}^3$ ) were only referred to LD-PF group reared at  $8\text{--}10 \text{ kg/m}^3$ . During the

course of the trial, body weight increased more than two times in all experimental groups. However, a slight and parallel decrease (10% reduction) in growth rates ( $P<0.09$ ) and feed efficiency ( $P<0.10$ ) were found in the HD group in comparison to LD-PF fish (**Table 1**).

**Table 1.** Data on growth performance and metabolic condition of fish reared at high (HD) and low (LD-PF) densities in a 3 weeks pair-fed study

	LD-PF	HD	$P^a$
Initial body weight (g)	18.6 ± 0.12	18.4 ± 0.15	0.31
Final body weight (g)	41.3 ± 0.41	38.7 ± 0.21	0.08
Dry matter intake (g/fish)	20.9 ± 0.49	21 ± 0.01	0.36
DGI <sup>b</sup>	3.37 ± 0.07	3.19 ± 0.03	0.09
FE <sup>c</sup>	1.09 ± 0.05	0.98 ± 0.01	0.10
Total proteins (mg/L)	16.4 ± 0.6	15.3 ± 0.6	0.23
ASAT (U/L) <sup>d</sup>	77.2 ± 5.56	82.1 ± 5.42	0.53
ALAT (U/L) <sup>e</sup>	62.7 ± 3.71	51.8 ± 2.79	0.05
Glucose (mMol/L)	3.48 ± 0.10	3.96 ± 0.17	0.03
Cortisol (µg/L)	26 ± 13.6	13.4 ± 5.3	0.25
Antioxidant capacity (Trolox mM)	0.10 ± 0.05	0.13 ± 0.05	0.71
PO (OD <sub>450nm</sub> ) <sup>f</sup>	0.55 ± 0.09	1.24 ± 0.23	0.03
RB (IRLU) <sup>g</sup>	18118 ± 3407	8918 ± 2871	0.01

Growth parameters are the mean±SEM of triplicate tanks. Blood and plasma parameters are the mean±SEM of 8–15 individuals.

<sup>a</sup>P values result of Student t-test/Mann–Whitney rank sum test.

<sup>b</sup>Daily growth index=[100×(final fish wt.<sup>1/3</sup>–initial fish wt.<sup>1/3</sup>) / days].

<sup>c</sup>Feed efficiency=wet weight gain / dry feed intake.

<sup>d</sup>Aspartate aminotransferase.

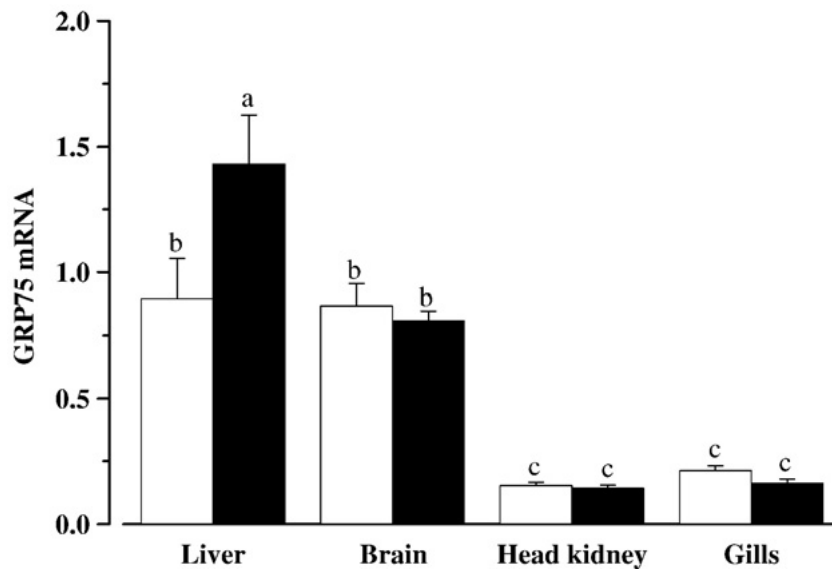
<sup>e</sup>Alanine aminotransferase.

<sup>f</sup>Plasma peroxidases.

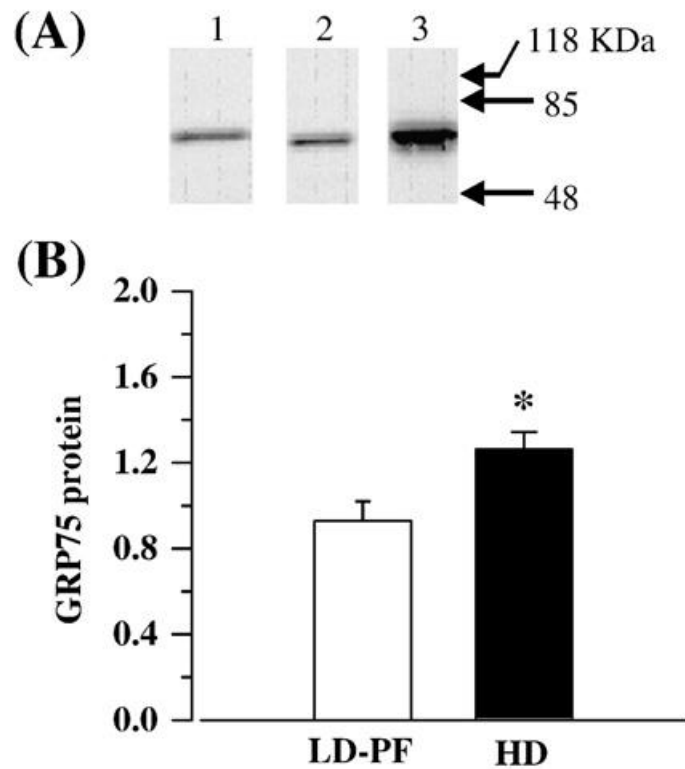
<sup>g</sup>Respiratory burst activity of circulating leucocytes. Integral luminescence in relative light units.

As shown in **Table 1**, plasma protein levels and the total plasma antioxidant capacity were not significantly affected by the rearing density. Likewise, plasma ASAT activity remained unchanged whereas ALAT activity was significantly decreased in the HD group. Plasma glucose levels were significantly increased in HD fish. An opposite trend was found for plasma cortisol levels, but no significant differences were found due to the high individual variability. Plasma PO was significantly increased with the high rearing density, whereas the RB of circulating leucocytes after PMA stimulation was significantly diminished.

As shown in **Fig. 5**, transcript levels of GRP75 in brain, head kidney and gills did not differ significantly between LD-PF and HD groups. However, hepatic transcription of GRP75 was not only high in basal conditions, but also inducible after prolonged confinement exposure. Furthermore, Western blotting revealed similar increments in GRP75 mRNA and protein levels (**Fig. 6**).



**Fig. 5.** Transcript levels of GRP75 in fish reared at high (HD, 45–50 kg/m<sup>3</sup>; black bars) and low (LD-PF, 10 kg/m<sup>3</sup>; white bars) densities in a pair-fed study after prolonged confinement exposure (3 weeks-trial). Data are represented as mean±SEM (n=6–8). Data in the liver of LD-PF fish were used as reference values in the normalization procedure. Different letters above each bar indicate statistically significant differences among tissues and treatments ( $P < 0.05$ , Student–Newman Keuls).



**Fig. 6.** Western blot of GRP75 in fish reared at high (HD, 45–50 kg/m<sup>3</sup>; black bars) and low (LD-PF, 10 kg/m<sup>3</sup>; white bars) densities in a pair-fed study after prolonged confinement exposure (3 weeks-trial). (A) Representative Western blot (lane 1: LD-PF; lane 2: HD; lane 3: human GRP75). (B) Graph integrating the bands obtained for LD-PF and HD fish. Data in LD-PF fish were used as reference values in the normalization procedure. Data are represented as mean ± SEM (n=6–8), and statistically significant differences between LD-PF and HD fish are indicated (\*,  $P < 0.05$ ; Student t-test).

### 3.4. Discussion

The partial cDNA of GRP75 was PCR-amplified and sequenced in a perciform Sparidae fish. The nucleotide sequence covered 2139 bp with an open reading frame of 638 amino acids, closely related to orthologous genes of human and zebrafish. Sequence analyses also revealed a high degree of conservation of antigenic epitopes, which makes feasible the use of a commercial antibody against human GRP75 to measure fish GRP75 proteins by Western blot. Also, Hsp70 and mortalin-specific “latches” are strictly conserved, which reinforces the idea that these amino acids are important to preserve the conformational structure and chaperone activity of GRP75 (Mayer et al., 2000a; 2000b; Kaul et al., 2007). Moreover, both in this and in previous studies (Boorstein et al., 1994; Wada et al., 2006), the recovered phylogenetic tree evidenced the early divergence of the GRP75 branch within the Hsp 70 family, which supports the key role of GRP75 in ROS management, and mitochondrial and intracellular trafficking (Kaul et al., 2002; Liu et al., 2005). Thus, the GRP75-deficient mutant zebrafish has a serious blood developmental defect (Craven et al., 2005), and the present work highlights the stress-mediated response of GRP75 in a high valuable fish in Mediterranean aquaculture.

Stocking density is a pivotal factor affecting fish health and welfare, especially when high densities are reached under intensive production (Portz et al., 2006; Ashley, 2007). High density cultures are in fact associated with increased competition, aggression and physical injury due to increased contacts between fish and between fish and the housing. The relative stress responsiveness depends on fish strain but also on water quality, which is a major threshold factor for fish stocking density (Ellis et al., 2002). Thus, a threshold density of 22 kg/m<sup>3</sup> was reported for Atlantic salmon under commercial productive conditions in marine cages (Turnbull et al., 2005). Similar values were proposed for gilthead sea bream farming (Tort et al., 1996; Roncarati et al., 2006) as higher densities (30–70 kg/m<sup>3</sup>) produced chronic stress, evidenced by high cortisol levels, immunosuppression and altered metabolism (Montero et al.,



1999; Rotllant et al., 2000). Changes on innate immunity and stress-gene expression profiles were also reported in European sea bass when juvenile fish were housed at high stocking densities (60–100 kg/m<sup>3</sup>) for short- and long-term periods (Vazzana et al., 2002; Gornati et al., 2004). In the present study, an even higher stocking density (120 kg/m<sup>3</sup>) was setup to analyze acute stress responses after confinement exposure. Thus, hepatic GRP75 expression was markedly up-regulated at 24 h, which probably encompassed complex signals to protect and guard active metabolically active tissues in the face of stress and oxidative insults. Consistent with this finding, additional studies have evidenced the increased expression of hepatic GRP75 over the course of three days confinement exposure in fish sampled at 6, 24, 48 and 72 h (authors unpublished results).

Earlier studies in rats (Kaul et al., 1997) and humans (Srokowski et al., 2004) revealed a tissue-specific regulation of GRP75. In this study, this fact was primarily evidenced by a higher basal expression of GRP75 in liver and brain in comparison to head kidney and gills. Furthermore, hepatic transcription of GRP75 was altered by acute and prolonged confinement exposure, whereas extra-hepatic tissues were apparently refractory though we cannot exclude the masking effects of different tissue-kinetics. In any case, the hepatic production of GRP75 seems to be especially sensitive to stress, and a recent study evidenced low transcript levels of GRP75 in the liver of gilthead sea bream in comparison to data found in the common dentex (*Dentex dentex* L.) (Bermejo-Nogales et al., 2007), a stressful fish closely related to gilthead sea bream. Likewise, in vivo toxicogenomic studies indicated that the expression of GRP75 is 2–3 times increased in the liver of zebrafish exposed to arsenic for 8–96 h (Lam et al., 2006). Taken together all these findings, the inducible expression of fish GRP75 could be considered an adaptive response to restore cellular homeostasis in a distorted and oxidative milieu. Similarly, expression and protein production of GRP75 are substantially decreased in oxidative old-age pathologies including diabetes (Johannesen et al., 2004) and Parkinson's diseases (Li et al., 2005; Jin et al., 2006). The protein

synthesis of GRP75 also decreases in senescence human fibroblasts, whereas its over-expression leads to lifespan extension, making this protein a longevity and prooncogenic factor (Kaul et al., 2007; Kimura et al., 2007). Experimental evidence also shows that over-expression of GRP75 in PC12 cells alters ROS production and/or scavenging upon glucose deprivation (Liu et al., 2005), and it makes plausible that GRP75 stabilizes important components of the respiratory chain decreasing thereby ROS accumulation. Alternatively, GRP75 could interact with antioxidant enzymes regulating its activity during the depletion of redox potential NADPH.

The effects of aging and caloric restriction on the ability of cells to regulate the expression of GRP75 and other molecular chaperones have been demonstrated in rats (Heydari et al., 1996; Um et al., 2003). To date, similar data in fish are not available, though recent studies in turbot revealed that 30% caloric restriction favours a reduced tissue oxidation (Abele et al., 2007). Experimental data also support the detrimental effects of increased adiposity and fat intake upon the innate immune response of juvenile European sea bass (Sitjà-Bobadilla and Pérez-Sánchez, 1999), which agrees with the idea that both excesses and nutritional deficiencies compromise growth performance, immune response and diseases resistance of a wide variety of animal models (Chandra, 1993). In addition, some benefits of moderate feed restriction upon fish health and welfare were proved over the course of gilthead sea bream productive cycles (Sitjà-Bobadilla et al., 2003). However, feed intake needs to be managed carefully since a half ration is able to induce oxidative stress in juvenile gilthead sea bream (Pascual et al., 2003). Crowding stress by itself also affects multiple physiological variables including feeding behaviour, metabolic rates and redox balance (Wendelaar-Bonga, 1997). Thus, when hepatic GRP75 was herein analyzed in the pair-fed study (prolonged confinement exposure), its increased gene and protein expression reinforced the idea of an adaptive response to face up a pro-oxidative and stressful condition related to a reduced feed conversion efficiency. Of note, water quality was always assured and growth performance of both HD and LD-PF groups was in the upper

range for this size class of fish (Mingarro et al., 2002; Gómez-Requeni et al., 2004). All this prompted us to consider GRP75 as a valuable stress marker in gilthead sea bream, but this assumption needs to be validated in different life stages exploring in detail the possibility of non-lethal sampling and the threshold level for the tissue-specific induction of GRP75.

The relevance of the above findings was reinforced by the observation that more conventional stress markers were differently affected by prolonged confinement exposure in the pair-fed study. Thus, plasma protein levels remained unchanged, but the imbalances in plasma transaminases could indicate some disorder of liver and amino acid metabolism as reported in peripheral insulin resistance and non-alcoholic fatty liver diseases (Van Hoek, 2004). As a characteristic stress feature, plasma glucose levels were increased at long-term by high rearing densities, but plasma cortisol levels showed a non significant decrease, probably due to the feedback regulation of the stress response (Raison and Miller, 2003). On the other hand, the high stocking density did not compromise the total plasma antioxidant capacity, but a deleterious effect on the immune system can be inferred by the increased plasma PO and the decreased RB. In the present study, the reduced RB of circulating leucocytes could be due either to a reduction in the number of cells (Montero et al., 1999) and/or to a decrease in the ability to respond to PMA stimulation (Yin et al., 1995). In any case, this diminished activity could be directed to reduce ROS production, and thereby to counteract the increased bioavailability of PO. Since PO play a role in the conversion of peroxides to even more toxic products (Aldridge et al., 2002; Klebanoff, 2005), stressed gilthead sea bream could be considered to be in a state of oxidative stress. Again, the higher levels of PO in stressed animals could be due to a higher number of those cells types with PO-containing granules or to a higher degranulation activity. Previous studies in fish have shown that chronic (Palić et al., 2006) and acute stress (Palić et al., 2007) can induce a lower degranulation in head kidney neutrophils and a lower release of myeloperoxidase (MPO), respectively. Therefore, it is

tempting to suggest that the observed higher levels of PO could be the result of an increase in the number and/or the degranulation of a cell type other than neutrophil, probably eosinophils or mast cells, as acute tissue damage causes their degranulation, and an increase in the number of these cells is often found in chronically inflamed tissues (Reite and Evensen, 2006).

In summary, the gilthead sea bream GRP75 has been molecularly characterized, and the present study highlights the tissue-specific regulation of GRP75 as a part of stress adaptive responses that may be critical for the protection of metabolically active tissues against oxidative damage. The extent to which this conclusion may be extrapolated to other fish species and life stages needs more detailed studies, but this work opens new research opportunities to effectively monitor stress-adaptive responses and helps to establish the limits for fish stocking density under intensive aquaculture practice.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to M.A. González for excellent technical assistance in PCR assays. This work was partially funded by UE-VI FP project: “Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance marker assisted selection in fish and shellfish” (AQUAFIRST, contract no. SSP98-CT-2004-513692).

## References

- Abele, D., Roecken, D., Graeve, M., Buck, B.H., 2007. Body growth, mitochondrial enzymatic capacities and aspects of the antioxidant system and redox balance under calorie restriction in young turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquac. Res.* 38, 467–477.
- Aldridge, R.E., Chan, T., Van Dalen, C.J., Senthilmohan, R., Winn, M., Venge, P., Town, G.I., Kettle, A.J., 2002. Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 847–856.
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 199–235. Bermejo-Nogales, A., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Navarro, J.C., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 2007. Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in relation to redox homeostasis. *Aquaculture* 267, 213–224.
- Bhattacharyya, T., Karnezis, A.N., Murphy, S.P., Hoang, T., Freeman, B.C., Phillips, B., Morimoto, R.I., 1995. Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J. Biol. Chem.* 270, 1705–1710.
- Boorstein, W.R., Ziegelhoffer, T., Craig, E.A., 1994. Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. *J. Mol. Evol.* 38, 1–17.
- Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream, (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B, 1–13.
- Cara, J.B., Aluru, N., Moyano, F.J., Vijayan, M.M., 2005. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 142B, 426–431.
- Chandra, R.K., 1993. Nutrition and the immune-system. *Proc. Nutr. Soc.* 52, 77–84. Craig, E.A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kosc-Smithers, J., Nicolet, C.M., 1989. Ssc1, an essential member of the yeast Hsp70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3000–3008.
- Craven, S.E., French, D., Ye, W., de Sauvage, F., Rosenthal, A., 2005. Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood* 105, 3528–3534.
- Dahlhoff, E.P., 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Ann. Rev. Physiol.* 66, 183–207.

- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* 61, 493–531.
- Fulladosa, E., Deane, E., Ng, A.H.Y., Woo, N.Y.S., Murat, J.C., Villaescusa, I., 2006. Stress proteins induced by exposure to sublethal levels of heavy metals in sea bream (*Sparus sarba*) blood cells. *Toxicol. In Vitro* 20, 96–100.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Caldach-Giner, J.A., Médale, F., Martín, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493–510.
- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gene* 341, 111–118.
- Heydari, A.R., You, S.H., Takahashi, R., Gutschmann, A., Sarge, K.D., Richardson, A., 1996. Effect of caloric restriction on the expression of heat shock protein 70 and the activation of heat shock transcription factor 1. *Dev. Genet.* 18, 114–124.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K., 2004. Are hsp70 suitable for indicating stressed states in fish? *J. Exp. Biol.* 207, 15–19.
- Jin, J., Hulette, C., Wang, Y., Zhang, T., Pan, C., Wadhwa, R., Zhang, J., 2006. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: relevance to Parkinson's disease. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1193–1204.
- Johannesen, J., Pie, A., Karlsen, A.E., Larsen, Z.M., Jensen, A., Vissing, H., Kristensen, O.P., Pociot, F., Nerup, J., 2004. Is mortalin a candidate gene for T1DM? *Autoimmunity* 37, 423–430.
- Kaufman, R.J., 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13, 1211–1233.
- Kaul, S.C., Matsui, M., Takano, S., Sugihara, T., Mitsui, Y., Wadhwa, R., 1997. Expression analysis of mortalin, a unique member of the Hsp70 family of proteins, in rat tissues. *Exp. Cell. Res.* 232, 56–63.
- Kaul, S.C., Taira, K., Pereira-Smith, O.M., Wadhwa, R., 2002. Mortalin: present and prospective. *Exp. Gerontol.* 37, 1157–1164.
- Kaul, S.C., Deocaris, C.C., Wadhwa, R., 2007. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp. Gerontol.* 42, 263–274.
- Kimura, K., Tanaka, N., Nakamura, N., Takano, S., Ohkuma, S., 2007. Knockdown of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-

- like phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. J. Biol. Chem. 282, 5910–5918.
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. J. Leukoc. Biol. 77, 598–625. Krone, P.H., Evans, T.G., Blechinger, S.R., 2003. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. Semin. Cell Dev. Biol. 14, 267–274.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5, 150–163.
- Lam, S.H., Winata, C.L., Tong, Y., Korzh, S., Lim, W.S., Korzh, V., Spitsbergen, J., Matahavan, S., Miller, L.D., Liu, E.T., Gong, Z., 2006. Transcriptome kinetics of arsenic-induced adaptive response in zebrafish liver. Physiol. Genomics 27, 351–361.
- Li, H.M., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., Ariga, H., 2005. Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. Free Radic. Res. 39, 1091–1099.
- Liu, Y., Liu, W., Song, X.D., Zuo, J., 2005. Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells. Mol. Cell. Biochem. 268, 45–51.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. Methods 25, 402–408.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell. Mol. Life Sci. 62, 670–684.
- Mayer, M.P., Rudiger, S., Bukau, B., 2000a. Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. Biol. Chem. 381, 877–885.
- Mayer, M.P., Schröder, M., Rüdiger, S., Paal, K., Laufen, T., Bukau, B., 2000b. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. Nat. Struct. Biol. 7, 586–593.
- Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, R., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. Gen. Comp. Endocrinol. 128, 102–111.
- Minowada, G., Welch, W.J., 1995. Clinical implications of the stress response. J. Clin. Invest. 95, 3–12.
- Molina, A., Biemar, F., Müller, F., Iyengar, A., Prunet, P., Maclean, N., Martial, J.A., Müller, M., 2000. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. FEBS Lett. 474, 5–10.

- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53–60.
- Nikoskelainen, S., Verho, S., Airas, K., Lilius, E.M., 2005. Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium *Aeromonas salmonicida* can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 525–537.
- Palić, D., Andreasen, C.B., Herolt, D.M., Menzel, B.W., Roth, J.A., 2006. Immunomodulatory effects of  $\beta$ -glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Dev. Comp. Immunol.* 30, 817–830.
- Palić, D., Andreasen, C.B., Ostojić, J., Tell, R.M., Roth, J.A., 2007. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J. Immunol. Methods* 319, 87–97.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J., 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem. Biol. Interact.* 145, 191–199.
- Portz, D.E., Woodley, C.M., Cech, J.J., 2006. Stress-associated impacts of shortterm holding on fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 16, 125–170.
- Prohászka, Z., Füst, G., 2004. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol. Immunol.* 41, 29–44.
- Raison, C.L., Miller, A.H., 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am. J. Psychiatry* 160, 1554–1565.
- Ran, Q.T., Wadhwa, R., Kawai, R., Kaul, S.C., Sifers, R.N., Bick, R.J., Smith, J.R., Pereira-Smith, O.M., 2000. Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 174–179.
- Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* 514, 122–128.
- Reite, O.B., Evensen, Ø., 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 192–208.
- Roncarati, A., Melotti, P., Dees, A., Mordenti, O., Angellotti, L., 2006. Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 225–234.



- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Ruane, N.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2000. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 152–163.
- Schröder, M., Kaufman, R.J., 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 569, 29–63.
- Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 1999. Diet related changes in nonspecific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 9, 637–640.
- Sitjà-Bobadilla, A., Mingarro, M., Pujalte, M.J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2003. Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture* 220, 707–724.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387–400.
- Smith, T.R., Tremblay, G.C., Bradley, T.M., 1999. Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *J. Exp. Zool.* 284, 286–298.
- Srokowski, T., Pfeifer, J.D., Li, J.D., Olson, L.M., Rader, J.S., 2004. Expression and localization of GRP75 in human epithelial tumors and normal tissues. *App. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 12, 132–138.
- Tort, L., Sunyer, J.O., Gómez, E., Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 179–188.
- Turnbull, J., Bell, A., Adams, C., Bron, J., Huntingford, F., 2005. Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture* 243, 121–132.
- Um, J.H., Kim, S.J., Kim, D.W., Ha, M.Y., Jang, J.H., Kim, D.W., Chung, B.S., Kang, C.D., Kim, S.H., 2003. Tissue-specific changes of DNA repair protein Ku and mtHSP70 in aging rats and their retardation by caloric restriction. *Mech. Ageing Dev.* 124, 967–975.
- Van Hoek, B., 2004. Non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Scand. J. Gastroenterol.* 39, 56–59.
- Varó, I., Navarro, J.C., Nunes, B., Guilhermino, L., 2007. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. *Aquaculture* 266, 87–96.

- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E.L., Parrinello, N., 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210, 231–243.
- Wada, S., Hamada, M., Satoh, N., 2006. A genomewide analysis of genes for the heat shock protein 70 chaperone system in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Cell Stress Chaperones* 11, 23–33.
- Wadhwa, R., 2002. An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones* 7, 309–316.
- Wadhwa, R., Taira, K., Kaul, S.C., 2002. Mortalin: a potential candidate for biotechnology and biomedicine. *Histol. Histopathol.* 17, 1173–1177.
- Welch, W.J., 1992. Mammalian stress response. Cell physiology, structure, function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72, 1063–1081.
- Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* 77, 591–625.
- Yin, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 1995. The effects of crowding stress on the nonspecific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 5, 519–529.
- Zarate, J., Bradley, T.M., 2003. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. *Aquaculture* 223, 175–187.
- Zylicz, M., Wawrzynow, A., 2001. Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life* 51, 283–287.

## CAPÍTULO 4

### **Differential metabolic and gene expression profile of juvenile common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in relation to redox homeostasis**

Azucena Bermejo-Nogales, Alfonso Saera-Vila, Josep Alvar Calduch-Giner, Juan Carlos Navarro, Ariadna Sitjà-Bobadilla, Jaume Pérez-Sánchez

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), Department of Biology, Culture and Pathology of Marine Species

***Aquaculture* (2007) 267: 213-22**



## ABSTRACT

The present study analyses the network that regulates and guards against oxidative imbalances in common dentex, poorly adapted to culture conditions, in comparison to the successfully cultured and closely related gilthead sea bream. Both sparid fish were grown from fingerlings to market size, and several molecular and metabolic biomarkers were analysed in fish sampled at the end of the trial. For such purpose, partial cDNA sequences coding for tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), growth hormone receptors (GHR-I and II), insulin-like growth factors (IGF-I and II), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), glucose regulated protein-75 (GRP75), metallothionein (MT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPX-1) were first PCR amplified and sequenced in common dentex. The hepatic gene expression profile was then analysed by real-time PCR assays, using  $\beta$ -actin as housekeeping gene. Metabolic biomarkers included total plasma antioxidant capacity, ROS production, and circulating levels of GH, IGF-I, cortisol, glucose and blood lactate. Overall growth rates to attain market size were similar in both species. However, common dentex exhibited accelerated growth over the course of larval and initial juvenile stages that was not retained thereafter. They also exhibited higher levels of plasma peroxidases and secondary stress metabolites (glucose, lactate) in combination with an increased expression of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), which is in accordance with an inflammatory over activity in chronically stressed fish. The activity of oxidative CYP1A1 and GH/IGF pathways was downregulated in common dentex, possibly to equilibrate this oxidative pressure. In the same way, hepatic transcripts of enzymatic (GPX-1) and non-enzymatic (GRP75, MT) antioxidant genes were up-regulated, remaining the total plasma antioxidant capacity within the reference values of gilthead sea bream. Thus, common dentex seems to orchestrate in the last juvenile stages several biological strategies, which may serve to preserve redox homeostasis at the expense of reduced growth and low detoxifying capacity for pollutants and endogenous substrates.

*Keywords:* Inflammatory cytokines; Antioxidant enzymes; Glucose regulated protein-75; Metallothionein; Peroxidases; Respiratory burst; GH/IGF axis; Cortisol; Stress metabolites

## 4.1. Introduction

Mediterranean aquaculture is mostly based on the intensive culture of gilthead sea bream and European sea bass with an annual production of over 180,000 Mt. This production grew at an annual average rate of 25% from 1996 to 2000 (FAO, 2002), but the decrease of the market price has stimulated research in alternative fish species. In this scenario, common dentex has been considered a very promising candidate for the diversification of Mediterranean aquaculture. This gonochoric and carnivorous fish displays high specific growth rates and spawns spontaneously in late spring with a long reproductively quiescent phase, lasting from June to December (Pavlidis et al., 2000). However, large scale production is hampered by very low larval survival and high incidence of skeletal deformities (Rueda and Martínez, 2001), extreme sensitivity to handling stress (Tibaldi et al., 1996; Koumoundouros et al., 1998), and frequent pathological outbreaks during larval and ongrowing phases (Efthimiou et al., 1994; Rigos et al., 1998; Company et al., 1999c). Accordingly, there is an urgent need to establish the precise aetiology of these problems in order to find adequate solutions. Since common dentex is considered a stress-sensitive species, a first step would be to analyse several metabolic and molecular biomarkers related to oxidative stress, in order to elucidate the possible mechanisms involved in the poor adaptation of common dentex to culture conditions in comparison to another successfully cultured sparid, the gilthead sea bream.

Fish, like all aerobic organisms, are susceptible to the attack of endogenous and exogenous reactive oxygen species (ROS) and have developed antioxidant defences that are modulated by age, infection and xenobiotic exposure, nutritional condition, and environmental and behavioural factors (see Martínez-Álvarez et al., 2005). In common dentex, antioxidant enzymes are present from the egg stage (Mourente et al., 1999) and change as a metabolic adaptation mechanism (Morales et al., 2004). Accordingly, it is now accepted in mammals that oxidative damage accumulates during the life cycle, and most

nutritional, pathological and stress-related disorders involve ROS at an early stage of diseases (Evans et al., 2004; Singh et al., 2005; Singh and Jialal, 2006; Valko et al., 2006). The modulation of ROS production and antioxidant defences by the endocrine system has also been shown. Thus, in long-lived dwarf mice, the reduced signalling of growth hormone (GH) and insulinlike growth factor-I (IGF-I) contribute to maintain an appropriate cellular redox state (Coschigano et al., 2003; Holzenberger et al., 2003). Conversely, animals over expressing GH live shorter and combat oxidative stress less efficiently than normal and dwarf mice (Brown-Borg et al., 1999; Brown-Borg and Rakoczy, 2000, 2003).

All the above findings prompted us to use a candidate gene approach to analyze different processes governing ROS production and scavenging in juvenile common dentex, using data in gilthead sea bream as reference values. Liver was chosen as a target tissue for monitoring the relative expression of pro-inflammatory cytokines [tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )], GH receptors (GHR-I and II), IGFs (IGF-I and II), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), glucose regulated protein-75 (GRP75), metallothionein (MT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPX-1). Hepatic transcriptome was complemented with metabolic markers such as plasma antioxidant capacity, ROS production, and circulating levels of GH, IGF-I, cortisol, glucose and lactate.



## 4.2. Materials and methods

### 4.2.1. Fish rearing and sampling

Fertilized eggs of common dentex (*Dentex dentex* L.) were obtained from a broodstock at the Centre d'Aqüicultura (IRTA, Tarragona, Spain) and were hatched (May 2004) in 3000 l fiber-glass tanks in an open system at a density of 10 eggs/l in the indoor marine experimental facilities of IATS (Institute of Aquaculture Torre de la Sal). Newly hatched larvae were fed as in Koumoundouros et al. (2004), and grown in 2 µm filtered seawater (37.5‰ salinity) until they reached the fingerling stage. Water temperature increased from 20 °C to 25 °C during larval rearing.

Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings of Atlantic origin (Ferme Marine de Dohuet, Ile d'Oleron, France) were acclimated to laboratory conditions for 20 days before the start of the growth study. Both fish species were grown in parallel in separate 3000 l tanks until achieving market size. During the trial, photoperiod and temperature followed the natural cycle (40°5' N; 0°10'E) (**Fig. 1A**), and fish were fed commercial dry pellets (PROAQUA, Palencia, Spain) based on fish meal and fish oil (47% protein; 21% lipids) offered to visual satiety (6 days/week). Fish were weighed collectively at regular intervals, and the feed conversion ratio for the overall growing period was calculated.

At the end of the experimental period, 12 overnight fasted fish were randomly selected and killed by decapitation under anaesthesia (3-aminobenzoic acid ethyl ester, 100 mg/l). Liver was rapidly excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until RNA extraction and analysis. Blood was taken with heparinized syringes from caudal vessels, and kept on ice. One blood aliquot was immediately used to measure respiratory burst activity. A second aliquot was deproteinized and used for blood lactate determination. The remaining blood was centrifuged at 3000 × g for 20 min at 4 °C, and plasma aliquots were stored at -80 °C until use.

### 4.2.2. Hormone and plasma metabolite assays

Plasma GH levels were measured by a specific GH gilthead sea bream radioimmunoassay (RIA), previously validated for common dentex (Company et al., 1999b). Sensitivity and midrange of the assay were 0.1 and 2.1–2.3 ng/ml, respectively.

Circulating levels of IGF-I were determined with a generic fish IGF-I RIA (sensitivity 0.05 ng/ml) currently used for IGF-I measurements in gilthead sea bream and European sea bass (Vega-Rubín de Celis et al., 2004). The assay was based on the use of recombinant bream IGF-I (GroPep, Adelaide, Australia) that shares 100% amino acid identity with the IGF-I sequence (mature protein) of common dentex deposited in GenBank under accession number **DQ414522**.

Plasma cortisol levels were assayed by an enzyme immunoassay kit (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) based on the competition between unlabelled cortisol and cortisol-horseradish peroxidase for a fixed number of antibody binding sites. Tetramethylbenzidine was used as a chromogen solution. The sensitivity of the assay was 1 ng/ml.

Plasma glucose levels were measured by the glucose oxidase method (Thermo Electron, Louisville, CO, USA). Blood lactate was measured in deproteinized samples (perchloric acid, 8%) by an enzymatic method based on the use of lactate dehydrogenase (InstruChemie, Delfzijl, The Netherlands).

### 4.2.3. Antioxidant capacity

Total antioxidant capacity in plasma samples was measured with a commercial kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) adapted to 96-well microplates. The assay relies on the ability of antioxidants in the sample to inhibit the oxidation of ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) to ABTS radical cation by metamyoglobin, a derivatized form of myoglobin. The capacity of the sample to prevent ABTS oxidation is compared with that of Trolox (water-soluble tocopherol analogue), and is quantified as millimolar Trolox equivalents.

#### 4.2.4. ROS production

Induction of the respiratory burst (RB) activity in blood leucocytes was measured directly from heparinized blood, following the method described by Nikoskelainen et al. (2005). Briefly, 100 µl of diluted blood (1:25) in HBSS (Hanks balanced salt solution, pH 7.4) were dispensed in white flat-bottomed 96-wells, and incubated with 100 µl of a freshly prepared luminol suspension (2 mM luminol in 0.2 M borate buffer pH 9.0, with 2 µg/ml PMA) for 1 h at 24–25 °C. Luminol amplified chemiluminescence was measured every 3 min with a plate luminescence reader for generation of kinetic curves. Each sample was run by duplicate and read against a blank in which no blood was added. The integral luminescence in relative light units (RLU) was calculated.

Total plasma peroxidases (PO) which includes myeloperoxidase (MPO), were chosen as a measure of the oxidizing capacity of the plasma, because of their involvement in the production of ROS. They were measured following the procedure described in Sitjà-Bobadilla et al. (2005). Briefly, 15 µl of plasma were mixed in flat-bottomed well plates with 135 µl of HBSS-plus (HBSS, without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, 0.1% NaCL and antimycotic/antibiotic mixture) and 50 µl of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB). After 2 min of incubation, the reaction was stopped with 25 µl of 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the optical density was read at 450 nm. Wells in which no plasma was added were run as blanks.

#### 4.2.5. RNA extraction and RT procedure

Total RNA extraction was performed with the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, liver tissue was homogenized at a ratio of 25 mg/ml with a guanidine-detergent lysis reagent. The reaction mixture was treated with protease K, and RNA purification was achieved by passing the tissue lysate (0.5 ml) through a purification tray containing an application-specific membrane. Wash solutions containing DNase were applied, and total RNA was eluted into a 96-well PCR plate. The RNA yield was 40–50 µg with absorbance measures (A<sub>260/280</sub>) of 1.9–2.1.

Reverse transcription (RT) with random decamers was performed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For this purpose, 500 ng total RNA were reverse transcribed in a final volume of 100  $\mu$ l. RT reactions were incubated 10 min at 25 °C and 2 h at 37 °C. Control reactions were run without reverse transcriptase and were used as negative real-time PCR controls.

#### 4.2.6. PCR amplification and sequencing

Partial cDNA sequences coding in common dentex for GHR-I, GHR-II, IGF-I, IGF-II, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CYP1A1, GR, GPX-1, MT and GRP75 were PCR amplified (35 cycles at 94 °C for 30–45 s, 50–63 °C for 30–60 s and 72 °C for 30–120 s) in 50  $\mu$ l volume with a master mix containing 2.5 units of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA). Primers were designed on the basis of available gilthead sea bream sequences (see **Table 1**). Amplified PCR products were gel-extracted and sequenced by the deoxy chain termination method (ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing kit, Perkin–Elmer, Wellesley, MA, USA). The BLAST search strategy was used to corroborate the identity of amplified products (382–1078 bp) that share 88–100% amino acid identity with orthologous genes of gilthead sea bream.

#### 4.2.7. Real-time PCR

Real-time PCR was performed using an iCycler IQ Real-time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as previously described (Calduch-Giner et al., 2003). RT reactions were conveniently diluted (1:7.5; 1:75; 1:375), and 7.5  $\mu$ l were used for PCR reactions in 25  $\mu$ l volume. Each PCR-well contained a SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) with specific primers at a final concentration of 0.3–0.9  $\mu$ M. Primers were designed to amplify the same amplicon of each protein in both species (51–169 bp in length) (see **Table 2**).

The efficiency of PCR reaction for target and reference genes varied between 88 and 95%. The dynamic range of standard curves (serial dilutions of RT-PCR reactions) spanned five orders of magnitude, and the amount of product in a particular sample was determined by interpolation of the cycle

**Table 1.** Forward (f) and reverse (r) primers for the partial cloning and sequencing of target genes in common dentex

Gene	Primer	Amplicon (bp)	GenBank Accession
$\beta$ -Actin	f 5' - CGA CGG ACA GGT CAT CAC CA r 5' - AGA AGC ATT TGC GGT GGA CG	398	DQ414528
GHR-I	f 5' - CGA CGA CTC CTG GGT TGA (R)TT (Y)GT HGA r 5' - TGT CGG ACA CCT GGG C(R)T ARA A(R)T C	390	DQ414525
GHR-II	f 5' - GCT GCT GTC GCC TGA GGA ACA GAC CGA G r 5' - CCT GGT GTT GGC ATG GTC TTC GGG ATT ATC	381	DQ414521
IGF-I	f 5' - TTC GCC GGG CTT TGT CTT r 5' - CCC GCG TTG CCT CGA CTT	570	DQ414522
IGF-II	f 5' - GAC GGA GAG CAG CAG AAT GAA G r 5' - TGA TCA GAG GCC TGT GGA AG	533	DQ414523
TNF $\alpha$	f 5' - AAG CCA AGG CAG CCA TCC ATT TAG r 5' - TGC AAA CAC ACC AAA GAA GGT CTT GC	479	DQ414524
IL-1 $\beta$ <sup>1</sup>	f 5' - TCA TCG CCA TGG AGA GGT TAA A r 5' - GTG ACA TGT TTG TAG AAG AGA AAT	481	AJ459239
CYP1A1	f 5' - TCG GAG (R)GT (Y)T(S) GTG GCC AT r 5' - GAA GA(S) GGA TC(Y) TTC CAC AG	1250	DQ414529
GR	f 5' - AAA CGG ACA AAG GGC TGG AG r 5' - CAC ACA CAC CAG CTT CAT GAT GC	515	DQ414527
GPX-1	f 5' - CTG AAA TAC GTC CG(D) CC(H) GG r 5' - TAT CAG G(H)T C(R)A TGT C(R)A TGG T	289	DQ414526
MT	f 5' - AAA CCT CGA CAT CA(Y) CTG A(R)A A r 5' - GTG TGC AAA GGG AAG ACG TGC G	185	DQ524999
GRP75	f 5' - CTC CAT GGT CCT (SS)T GAA GAT G r 5' - GCT CAG ACG (R)CC CTT (R)TC (R)TT GG	1123	DQ524996

Degenerated nucleotides are in parentheses. Amplified cDNA sequences were deposited in GenBank. <sup>a</sup> Partial coding sequence for IL-1 $\beta$  was already available in GenBank under accession number AJ459239.

**Table 2.** Common dentex and gilthead sea bream primers for real-time PCR. Nucleotides in parentheses indicate species differences in the primer sequence. The first letter corresponds to gilthead sea bream and the second one to common dentex primer.

Gene	Primer
β-Actin	f 5'- TCC TGC GGA ATC CA(T,C) GAG A
	r 5'- GAC GTC (G,A)CA CTT CAT GAT GCT
GHR-I	f 5'- ACC TGT C(A,G)G CCA CCA CAT GA
	r 5'- TCG TGC AGA TCT GGG TCG TA
GHR-II	f 5'- GAG TGA (A,G)CC C(G,A)G CCT GAC AG
	r 5'- G(C,G)G GTG G(T,G)A TCT GAT TCA TGG T
IGF-I	f 5'- TGT CTA GCG CTC TTT CCT TTC A
	r 5'- AGA GGG TGT GGC TAC AGG AGA TAC
IGF-II	f 5'- TGG GAT CGT AGA GGA GTG TTG T
	r 5'- CTG TAG AGA GGT GGC CGA CA
TNFα	f 5'- CAG GCG TC(G,C) TTC AGA GTC TC
	r 5'- CTG TGG CTG AGA GGT GTG (A,T)G
IL-1β	f 5'- GCGACCTACCTGCC(A,C)CCTACACC
	r 5'- TCG TCC ACC GCC TCC AGA TGC
CYP1A1	f 5'- (G,T)CA TCA ACG (A,C)CC GCT TCA ACG C
	r 5'- CCT ACA A(C,T)C TTC TCA TCC GAC ATC TGG
GR	f 5'- TGT TCA GCC ACC CAC CCA TCG G
	r 5'- GCG TGA TAC ATC GGA GTG AAT GAA GTC TTG
GPX-1	f 5'- GAA GGT GGA TGT GAA TGG AAA (A,G)GA TG
	r 5'- CTG ACG GGA CTC CAA ATG ATG (G,T)
MT	f 5'- CTC TAA GAC TGG AAC CTG
	r 5'- GGG CAG CAT GAG CAG CAG
GRP75	f 5'- TC(C,T) GGT GTG GAT CTG ACC AAA GAC
	r 5'- TGT TTA GGC CCA GAA GCA TCC ATG

threshold (Ct) value. The specificity of reaction was verified by analysis of melting curves and by electrophoresis and sequencing of PCR amplified products. Reactions were performed in triplicate and fluorescence data acquired during the extension phase were normalized to  $\beta$ -actin, using data values of gilthead sea bream as reference values in the analysis of relative gene expression by the delta–delta method (Livak and Schmittgen, 2001).

#### **4.2.8. Statistics**

Differences in metabolic and gene expression data between common dentex and gilthead sea bream were first analyzed by Student t-test. To further elucidate the relationship among genes, data corresponding to their expression were entered into the SPSS 13.0 program (SPSS Inc., Chicago, USA) for multivariate principal components analysis (PCA). With this analysis the different variables are displayed on a single plane (principal axis), accounting for maximum dispersion (variance). Principal component plots are positions of the original variables along the new axes (principal components). Points in the component plot are the variables, and the coordinates of each variable are its factor loadings, which represents the correlation of variable with the factors. Variables at the end of the zero lines have high loadings on only that factor. Variables near the intersection are associated with neither factor. The factor score plot shows the relationships among individual fish and the variables.

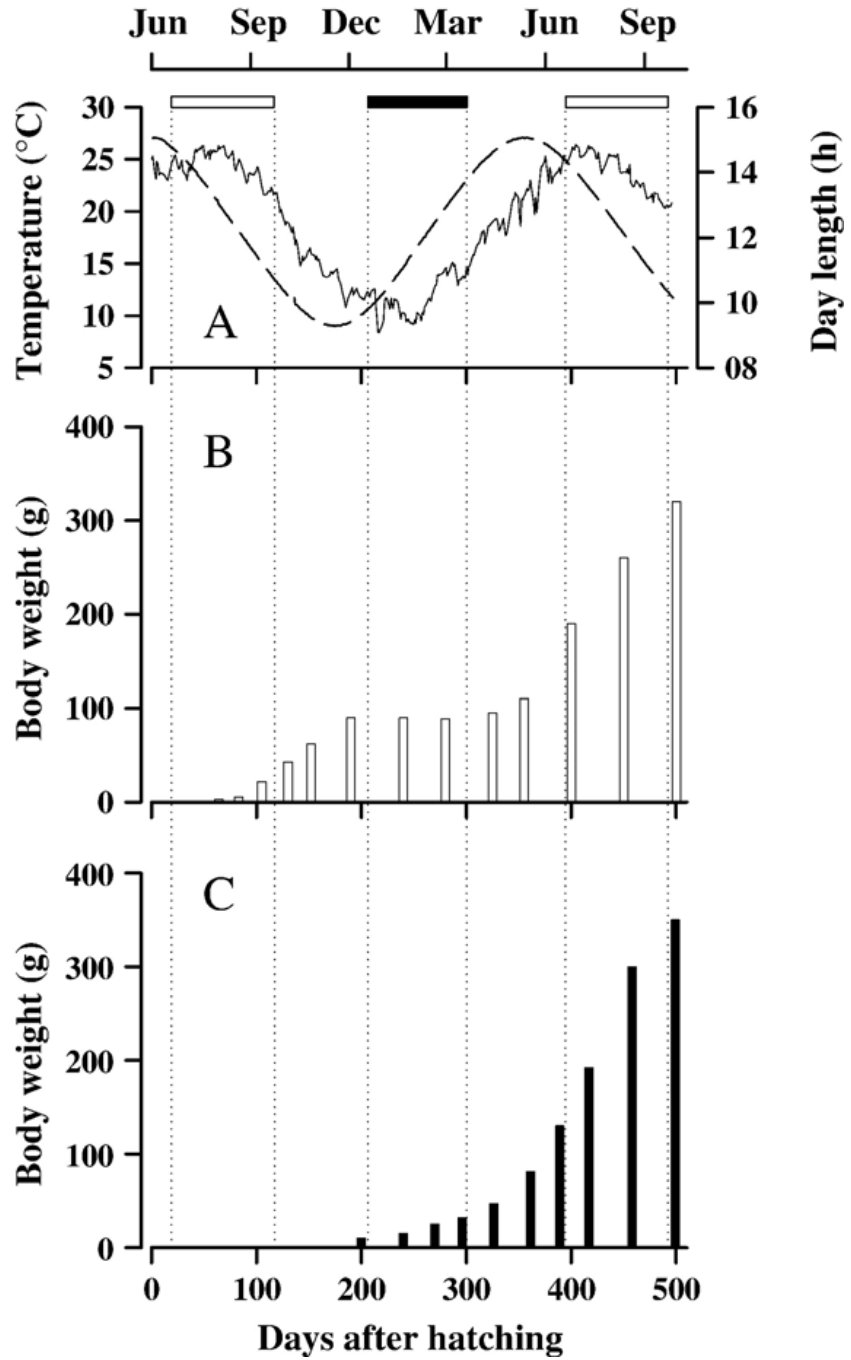
## 4.3. Results

### 4.3.1. Growth performance

Common dentex grew and developed rapidly during the course of the larval and weaning cycle (50 days), which lasted 40 days less than the standard time established for gilthead sea bream rearing. Fingerlings reached 10 g mean body weight 90 days after hatching and 90 g before overwintering. However, additional weigh gain was practically stopped during the cold season, and the finishing animals attained 300–400 g at the end of the summer growth spurt (**Fig. 1B**).

The growth trial with gilthead sea bream fingerlings started when they reached 1 g (100 days after hatching in the facilities of the producer). In comparison to common dentex, these animals grew slowly at the beginning, but later on exhibited a higher feed intake and accelerated growth along the cold season and the second summer period (**Fig. 1C**). The overall feed efficiency was also improved in gilthead sea bream (1.1 vs 1.25) and market size was accomplished almost at the same time in both species.

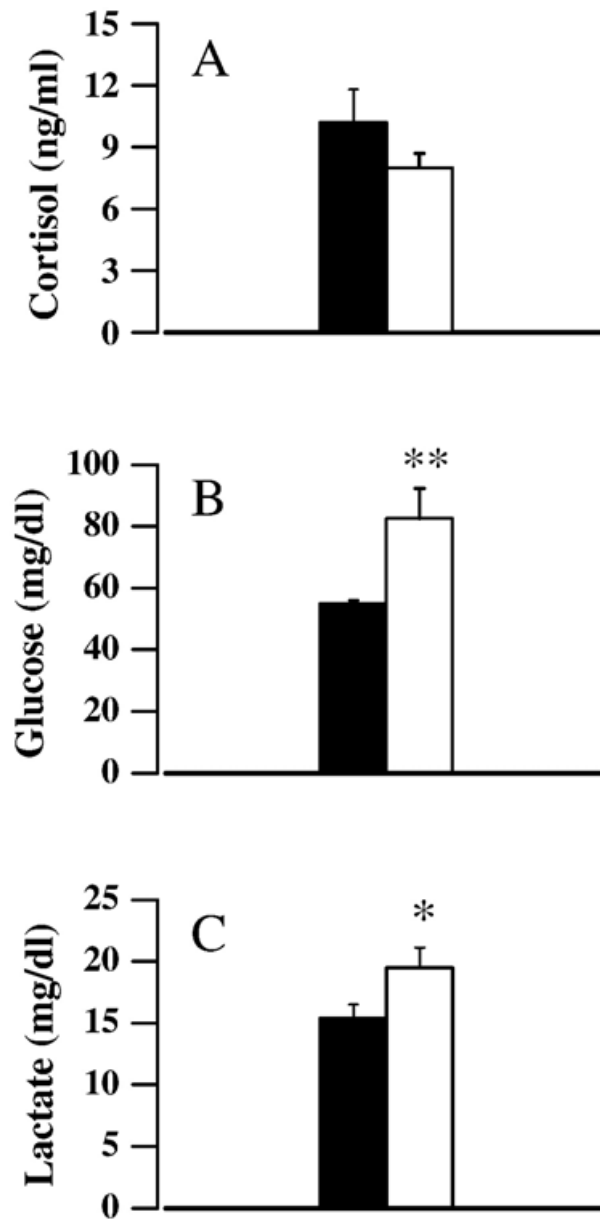




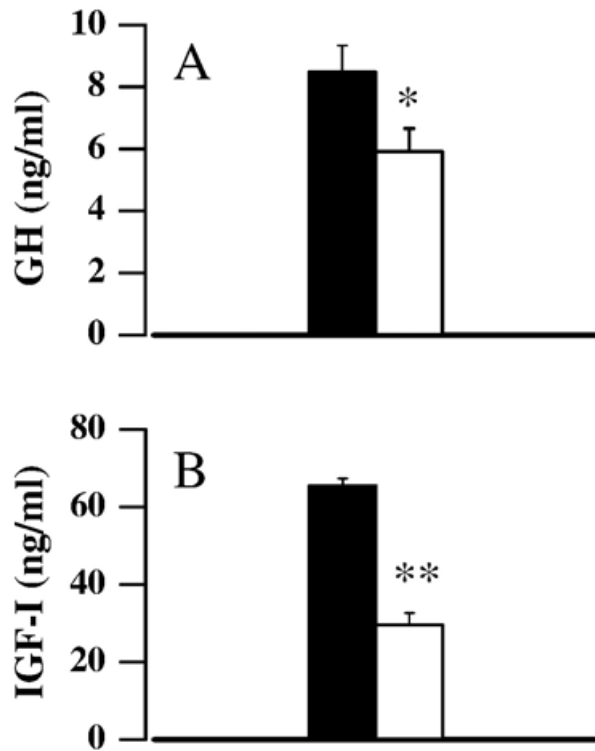
**Fig. 1.** (A) Seasonal changes on temperature (solid line) and day length (dash line). Growth curves of common dentex (B) and gilthead sea bream (C). White and black boxes at the top of figure refer to summer and winter period, respectively.

### 4.3.2. Metabolic biomarkers

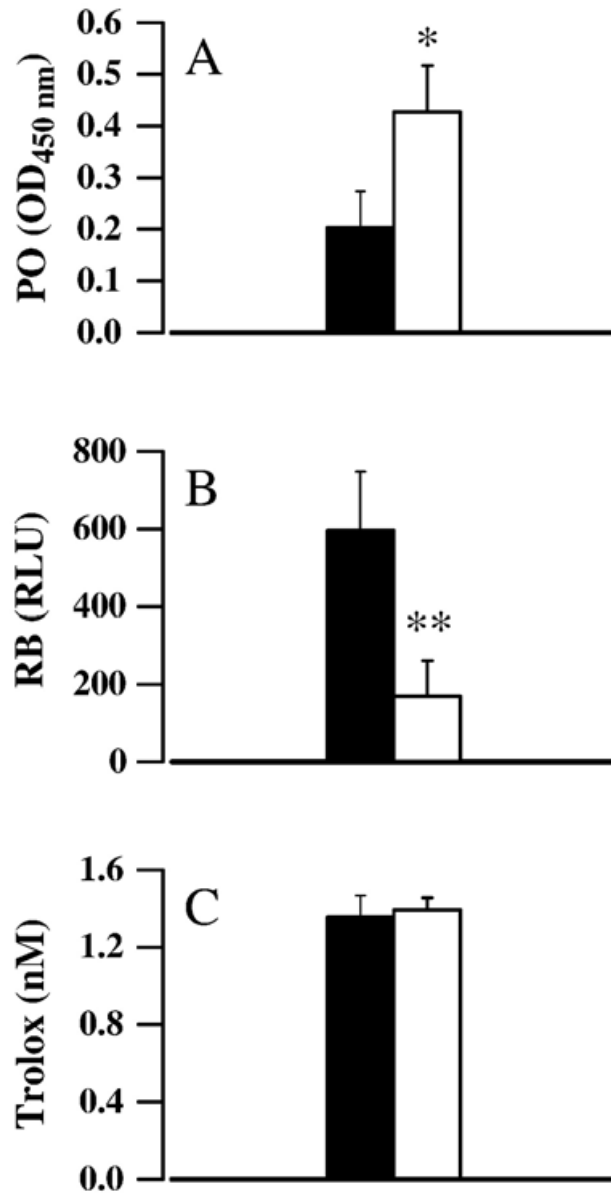
Plasma cortisol levels were lower in common dentex than in gilthead sea bream, though the difference was not statistically significant (**Fig. 2A**). By contrast, plasma glucose and blood lactate levels were significantly higher in common dentex than in gilthead sea bream (**Fig. 2B** and **C**). Regarding growth factors, circulating levels of GH (**Fig. 3A**) and IGF-I (**Fig. 3B**) were significantly lower in common dentex. Plasma peroxidases were significantly higher in common dentex (**Fig. 4A**), but respiratory burst activity of blood leucocytes after PMA stimulation was markedly lower (**Fig. 4B**). Total plasma antioxidant capacity was similar in both species (**Fig. 4C**).



**Fig. 2.** Levels of plasma cortisol (A), plasma glucose (B) and blood lactate (C) of gilthead sea bream (black) and common dentex (white). Each value is the mean  $\pm$  SEM of 10 animals. Statistically significant differences between both species at  $P < 0.05$  (\*) and  $P < 0.01$  (\*\*) are indicated.



**Fig. 3.** Plasma levels of growth hormone (GH) (A) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) (B) of gilthead sea bream (black) and common dentex (white). Each value is the mean $\pm$ SEM of 10 animals. Statistically significant differences between both species at  $P<0.05$  (\*) and  $P<0.01$  (\*\*) are indicated.

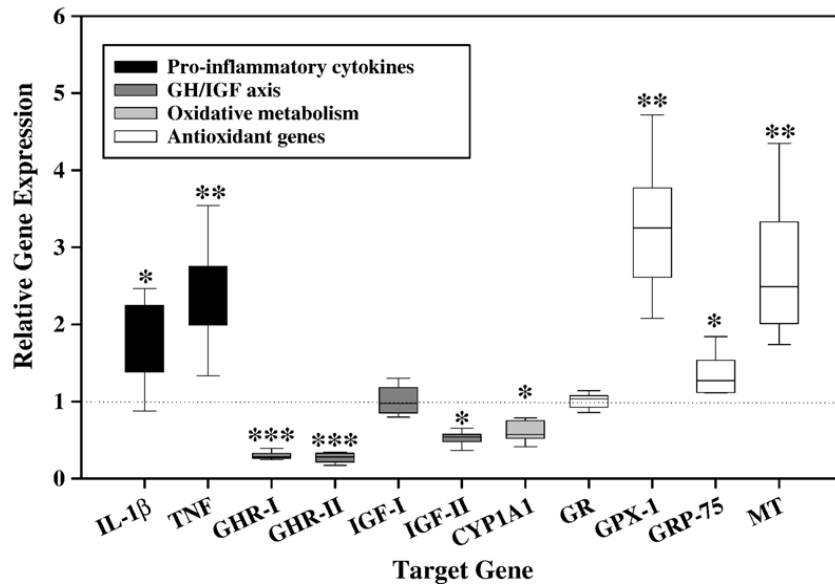


**Fig. 4.** Total plasma peroxidases (A), respiratory burst activity (B) and total antioxidant capacity (C) of gilthead sea bream (black) and common dentex (white). Each value is the mean $\pm$ SEM of 10 animals. Statistically significant differences between both species at  $P < 0.05$  (\*) and  $P < 0.01$  (\*\*) are indicated.

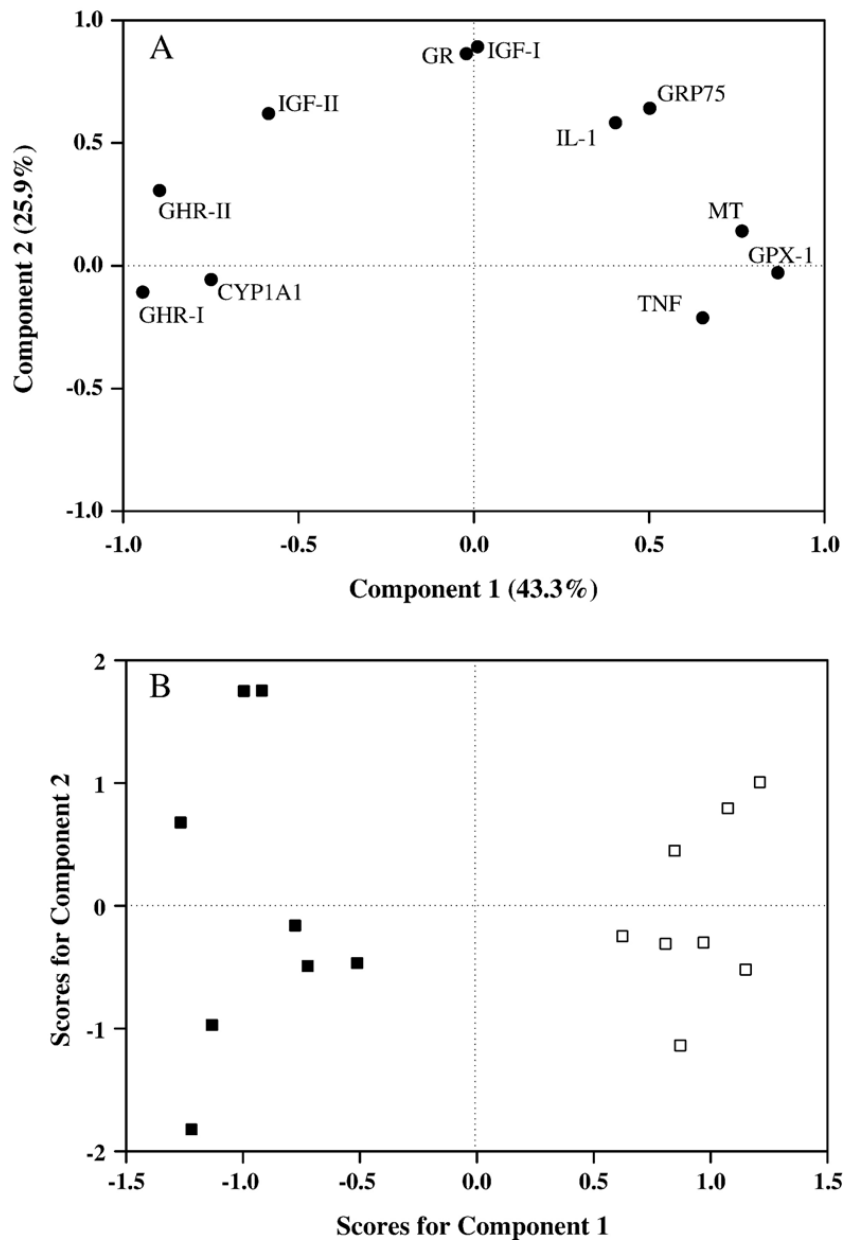
### 4.3.3. Hepatic transcriptome

The relative gene expression of target genes was analyzed in the liver of the two fish species, using  $\beta$ -actin as housekeeping gene and gilthead sea bream data for each gene as reference values in the normalization procedure (**Fig. 5**). According to this, TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression were significantly up-regulated in common dentex, whereas the relative amount of IGF-I transcripts was similar to level found in gilthead sea bream. Transcripts of IGF-II, GHR-I and GHR-II mRNA were markedly and significantly down-regulated in common dentex. The oxidative enzyme CYP1A1 was also significantly down-regulated. By contrast, the expression of antioxidant genes was not altered (GR) or significantly up-regulated (GPX-1, GRP75, MT).

When all data on gene expression were put together in the PCA matrix, the two principal components accounted for 69% of variation. The component 1 explained 43% of variation and clearly separated up-regulated genes (left) related to growth and oxidative metabolism (GHR-I, GHR-II and CYP1A1) from down-regulated genes (right), linked to the inflammatory response (TNF $\alpha$ ) and antioxidative defences (GPX-1 and MT) (**Fig. 6A**). The individual scores for all the studied variables separated clearly the hepatic transcriptome of common dentex from that of gilthead sea bream along the abscises axis, which shows the association of both species to the corresponding gene expression pattern (**Fig. 6B**).



**Fig. 5.** Box-Whisker plot representing the hepatic transcriptome of common dentex. Each value is the mean of 8 animals; lines inside the box are the median. For each gene, expression data in gilthead sea bream were used as arbitrary reference values in the normalization procedure (values >1 or <1 mean increase or decrease with respect to reference values). Statistically significant differences between both species at  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) and  $P < 0.001$  (\*\*\*) are indicated.



**Fig. 6.** Component plot (PCA analysis) of hepatic transcriptome (A). In the factor score plot, gilthead sea bream and common dentex individuals are in black and white, respectively (B). Percentage of variance explained by each component is in parenthesis.



## 4.4. Discussion

The present study indicates that common dentex and gilthead sea bream show different metabolic and gene expression profiles, as evidenced by the score plot of the hepatic transcriptome which clearly separated individuals of both species. These results agree with the idea that the observed differences are due to inter-specific rather than to intra-specific variability, and are probably related with the differential growth pattern of both species from larval stage to market size. Common dentex exhibited accelerated growth over the course of larval and initial juvenile stages, but this initial growth advantage was not retained thereafter, and juveniles of both species spent almost the same time in attaining market size. These different initial growth trajectories could be considered adaptive to exploit different ecological niches in order to assure a critical size before overwintering, since common dentex is adapted to spawn later on than gilthead sea bream. Once this size is achieved, growth arrest can serve as a biological strategy to limit mitochondrial and peroxisomal ROS production, which may be specially relevant when the redox homeostasis is compromised by other sources of ROS (e.g. inflammatory ROS production) (see Finkel and Holbrook, 2000; Boonstra and Post, 2004). At this standpoint, the concurrent transcriptional inhibition of the oxidative enzyme CYP1A1 can be considered adaptive. Likewise, the higher transcription of enzymatic (GPX-1) and non-enzymatic (GRP75, MT) antioxidant genes could be also essential to preserve the total plasma antioxidant capacity, which remained high and within the reference values of gilthead bream.

In common dentex, the observed increase in secondary stress metabolites (glucose and lactate), together with low cortisol values, was in accordance with a chronic stress condition related to its agonistic behaviour. Acute stress activates the nervous system of fish and triggers a cascade of humoral reactions along the hypothalamus–pituitary–interrenal axis that finally results in a rapid increase of plasma cortisol levels (Wendelaar-Bonga, 1997). This short-term response exerts a large array of effects including the suppressed production and activity of inflammatory cytokines (Franchimont et al., 2002).

However, experimental evidence in mammals indicates that chronic stress reduces glucocorticoid production in order to maintain body defences, at the expense of increased stress sensitivity, pain and fatigue (Raison and Miller, 2003; Fries et al., 2005). Furthermore, stress increases the metabolic rate of fish (Sloman et al., 2000), and positive correlations have been found between antioxidant enzymes and metabolic intensity (Cassini et al., 1993; Filho et al., 1993). Besides, fish subjected to stress have decreased antioxidant vitamins (Tucker et al., 1987), supporting the idea that stress promotes oxidative stress.

In the present study, the higher expression of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in common dentex liver was most probably paralleled in other more immune-relevant tissues, and could have been induced by chronic stress. These two pro-inflammatory cytokines largely overlap in their role of modulating ROS production during inflammation, infection and other physiological challenges in fish (Engelsma et al., 2002). IL-1 $\beta$  plays a pivotal role in the regulation of acute inflammatory events (Dinarello, 1997). Their precise contribution in the overall activity of the immune system of common dentex remains to be clarified herein. However, the increased plasma levels of peroxidases seem to indicate a cytokine-induced proliferation and/or activation of peroxidase-releasing leucocytes (including MPO). This finding, however, contrasts with the lower RB activity of circulating leucocytes, which may be adaptive to preserve phagocytes of oxidative damage in the absence of apparent signs of infection and diseases. A reduction in the input of superoxide anion could be a feedback response to reduce the production of hydrogen peroxide, which is used by MPO to oxidize many substrates like hypohalous acids, reactive free radicals, and MPO-derived oxidants which modify biologic macromolecules and cell-regulatory pathways (Winterbourn et al., 2000; Klebanoff, 2005). In addition, a lower production of superoxide anion would imply a lower consumption of NADPH, which protects catalase (an antioxidant enzyme) from inactivation. A high availability of NADPH also assures GR activity, which is responsible for GSH regeneration. Alternatively, we cannot exclude signs of immune exhaustion after prolonged periods of exposure to rearing stressors.

The GH/IGF axis plays a key role in the regulation of fish growth, and plasma levels of IGF-I are decreased in fish under different catabolic states arising from nutritional (Pérez-Sánchez and Le Bail, 1999; Dyer et al., 2004) and stress-related disorders (Kajimura et al., 2003; Peterson and Small, 2005; Wilkinson et al., 2006). Experimental evidence also indicates that handling and crowding stress reduce plasma GH levels in gilthead sea bream (Rotllant et al., 2000, 2001). By contrast, circulating GH levels are increased by malnutrition states arising from reduced feed intake, dietary protein/energy ratio and nutritive value of feed raw materials (Pérez-Sánchez et al., 1995; Company et al., 1999a; Gómez-Requeni et al., 2004). Therefore, the concurrent decrease in common dentex of plasma levels of GH and IGF-I suggest that growth adjusts to stress condition rather than to nutritional state. The disturbance of GH/IGF axis in common dentex was further evidenced in the present study by the reduced expression of hepatic GHRs and IGF-II. Additionally, since IGF-I mRNA transcripts were not lowered, a key role of posttranscriptional and plasma clearance events seems to be involved in the low circulating levels of IGF-I. Similarly, cortisol treatment in channel catfish was able to reduce plasma levels of IGF-I without affecting hepatic IGF-I expression (Peterson and Small, 2005). In tilapia, however, both hepatic expression and circulating levels of IGF-I were lowered by cortisol treatment (Kajimura et al., 2003). Thus, fish species differences in the regulation and mode of action of GH/IGF axis are evidenced.

CYP1A1 in liver is a major metabolizing enzyme that transforms endogenous substrates, procarcinogens and environmental pollutants into non-toxic or less carcinogenic metabolites (Van der Oost et al., 2003). A key activator of the CYP1A1 gene is the aromatic hydrocarbon receptor (AHR), which acts as a ligand activated transcription factor, interacting with xenobiotic responsive elements (XREs) on the CYP1A1 promoter (Whitlock, 1999; Hahn, 2002). The modulating role of ROS and other stress-signalling pathways on CYP1A1 expression and activity has also been established in different experimental models (Barouki and Morel, 2001). Accordingly, the lower hepatic expression of CYP1A1 could be considered adaptive to preserve redox homeostasis in the face of the prooxidative status of common dentex. This strategy has also

been regarded advantageous for wildlife fish populations in polluted environments (Bello et al., 2001; Nacci et al., 2002). Nevertheless, other risk factors associated to low metabolism and elimination of xenobiotics need to be considered when animals are exposed for long exposure times to anthropogenic stressors.

The present results also support the induction of antioxidant defences as a part of the counterregulatory strategy to avoid redox imbalances in growing common dentex. Certainly, GR is a glutathione recycling enzyme that is mostly expressed in a constitutive manner in several fish experimental models (Van der Oost et al., 2003). It is not surprising, therefore, that transcripts of GR were regulated in common dentex as in gilthead sea bream, though experimental evidence indicates that prolonged starvation decreases hepatic activity of GR in common dentex (Morales et al., 2004). By contrast, the increased expression of the selenium-dependent GPX-1 (metabolizing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to water using reduced glutathione as cofactor) found in the liver of common dentex, is in accordance with its transcriptional orientation in fish and other vertebrates (Van der Oost et al., 2003; Haddad and Harb, 2005). Similarly, non-enzymatic antioxidant genes (GRP75 and MT) were up-regulated in common dentex. The GRP75, also named mortalin/HSPA9B/PBP74/mtHSP70, is a conserved stress-responsive protein of heat shock protein 70 (HSP 70) family that preserves the integrity of mammalian cells facing drug exposure, glucose deprivation and oxidative injury (Liu et al., 2005). In the same way, MT is a ubiquitous low molecular cystein-rich protein that plays a variety of functions, including protection against heavy metals and oxidant stressors (Gornati et al., 2004; Scudiero et al., 2005). Certainly, in many species including fish, MT transcription is mediated by metal response elements (MREs) involved in the regulation of other important genes for the protection against oxidative stress (Dalton et al., 2000).

In summary, common dentex appears as an obligate fast grower during larval and fingerling stages, which probably exacerbates signs of oxidative stress (e.g. low larval survival and high incidence of skeletal deformities). By contrast, the reduced growth rate during the advanced juvenile stages seems to be part of the biological strategy to avoid oxidant-inflammation

imbalances, which also implies a low detoxifying capacity for pollutants and endogenous substrates. Whether or not these and other health risks can be alleviated by therapeutic treatments and alternative rearing procedures remains an open question, but the results presented herein suggest that the now emerging molecular tools (real-time PCRs, PCR-arrays, microarrays) can be useful for the screening in a time course basis a wide spectrum of rearing stressors limiting large scale production of candidate fish species for aquaculture diversification.

### Acknowledgements

Funding for this study was partially provided by JACUMAR-Generalitat Valenciana (project no. GCI 0870/2002). AS-V was recipient of a PhD fellowship from the Diputació Provincial de Castellón. The authors are in debt with A. Estevez (Centre d'Aqüicultura, IRTA, Tarragona) for providing common dentex eggs. The authors are also grateful to M.A. González for the excellent technical assistance in molecular analysis.

### References

- Barouki, R., Morel, Y., 2001. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* 61, 511–516.
- Bello, S.M., Franks, D.G., Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 2001. Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: in vivo and in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol. Sci.* 60, 77–91.
- Boonstra, J., Post, J.A., 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337, 1–13.
- Brown-Borg, H.M., Rakoczy, S.G., 2000. Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Exp. Gerontol.* 35, 199–212.
- Brown-Borg, H.M., Rakoczy, S.G., 2003. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. *Mech. Ageing Dev.* 124, 1013–1024.

Brown-Borg, H.M., Bode, A.M., Bartke, A., 1999. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone levels—potential relationship in the aging process. *Endocrine* 11, 41–48.

Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream, (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B, 1–13.

Cassini, A., Favero, M., Albergoni, V., 1993. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded Antarctic teleost fish *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 333–336.

Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 1999a. Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* 171, 279–292.

Company, R., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., Kaushik, S.J., 1999b. Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour.* 12, 23–30.

Company, R., Sitjà-Bobadilla, A., Pujalte, M.J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 1999c. Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *J. Fish Dis.* 22, 299–309.

Coschigano, K.T., Holland, A.N., Riders, M.E., List, E.O., Flyvbjerg, A., Kopchick, J.J., 2003. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* 144, 3799–3810.

Dalton, T.P., Solis, W.A., Nebert, D.W., Carvan, M.J., 2000. Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B, 325–335.

Dinareello, C.A., 1997. Interleukin 1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 253–265.

Dyer, A.R., Barlow, C.G., Bransden, M.P., Carter, C.G., Glencross, B.D., Richardson, N., Thomas, P.M., Williams, K.C., Carragher, J.F., 2004. Correlation of plasma IGF-I concentrations and growth rate in aquacultured finfish: a tool for assessing the potential of new diets. *Aquaculture* 236, 583–592.

Efthimiou, S., Divanach, P., Rosenthal, H., 1994. Growth, food conversion and agonistic behaviour in common dentex (*Dentex dentex*) juveniles fed on pelleted moist and dry diets. *Aquat. Living Resour.* 7, 267–275.

Engelsma, M.Y., Huising, M.O., van Muiswinkel, W.B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H.F.J., Verburg-van Kemenade, B.M.L., 2002. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 467–479.

- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567, 1–61.
- FAO, Food and agriculture organization, 2002. The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries Department, Rome. 150 pp.
- Filho, D.W., Giulivi, C., Boveris, A., 1993. Antioxidant defences in marine fish-I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 409–413.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Franchimont, D., Kino, T., Galon, J., Meduri, G.U., Chrousos, G., 2002. Glucocorticoids and inflammation revisited: the state of the art. *Neuroimmunomodulation* 10, 247–260.
- Fries, E., Hesse, J., Hellhammer, J., Hellhammer, D.H., 2005. A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology* 30, 1010–1016.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493–510.
- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341, 111–118.
- Haddad, J.J., Harb, H.L., 2005. L- $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s). *Mol. Immunol.* 42, 987–1014.
- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* 141, 131–160.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P., Le Bouc, Y., 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182–187.
- Kajimura, S., Hirano, T., Visitacion, N., Moriyama, S., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol.* 178, 91–99.
- Klebanoff, S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598–625.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M., 1998. Embryonic and yolk-sac larval development of *Dentex dentex* Linnaeus 1758 (Osteichthyes, Sparidae). *Mar. Life* 6, 41–50.
- Koumoundouros, G., Carrillo, J., Divanach, P., Kentouri, M., 2004. The rearing of common dentex *Dentex dentex* (L.) — during the hatchery and on-growing phases. *Aquaculture* 240, 165–173.

- Liu, Y., Liu, W., Song, X.D., Zuo, J., 2005. Effect of GRP75/mtHSP70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 268, 45–51.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88.
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 139C, 153–161.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Diaz, E., Grau, A., Pastor, E., 1999. Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture* 179, 309–324.
- Nacci, D.E., Kohan, M., Pelletier, M., George, E., 2002. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquat. Toxicol.* 57, 203–215.
- Nikoskelainen, S., Verho, S., Airas, K., Lilius, E.M., 2005. Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium (*Aeromonas salmonicida*) can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 525–537.
- Pavlidis, M., Greenwood, L., Mourot, B., Kokkari, C., Le Menn, F., Divanach, P., Scott, A.P., 2000. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common dentex (*Dentex dentex*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 14–25.
- Pérez-Sánchez, J., Le Bail, P.Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117–128.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Kaushik, S.J., 1995. Ration size and protein-intake affect circulating growth-hormone concentration, hepatic growth-hormone binding and plasma insulin-like growth-factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546–552.
- Peterson, B.C., Small, B.C., 2005. Effects of exogenous cortisol on the GH/IGF-I/IGFBP network in channel catfish. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28, 391–404.
- Raison, C.L., Miller, A.H., 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am. J. Psychiatry* 160, 1554–1565.



- Rigos, G., Grigorakis, K., Nengas, I., Christophiligiannis, P., Yiagnisi, M., Koutsodimou, M., Andriopoulou, A., Alexis, M., 1998. Stress related pathology seems a significant obstacle for the intensive farming of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus 1758). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 18, 15–18.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Ruane, N.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2000. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus–pituitary–interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: Differential regulation of adrenocorticotropin hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 119, 152–163.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. Gen. Comp. Endocrinol. 121, 333–342.
- Rueda, F.M., Martínez, F.M., 2001. A review on the biology and potential aquaculture of *Dentex dentex*. Rev. Fish Biol. Fish. 11, 57–70.
- Scudiero, R., Temussi, P.A., Parisi, E., 2005. Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. Gene 345, 21–26.
- Singh, U., Jialal, I., 2006. Oxidative stress and atherosclerosis. Pathophysiology 13, 129–142.
- Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I., 2005. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. Annu. Rev. Nutr. 25, 151–174.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2005. Effect of fishmeal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 249, 387–400.
- Sloman, K.A., Motherwell, G., O'Connor, K.I., Taylor, A.C., 2000. The effect of social stress on the standard metabolic rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. Fish Physiol. Biochem. 23, 49–53.
- Tibaldi, E., Beraldo, P., Volpelli, L.A., Pinosa, M., 1996. Growth response of juvenile dentex (*Dentex dentex* L) to varying protein level and protein to lipid ratio in practical diets. Aquaculture 139, 91–99.
- Tucker, B.W., Tolbert, B.M., Halver, J.E., Balaban, M., 1987. Brain ascorbate depletion as a response to stress. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 57, 289–295.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160, 1–40.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149.

Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Pérez-Sánchez, J., 2004. Production and characterization of recombinantly derived peptides and antibodies for accurate determinations of somatolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 266–277.

Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.

Whitlock, J.P., 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 103–125.

Wilkinson, R.J., Porter, M., Woolcott, H., Longland, R., Carragher, J.F., 2006. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 145A, 214–224.

Winterbourn, C.C., Vissers, M.C.M., Kettle, A.J., 2000. Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 53–58.

## CAPÍTULO 5

### **Gene expression survey of mitochondrial uncoupling proteins (UCP1/UCP3) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)**

Azucena Bermejo-Nogales, Josep Alvar Calduch-Giner, Jaume Pérez-Sánchez

Fish Nutrition and Growth Endocrinology Group, Department of Biology, Culture and Pathology of Marine Fish Species, Institute of Aquaculture Torre de la Sal (IATS), CSIC

**Journal of Comparative Physiology (2010) 180: 685-694**



**ABSTRACT**

The aim of this work is to underline the biological significance of mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) in ectothermic fish using the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) as an experimental model. A contig of 1,990 bp in length was recognized as a UCP1 ortholog after initial searches in the gilthead sea bream AQUAFIRST database (<http://www.sigenae.org/aquafirst>). Additional searches were performed in skeletal muscle by RT-PCR, and the amplified PCR product was recognized as UCP3 after sequence completion by 5'- and 3' RACE. UCP1 expression was mostly detected in liver, whereas UCP3 transcripts were only found in skeletal and cardiac muscle fibres (white skeletal muscle > red skeletal muscle > heart). Specific gene regulation of UCP1 (liver) and UCP3 (white skeletal muscle) was addressed in physiological models of age, seasonal growth and energy-metabolic unbalances. Both the increase in energy demand (stress confinement) and the reduction in energy supply during adaptive cold response in winter down-regulated UCP1 expression. Conversely, transcript levels of UCP3 were higher with age, seasonal fattening and dietary deficiencies in essential fatty acids leading to the increase in fatty acid flux towards the muscle. This close association between UCP1 and UCP3 with the oxidative and metabolic tissue status is perhaps directly related to the ancestral protein UCP function, and allows the use of UCPs as lipotoxicity markers in ectothermic fish.

*Keywords:* Age, Season, Fatty acids, Stress, Lipotoxicity

## 5.1. Introduction

Uncoupling proteins (UCP) are mitochondrial transporters that uncouple oxidative phosphorylation by the net discharge of the proton gradient (Krauss et al. 2005). This protein family is widely distributed in plants and animal phyla, but cellular mechanisms and biological significance remain unclear and vary among the different UCP family members. Thus, a core group of three UCP genes has been recognized in mammals, but contribution to basal proton conductance (Parker et al. 2009) and a high nucleotide-sensitive proton conductance, strongly inhibited by purine nucleotides and activated by low concentrations of fatty acids (Locke et al. 1982; Rial et al. 1983), have only been reported for UCP1. Tissue distribution and relative abundance also vary among UCP family members. Thus, UCP1 is present in high concentrations (up to 10% of membrane protein) in the brown adipose tissue (BAT) of rodents, hibernators and newborns (Heaton et al. 1978), and has a well-documented role in non-shivering thermogenesis (Nicholls and Locke 1984). By contrast, closely related UCP paralogues are expressed ubiquitously (UCP2) or more specifically in heart and skeletal muscle (UCP3) at lower concentrations (Harper et al. 2002; Pecqueur et al. 2001). Hence, the physiological function of UCP2-3 remains currently under debate, but they share a common role as redox-sensors to attenuate the production of reactive oxygen species (ROS) (Krauss et al. 2005).

In chickens, cold exposure and feeding influence the gene expression level of avian UCP that shares 71, 70 and 55% amino acid identity with human UCP3, UCP2 and UCP1, respectively (Raimbault et al. 2001; Abe et al. 2006). In contrast to the pluripotent avian UCP, the three members of the core UCP family (UCP1-3) have been retained in ectothermic fish (Stuart et al. 1999; Jastroch et al. 2005). However, studies in this vertebrate lineage are not representative of all fish taxa and the primary goal of this work is to gain more understanding on the physiological regulation of UCPs in ectothermic and carnivorous fish, using gilthead sea bream (*Sparidae* family) widely cultured in all the Mediterranean area as experimental model. Initial searches in the gilthead sea bream cDNA database

(<http://www.sigenae.org/aquafirst>) of the European AQUAFIRST project recognized a contig of 1,990 bp in length as a UCP1 ortholog. Additional UCP-searches were performed by means of RT-PCR, and amplified cDNA fragments in skeletal muscle were unequivocally recognized as UCP3. The study was then focused on the gene expression analysis of UCP1 and UCP3 in physiological models of age, seasonal growth and energy-metabolic unbalances induced either by crowding stress or nutritional deficiencies in essential fatty acids.

## 5.2. Materials and methods

### 5.2.1. Animal care and sampling

Juveniles and adults of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) were reared in the indoor experimental facilities of Institute Aquaculture Torre de la Sal (IATS) under the natural photoperiod and temperature conditions at IATS latitude (40°5\_N; 0°10\_E). Seawater was pumped from ashore (open system) and 10 µm filtered. The oxygen content of water effluents was always higher than 85% saturation, and unionized ammonia remained below toxic levels (<0.02 mg/l). Except where indicated, fish were fed on a commercial diet (Proaqua, Palencia, Spain) containing 47% protein and 21% lipid. At the sampling time, fish were fasted overnight and decapitated under anaesthesia (3-aminobenzoic acid ethyl ester, 100 mg/l). Targeted tissues were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction and analysis were performed.

All procedures were carried out according to the national and institutional regulations on experimental animal handling (IATS-CSIC Review Board).

### 5.2.2. Experimental step

Tissue screening of UCP1 and UCP3 gene expression was carried out in 2-year-old fish. Two randomly selected fish were sampled in October and targeted tissues (liver, intestine, white skeletal muscle, red skeletal muscle, heart, mesenteric adipose tissue, head kidney, gills, spleen, eye, testis, brain) were excised and nitrogen frozen in less than 10 min.

The age-related effects on UCP expression were monitored during the summer growth spurt in 1- and 3-year-old fish reared from fingerlings in the experimental facilities of IATS. At the sampling time (July), six growing fish from each age group were sampled for collection of liver and white skeletal muscle.

Tissue samples for analysis of the effect of nutritional background (dietary lipid source) on UCP expression come from a previously published dietary trial (Benedito-Palos et al. 2007). Briefly, juvenile fish of 16-g initial body weight were fed to visual satiety from May to mid-August with plant protein diets containing either fish oil (FO diet) or a blend of vegetable oils replacing fish-oils by 100% (VO diet). At the end of the trial period, eight randomly selected fish per dietary treatment were sampled for liver and white skeletal muscle collections.

Tissue samples for analysis of the effect of high stocking density (a common aquaculture stressor) on UCP expression come from a previously published pair-fed study (Bermejo-Nogales et al. 2007). Briefly, juvenile fish of 16–20-g initial body weight were randomly allocated into six 90 L-tanks. One triplicate group was reared at high density (45–50 kg/m<sup>3</sup>; 80 fish per tank) and fed to visual satiety (HD group). The reference group (LD group) was reared at the optimum density (8–10 kg/m<sup>3</sup>; 20 fish per tank) and fed with the same rations as the HD group. Three weeks later, nine fish per experimental condition were sampled for liver and white skeletal muscle collection.

The time course of changes in liver and muscle UCP expression was analysed in juvenile fish (1-year-old fish) fed from May to January to visual satiety. At the end of the growth trial (cold season), fish feed intake was naturally reduced to the maintenance ratio, and 8–9 fish were randomly selected for sampling of liver and white skeletal muscle. Additional tissue samples were taken in mid summer (July, growth period) and early autumn (October, fattening period).



### 5.2.3. RNA extraction and RT procedure

Total RNA extraction from target tissues was performed with the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, tissue samples were homogenized at a ratio of 25 mg/ml with a guanidine-detergent lysis reagent. The reaction mixture was treated with protease K, and RNA purification was achieved by passing the tissue lysate (0.4–0.5 ml) through a purification tray containing an application-specific membrane. Wash solutions containing DNase were applied, and total RNA was eluted into a 96-well PCR plate. The RNA yield was 30–50 µg with absorbance measures ( $A_{260/280}$ ) of 1.9–2.1.

Reverse transcription (RT) with random decamers was performed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For this purpose, 500 ng total RNA were reverse transcribed with a final volume of 100 µl. RT reactions were incubated for 10 min at 25°C and 2 h at 37°C. Negative control reactions were run without reverse transcriptase.

### 5.2.4. RT-PCR approach for UCP3 amplification

Degenerated primers for gilthead sea bream UCP3 were designed on the basis of available sequences in humans, pufferfish and carp. Forward primer (5'-CTG CAT AGC TGA CCT CVT CAC YTT YCC A) was located 68 nucleotides downstream from the initial methionine; reverse primer (5'-CTA GAC MAY RTT CCA SGA KCC CAG) was located 69 nucleotides upstream from the stop codon. PCR amplification was performed with 2 µl of RT reactions from white skeletal muscle in a total volume of 50 µl and two units of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA). Thirty-five cycles were carried out with denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 60 s and extension at 72°C for 90 s.

Rapid amplification of the 3'-end (3'RACE) was performed according to the manufacturer's instructions (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Briefly, 500 ng of total RNA (white skeletal muscle) were reverse transcribed with oligo (dT)<sub>30</sub> coupled to an anchor cDNA sequence. Amplification was performed with a specific forward primer (5'-GTG CGA CTG

GCT GAC GGC GGG AGG AGG); the reverse primer corresponded to the anchor sequence. This PCR consisted of 30 cycles of 60 s at 94°C, 90 s at 62°C and 3 min at 72°C. A nested PCR (35 cycles of 60 s at 94°C, 90 s at 60°C and 3 min at 72°C) was performed with an inner forward primer (5'-AAA CAC GGT TCA TGA ACT CAG GGT CTG) and 1 µl of the first PCR reaction.

Rapid amplification of the 5'-end (5'RACE) was performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Briefly, 4 µg of total RNA (white skeletal muscle) were reverse transcribed with a specific reverse primer (5'-GTT CGG CAT ACA ACC TC). After RNase H treatment and cDNA purification, an oligo (dC) tail was added at the 5'-end. The resulting product was PCR amplified with a universal primer containing a poly-dG sequence and specific oligonucleotides for the first and second PCR, respectively (5'-CCA GCG TGC TGT TGT ACC TCC TCC; 5'-ATC GAT GCC ACC TTT GCC TTT CTG A).

All amplified PCR products were gel-extracted and sequenced by the deoxy chain termination method (ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing kit, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). A BLAST-X search strategy and multiple sequence alignments were carried out with ClustalW to compare the identity of amplified products.

### 5.2.5. UCP expression analyses

Real-time PCR was performed using an iCycler IQ Real-time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as previously described (Calduch-Giner et al. 2003). Briefly, diluted RT reactions were conveniently used for PCR reactions in 25-µl volume. Each PCR-well contained a SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) and specific primers for UCP1 (forward, 5'-GCA CAC TAC CCA ACA TCA CAA G; reverse, 5'-CGC CGA ACG CAG AAA CAA AG) and UCP3 (forward, 5'-AGG TGC GAC TGG CTG ACG; reverse, 5'-TTC GGC ATA CAA CCT CTC CAA AG) were used at a final concentration of 0.9 µM to obtain an amplicon of 137 and 108 bp in length for UCP1 and UCP3, respectively. β-actin was used as the housekeeping gene and the efficiency of PCR reactions for the target and the

reference genes varied between 95 and 98%. The dynamic range of standard curves (serial dilutions of RT-PCR reactions) spanned five orders of magnitude, and the amount of product in a particular sample was determined by interpolation of the cycle threshold (Ct) value. The specificity of reaction was verified by analysis of melting curves and by electrophoresis and sequencing of PCR amplified products. Reactions were performed in triplicate and the fluorescence data acquired during the extension phase was normalized to  $\beta$ -actin by the delta–delta method (Livak and Schmittgen 2001).

### 5.2.6. Statistics

Data on growth and UCP gene expression is represented as the mean  $\pm$  SE. The effect of age, nutritional background and stocking density on UCP expression was analysed by the Student's t test. The in-season regulation of UCP expression was evaluated by ANOVA on ranks followed by the Tukey test for multiple comparisons. All statistical analyses were performed with the SPSS 13.0 program (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

## 5.3. Results

### 5.3.1. Cloning of gilthead sea bream UCPs

The search for gilthead sea bream UCPs in the AQUAFIRST database (<http://www.siginae.org/aquafirst>) unequivocally recognized a contig of five clones in depth and 1,990 bp in length as UCP1. Best BLAST-X hit with *E* value of 1e-150 was for carp UCP1 (**AY461434**). The sequence encodes for an open reading frame of 306 amino acids introduced in GenBank with the accession number **FJ710211**. Additional search by RT-PCR for UCP3 yielded in the white skeletal muscle a PCR product of expected size (766 bp). The nucleotide sequence was completed by means of 3'- and 5'RACE and a cDNA fragment of 1,590 bp in length with an open reading frame of 309 amino acids, a 5'UTR of 245 bp and a 3'UTR of 415 bp were obtained and introduced in GenBank with the accession number **EU555336**. BLAST-X searches produced significant alignments (*E* values  $>7e-135$ ) with lamprey, zebrafish and pufferfish UCP3. The best hits with *E* values for endothermic vertebrates were 1e-127 for

dog (**AB022020**) and 3e-127 for the marsupial yellow-footed antechinus (**AY519198**).

Sequence alignments with fish UCP orthologues closely related gilthead sea bream UCP1 to carp and pufferfish UCP1 sequences (86–93% identity, 93–97% similarity). Likewise, gilthead sea bream UCP3 is closely related to stickleback and pufferfish UCP3 sequences with 87–92% identity and 93–96% similarity, respectively. These sequence identities decreased until 66–69% when comparisons were made among fish UCP paralogues already available in public databases as complete sequences (**Table 1**).

**Table 1** Identity and similarity (brackets values) of gilthead sea bream UCP1 (FJ10211) and UCP3 (EU555336) with fish UCP orthologues and paralogues available in public databases

	Accession Number	Gilthead sea bream	
		UCP1	UCP3
UCP1			
Pufferfish	CR640550	93 (97)	70 (83)
Carp	AY461434	86 (93)	69 (83)
Zebrafish	NM_199523	86 (92)	69 (84)
Red sea bream <sup>a</sup>	AF487341	97 (99)	74 (87)
Stickleback <sup>a</sup>	ENSGACT00000022876	87 (93)	68 (82)
UCP3			
Pufferfish	CAAE01014703	69 (83)	92 (96)
Stickleback	ENSGACT00000026952	67 (82)	87 (93)
Carp <sup>a</sup>	AY505343	66 (85)	83 (94)

<sup>a</sup> Partial UCP sequences

Sequence alignments also revealed a high degree of amino acid identity (68%) and similarity (82%) between gilthead sea bream UCP1 and UCP3 (**Fig. 1**). Both the sequences shared the characteristic features of the UCP1-3 family with three tandem repeats of approximately 100 amino acids, with each domain containing two transmembrane domains and a long hydrophilic loop that includes the conserved sequence motif of the mitochondrial carrier superfamily P[LTV]D[TV][AV]K[VT]R[LFY]. The consensus sequence for

human UCP1-3, avian UCP and gilthead sea bream UCPs showed a strict conservation of 132 amino acid residues with seven invariant amino acids in the three tandem UCP-repeats. The amino acids of the putative GDP binding site essential for nucleotide interaction were strictly preserved in UCP1 (Arg83, Arg181, His214) and UCP3 (Arg86, Arg184, His217) gilthead sea bream sequences.

---

**Fig. 1** Amino acid alignment of human UCP1-3 (H-UCP-1, H-UCP2, H-UCP3), avian UCP (avUCP), gilthead sea bream UCP1 (Gsb-UCP1) and gilthead sea bream UCP3 (Gsb-UCP3). Sequences are arranged to identify amino acid residues conserved in the three repeats and UCP homologues. Tandem repeats contain two transmembrane  $\alpha$ -helices (*Dark grey*) and the conserved sequence motif of the mitochondrial carrier superfamily (*Light grey*). *Asterisks* denote strict conservation, while *double dot* indicates homology and *simple dot* majority. Lines between blocks help to identify conserved residues highlighted in *bold*. *Highlighted asterisks* indicate conserved amino acids of the GDP-binding site essential for nucleotide interaction. Position of specific primers for real-time PCR is *underlined*.

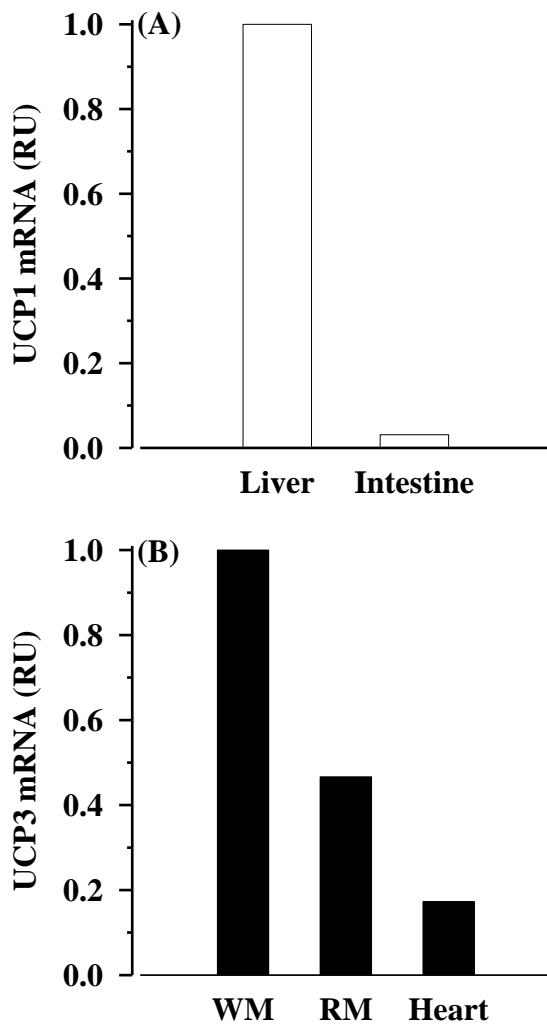
```

Repeat 1
H-UCE1      MGGLTASDVHPTLGVQVLSAGTAACIADLVITPPLDPTAKVRLQVQGECP-----TSSVYIKRVKVLGHTITAVKTKRMLYSGFAGIQRQISSASIRIGLXDVTQVEFLT-AGKE 108
H-UCE2      MVGFKATDVPPTATVVKLGAGTAACIADLVITPPLDPTAKVRLQIQEGSQGVPVATASAQVRGVNGITLTMVTRTEGPPRSYNGVAGLQRMQSFASVIRIGLXDYSVKQFYT-KGSE 112
H-UCE3      MVGLKPSDVPPTMAVKFLGAGTAACIADLVITPPLDPTAKVRLQIQEGNO-AVOTARLVQVRGVLGTLTMVTRTEGPPCSFYNGVAGLQRMQSFASIRIGLXDYSVKQVYTFKGA 112
avUCP      MVGLKPEEVPPTAAVKFFSAGTAACIADLVITPPLDPTAKVRLQIQGEVR-I PRSINTVVCYRGLGTLSTMVTRTEGPPSLYSGLVAGLQRMQSFASIRIGLXDYSVKQVYTFKGA 112
Gsb-UCP1   MVGLKPSDVPFPLGVKMASAGIACIADLVITPPLDPTAKVRLQIQGEKTI-----AVGGIIRYRQVGFVGTITMKTREGPPRSYNGVAGLQRMQSFASIRIGLXDYNVKNFYT-GGKD 108
Gsb-UCP3   MVGMKPNMWPSSAAVKFFGAGTAACIADLVITPPLDPTAKVRLQIQEGSQ-KRGGIDVIRYRQVGFVGTITMKTREGPPRSYNGVAGLQRMQSFASVIRIGLXDYSVKQFYT-RGTE 111
Consensus  ***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **
Repeat 2
H-UCE1      ---TAPSLGSKLLAGLTGCVAVFIGQPTTEVVKVRLQAO-----SHLHGKPRYTGTYNAVRIIATTEGLTGLMKQTENIMRSVZINCTELVTVLMLKEAFVKNNI 207
H-UCE2      ---HASIGRLLAGSTTGALAVAVQPTDQVKVRFQAO-----ARAGGRRYOSTVNAVKTIAREEGFRGLMKGTSENVARNAVCAELVTVLMLKDLKLANL 209
H-UCE3      ---NSSLITRLLAGCTTGAMAVTCAQPTDQVKVRFQAS---IHLGPRSDRKYSGTMDAVRTIAREEGVFRGLMKGTENIMRNVAVNCAEVTVLMLKEKLDYHL 212
avUCP      ---STGLLARLLAGCTTGAVATCAQPTDQVKVRFQAL---GALPESNRKYSGTMDAVRTIAREEGVFRGLMKGTLENIRNSIINGELVTVLMLKDLKDLRAQL 210
Gsb-UCP1   ---NPSVLIRLLAGCTTGAMAVSFAQPTDQVKVRFQAO---MNLDPVARRYTGTMOAVRHIQNEGFRGLMKGTLENITRVALVCTELVTVLMLKEAILRHNL 206
Gsb-UCP3   ---SAGIVTRLLMAGCTTGAMAVAFAQPTDQVKVRFQAO---VRLADGGRRYKSTLDAVKTIADEGVRGLMKGTENITRVAIVNCAELVTVLMLKELIKYDL 209
Consensus  . . . :***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **
Repeat 3
H-UCE1      ---LADDVPCHEVYSALVAGFCATAMSQVVDVVKTRFINS-----PPGQYKSVENCAMKVFNECPVAFPLGYPSELRIGSNWVIMFYCEQLKRELSKSRQTMDCAT 307
H-UCE2      ---MTDDLPCHFSAFGAGFCATVVAQVVDVVKTRFVWNS-----ALGGYSAGHCALTMQKQEPKAFYKGFMPSELRIGSNWVIMFYCEQLKRALMAACTSREAFP 309
H-UCE3      ---LTDNPFCHFVSFAFGAGFCATVVAQVVDVVKTRFVWNS-----PPGQYFSLDCMIRMAAQEPTAFYKGFMPSELRIGSNWVIMFYCEQLKRALMKVQMLRESFP 312
avUCP      ---MTDNVPCHEVAFAGAGFCATVVAQVVDVVKTRFVWNA-----SPGQYRNVPSCILLALLIQDGIAGIYKGFYPSFLRIGSNWVIMFYCEQLQQRVVM--LARSAPP 307
Gsb-UCP1   ---LSDNLPCHFVAFAGAGFCATVVAQVVDVVKTRFVWNS-----PPSQYKSAINCALWTMTKEGPTAFYKGFYPSFLRIGSNWVIMFYCEQLKRAMVTKRITDDPN 306
Gsb-UCP3   ---MTDNLPCHFVAFAGAGFCATVVAQVVDVVKTRFVWNS-----GSGQYSAINCALTMLEHHEGPTAFYKGFMPSELRIGSNWVIMFYCEQLKRAMVTKRITDDPN 306
Consensus  :*.* **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **:::***** **

```

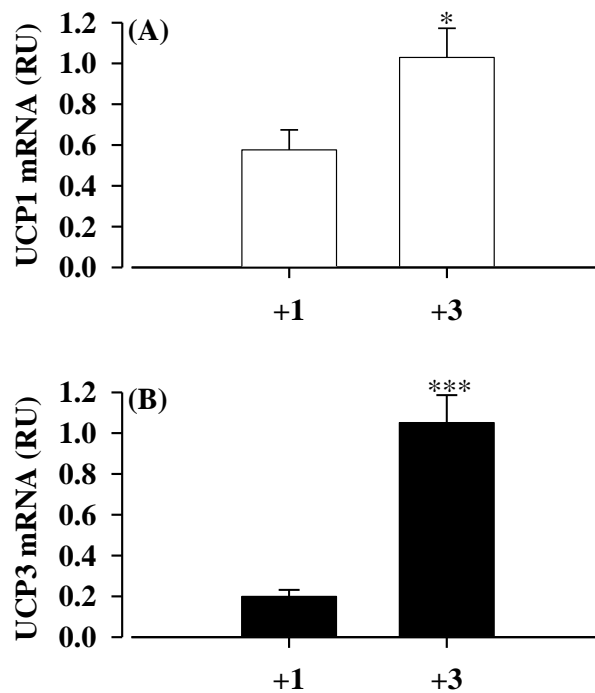
### 5.3.2. Gene expression analyses

Tissue-expression pattern of UCP1 and UCP3 is shown in **Fig. 2**. UCP1 was primarily expressed in liver and secondly in the intestine at tenfold lower levels (**Fig. 2a**). No detectable expression of UCP1 was found in any other tissue analysed (skeletal and cardiac muscles, mesenteric adipose tissue, head kidney, gills, spleen, eye, gonad and brain). The expression of UCP3 was also tissue-specific and was detected in skeletal and cardiac muscles (**Fig. 2b**). Comparisons of gene expression levels revealed that the abundance of UCP3 mRNA was highest in glycolytic muscle (white skeletal muscle), 2–3-fold lower in oxidative muscle (red skeletal muscle) and 5–6-fold lower in cardiac muscle. No detectable expression of UCP3 was found in any other tissue analysed (liver, intestine, mesenteric adipose tissue, head kidney, gills, spleen, eye, gonad and brain). Attention was then focused on gene expression analysis in liver and white skeletal muscle as the most important targets of UCP1 and UCP3 in gilthead sea bream. With this aim, we first analysed the expression of UCPs in the model of age. Interestingly, the abundance of hepatic UCP1 mRNA in 3-year-old fish (mature fish) was twofold higher than in 1-year-old fish (immature fish) (**Fig. 3a**). Similarly, the abundance of UCP3 mRNA was highest in the oldest fish and 4–5-fold lower in 1-year-old fish (**Fig. 3b**).



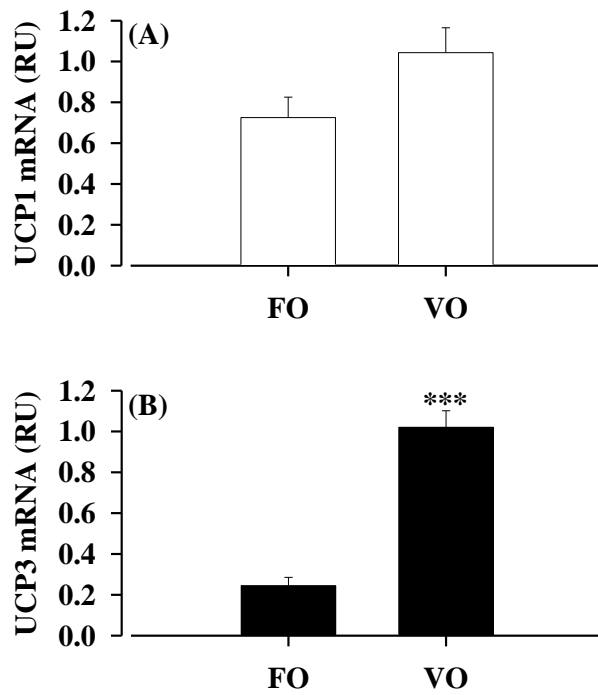
**Fig. 2** Representative tissue-expression pattern of UCP1 (a) and UCP3 (b) in 2-year-old fish. White skeletal muscle (*WM*), red skeletal muscle (*RM*). UCP1 was not detectable in skeletal and cardiac muscles, mesenteric adipose tissue, head kidney, gills, spleen, eye, gonad and brain. UCP3 was not detectable in liver, intestine, mesenteric adipose tissue, head kidney, gills, spleen, eye, gonad and brain. Data in liver and WM were used as reference values in the normalization procedure for UCP1 and UCP3, respectively (*RU* relative units).



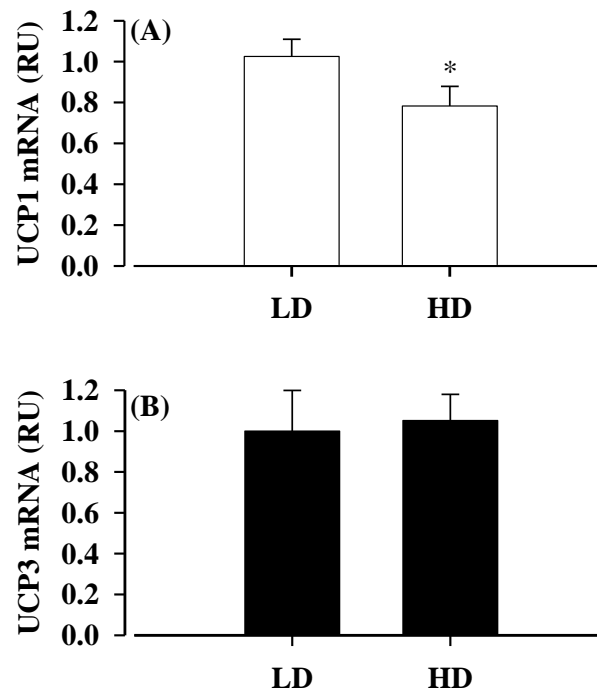


**Fig. 3** Age-related changes in transcript levels of UCP1 in liver (a) and UCP3 in white skeletal muscle (b). Values are the mean  $\pm$  SEM of six animals. UCP1 and UCP3 data in 3-year-old fish were used as reference values in the normalization procedure (*RU* relative units). Statistically significant differences between groups are indicated (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Student's *t* test).

The tissue-specific expression of UCPs was altered by dietary manipulation and both hepatic UCP1 and white skeletal muscle UCP3 were up-regulated after the total replacement of fish oil with vegetable oils (**Fig. 4a, b**). However, the magnitude of change was higher for UCP3 (fourfold change) than for UCP1 transcript levels, which presented a slight but not significant increase in fish fed on the VO diet. Fish-rearing density did not alter the expression of UCP3 in white skeletal muscle (**Fig. 5b**), whereas a reduced but significant decrease was found for hepatic transcript levels of UCP1 in the HD group (**Fig. 5a**).



**Fig. 4** Transcript levels of hepatic UCP1 (a) and white skeletal muscle UCP3 (b) in fish fed fish oil (FO diet) or a blend of vegetable oils replacing fish-oils by 100% (VO diet). Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). UCP1 and UCP3 data in fish fed the VO diet were used as reference values in the normalization procedure (RU relative units). Statistically significant differences between groups are indicated (\*\*\*)  $P < 0.001$ ; Student's  $t$  test).

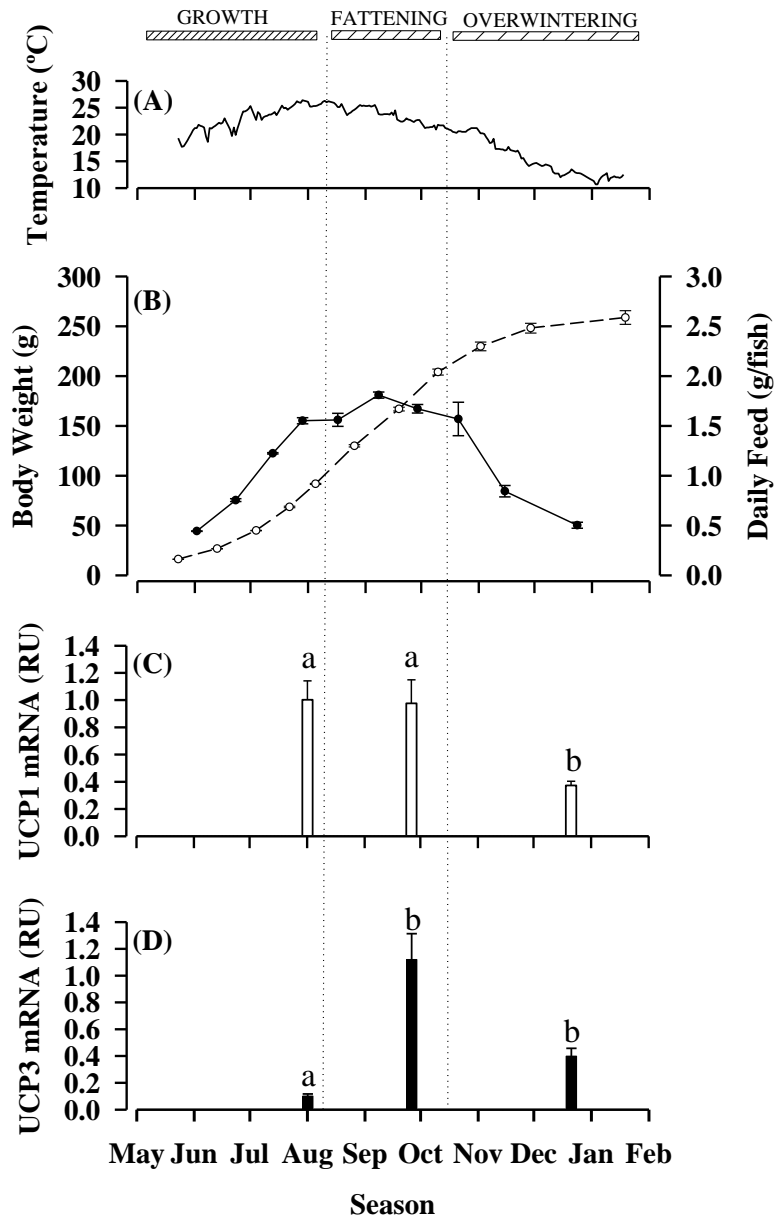


**Fig. 5** Transcript levels of hepatic UCP1 (a) and white skeletal muscle UCP3 (b) in fish reared at high (*HD* 45–50 kg/m<sup>3</sup>) and low (*LD* 10 kg/m<sup>3</sup>) densities in a pair-fed study. Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). UCP1 and UCP3 data in LD fish were used as reference values in the normalization procedure (*RU* relative units). Statistically significant differences between groups are indicated (\* $P < 0.05$ ; Student's *t* test).

The expression of UCP1 and UCP3 was regulated on a seasonal basis. Thus, over the course of the seasonal trial, feed intake increased continuously from spring to early summer (growth period), reached a plateau during the second half of the summer (growth and fattening period) and decreased progressively during the autumn and winter period (overwintering period) (**Fig. 6a, b**). In this scenario, the abundance of hepatic UCP1 mRNA was highest in summer and early autumn and 2–3-fold lower in early winter (**Fig. 6c**). In the white skeletal muscle, the abundance of UCP3 mRNA was highest in autumn and lowest in summer in coincidence with fattening and growth periods, respectively. Intermediate values were reported in winter with the maintenance of feeding ratios (**Fig. 6d**).

---

**Fig. 6.** (a) Seasonal changes in water temperature. (b) Body mass (*open circles*) and daily feed intake (*filled circles*) over the course of the experiment are represented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  tanks). *Boxes* at the top of the figure refer to the critical step windows over the course of the culture cycle. Transcript levels of UCP1 in liver (c) and UCP3 in white skeletal muscle (d) are the mean  $\pm$  SEM of 8–9 animals. Data values of UCP1 and UCP3 in fish sampled in October were used as reference values in the normalization procedure (*RU* relative units). *Different letters* above each bar indicate statistically significant differences among step windows of the season ( $P < 0.05$ ; Tukey test).



## 5.4. Discussion

Gilthead sea bream belongs to the *Sparidae* family, *Perciformes* order, and this is the first report analysing the tissue-specific regulation of UCPs in this important group of teleosts. Mapping of UCP sequences in vertebrate taxa contributes to highlight invariant amino acids as well as the shared-derived amino acids of UCP family. Mutagenesis experiments have demonstrated that amino acids of the putative GDP-binding site are essential for nucleotide binding (Modrianský et al. 1997) and these amino acids are strictly preserved in gilthead sea bream sequences. Functional experimental evidence in cold acclimated carp indicates that purine nucleotides prevents fatty acid inducible proton conductance in isolated liver mitochondria (Jastroch et al. 2007). However, in both fish and higher vertebrates, the competition between inhibitors (GDP) and activators (fatty acids, pH, ROS, HNE) of UCP function is still unclear and more complex than initially envisaged (Krauss et al. 2005).

Phylogeny studies on available literature provide evidence for a long UCP1 branch that closely relates fish and marsupials to the large distanced eutherians (Hughes et al. 2009). Since adaptive non-shivering thermogenesis is not fully developed in marsupials, this divergent evolution can be interpreted as the acquisition of novel thermogenic functions in BAT (independently of shivering and locomotor activity) just after the split of eutherians from marsupial lineages ~150 million years ago (Jastroch et al. 2008). However, it seems that most UCP1 orthologues are specifically expressed in metabolically active tissues with high lipid contents, which can be converted into fat-burning machines during adaptive thermogenesis and excessive feed intake. This is inferred from obesity models in rodents, which are in most cases associated with low levels and activity of UCP1 in BAT (Kozak and Koza 1999). Moreover, UCP1 deficiencies increase the ageing susceptibility of mice to diet-induced obesity (Kontani et al. 2005), whereas ectopic expression of UCP1 in genetically obese mice decreases adiposity and increases temperature and metabolic rates (Gates et al. 2007). Less clear is the role of UCP1 in human obesity (Gonzalez-Barroso et al. 2000), but even in marsupials overexpression of UCP1 in the archetypal BAT can be of

relevance for the whole-body energy balance (Jastroch et al. 2008). In fish, the number of analysed species is little representative of the phyla, but both this (gilthead sea bream study/superorder Acanthopterygii) and earlier studies in carp (superorder Ostariophysi) (Jastroch et al. 2005) support a high expression level of UCP1 in liver and notably not in cells of adipose tissue. Meanwhile, low but detectable UCP1 expression was found in the intestine, which is also highly vulnerable to oxidative stress due to constant exposure to transition metals, bacterial metabolites, bile acids and ROS generated by luminal contents.

Low amino acid substitution rates in UCP2 and UCP3 clades reflect the strong purifying selection in the UCP2/3 branch (Hughes and Criscuolo 2008; Hughes et al. 2009). Moreover, UCP2 and UCP3 genes are located adjacently in fish (Jastroch et al. 2005) and mammalian genomes (Pecqueur et al. 1999; Solanes et al. 1997), which suggests that the duplication of the ancestral UCP2/3 gene may have occurred before the divergence of higher and lower vertebrate lineages. Alternatively, different duplication events of the ancestral UCP2/3 gene may have arisen through fish and higher vertebrate evolution. However, UCP2 has not been yet characterized in the fish *Sparidae* lineage since a red sea bream UCP2 sequence, firstly identified as UCP2 by Liang et al. (2003), has been recognized as UCP1 after more exhaustive BLAST searches and phylogenetic analyses (Emre et al. 2007). Furthermore, extensive work by RT-PCR with degenerated primers failed to detect the expression of UCP2 in gilthead sea bream (authors' unpublished observations), but genome sequencing is needed to sustain the apparent loss or silencing of UCP2 in this fish lineage.

The present study highlights that gilthead sea bream UCP3 is primarily expressed in skeletal muscle and heart. This is not surprising given the expression in muscle fibres of carp UCP3 (Jastroch et al. 2005) and the closely related avian UCP (Raimbault et al. 2001) and mammalian UCP3 counterparts (Boss et al. 1997; Vidal-Puig et al. 1997). Moreover, the expression rates of the gilthead sea bream UCP3 was highest in glycolytic muscle (white skeletal muscle) and lower in oxidative (red skeletal muscle) and cardiac muscle fibres. In carp, however, UCP3 is preferentially expressed in red oxidative

muscle, although fasting is able to strongly up-regulate UCP3 expression in white muscle fibre types (Jastroch et al. 2005). Samec et al. (2002) indicate that in rats there is not a muscle fibre-type-specific pattern for UCP3 mRNA levels in ad libitum fed animals, but other studies reveal a close negative association between UCP3 protein content and mRNA levels with fat oxidative capacity in white gastrocnemius, soleus and cardiac muscle (Hoeks et al. 2003). In the same line, protein expression of human UCP3 is highest in glycolytic muscle fibres and lower in oxidative ones (Hesselink et al. 2001). These findings does not easily match with a facilitative role for UCP3 in fatty acid oxidation, but available literature collectively indicates that UCP3 expression is enhanced when the energy supply exceeded the energy demand, which leads to the concept that UCP3 is mostly involved in fat metabolism rather than in the regulation of energy expenditure as recently reviewed by Nabben and Hoeks (2008).

Previous investigations in mammals (Samec et al. 2002) and birds (Abe et al. 2006), irrespective of the postulated mechanism of action, have shown a link between the uncoupling protein expression and fatty acid metabolism as an attempt to protect the cell against the detrimental effects of fatty acid accumulation. In the present study, we also addressed over a range of physiological models the specific expression of UCP1 and UCP3 in liver and white skeletal muscle, respectively. In this respect it must be noted that in gilthead sea bream the up-regulation of UCP1 and UCP3 with age was linked to increases in whole-body adiposity and reallocation of body fat depots. This was especially relevant for UCP3 (fourfold increase), which might mediate major changes in local free fatty-acid availability. This is not surprising given that rate-limiting enzymes on tissue fatty-acid uptake (e.g. lipoprotein lipase, LPL) are also highly expressed in the white skeletal muscle of 3-year-old gilthead sea bream (Saera-Vila et al. 2007). Hence, the rise in UCP3 transcripts can be viewed as a counter-regulatory response against the increased risk of lipid-oxidative stress. Similarly, the specific induction of LPL in the skeletal muscle of mouse leads to a rise in UCP3 mRNA (Kratky et al. 2001). Experimental evidence also indicates that UCP3 overexpression in transgenic mice blunts the age induced increase in ROS production (Nabben



et al. 2008). Overexpression of UCP2 and UCP3 also improves mice insulin sensitivity (Clapham et al. 2000; Horvath et al. 2003; Choi et al. 2007) and steatotic livers have chronically elevated levels of ROS and a higher counter-regulatory expression of UCP2 (Evans et al. 2008). Thus, while some doubts persist about the expression of UCP2 in hepatocytes of lean mice, UCP2 mRNA is approximately sixfold higher in genetically obese animals (Pecqueur et al. 2001).

A close association between UCP induction and dietary fatty acid overloads was also found in the current study after the total replacement of fish oil with vegetable oils. This nutritional model of deficiencies in omega-3 polyunsaturated fatty acids increases the flux of fatty acids from adipose tissue towards liver and skeletal muscle. Therefore, the enhanced expression of UCP3 in skeletal muscle and to a lower extent in the liver tissue, which also showed clear signs of lipid liver degeneration as evidenced elsewhere (Benedito-Palos et al. 2008), is not surprising. The opposite situation with the increase of energy demand was also analysed, and we found that the enhancement of metabolic rates after chronic confinement exposure significantly reduced the expression level of UCP1 in the liver tissue. At the same time, however, other life-essential mitochondrial proteins (e.g. glucose-regulated protein 75; mitochondrial stress-protein of the HSP70 family), with a wide range of antioxidant functions, were up-regulated (Bermejo-Nogales et al. 2007). Therefore, in this experimental model, the primary strategy of mitochondria for reducing oxidative stress would be the improvement of ROS scavenging and oxidative repair rather than the reduction of ROS production by respiration uncoupling. Similarly, aerobic exercise training decreases the muscle expression of UCP3 in rats (Peterson et al. 2008) but opposite effects after exercise exhaustion have been reported (Jiang et al. 2009), which suggests that the antioxidant strategy depends on the intensity, duration and nature of the oxidative-stressor.

UCP-mediated effects on whole-body thermogenesis have been considered in Antarctic fish (Mark et al. 2006). The involvement of fish UCP1 on local brain thermogenesis has also been suggested in carp (Jastroch et al. 2007), but the present study in gilthead sea bream does not support a significant

thermogenic role for hepatic UCP1 in ectothermic fish. This was based on the observation that the expression of hepatic UCP1 was highest in summer and autumn and markedly lower (2–3-fold) during cold exposure in winter. In this multivariate experiment, the down-regulated expression may be indicative that hepatic UCP1 is primarily under a negative in-season regulation that follows the temperature-mediated changes in metabolic rates and feeding levels. In the same line, hepatic expression of UCP1 is reduced by cold exposure in carp (Jastroch et al. 2005), but in both cases the experimental design does not allow to determine the specific effects due to changes in feed intake. Regarding white muscle expression in season, a similar conclusion can be drawn for UCP3 with a highest expression level in autumn rather than in winter. Moreover, the lowest expression was found in summer in coincidence with the increased demand of energy substrates for growth purposes. This expression pattern may be indicative that UCP3 in skeletal muscle is primarily under a positive regulation with the increased intracellular concentration of fatty acids to protect the cell against lipotoxicity. In gilthead sea bream and other fish species, we (Mingarro et al. 2002; Pérez-Sánchez et al. 2002) and other authors (Björnsson et al. 2002; Lynn et al. 2009) have demonstrated that growth hormone (GH), prolactin (PRL) and somatolactin provide an integrated signal for nutrient utilization and partitioning all year round, and it would be of interest to analyse the links between UCPs and fish GH/PRL family as key points of the endocrine cascade with overlapping functions in growth, fat deposition and reproduction.

To sum up, gilthead sea bream UCPs were unequivocally recognized as UCP1 and UCP3 counterparts. Each transcript had a tissue-specific expression pattern although more probably they show overlapping functions. Thus, major changes in both UCP1 and UCP3 were associated to switches in oxidative capacities in order to match both energy demand and antioxidant defence. This dual role is probably closely related to the ancestral protein UCP function, and allows the use of UCPs as lipotoxicity markers in ectothermic fish; although, the exact physiological function is so far unknown and requires more precise causal studies.

## Acknowledgements

The authors are grateful to E. Rial and anonymous reviewers for helpful suggestions and revision of the manuscript and M.A. González for excellent technical assistance in PCR assays. This work was partially funded by the European Union (FOOD-CT-2006-16249: Sustainable Aquafeeds to Maximise the Health Benefits of Farmed Fish for Consumers, AQUAMAX) and Spanish (Ingenio-2010 Programme; Improvement of Aquaculture Production by the use of biotechnological tools, AQUAGENOMICS) projects. AB-N was recipient of a PhD fellowship from CSIC-BANCAJA.

## References

- Abe T, Mujahid A, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M (2006) Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. *FEBS Lett* 580:4815–4822.
- Benedito-Palos L, Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Kaushik S, Pérez-Sánchez J (2007) Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267:199–212.
- Benedito-Palos L, Navarro JC, Sitjà-Bobadilla A, Bell JG, Kaushik S, Pérez-Sánchez J (2008) High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *Br J Nutr* 100:992–1003.
- Bermejo-Nogales A, Benedito-Palos L, Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J (2007) Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/mortalin/mtHsp70/PBP74/HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp Biochem Physiol* 149B:428–438.
- Björnsson BT, Johansson V, Benedet S, Einarisdóttir IE, Hildahl J, Agustsson T, Jönsson E (2002) Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol Biochem* 27:227–242.
- Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408:39–42.
- Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Boujard D, Pérez-Sánchez J (2003) Molecular cloning and characterization of gilthead sea

bream, (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp Biochem Physiol* 136B:1–13.

Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK, Liu ZX, Kim S, Collier EF, Kulkarni A, Distefano A, Hwang YJ, Kahn M, Chen Y, Yu CL, Moore IK, Reznick RM, Higashimori T, Shulman GI (2007) Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:1995–2003.

Clapham JC, Arch JRS, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GBT, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A (2000) Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406:415–418.

Emre Y, Hurtaud C, Ricquier D, Bouillaud F, Hughes J, Criscuolo F (2007) Avian UCP: the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins. *J Mol Evol* 65:392–402.

Evans ZP, Ellett JD, Schmidt MG, Schnellmann RG, Chavin KD (2008) Mitochondrial uncoupling protein-2 mediates steatotic liver injury following ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 283:8573–8579.

Gates AC, Bernal-Mizrachi C, Chinault SL, Feng C, Schneider JG, Coleman T, Malone JP, Townsend RR, Chakravarthy MV, Semenkovich CF (2007) Respiratory uncoupling in skeletal muscle delays death and diminishes age-related disease. *Cell Metab* 6:497–505.

Gonzalez-Barroso MD, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM (2000) The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *Obes Rev* 1:61–72.

Harper JA, Stuart JA, Jekabsons MB, Roussel D, Brindle KM, Dickinson K, Jones RB, Brand MD (2002) Artifactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem J* 361:49–56.

Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A, Nicholls DG (1978) Brown adipose tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem* 82:515–521.

Hesselink MKC, Keizer HA, Borghouts LB, Schaart G, Kornips CFP, Sliker LJ, Sloop KW, Saris WHM, Schrauwen P (2001) Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *FASEB J* 15:1071–1073.

Hoeks J, Hesselink MKC, van Bilsen M, Schaart G, van der Vusse GJ, Saris WHM, Schrauwen P (2003) Differential response of UCP3 to medium versus long chain triacylglycerols; manifestation of a functional adaptation. *FEBS Lett* 555:631–637.

Horvath T, Diano S, Miyamoto S, Barry S, Gatti S, Alberati D, Livak F, Lombardi A, Moreno M, Goglia F, Mor G, Hamilton J, Kachinskas D,

- Horwitz B, Warden CH (2003) Uncoupling proteins-2 and 3 influence obesity and inflammation in transgenic mice. *Int J Obes* 27:433–442.
- Hughes J, Criscuolo F (2008) Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. *BMC Evol Biol* 8:306.
- Hughes DA, Jastroch M, Stoneking M, Klingenspor M (2009) Molecular evolution of UCP1 and the evolution history of mammalian non-shivering thermogenesis. *BMC Evol Biol* 9:4.
- Jastroch M, Wuertz S, Kloas W, Klingenspor M (2005) Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol Genomics* 22:150–156.
- Jastroch M, Buckingham JA, Helwig M, Klingenspor M, Brand MD (2007) Functional characterisation of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain. *J Comp Physiol* 177B:743–752.
- Jastroch M, Withers KW, Taudien S, Frappell PB, Helwig M, Fromme T, Hirschberg V, Heldmaier G, McAllan BM, Firth BT, Burmester T, Platzer M, Klingenspor M (2008) Marsupial uncoupling protein 1 sheds light on the evolution of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol Genomics* 32:161–169.
- Jiang N, Zhang G, Bo H, Qu J, Ma G, Cao D, Wen L, Liu S, Ji LL, Zhang Y (2009) Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function. *Free Radic Biol Med* 46:138–145.
- Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N, Yamashita H (2005) UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4:147–155.
- Kozak LP, Koza RA (1999) Mitochondrial uncoupling proteins and obesity: molecular and genetic aspects of UCP1. *Int J Obes* 23:S33–S37.
- Kratky D, Strauss JG, Zechner R (2001) Tissue-specific activity of lipoprotein lipase in skeletal muscle regulates the expression of uncoupling protein 3 in transgenic mouse models. *Biochem J* 355:647–652.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248–261.
- Liang XF, Ogata HY, Oku H, Chen J, Hwang F (2003) Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major*. *Comp Biochem Physiol* 136A:655–661.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25:402–408.
- Locke RM, Rial E, Nicholls DG (1982) The acute regulation of mitochondrial proton conductance in cells and mitochondria from the brown fat of cold-adapted and warm-adapted guinea pigs. *Eur J Biochem* 129:381–387.

- Lynn SG, Powell KA, Westneats DF, Shepherd BS (2009) Seasonal and sex-specific mRNA levels of key endocrine genes in adult yellow perch (*Perca flavescens*) from Lake Erie. *Mar Biotechnol* 11:210–222.
- Mark FC, Lucassen M, Pörtner HO (2006) Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate Fish. *Comp Biochem Physiol* 1D:365–374.
- Mingarro M, Vega-Rubín de Celis R, Astola A, Pendón C, Valdivia MM, Pérez-Sánchez J (2002) Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen Comp Endocrinol* 128:102–111.
- Modrianský M, Murdza-Inglis DL, Patel HV, Freeman KB, Garlid KD (1997) Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition. *J Biol Chem* 272:24759–24762.
- Nabben M, Hoeks J (2008) Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac- and skeletal muscle metabolism. *Physiol Behav* 94:259–269.
- Nabben M, Hoeks J, Briedé JJ, Glatz JFC, Moonen-Kornips E, Hesselink MKC, Schrauwen P (2008) The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice. *FEBS Lett* 582:4147–4152.
- Nicholls DG, Locke RM (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64:1–64.
- Parker N, Crichton PG, Vidal-Puig AJ, Brand MD (2009) Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 41:335–342.
- Pecqueur C, Cassard-Doulcier AM, Raimbault S, Miroux B, Fleury C, Gelly C, Bouillaud F, Ricquier D (1999) Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 255:40–46.
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Lévi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B (2001) Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276:8705–8712.
- Pérez-Sánchez J, Caldach-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P, Saera-Vila A, Astola A, Valdivia MM (2002) Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol Biochem* 27:243–258.
- Peterson JM, Bryner RW, Frisbee JC, Alway SE (2008) Effects of exercise and obesity on UCP3 content in rat hindlimb muscles. *Med Sci Sports Exerc* 40:1616–1622.

Raimbault S, Dridi S, Denjean F, Lachuer J, Couplan E, Bouillaud F, Bordas A, Duchamp C, Taouis M, Ricquier D (2001) An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem J* 353:441–444.

Rial E, Poustie A, Nicholls DG (1983) Brown adipose tissue mitochondria: regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. *Eur J Biochem* 137:197–203.

Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Navarro I, Pérez-Sánchez J (2007) Tumour necrosis factor (TNF) $\alpha$  as a regulator of fat tissue mass in the Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp Biochem Physiol* 146B:338–345

Samec S, Seydoux J, Russell AP, Montani JP, Dulloo AG (2002) Skeletal muscle heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3, PPAR $\gamma$  and key enzymes of lipid oxidation. *Pflugers Arch* 445:80–86.

Solanes G, Vidal-Puig A, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997) The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short and long form transcripts. *J Biol Chem* 272:25433–25436.

Stuart JA, Harper KM, Brindle KM, Brand MD (1999) Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim Biophys Acta* 1413:50–54.

Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235:79–82.





### **Feed restriction up-regulates uncoupling protein 3 (UCP3) gene expression in heart and red muscle tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): New insights in substrate oxidation and energy expenditure**

Azucena Bermejo-Nogales, Laura Benedito-Palos, Josep Alvar Calduch-Giner, Jaume Pérez-Sánchez

Fish Nutrition and Growth Endocrinology Group, Department of Biology, Culture and Pathology of Marine Fish Species, Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, IATS-CSIC, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

**Comparative Biochemistry and Physiology, Part A (2011): 159 (3): 296-302.**



## ABSTRACT

The physiological regulation of the mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) remains practically unexplored in fish and the aim of this study was to examine the effects of ration size on the regulation of UCP3 in heart, red skeletal muscle and white skeletal muscle of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Juvenile fish were fed at three different levels for 11 weeks: i) full ration until visual satiety (R<sub>100</sub> group), ii) 70% of satiation (R<sub>70</sub> group) and iii) 70% of satiation with two finishing weeks at the maintenance ration (20% of the satiation level) (R<sub>70-20</sub> group). The thirty percent feed restriction improved fish performance, increasing feed conversion efficiency and circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I). Fish of the R<sub>70-20</sub> group showed reduced growth and low circulating levels of IGF-I in combination with increased circulating concentrations of growth hormone and free fatty acids. Feed restriction did not alter UCP3 transcript levels in white skeletal muscle, but improved this tissue's oxidative capacity as assessed by changes in glycolytic and oxidative mitochondrial enzyme activities. In contrast, in cardiac and red skeletal muscle tissues, this dietary treatment primarily increased UCP3 mRNA expression. The respiratory control ratio of freshly isolated heart mitochondria was slightly lower in R<sub>70-20</sub> fish than in R<sub>100</sub> fish, which suggests that there was an increase in mitochondrial uncoupling concomitant with the enhanced UCP3 mRNA expression. Altogether, these findings highlight the different adaptive mechanism of glycolytic and highly oxidative muscle tissues for their rapid adjustment to varying feed intake.

*Keywords:* Free fatty acids, Growth hormone, Heart, Insulin-like growth factor-I, Lipotoxicity, Mitochondrial respiration, Oxidative capacity, Skeletal muscle

## 6.1. Introduction

Uncoupling proteins (UCPs) are mitochondrial transporters that uncouple oxidative phosphorylation by the net discharge of proton gradient (Krauss et al., 2005). This protein family is widely distributed in animal phyla with a core group of three UCP genes that are expressed in a tissue-specific manner. In particular, UCP3 is preferentially expressed in skeletal muscle and to a lesser extent in heart (Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997). The physiological role of this UCP paralog is still under debate, but it may share a role as redox-sensor to match both energy demand and antioxidant defense in a wide range of physiological conditions. Thus, mammalian UCP3 counterparts are inversely related to fat oxidative capacity (Hoeks et al., 2003), are low in type 1 muscle fibers (Hesselink et al., 2001) and are reduced by endurance training (Russell et al., 2003; Schrauwen et al., 2005) and by predisposing factors for developing type 2 diabetes mellitus (Schrauwen et al., 2006b). Conversely, UCP3 is up-regulated by high fat diets (Hesselink et al., 2001) and elevated circulating levels of free fatty acids (Weigle et al., 1998).

In fish species, major changes in UCP3 mRNA expression are also associated to switches in energy demand or oxidative capacities. Thus, fasting up-regulates transcript levels of UCP3 in the skeletal muscle of carp (Jastroch et al., 2005). Likewise, UCP3 mRNA expression in ongrowing gilthead sea bream is markedly higher in glycolytic muscle (white skeletal muscle) than in highly oxidative muscle tissues (heart and red skeletal muscle) (Bermejo-Nogales et al., 2010). In the same study, it is highlighted that a close association between UCP3 and fatty acid metabolism with aging and seasonal changes on muscle fat deposition. Fish with signs of essential fatty acid deficiencies also share an altered pattern of UCP3 mRNA expression. In contrast, high stocking densities do not significantly alter UCP3 transcript levels, which is indicative that the regulation of UCP3 depends on the intensity, duration and nature of the stressor. In this sense, the aim of the present study was to underline the specific muscle-type regulation of UCP3 by ration size. To achieve this goal, juvenile gilthead sea bream

were fed at varying feeding levels: i) full ration, ii) 70% of satiation; and iii) 70% of satiation with a finishing period at the maintenance ration. Changes in UCP3 transcript levels and tissue oxidative capacity were assessed in heart, white skeletal muscle and red skeletal muscle. The study also included measurements of fish performance and oxygen consumption on freshly isolated heart mitochondria.

## 6.2. Materials and methods

### 6.2.1. Animal care, experimental setup and sampling

Juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) of Atlantic origin (Ferme Marine de Douhet, Ile d'Oléron, France) were acclimatized to laboratory conditions for 25 days before the start of the trial in the indoor experimental facilities of Institute Aquaculture Torre de la Sal (IATS). After this initial period, fish of 17 g initial mean body mass were randomly distributed into 500 L-tanks in triplicate groups of 50 fish each. Fish were fed from May to August (11 weeks) with a commercial diet (D-2 Excel 1P, Skretting, Stavanger, Norway) twice per day at three different feeding levels: i) full ration until visual satiety (R<sub>100</sub> group), ii) 70% of satiation (R<sub>70</sub> group) and iii) 70% of satiation with the last two weeks at the maintenance ration (20% of the satiation level), (R<sub>70-20</sub> group). The trial was conducted under natural photoperiod and temperature conditions at IATS latitude (40°5N; 0°10E). Water flow was 20 L/min, oxygen content of water effluents was always higher than 85% saturation, and unionized ammonia remained below toxic levels (<0.02 mg/L).

At the end of trial (following overnight fasting), nine randomly selected fish per dietary treatment were anesthetized with 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222, 100 µg/mL). Blood was taken with heparinized syringes from caudal vessels, centrifuged at 3000 g (20 min at 4 °C) and plasma aliquots stored at -80 °C until hormone and metabolite assays. Heart ventricles and tissue samples of white and red skeletal muscle (right-hand side) were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA extraction and enzyme activity analyses. From the same animals, whole filets from the left-hand side were taken for proximate composition analyses of skeletal muscle.

Mesenteric adipose tissue was excised from the ventral cavity and weighed to calculate the mesenteric fat index.

Additional fish from the two extreme groups (R<sub>100</sub> and R<sub>70-20</sub>) were sampled in consecutive days for measurements of oxygen consumption on pooled samples of freshly isolated heart mitochondria (three to four fish per dietary treatment).

All procedures were carried out according to the national (IATS-CSIC Review Board) and the current EU legislation on the handling of experimental animals.

### **6.2.2. Muscle proximate composition**

The proximate composition of skeletal muscle (whole filet of left-hand side) was analyzed by standard procedures (AOAC, 1990). Moisture content was determined by drying in an oven at 105 °C for 24 h. The remaining samples were freeze-dried and blended for lipid determinations using a Soxhlet 4001046 Auto extraction apparatus (Selecta, Barcelona, Spain) according to manufacturer's instructions.

### **6.2.3. Circulating hormone and lipid profiles**

Plasma GH levels were determined by a homologous gilthead sea bream radioimmunoassay (RIA) as reported elsewhere (Martínez-Barberá et al., 1995). The sensitivity and midrange (ED<sub>50</sub>) of the assay were 0.15 and 1.5–2 ng/mL, respectively. Plasma IGFs were extracted by acid–ethanol cryoprecipitation (Shimizu et al., 2000), and the concentration of IGF-I was measured by means of a generic fish IGF-I RIA validated for Mediterranean perciform fish (Vega-Rubín de Celis et al., 2004). The assay is based on the use of red sea bream (*Pagrus major*) IGF-I (GroPep, Adelaide, Australia) as tracer and standard, and anti-barramundi (*Lates calcarifer*) IGF-I serum (GroPep) (1:8000) as a first antibody. The sensitivity and midrange of the assay were 0.05 and 0.7–0.8 ng/mL, respectively. Plasma levels of triglycerides were measured by means of the Infinity triglycerides liquid stable reagent kit (Sigma, catalog no. 337B). Plasma cholesterol levels were measured using the Infinity cholesterol reagent kit (Sigma, catalog no. 401-25P). The Wako NEFA C test kit (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany, catalog no. 999-75406) was utilized as an *in vitro* enzymatic

colorimetric method for the quantization of non-esterified fatty acids in plasma.

#### **6.2.4. Gene expression**

Total RNA was extracted from heart and skeletal muscles using the ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reverse transcription (RT) with random decamers was performed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Measurements of muscle UCP3 transcript levels were made using an iCycler IQ Realtime Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described elsewhere (Bermejo-Nogales et al., 2010). Briefly, diluted RT reactions were used for PCR reactions in 25- $\mu$ L volume. Each PCR-well contained a SYBR GreenMasterMix (Bio-Rad), and specific gilthead sea bream primers for UCP3 (forward primer: 5'-AGG TGC GAC TGG CTG ACG; reverse primer: 5'-TTC GGC ATA CAA CCT CTC CAA AG) were used at a final concentration of 0.9  $\mu$ M. In parallel, cytochrome c oxidase subunit IV (COX IV) was PCR amplified with specific primers (forward primer: 5'-ACC CTG AGT CCA GAG CAG AAG TCC; reverse primer: 5'-AGC CAG TGA AGC CGA TGA GAA AGA) and used as housekeeping gene. The efficiency of PCR reactions for the target and the reference gene varied between 95% and 98%. Reactions were performed in triplicate and the fluorescence data acquired during the extension phase were normalized to COX IV by the delta–delta method (Livak and Schmittgen, 2001). No changes in COX IV transcript levels were found in response to varying feed intake.

#### **6.2.6. Enzyme activity assays**

The tissue oxidative capacity of heart (pooled tissue samples) and skeletal muscle (individual fish samples) was assessed by specific activity measurements of pyruvate kinase (PK; EC 2.7.40), lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27), citrate synthase (CS; EC 4.1.3.7.) and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HOAD; EC 1.1.1.35) as described elsewhere (Michaelidis et al., 2007) with minor modifications. Briefly, tissue samples were homogenized in 20 vol. of a cold CelLytic MT Cell Lysis Reagent (Sigma, catalog no. C3228), centrifuged at 14,000 g for 10 min at 4 °C and supernatant aliquots stored

at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . PK, LDH and HOAD activities were measured following the oxidation of NADH at 340 nm (mM extinction coefficient 6.22). CS activity was determined based on the reaction of free coenzyme A with DTNB (5'5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) at 412 nm (mM extinction coefficient 13.6). Enzyme activities were expressed as International milliunits per mg of protein. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to transform 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per min at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Protein content was determined with the Bio-Rad protein assay using bovine serum albumin (BSA) as standard.

### 6.2.6. Mitochondrial isolation and respiration

Heart mitochondria from the two extreme groups ( $R_{100}$  and  $R_{70-20}$ ) were isolated by differential centrifugation. Briefly, tissue samples were washed, fine minced, disrupted with a Dounce homogenizer and digested with trypsin (2.5 mg/mL) in 10 volumes of an ice-cold isolation medium (200mM mannitol, 50 mM sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 7.5). Defatted BSA was added to a final concentration of 10 mg/mL to quench the proteolytic reaction. After two spin cycles, digested samples were homogenized with 8 volumes of isolation medium and centrifuged at 900 g for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was then centrifuged at 9000 g for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the resulting pellet was the final mitochondria-enriched fraction. Prior to determination of protein concentration (Bio-Rad protein assay), isolated mitochondria were treated with 2% CHAPS in Tris buffered saline (150mM NaCl, 25mM Tris pH 7.2).

Intactness of the mitochondria inner membrane was assessed by means of the CS activity assay. The assay relies on the exclusiveness of CS as a marker of the mitochondrial matrix. Briefly, isolated mitochondria were suspended in a non-detergent Bicine buffer (1M pH 5.2) and centrifuged at 11,000 g for 10min. Pellets were then resuspended with either a Cell Lytic M Cell Lysis reagent (Sigma, catalog no. C2978) or bicine buffer. The percentage of mitochondria intactness was calculated as the CS activity ratio in the two mitochondria samples.

Oxygen consumption of isolated mitochondria was monitored polarographically using a Clark type electrode (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, U.K.). Briefly, mitochondria (0.5 mg protein/mL) were incubated at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a final volume



of 1 mL of incubation medium (125 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% defatted BSA (w/v), 10 mM HEPES pH 7.2) containing 8 μM rotenone. Measurements were carried out with succinate (6 mM) as substrate. The active state of respiration (state 3, S3) was defined as the rate of oxygen consumption in the presence of substrate and ADP (200 μM). State 4 (leak-dependent respiration, S4) was measured in the presence of the ATP synthase inhibitor oligomycin (4 μg/mL) and the respiratory control ratio (RCR) was calculated as the S3/S4 quotient. Mitochondria were uncoupled by adding 0.5 μM of the uncoupler carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy phenylhydrazone (FCCP).

### **6.2.7. Chemicals**

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

### **6.2.8. Statistical analysis**

Data on mitochondrial respiration was analyzed by Student t-test. Data on growth performance, tissue composition, gene expression and circulating levels of lipids and growth factors were analyzed by one-way ANOVA followed by Student Newman–Keuls (SNK) test (P<0.05). Data on tissue enzyme activities were analyzed by two-way ANOVA followed by SNK test (P<0.05). Pearson Product Moment correlations were used for correlation analysis of circulating levels of free fatty acids and UCP3 mRNA levels of heart and red skeletal muscle. All analyses were performed with the SPSS 17.0 program (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## 6.3. Results

### 6.3.1. Fish performance and metabolic condition

Effects of ration size on fish performance and circulating hormone and lipid profiles are shown in **Table 1**. Fish of the R<sub>100</sub> group grew from 17 to 72 g at specific growth rates ( $1.95 \pm 0.01\%$  mass day<sup>-1</sup>) in the upper range for this fish species and class size. The R<sub>70</sub> group had lower specific growth rates ( $1.68 \pm 0.01\%$  mass day<sup>-1</sup>) and final body mass ( $59.9 \pm 0.16$  g), but a significantly higher (by 10%) feed efficiency. In the R<sub>70-20</sub> group, feed intake was adjusted in the last two weeks to maintenance ration and the final body weight ( $48.7 \pm 0.13$  g) was reduced accordingly.

Viscerosomatic and hepatosomatic indices were progressively and significantly lowered with the reduction of feed intake. The same trend, but not statistically significant, was found for the mesenteric fat index. Muscle fat content was significantly reduced by 30% and 50% in R<sub>70</sub> and R<sub>70-20</sub> groups, respectively. This lower muscle lipid deposition was concurrent with a 3% increase of muscle water content in the R<sub>70-20</sub> group.

Plasma levels of GH increased progressively and significantly with the reduction of feed intake from  $5.2 \pm 1.1$  ng/mL to  $11.4 \pm 1.3$  ng/mL in R<sub>100</sub> and R<sub>70-20</sub> fish, respectively. The R<sub>70-20</sub> group had 40–50% lower circulating levels of IGF-I ( $36.9 \pm 2.2$  ng/mL) when compared with that measured in the R<sub>100</sub> ( $56.03 \pm 2.7$ ) and R<sub>70</sub> ( $67.7 \pm 4.8$  ng/mL) groups, respectively. Circulating levels of triglycerides and total cholesterol were also significantly reduced in the R<sub>70-20</sub> group. In contrast, plasma concentration of free fatty acids in fish with active growing (R<sub>100</sub> and R<sub>70</sub>) was  $0.09 \pm 0.01$  mM, whereas in fish at the maintenance group was markedly increased up to  $0.17 \pm 0.02$  mM.

**Table 1.** Growth performance, biometric indices, muscle composition and plasma levels of lipids and growth factors in gilthead sea bream fed at three different feeding levels. Full ration until visual satiety (R<sub>100</sub> group), 70% of satiety (R<sub>70</sub> group) and 70% of satiety with the last two weeks at 20% of satiety level (R<sub>70-20</sub> group). Data on fish growth performance are the mean±SEM of triplicate tanks. Data on biometric indices, muscle composition and circulating parameters are the mean±SEM of 9 individuals.

	R <sub>100</sub>	R <sub>70</sub>	R <sub>70-20</sub>	P <sup>1</sup>
Initial body mass (g)	17.06 ± 0.07	17.28 ± 0.07	17.10 ± 0.07	0.138
Final body mass (g)	72.55 ± 0.20 <sup>a</sup>	59.99 ± 0.16 <sup>b</sup>	48.67 ± 0.13 <sup>c</sup>	<0.001
DM intake (g/fish)	62.79 ± 2.5 <sup>a</sup>	44.09 ± 1.78 <sup>b</sup>	33.5 ± 1.35 <sup>c</sup>	0.002
SGR <sup>2</sup>	1.95 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.41 ± 0.01 <sup>c</sup>	<0.001
FE <sup>3</sup>	0.89 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>c</sup>	<0.001
Viscera (g)	7.10 ± 0.43 <sup>a</sup>	4.78 ± 0.29 <sup>b</sup>	3.27 ± 0.18 <sup>c</sup>	<0.001
Mesenteric fat (g)	1.05 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.58 ± 0.06 <sup>b</sup>	<0.001
Liver (g)	1.29 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>c</sup>	<0.001
VSI (%) <sup>4</sup>	9.49 ± 0.54 <sup>a</sup>	8.02 ± 0.26 <sup>b</sup>	6.69 ± 0.21 <sup>c</sup>	<0.001
MFI (%) <sup>5</sup>	1.40 ± 0.13	1.26 ± 0.22	1.19 ± 0.13	0.677
HSI (%) <sup>6</sup>	1.72 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.03 <sup>b</sup>	<0.001
Muscle moisture (%)	72.44 ± 0.36 <sup>a</sup>	74.75 ± 0.44 <sup>b</sup>	75.51 ± 0.53 <sup>b</sup>	<0.001
Muscle fat (%)	6.50 ± 0.40 <sup>a</sup>	4.49 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.36 ± 0.24 <sup>c</sup>	<0.001
GH (ng/mL)	5.25 ± 1.15 <sup>a</sup>	7.44 ± 1.49 <sup>ab</sup>	11.40 ± 1.30 <sup>b</sup>	0.003
IGF-I (ng/mL)	56.03 ± 2.75 <sup>a</sup>	67.75 ± 4.83 <sup>b</sup>	36.95 ± 2.20 <sup>c</sup>	<0.001
Triglycerides (mmol/l)	0.89 ± 0.17 <sup>ab</sup>	1.05 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.041
Cholesterol (mg/dl)	123.13 ± 7.70 <sup>a</sup>	121.13 ± 10.30 <sup>a</sup>	62.81 ± 2.70 <sup>b</sup>	<0.001
Free fatty acids (mmol/l)	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.004

<sup>1</sup>P values result from one-way analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among ration size (Student Newman-Keuls test, P<0.05).

<sup>2</sup>Specific growth rate = [100 × (ln final fish mass – ln initial fish mass)]/days.

<sup>3</sup>Feed efficiency = wet mass gain/dry feed intake. Values in the R<sub>70-20</sub> group were referred to the last two weeks close to maintenance ratio.

<sup>4</sup>Viscerosomatix index = (100 × viscera mass)/fish mass.

<sup>5</sup>Hepatosomatic index = (100 × liver mass)/fish mass.

<sup>6</sup>Mesenteric fat index = (100 × mesenteric fat mass.) /fish mass.

### 6.3.2. Tissue oxidative capacity

The activities of glycolytic (PK, LDH) and oxidative mitochondrial (CS, HOAD) enzymes were dependent on tissue, and a significant interaction between muscle-type and feeding regime was also found (**Table 2**). Thus, the overall activity of PK and LDH was lowest in heart and highest in the white skeletal muscle. Conversely, CS and HOAD activities were lowest in the white skeletal muscle and highest in heart or red skeletal muscle. Relative to the feeding level, all enzyme activities in the white skeletal muscle of R<sub>70-20</sub> fish were approximately double than those reported for fish fed to satiation. In the red skeletal muscle, a significant but lower increase (by 15–25%) of glycolytic enzyme activities was found in the R<sub>70-20</sub> group. In parallel, CS and HOAD activities were significantly decreased (by 16–20%) with the reduction of feed intake. Apparently, the cardiac muscle was less sensitive than skeletal muscle to nutritionally-mediated changes in tissue oxidative capacities, and no statistically significant changes were found for any of the analyzed enzymes.

### 6.3.3. UCP3 gene expression

The tissue-specific regulation of UCP3 by ration size is shown in **Fig. 1**. In the white skeletal muscle, ration size did not affect UCP3mRNA expression when it was normalized to COX IV, although UCP3 transcript levels were 10–20 times higher in the whole muscle than in heart or red muscle. In contrast, a marked up-regulation in UCP3 transcript levels was seen in both heart and red skeletal muscle as feed intake was decreased. These nutritionally-mediated changes in UCP3 gene expression were positively correlated in red skeletal muscle (correlation coefficient, 0.49; P<0.018) and heart (correlation coefficient, 0.54; P<0.029) with circulating levels of free fatty acids.

**Table 2.** Muscle enzymes activities (mU/mg protein) in gilthead sea bream fed at three different feeding levels. Full ration until visual satiety (R<sub>100</sub> group), 70% of satiation (R<sub>70</sub> group) and 30% of satiation with the last two weeks at 20% of satiation level (R<sub>70-20</sub> group). Data on white and red skeletal muscle tissues are the mean  $\pm$  SEM of 7-9 individuals. Data on heart are the mean  $\pm$  SEM (n = 3) of pooled tissue samples from each tank experimental unit (three fish for each pool).

		Glycolysis			Citric acid cycle		B-oxidation	
		PK <sup>1</sup>	LDH <sup>2</sup>	CS <sup>3</sup>	HOAD <sup>4</sup>	HOAD <sup>4</sup>	HOAD <sup>4</sup>	
White Skeletal Muscle	R <sub>100</sub>	1308.7 $\pm$ 71.2 <sup>a</sup>	4923.5 $\pm$ 375.5 <sup>a</sup>	20.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>			
	R <sub>70</sub>	1493.1 $\pm$ 84.7 <sup>a</sup>	7368.7 $\pm$ 417.7 <sup>b</sup>	22.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>			
	R <sub>70-20</sub>	2870.7 $\pm$ 66.4 <sup>b</sup>	13902.7 $\pm$ 530.7 <sup>c</sup>	39.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	8.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>			
Red Skeletal Muscle	R <sub>100</sub>	1826.1 $\pm$ 50.4 <sup>a</sup>	3923.6 $\pm$ 82.6 <sup>a</sup>	145.0 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	150.6 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>			
	R <sub>70</sub>	1650.0 $\pm$ 123.8 <sup>a</sup>	3874.6 $\pm$ 164.5 <sup>a</sup>	112.1 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>	127.9 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>			
	R <sub>70-20</sub>	2363.0 $\pm$ 156.2 <sup>b</sup>	4465.7 $\pm$ 168.7 <sup>b</sup>	116.7 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>	113.3 $\pm$ 3.2 <sup>c</sup>			
Heart	R <sub>100</sub>	809.9 $\pm$ 53.5	3010.3 $\pm$ 57.0	245.5 $\pm$ 12.6	74.5 $\pm$ 15.7			
	R <sub>70</sub>	720.1 $\pm$ 79.8	3014.2 $\pm$ 158.5	263.3 $\pm$ 8.7	72.5 $\pm$ 3.0			
	R <sub>70-20</sub>	758.2 $\pm$ 140.5	3830.3 $\pm$ 327.6	276.4 $\pm$ 25.1	104.3 $\pm$ 5.3			
two-way ANOVA (P value)								
Tissue		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001			
Ration		<0.001	<0.001	0.001	<0.001			
Tissue x Ration		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001			

<sup>1</sup>PK, pyruvate kinase; <sup>2</sup>LDH, lactate dehydrogenase; <sup>3</sup>CS, citrate synthase; <sup>4</sup>HOAD, 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student Newman-Keuls test, P<0.05).

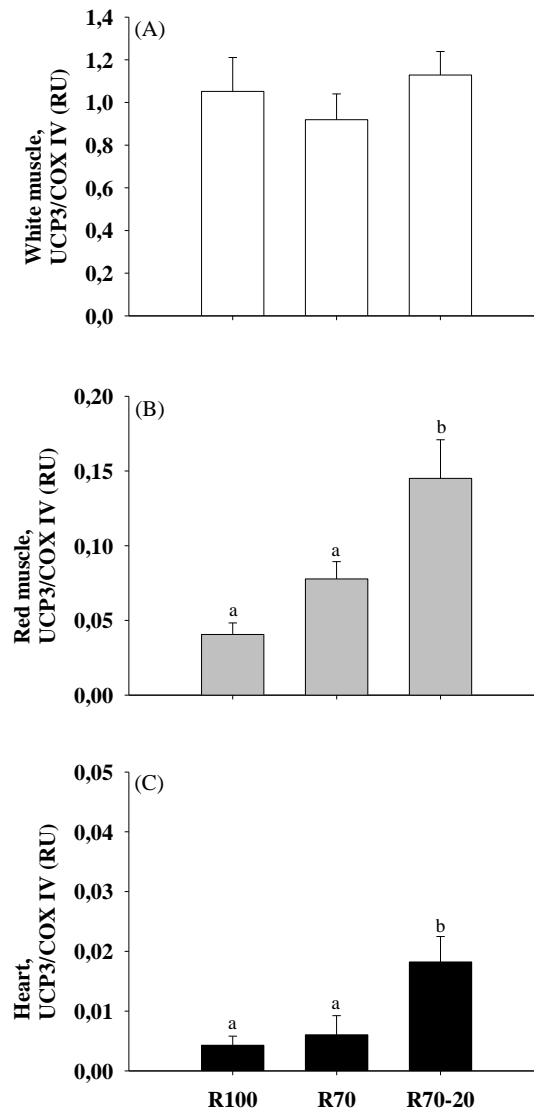
### 6.3.4. Respiration uncoupling

The integrity of isolated mitochondria, measured as CS activity ratio, was always higher than 80%, and maximal chemical uncoupling after FCCP induction was not altered by dietary treatment ( $R_{100}$  vs.  $R_{70-20}$  fish). However, the RCR of coupled mitochondria in fish of the  $R_{70-20}$  group was  $2.21 \pm 0.08$ , which represents a slight but statistically significant decrease over the reference values ( $2.93 \pm 0.23$ ) in fish of the of  $R_{100}$  group (**Fig. 2**).

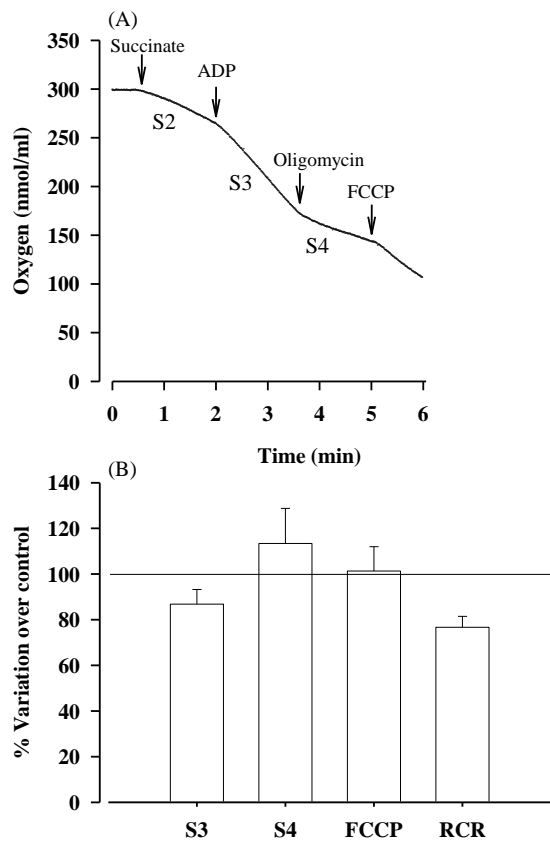
## 6.4. Discussion

The regulation of feed intake is an evolutionary adaptation that integrates signals of appetite, satiation and energy balance in higher and lower vertebrate species (Bernier and Peter, 2001; Volkoff et al., 2010). Nevertheless, the fine regulation of feed intake is still a matter of intense debate and now becomes evident that unrestricted feeding do not necessarily improve growth performance in a wide range of fish species, including sturgeon (Hung and Lutes, 1987), rainbow trout (Storebakken and Austreng, 1987), tilapia (Papoutsoglou and Voutsinos, 1988), striped bass (Hung et al., 1993), grass carp (Du et al., 2006) and mangrove red snapper (Abbas and Siddiqui, 2009). Hence, an effective control of feed intake to avoid liver GH-desensitization is absent and/or deficient in gilthead sea bream fed high lipid-enriched diets (Pérez-Sánchez et al., 1995). Importantly, also in this fish species, high fat diets (Sitjà-Bobadilla and Pérez-Sánchez, 1999) and long-term unrestricted feeding (Sitjà-Bobadilla et al., 2003) increase the prevalence and progression of fish parasite infections, which agrees with the notion that dietary requirements for optimal growth do not necessarily coincide with those for optimal functioning of the immune system.

Overfeeding is also perceived as an increased risk of oxidative stress (Faine et al., 2002; Evans et al., 2004), and the inhibition of fatty acid oxidation and mitochondrial oxidative phosphorylation in peripheral tissues is viewed in rats fed high fat diets as an adaptive response to limit the production of reactive oxygen species (ROS) with nutrient excess (Obici et al., 2002; Obici and Rossetti, 2003). Fish also adopt multiple strategies to cope with periods of nutrient excess or enhanced



**Fig 1.** Effect of ration size on transcript levels of UCP3 in white skeletal muscle (A), red skeletal muscle (B) and heart (C). Data are the mean  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). COX IV is used as housekeeping gene and gene expression values in the white skeletal muscle of R<sub>100</sub> fish were used as reference values in the normalization procedure (RU relative units). Different letters above each bar indicate statistical significant differences among groups ( $P < 0.05$ ; Student Newman-Keuls test).



**Fig 2.** (A) Polarographic oxygen electrode trace of freshly isolated heart mitochondria after succinate, ADP, oligomycin and FCCP induction. (B) Oxygen consumption (S3, S4, FCCP uncoupling) and respiratory control ratio (RCR) in fish at the maintenance ratio ( $R_{70-20}$  group) are expressed as a percentage over control values ( $R_{100}$ , full ration until visual satiety). Data are the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ) of fish processed at the same time. Statistical significant differences between groups are indicated (\* $P < 0.05$ ; Student's  $t$  test).



energy demand. For instance, the shift from glycolytic towards lipid and protein catabolism is a well-known metabolic adaptation to face long fasting spawning migration in salmonids (Mommsen, 2004; Miller et al., 2009). High intensity training also shifts the proportion of energy derived from fat oxidation to carbohydrate-derived energy in swimming muscles of sea trout (Anttila et al., 2010). In particular, in the present study, feed restriction reduced body fat stores leading to two different energy steady states. Thus, the R<sub>70</sub> group had improved fish performance and increased circulating levels of IGF-I, which can be viewed as a healthy metabolic condition in comparison to fish fed to satiation. In contrast, the R<sub>70-20</sub> fish showed low circulating levels of IGF-I in combination with a hypersomatotropic state (increased circulating levels of GH) that is indicative of liver GH-desensitization (loss of hepatic GH receptors) and impaired growth performance as reported previously in a wide range of gilthead sea bream malnutrition models, arising from changes in diet composition and feeding levels (Pérez-Sánchez et al., 1995; Pérez-Sánchez and Le Bail, 1999; Pérez-Sánchez et al., 2002; Gómez-Requeni et al., 2004; Benedito-Palos et al., 2007).

In the present study, UCP3 transcript levels were 10–20 times higher in white than in red skeletal muscle regardless of ration size. Muscle-type differences in UCP3 mRNA expression were even more evident (up to 100 fold) when comparisons were made between skeletal muscle and heart. This agrees with the global concept that UCP3 is preferentially expressed in the glycolytic skeletal muscle and to a lower extent in the highly oxidative cardiac muscle (Hesselink et al., 2001; Schrauwen et al., 2001). Moreover, it is generally accepted that UCP3 transcripts are up-regulated when fatty acid supply to the mitochondria exceeds the oxidative capacity (Schrauwen et al., 2006a; Nabben and Hoeks, 2008). In other words, UCP3 would act as a safety valve that activates a futile cycle of energy that becomes rapidly inactive when the oxidative capacity of glycolytic muscles is improved. However, in aerobic muscles, the compensatory mechanisms via substrate oxidation are theoretically less operative, and respiration uncoupling would match the antioxidant defense system to protect the mitochondria against lipid-induced oxidative stress. This idea is supported by

the tissue-specific regulation of UCP3 mRNA transcript levels in cardiac and skeletal muscle tissues of gilthead sea bream. In the same line, UCP3 protein content is increased either by short- or long-term caloric restriction in rat glycolytic-fiber muscles, which facilitates substrate oxidation over energy storage during reduced nutrient availability (Bevilacqua et al., 2004, 2005). However, the chicken UCP3 counterpart (avian-UCP) is quickly up-regulated by fasting in the glycolytic pectoralis muscle (Abe et al., 2006). A simple explanation for these apparently contradictory results remains unclear, although species differences in muscle fiber-type composition, thermoregulation, oxidative capacity and energy status can be hypothesized.

Attempts to correlate energy status and UCP3 transcript levels are sometimes confusing, but in rodents the overall literature supports the up-regulation of UCP3 by high fat diets (Matsuda et al., 1997; Hoeks et al., 2003) and lipid emulsions (Weigle et al., 1998). Consistent with these findings, recombinant human UCP3 reconstituted into liposomes and assayed for fatty acids shares an enhanced proton efflux inhibited by purine nucleotides (Jabůrek et al., 1999; Žáčková et al., 2003). Moreover, uncoupling UCP3 activity in permeabilized muscle-fibers of 18 h exercised rats becomes evident upon the addition of palmitate or under substrate conditions eliciting substantial rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission (Anderson et al., 2007). Changes in circulating free fatty acids also appear to mediate the nutritional and developmental regulation of UCP3 gene expression in humans and rodents (Boss et al., 1998a, 1998b; Brun et al., 1999; Peterson et al., 2008). Less is known in fish, but UCP3 mRNA levels are increased by fasting in the skeletal muscle of carp (Jastroch et al., 2005). This fasting response would be mediated by the increase of circulating free fatty acids, and interestingly we found for the first time in fish a positive correlation between circulating levels of free fatty acids and UCP3 mRNA expression in heart and red skeletal muscle when UCP3 transcripts are normalized to COX IV, one of the most common biomarkers of mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation (Kadenbach et al., 2000; Mitchell et al., 2002).

In the end, there is no doubt about the significant role of UCP3 in muscle metabolism, but the question that arises is whether the increases in UCP3 mRNA expression are

accompanied by an increased mitochondrial proton leak. As reviewed by Nabben and Hoeks (2008), isolated mitochondria from mice lacking UCP3 show a significant decrease in S4 respiration (Vidal-Puig et al., 2000) and an increased proton motive force (Gong et al., 2000). However, many studies fail to observe changes in S4 respiration, proton conductance, total oxygen consumption or body mass gain in UCP3 knockout animals. More limited are data about the role of UCP3 in cardiac energy metabolism, but again contradictory results are found when the role of UCP3 in respiration uncoupling (S3/S4 respiration) is considered (Nabben and Hoeks, 2008). Hence, a common feature is an increased concentration of circulating fatty acids. In that context, Murray et al. (2004) reported that increased cardiac UCP3 levels in heart failure patients are positively correlated to the amount of circulating free fatty acids, which may suggest a primary role for UCP3 in fatty acid metabolism rather than in energy metabolism. In the same way, the compromise of the oxidative phosphorylation efficiency due to UCP2/3 up-regulation would serve in heart (Bo et al., 2008) and skeletal muscle (Jiang et al., 2009) as an antioxidant function to protect the mitochondria during exercise-induced oxidative stress. The increase of uncoupling respiration has been associated to thermal resistance in various species of triplefin fish, and in the last term this might contribute to heart failure at ecologically high temperatures (Hilton et al., 2010). Significantly, the present study pointed out changes in mitochondrial respiration uncoupling in response to varying feed intake. These findings are far from conclusive due to limited number of respiratory measurements, although it is noteworthy that this is the first report linking in fish mitochondrial respiration uncoupling with increases in UCP3 mRNA expression and circulating levels of free fatty acids.

In summary, UCP3 gene expression is nutritionally regulated in a tissue-specific manner in gilthead sea bream. Thus, in the glycolytic white skeletal muscle, feed restriction increases the tissue oxidative capacity rather than UCP3 expression. In contrast, in highly oxidative tissues, feed restriction primarily up-regulates UCP3 gene expression in coincidence with the increase of circulating free fatty acid levels. Hence, UCP3 emerges as a promising muscle fish biomarker of lipotoxicity that would

protect mitochondria against oxidative stress. This is of special relevance in aquaculture practice due to the increased use of lipid energized diets and high feeding schedules to maximize fish growth.

### Acknowledgements

The research was funded by AQUAGENOMICS (CSD2007-00002, Improvement of aquaculture production by the use of biotechnological tools) and AQUAFAT (AGL2009-07797; Predictive modeling of flesh fatty acid composition in cultured fish species with different muscle lipid content) projects. Additional funding was obtained from the “Generalitat Valenciana” (research grant PROMETEO 2010/006). The authors are grateful to M.A. González for the excellent technical assistance in PCR analysis.

### References

- Abbas, G., Siddiqui, P.J.A., 2009. Effects of different feeding level on the growth, feed efficiency and body composition of juvenile mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal 1775). *Aquac. Res.* 40, 781–789.
- Abe, T., Mujahid, A., Sato, K., Akiba, Y., Toyomizu, M., 2006. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. *FEBS Lett.* 580, 4815–4822.
- Anderson, E.J., Yamazaki, H., Neuffer, P.D., 2007. Induction of endogenous uncoupling protein 3 suppresses mitochondrial oxidant emission during fatty acid-supported respiration. *J. Biol. Chem.* 282, 31257–31266.
- Anttila, K., Jäntti, M., Mänttari, S., 2010. Effects of training on lipid metabolism in swimming muscles of sea trout (*Salmo trutta*). *J. Comp. Physiol. B* 180, 707–714.
- AOAC, Association of official analytical chemists, 1990. *Official Methods of analysis*. K Heldrich Ed. Arlington, VA.
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2007. Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267, 199–212.
- Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J., Pérez-Sánchez, J., 2010. Gene expression survey of mitochondrial uncoupling proteins (UCP1/UCP3) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *J. Comp. Physiol. B* 180, 685–694.

- Bernier, N.J., Peter, R.E., 2001. The hypothalamic–pituitary–interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 639–644.
- Bevilacqua, L., Ramsey, J.J., Hagopian, K., Weindruch, R., Harper, M.E., 2004. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E852–E861.
- Bevilacqua, L., Ramsey, J.J., Hagopian, K., Weindruch, R., Harper, M.E., 2005. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E429–E438.
- Bo, H., Jiang, N., Ma, G., Qu, J., Zhang, G., Cao, D., Wen, L., Liu, S., Ji, L.L., Zhang, Y., 2008. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1373–1381.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., Giacobino, J.P., 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 408, 39–42.
- Boss, O., Bobbioni-Harsch, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Muzzin, P., Munger, R., Giacobino, J.-P., Golay, A., 1998a. Uncoupling protein-3 expression in skeletal muscle and free fatty acids in obesity. *Lancet* 351 (1933-1933).
- Boss, O., Samec, S., Kühne, F., Bijlenga, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Giacobino, J.-P., Muzzin, P., 1998b. Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J. Biol. Chem.* 273, 5–8.
- Brun, S., Carmona, M.C., Mampel, T., Viñas, O., Giralt, M., Iglesias, R., Villarroya, F., 1999. Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett.* 453, 205–209.
- Du, Z.-Y., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., He, J.-G., Cao, J.-M., Liang, G.-Y., 2006. The influence of feeding rate on growth, feed efficiency and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquacult. Int.* 14, 247–257.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567, 1–61.
- Faine, L.A., Diniz, Y.S., Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Ribas, B.O., 2002. Toxicity of ad lib. overfeeding: effects on cardiac tissue. *Food Chem. Toxicol.* 40, 663–668.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martín, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to

fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493–510.

Gong, D.-W., Monemdjou, S., Gavriloova, O., Leon, L.R., Marcus-Samuels, B., Chou, C.J., Everett, C., Kozak, L.P., Li, C., Deng, C., Harper, M.-E., Reitman, M.L., 2000. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem.* 275, 16251–16257.

Hesselink, M.K.C., Keizer, H.A., Borghouts, L.B., Schaart, G., Kornips, C.F.P., Sliker, L.J., Sloop, K.W., Saris, W.H.M., Schrauwen, P., 2001. Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *FASEB J.* 15, 1071–1073.

Hilton, Z., Clements, K., Hickey, A., 2010. Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J. Comp. Physiol. B* 180, 979–990.

Hoeks, J., Hesselink, M.K.C., van Bilsen, M., Schaart, G., van der Vusse, G.J., Saris, W.H.M., Schrauwen, P., 2003. Differential response of UCP3 to medium versus long chain triacylglycerols; manifestation of a functional adaptation. *FEBS Lett.* 555, 631–637.

Hung, S.S.O., Lutes, P.B., 1987. Optimum feeding rate of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): at 20 °C. *Aquaculture* 65, 307–317.

Hung, S.S.O., Conte, F.S., Hallen, E.F., 1993. Effects of feeding rates on growth, body composition and nutrient metabolism in striped bass (*Morone saxatilis*) fingerlings. *Aquaculture* 112, 349–361.

Jabůrek, M., Vařecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Ježek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A., Garland, K.D., 1999. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J. Biol. Chem.* 274, 26003–26007.

Jastroch, M., Wuertz, S., Kloas, W., Klingenspor, M., 2005. Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol. Genomics* 22, 150–156.

Jiang, N., Zhang, G., Bo, H., Qu, J., Ma, G., Cao, D., Wen, L., Liu, S., Ji, L.L., Zhang, Y., 2009. Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 138–145.

Kadenbach, B., Hüttemann, M., Arnold, S., Lee, I., Bender, E., 2000. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 211–221.

Krauss, S., Zhang, C.Y., Lowell, B.B., 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 248–261.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402–408.

Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Calduch-Giner, J.A., Rodríguez, R.B., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., 1995. The use of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 110, 335–340.

Matsuda, J., Hosoda, K., Itoh, H., Son, C., Doi, K., Tanaka, T., Fukunaga, Y., Inoue, G., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Yamori, Y., Nakao, K., 1997. Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed highfat diet. *FEBS Lett.* 418, 200–204.

Michaelidis, B., Spring, A., Pörtner, H.O., 2007. Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Mar. Biol.* 150, 1417–1429.

Miller, K.M., Schulze, A.D., Ginther, N., Li, S., Patterson, D.A., Farrell, A.P., Hinch, S.G., 2009. Salmon spawning migration: Metabolic shifts and environmental triggers. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 4, 75–89.

Mitchell, C.R., Harris, M.B., Cordaro, A.R., Starnes, J.W., 2002. Effect of body temperature during exercise on skeletal muscle cytochrome c oxidase content. *J. Appl. Physiol.* 93, 526–530.

Mommsen, T.P., 2004. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 383–400.

Murray, A.J., Anderson, R.E., Watson, G.C., Radda, G.K., Clarke, K., 2004. Uncoupling proteins in human heart. *Lancet* 364, 1786–1788.

Nabben, M., Hoeks, J., 2008. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac and skeletal muscle metabolism. *Physiol. Behav.* 94, 259–269.

Obici, S., Rossetti, L., 2003. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology* 144, 5172–5178.

Obici, S., Wang, J., Chowdury, R., Feng, Z., Siddhanta, U., Morgan, K., Rossetti, L., 2002. Identification of a biochemical link between energy intake and energy expenditure. *J. Clin. Invest.* 109, 1599–1605.

Papoutsoglou, S.E., Voutsinos, G.A., 1988. Influence of feeding level on growth rate of *Tilapia aureus* (Steindachner) reared in a closed circulated system. *Aquac. Res.* 19, 291–298.

Pérez-Sánchez, J., Le Bail, P.Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117–128.

- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Kaushik, S.J., 1995. Ration size and protein-intake affect circulating growth-hormone concentration, hepatic growth-hormone binding and plasma insulin-like growth-factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546–552.
- Pérez-Sánchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., Valdivia, M.M., 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 243–258.
- Peterson, J.M., Bryner, R.W., Frisbee, J.C., Alway, S.E., 2008. Effects of exercise and obesity on UCP3 content in rat hindlimb muscles. *Med. Sci. Sports Exerc.* 40, 1616–1622.
- Russell, Wadley, Hesselink, Schaart, Lo, Léger, Garnham, Kornips, Cameron, S., Giacobino, Muzzin, Snow, Schrauwen, 2003. UCP3 protein expression is lower in type I, IIa and IIx muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects. *Pflugers Arch.* 445, 563–569.
- Schrauwen, P., Hoppeler, H., Billeter, R., Bakker, A.H.F., Pendergast, D.R., 2001. Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int. J. Obes.* 25, 449–456.
- Schrauwen, P., Russell, A.P., Moonen-Kornips, E., Boon, N., Hesselink, M.K.C., 2005. Effect of 2 weeks of endurance training on uncoupling protein 3 content in untrained human subjects. *Acta Physiol. Scand.* 183, 273.
- Schrauwen, P., Hoeks, J., Hesselink, M.K.C., 2006a. Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? *Prog. Lipid Res.* 45, 17–41.
- Schrauwen, P., Mensink, M., Schaart, G., Moonen-Kornips, E., Sels, J.-P., Blaak, E.E., Russell, A.P., Hesselink, M.K.C., 2006b. Reduced skeletal muscle uncoupling protein-3 content in prediabetic subjects and type 2 diabetic patients: restoration by rosiglitazone treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1520–1525.
- Shimizu, M., Swanson, P., Fukada, H., Hara, A., Dickhoff, W.W., 2000. Comparison of extraction methods and assay validation for salmon insulin-like growth factor-I using commercially available components. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 26–36.
- Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 1999. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 9, 637–640.
- Sitjà-Bobadilla, A., Mingarro, M., Pujalte, M.J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2003. Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture* 220, 707–724.



Storebakken, T., Austreng, E., 1987. Ration level for salmonids: I. Growth, survival, body composition, and feed conversion in Atlantic salmon fry and fingerlings. *Aquaculture* 60, 189–206.

Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Pérez-Sánchez, J., 2004. Production and characterization of recombinantly derived peptides and antibodies for accurate determinations of somatolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 266–277.

Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J.S., Lowell, B.B., 1997. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 79–82.

Vidal-Puig, A.J., Grujic, D., Zhang, C.Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D.M., Lowell, B.B., 2000. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16258–16266.

Volkoff, H., Hoskins, L.J., Tuziak, S.M., 2010. Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: potential application in aquaculture. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 352–359.

Weigle, D.S., Selfridge, L.E., Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Cummings, D.E., Havel, P.J., Kuijper, J.L., Beltran del Rio, H., 1998. Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. *Diabetes* 47, 298–302.

Žáčková, M., Škobisová, E., Urbánková, E., Ježek, P., 2003. Activating  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J. Biol. Chem.* 278, 20761–20769.



## CAPÍTULO 7

### Discusión general



## 7.1. ¿Por qué la mitocondria?

La acuicultura, al igual que otros sectores de producción animal, está sujeta a procesos de diversificación y diferenciación, por lo que es una demanda urgente del sector el definir marcadores de alto valor predictivo para mejorar los cultivos ya existentes y/o determinar en qué medida es viable el cultivo de una nueva especie. Estos marcadores deben cubrir un amplio espectro de variables que tomadas en conjunto ofrezcan información precisa del estado de bienestar animal. Es más, el interés en la búsqueda de este tipo de marcadores radica en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y de prognosis que tengan en cuenta aspectos de gestión y manejo de stocks en conjunción con otros relacionados con el estado nutricional y de salud en general.

Las nuevas tecnologías “ómicas” aportan información relevante sobre procesos fisiológicos y están poniendo de manifiesto la interconexión entre los sistemas que regulan el crecimiento, el sistema inmune y el balance redox, mostrando que la respuesta es específica tanto del tejido como del tipo de agente estresante. Por ejemplo, se han utilizado chips de ADN (*microarrays*) para describir la respuesta al estrés por confinamiento en dorada (Calduch-Giner y cols., 2010), a la exposición a lipopolisacáridos y al sulfato de cobre en el lenguado senegalés (Osuna-Jiménez y cols., 2009), al cadmio en la platija europea (Shedder y cols., 2006) y a la furunculosis en el salmón del Atlántico (Škugor y cols., 2009). Asimismo, se han utilizado técnicas de proteómica para analizar la respuesta del ayuno y realimentación en pez cebra (Enyu y Shu-Chien, 2011) y del estrés agudo por confinamiento en el salmón del Atlántico (Veiseth-Kent y cols., 2010).

En este contexto, la mitocondria juega un papel clave ya que es el orgánulo dónde se localiza gran parte de la producción de ROS, lo que directa o indirectamente comporta cambios u alteraciones de la capacidad oxidativa y de la biogénesis mitocondrial (Lee y Wei, 2005; Murphy, 2009; Rigoulet y cols., 2011). Así por ejemplo, en peces de aguas frías la mayor

capacidad oxidativa del músculo rojo se debe al aumento del volumen y densidad mitocondrial (Johnston y cols., 1998); mientras que en especies intermareales y submareales el aumento de la temperatura y el metabolismo basal disminuyen el acoplamiento respiratorio de las mitocondrias del corazón (Hilton y cols., 2010). Este mismo fenómeno se ha observado con los cambios de estación en el músculo rojo de truchas arco iris, de modo que las mitocondrias de este tejido poseen durante el invierno una mayor capacidad de oxidación y acoplamiento de la respiración (Guderley y St Pierre, 1999). En la misma línea, Martín y cols. (2009) han demostrado que el aumento de la capacidad oxidativa está relacionado en trucha arco iris con la reducción del fotoperiodo, lo que se ve acentuado con el descenso de la temperatura. Por otro lado, la exposición a tóxicos también afecta a la función mitocondrial. Así por ejemplo, bajas concentraciones de decavanadato inhiben en la dorada la respiración e inducen la despolarización de las mitocondrias del músculo cardíaco (Soares y cols., 2007).

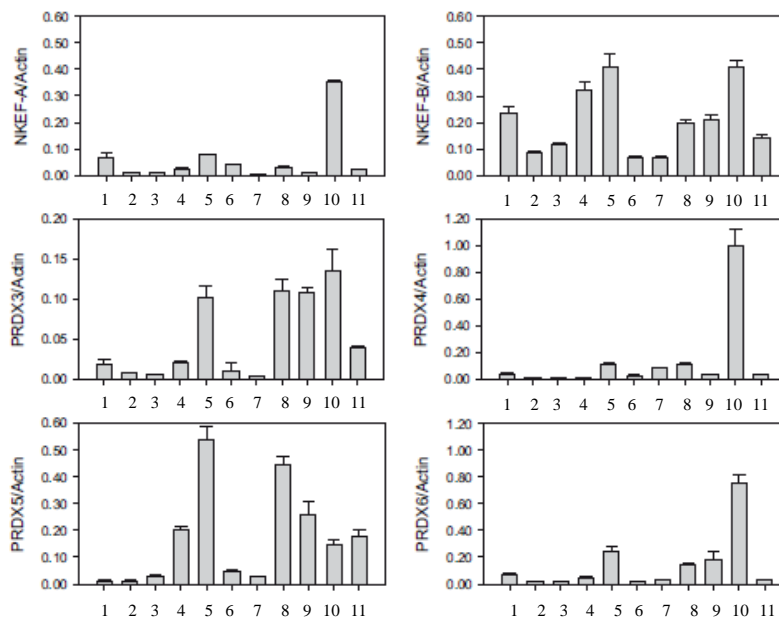
Estudios nutricionales en trucha arco iris relacionan la composición en ácidos grasos de la dieta y mitocondrias de músculo rojo, de modo que las mitocondrias de animales alimentados con dietas de bajo contenido en DHA tienen mayor control respiratorio a 5° C que a 15° C (Guderley y cols., 2008). Otros trabajos han utilizado diferentes componentes de la cadena de respiración mitocondrial como marcadores de eficiencia energética de cepas o familias de bagre del canal (Eya y cols., 2010). Así, con independencia de la cepa, los peces alimentados con la dieta de mayor contenido energético poseen una mayor actividad de las enzimas de la cadena respiratoria. Por el contrario, la cepa con mejor eficiencia energética presenta una mayor actividad del complejo I y del complejo IV en hígado y músculo y del complejo II en hígado e intestino. En todo caso, éste es un equilibrio enormemente complejo, y estos mismos autores han observado que las familias de trucha arco iris con una utilización más eficiente de los nutrientes presentan una baja expresión del complejo I en hígado y alta en músculo e intestino. (Eya y cols., 2011).

Por tanto, si bien son todavía escasos los estudios que relacionan la función mitocondrial con la eficiencia de un determinado cultivo, la mitocondria como tal va cobrando un papel cada vez más relevante como biomarcador en acuicultura, por lo que el objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido el estudio de la regulación funcional de la GRP75/mortalina y las UCPs como marcadores mitocondriales de estrés oxidativo y lipotoxicidad. Los resultados obtenidos muestran que estos marcadores son buenos indicadores de las condiciones de cultivo así como del estado nutricional y de inmunocompetencia. Además, sirven para determinar el establecimiento de niveles basales de riesgo. Por tanto, son herramientas que en conjunción con otros marcadores pueden ser de utilidad a la hora de definir la estrategia más adecuada para un determinado cultivo u explotación.

Un buen ejemplo, como ya se apuntaba en el **capítulo 1**, son las PRDXs. De hecho, a lo largo de la presente Tesis Doctoral y por primera vez en un vertebrado no tetrápodo, el Grupo de Nutrigenómica y Endocrinología del Crecimiento de Peces del IATS ha descrito y caracterizado molecularmente las seis isoformas de PRDXs de la dorada (Pérez-Sánchez y cols., 2011). Es un hecho aceptado que la distribución celular de los miembros de esta familia es variable, encontrándose la PRDX1, la PRDX2 y la PRDX6 en el citosol, la PRDX3 exclusivamente en la mitocondria, la PRDX4 en el retículo endoplasmático y espacio extracelular y la PRDX5 en el citosol, la mitocondria y los peroxisomas. En el caso de la dorada, se ha corroborado la expresión ubicua de las seis isoformas, aunque cada tejido presenta un patrón tisular propio o característico (**Figura 7.1**). Así pues, el hígado muestra una expresión global elevada de PRDXs que no se ve alterada por la exposición prolongada a altas densidades de cultivo ni por deficiencias en ácidos grasos esenciales, como resultado de la sustitución total de aceite de pescado por aceites vegetales en dietas basadas en proteínas vegetales. Por el contrario, el riñón anterior, el análogo de la medula ósea de los mamíferos, presenta una expresión relativamente baja de PRDXs que es a su vez fiel reflejo de la exposición a patógenos y del nivel de progresión de la enfermedad en un modelo de infección con el parásito intestinal

*Enteromyxum leei*. Es por ello que éste es un modelo de estudio especialmente interesante no sólo por las graves pérdidas que ocasiona este parásito a la acuicultura Mediterránea sino también por la progresión más rápida de la enfermedad en peces alimentados con aceites vegetales sin síntomas aparentes de deficiencias en términos de crecimiento (Estensoro y cols., 2011). Por tanto, está cada vez más extendida la idea de que los requerimientos nutricionales de crecimiento no suelen coincidir con los establecidos en base a “dietas salud”. En este sentido, la sobre-expresión de la PRDX1, PRDX2 y PRDX3 en animales expuestos pero no infectados tendría como objetivo disminuir la concentración de ROS, a la vez que desactivar la respuesta inflamatoria e inmune del hospedador mediada a nivel intracelular por niveles bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por el contrario, los peces infectados presentan una baja expresión intestinal de PRDXs, en parte como consecuencia de la profunda alteración del epitelio intestinal pero también como un sistema de protección ante una respuesta inflamatoria excesiva o prolongada en el tiempo.

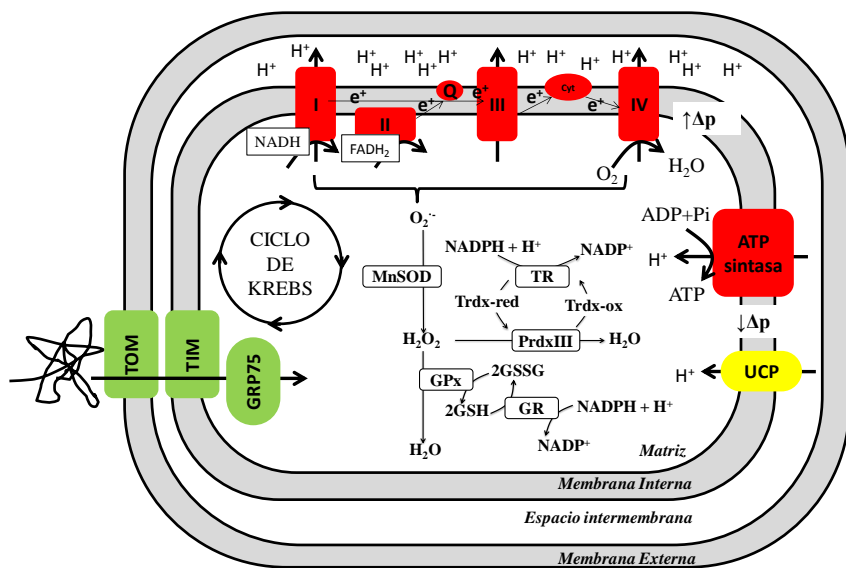
**Figura 7.1.** Expresión tisular de los transcritos que codifican para las seis peroxiredoxinas (PRDXs) de dorada. 1, intestino; 2, riñón anterior; 3, bazo; 4, cerebro; 5 ojos; 6, branquias; 7, tejido adiposo; 8, corazón; 9, músculo esquelético blanco; 10, hígado; 11, testículo.





Por consiguiente, frente a la acción antioxidante de las PRDXs, la acción mediada por GRP75/mortalina y las UCPs se ejercería reparando las proteínas dañadas u oxidadas a la vez que disminuyendo la producción mitocondrial de ROS (desacople de la respiración mitocondrial). En todo caso, el balance o equilibrio final entre cada uno de estos procesos depende de cada tejido o escenario en concreto, lo que acaba conformando un complicado equilibrio que se representa de forma esquemática en la **Figura 7.2**.

**Figura 7.2.** Representación esquemática de los principales procesos implicados en el mantenimiento del balance redox de la mitocondria.

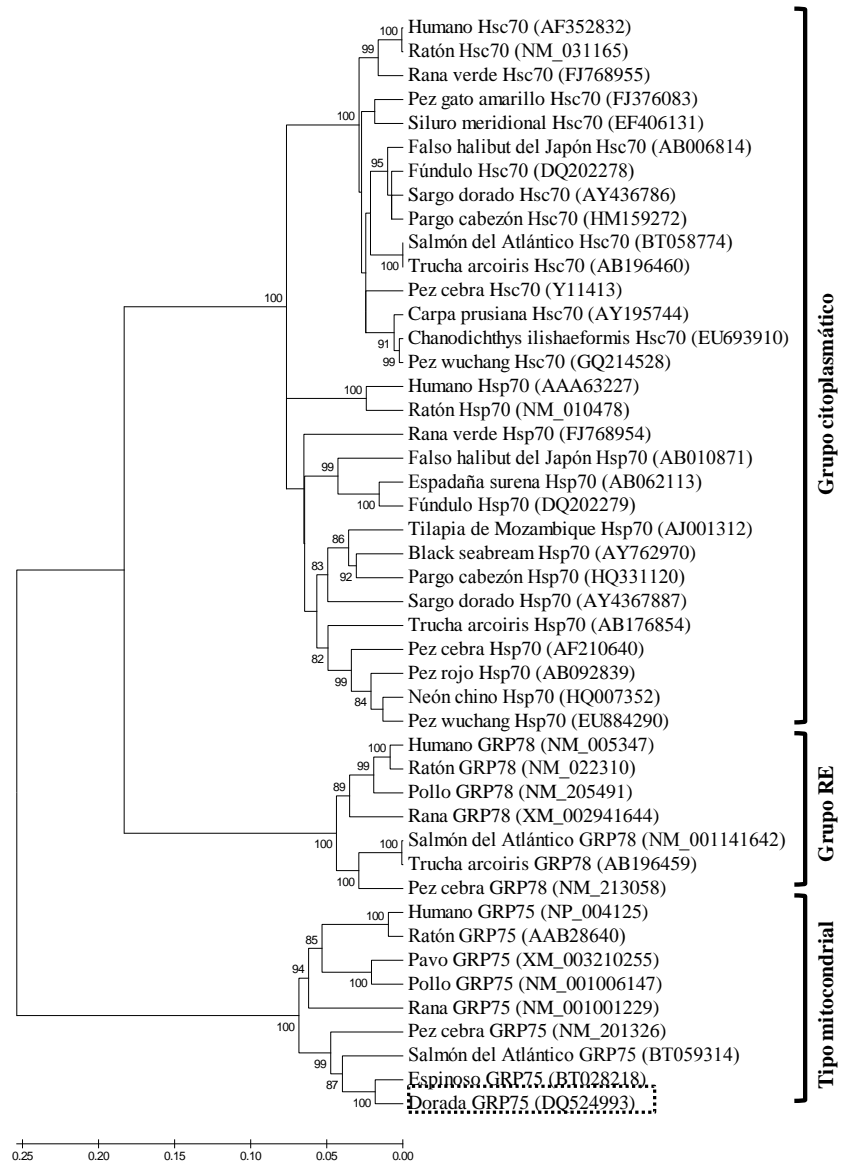


## 7.2. Análisis filogenético

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han permitido la caracterización molecular de la GRP75/mortalina en dos especies de perciformes de la familia Sparidae, la dorada y el dentón común (capítulos 3 y 4). Es de reseñar el 93-96% de homología de la secuencia de dorada con la de sus ortólogos de peces, anfibios, aves y mamíferos, conservando todas ellas unos motivos característicos que las diferencian de los otros miembros de la familia Hsp70 (Figura 2, capítulo 3). Así pues, el análisis filogenético de la familia Hsp70 muestra un alto grado de conservación de la familia a la vez que una pronta divergencia de la rama mitocondrial (Figura 3, capítulo 3). Desde la publicación de estos resultados en el 2008, se han introducido en las bases de datos públicas varias secuencias nuevas, por lo que el análisis filogenético se ha completado con 21 secuencias adicionales de peces, anfibios, reptiles y aves, tal y como se muestra en la Figura 7.3. La actualización de este árbol filogenético corrobora el alto grado de conservación de la familia Hsp70 y apoya, en un contexto evolutivo más amplio, la preservación de la función de la GRP75/mortalina como chaperona mitocondrial involucrada en el trasiego de proteínas del citoplasma a la matriz mitocondrial.

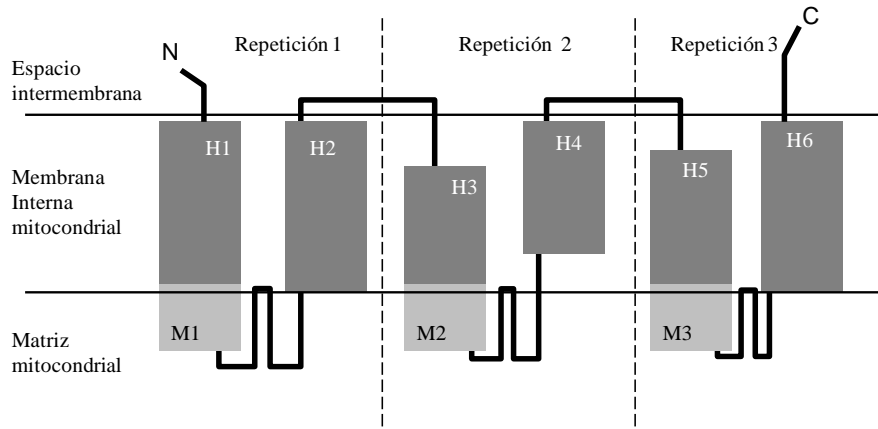
---

**Figura 7.3.** Árbol filogenético actualizado de la familia de las Hsp70 en el que se ubica la GRP75/mortalina de dorada. El árbol incluye 46 secuencias y se ha construido con el programa Mega5 y el método de Neighbor-Joining (*complete deletion*). Los números en las ramas indican los valores del test de bootstrap (1000 réplicas). La escala muestra las distancias evolutivas en número de diferencias de amino ácidos por sitio calculado mediante el método p-distance. Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis.



Otro de los aspectos a resaltar dentro de la presente Tesis Doctoral es la caracterización molecular de dos UCPs de dorada, que han sido anotadas de forma inequívoca como UCP1 y UCP3 (**capítulo 5**). El análisis de estas secuencias muestra el alto grado de conservación estructural de estas proteínas con tres repeticiones en tándem de aproximadamente 100 aminoácidos, cada una de las cuales contiene dos  $\alpha$ -hélices y un motivo característico de la familia de los transportadores mitocondriales P[LTV]D[TV][AV]K[VT]R[L FY] (**Figura 7.4**). Asimismo, cabe reseñar la conservación de siete aminoácidos invariables entre las tres repeticiones en tándem y los tres aminoácidos del sitio putativo de unión a GDP (UCP1: Arg83, Arg181, His214; UCP3: Arg86, Arg184 y His217) (**Figura 1, capítulo 5**). Las regiones con menor homología son los dominios intermembrana, lo que tras una fuerte selección positiva habría posibilitado la adquisición de las propiedades termogénicas de la UCP1 de los mamíferos placentarios (Hughes y Criscuolo, 2008).

**Figura 7.4.** Representación esquemática de la estructura de las UCPs con las tres repeticiones en tandem que contienen dos  $\alpha$ -hélices transmembrana (H) (gris oscuro) y un motivo de la familia de los transportadores mitocondriales (M) (gris claro). Las líneas discontinuas muestran la separación entre secuencias repetidas.



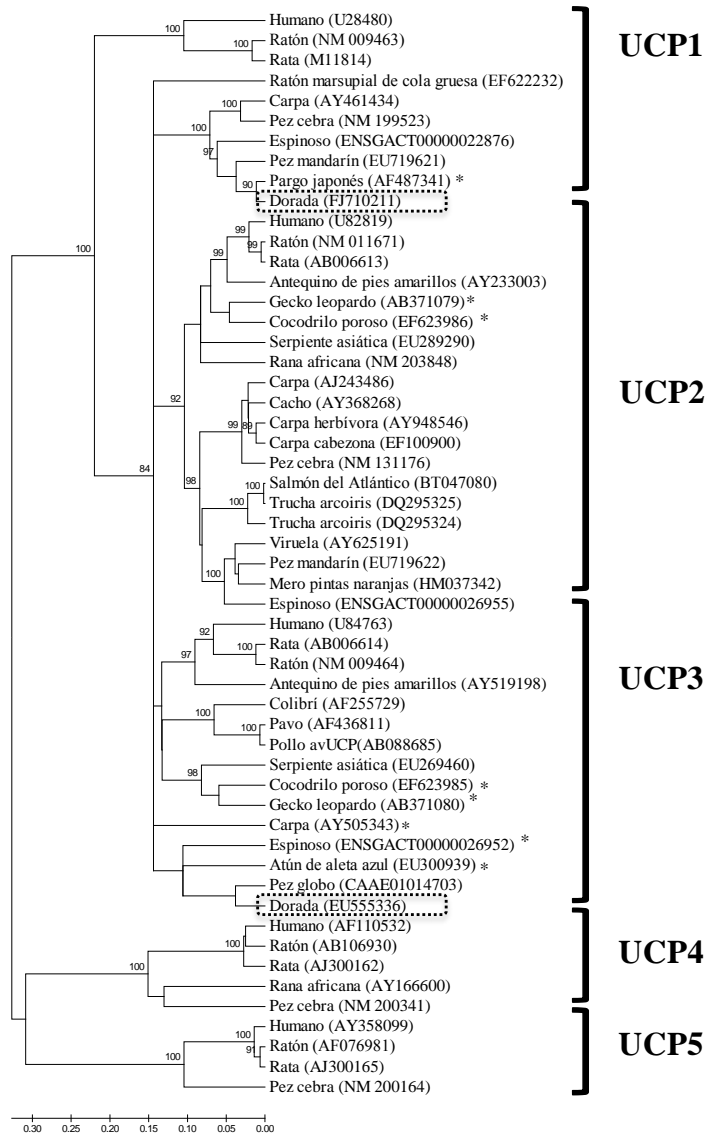
El análisis filogenético con más de 50 secuencias de UCPs disponibles en las bases de datos públicas está de acuerdo con la actual jerarquía de los vertebrados (**Figura 7.5**), a la vez que claramente diferencia dos nodos: UCP1/UCP2/UCP3 y UCP4/UCP5. Dentro del primer nodo, el grupo de la UCP1 es posiblemente el más evolucionado, por lo que no forma un clado monofilético y las secuencias de UCP1 de peces y marsupiales están más relacionadas con la rama de la UCP2/UCP3 que con la rama de la UCP1 de los euterios. Estos resultados corroboran estudios previos en los que se ha descrito la historia evolutiva de la familia de las UCPs, con dos rondas de duplicación del gen ancestral y la subsiguiente generación de genes parálogos que habrían estado sometidos a diversas presiones evolutivas (Hughes y Criscuolo, 2008; Saito y cols., 2008).

En todo caso, son evidentes ciertos conflictos de nomenclatura, especialmente en relación a secuencias de peces. Así por ejemplo, una secuencia parcial de pargo japonés (AF487341) fue inicialmente anotada como UCP2 (Liang y cols., 2003), pero al igual que en la presente Tesis Doctoral, estudios posteriores la han identificado como una UCP1 (Emre y cols., 2007). Asimismo, el análisis filogenético de Jastroch y cols. (2005) incluye las secuencias de UCP3 de pez cebra y fugu en la rama de las UCP2, mientras que análisis más recientes muestran una clara divergencia evolutiva de estas secuencias (Hughes y cols., 2009).

---

**Figura 7.5.** Árbol filogenético de la familia de las UCPs, en el que se resalta la posición de la UCP1 y UCP3 de dorada. El árbol incluye 54 secuencias y se ha analizado utilizando el programa Mega5 mediante el método de Neighbor-Joining (*pairwise deletion*). Los números en las ramas indican los valores del test de bootstrap (1000 réplicas). La escala muestra las distancias evolutivas en número de diferencias de amino ácidos por sitio calculado mediante el método p-distance. Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis. Los asteriscos indican secuencias parciales.

---



En el caso particular de la dorada, es objeto de discusión la presencia/ausencia de la UCP2, inicialmente considerada de expresión más constitutiva que la UCP1 y la UCP3. Durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral, el rastreo de la UCP2 de dorada mediante RT-PCR y cebadores degenerados ha sido del todo infructuoso, lo que sugiere la pérdida aparente o silenciamiento del gen de la UCP2 en espáridos. Éste no es un fenómeno nuevo, al haberse descrito la pérdida de la UCP1 en cerdos (Berg y cols., 2006) y reptiles (Schwartz y cols., 2008), la pérdida de uno de los parálogos de UCP2/3 en anfibios (Trzcionka y cols., 2008) y la pérdida de dos de los homólogos de UCP1/2/3 en aves (Emre y cols., 2007). Trabajos recientes, también muestran una diferente sintenia de las UCPs de peces y vertebrados tetrápodos, por lo menos en fugu y pez cebra (Tseng y cols., 2011). En todo caso, los resultados no son del todo concluyentes y no se puede afirmar la pérdida o silenciamiento de un determinado gen hasta que no se haya completado el transcriptoma y/o la base de datos genómica de un determinado linaje. En este sentido, es de reseñar que tras la actualización en Noviembre del 2011 de la base de datos propia de dorada (<http://www.siginae.org/iats>), con cerca de tres millones de secuencias y más de 60.000 secuencias anotadas, se ha detectado una secuencia parcial que codificaría para el extremo N-terminal de una secuencia de UCP2.

## 7.3. Regulación transcripcional

### 7.3.1 GRP75/mortalina

En la presente Tesis Doctoral se ha abordado por primera vez en perciformes el análisis transcripcional de la GRP75/mortalina (**capítulos 3 y 4**). Dicho estudio se centró en tejidos que directa o indirectamente están relacionados con la respuesta adaptativa al estrés (cerebro, hígado, riñón anterior y branquias). Es por ello que a título comparativo resulta especialmente interesante la mayor expresión de esta chaperona mitocondrial en tejidos con alto riesgo de estrés oxidativo, bien sea por una alta actividad metabólica, como es el caso del hígado, o por un alto contenido en ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga. El ejemplo por excelencia es el cerebro que, una vez cubiertos los requerimientos nutricionales, se muestra especialmente conservador frente a cambios en el perfil de ácidos grasos esenciales (Benedito-Palos y cols., 2010).

Los resultados obtenidos también indican que la expresión hepática de GRP75/mortalina es inducible en modelos de estrés por confinamiento; mientras que en los otros tejidos analizados, incluido el cerebro, es aparentemente de carácter constitutivo. Es más, la respuesta del hígado es dosis-dependiente, por lo que el incremento de expresión tras 24 horas de confinamiento a 120 Kg/m<sup>3</sup> es del orden de 2,5 veces, quedando reducida a 1,5 en un modelo de alimentación pareada de estrés crónico por confinamiento a 45-50 Kg/m<sup>3</sup> (**Figuras 4 y 5, capítulo 3**). La cinética de esta respuesta también ha sido analizada por nuestro grupo de investigación, habiéndose puesto de manifiesto en el modelo de estrés agudo una rápida respuesta a nivel transcripcional que persiste en el tiempo hasta las 72 horas post-confinamiento, tendiéndose a recuperar los niveles basales a las 120 horas (Saera-Vila y cols., 2009b).

Esta respuesta transcripcional al estrés agudo por confinamiento forma parte de una dinámica más global en la que el número de genes expresados diferencialmente es máximo a las 24 horas post-confinamiento (**Figura 7.6**) (Calduch-Giner y



cols., 2010). Este estudio se abordó mediante el uso de una primera versión de chips de ADN específicos de dorada con más de 6000 genes anotados, lo que ha permitido definir a nivel transcripcional tres etapas claramente marcadas en el tiempo: i) respuesta rápida (seis horas) encaminada a aumentar la disponibilidad energética, ii) respuesta másica e intensa (24 horas) de remodelado y reparación del daño tisular y iii) reajuste alostático (72 horas) con genes sobre-expresados e inhibidos para disminuir/aumentar la producción/secuestro de ROS y así minimizar el riesgo de estrés oxidativo.

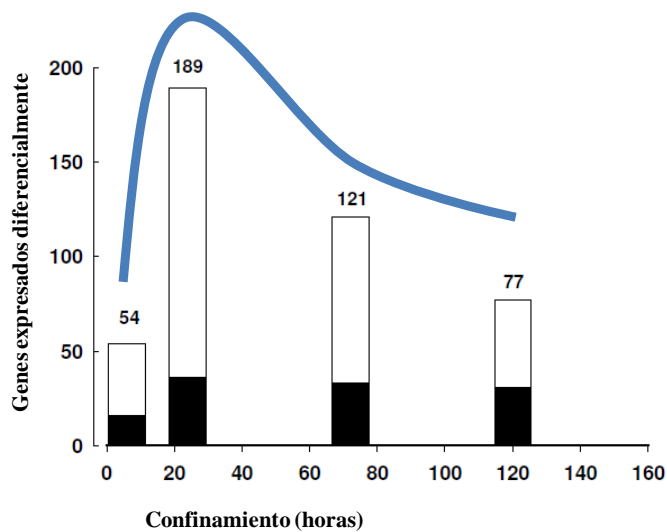
Otros trabajos, en los que también se analiza mediante chips de ADN la respuesta adaptiva al estrés por confinamiento muestran resultados similares. Así, truchas arco íris estresadas por confinamiento muestran una mayor respuesta transcripcional a las 24 horas, aunque en esta ocasión la mayor parte de genes hepáticos con expresión diferencial están relacionados con la respuesta inmune no específica (Cairns y cols., 2008). Asimismo, la respuesta del nototénido antártico *Harpagifer antarcticus* frente al estrés térmico es especialmente evidente a las 24-48 horas, estando en gran medida por genes relacionados con la respuesta inflamatoria aguda, el metabolismo lipídico y el estrés oxidativo (Thorne y cols., 2010).

Por consiguiente, la especie y posiblemente el agente estresante, tienen mucho que ver con la dinámica y magnitud de la respuesta adaptativa frente al estrés. En todo caso, en un modelo de estrés crónico la expresión hepática de GRP75/mortalina de dorada sigue siendo alta tras tres semanas de confinamiento. En la misma línea, cuando se compara la dorada con una especie como el dentón -escasamente adaptada a las condiciones de cultivo-, la expresión hepática de GRP75/mortalina, junto con la de otros marcadores de estrés oxidativo (metalotioenina, GPX-1, ), es significativamente más alta en la especie con un menor grado de domesticación. Por el contrario, como era de esperar, la expresión hepática de marcadores de crecimiento (IGF-II, GHR-I, GHR-II) es menor en juveniles de dentón (**Figura 5, capítulo 4**), a pesar de que en las fases iniciales de cultivo esta especie presenta un crecimiento explosivo no exento de una alta tasa de mortalidad. Por

consiguiente, desde una perspectiva de regulación epigenética, esto es lo que explicaría gran parte de los problemas asociados a fases posteriores del cultivo de una especie con un potencial de crecimiento importante, pero que difícilmente parece explotable en cautividad.

Por otra parte, es interesante reseñar que hay evidencias en dorada de una regulación nutricional-toxicológica de la GRP75/mortalina, que protegería a las mitocondrias de peces alimentados con dietas enteramente basadas en materias primas de origen marino y con una mayor carga de pesticidas y compuestos organoclorados (Saera-Vila y cols., 2009<sup>a</sup>). También es interesante reseñar que la expresión intestinal de la GRP75/mortalina se ve aumentada en animales infectados con el parásito intestinal *E. leei* (Sitjà-Bobadilla y cols., 2008). Por consiguiente, la GRP75/mortalina es un marcador consistente de estrés que responde a un amplio rango de retos que se vienen utilizando de forma rutinaria en nuestro laboratorio para evaluar el estado de salud y bienestar animal de las doradas en cultivo.

**Figura 7.6.** Patrón de expresión del hígado de dorada en respuesta al estrés por confinamiento (120 Kg/m<sup>3</sup>). Número total de genes expresados de forma diferencial; genes que aumentan (barra blanca) y genes que disminuyen (barra negra) (Calduch-Giner y cols., 2010).



### 7.3.2 UCPs

Al igual que con la GRP75/mortalina, también se abordó en el marco de la presente Tesis Doctoral el patrón de expresión tisular de las UCPs, aunque en esta ocasión el número de tejidos examinados aumentó de cuatro a 12, entre los que se incluyen hígado, intestino, tejido adiposo visceral, riñón anterior, músculo esquelético blanco, músculo esquelético rojo, corazón, branquias, bazo, ojo, gónada y cerebro (Figura 2, capítulo 5).

En base a ello, se ha establecido un patrón de expresión marcadamente diferente para la UCP1 y la UCP3, de modo que la expresión de la primera queda prácticamente relegada al hígado y en menor medida al intestino y la UCP3 a corazón y músculo esquelético. Por consiguiente, la UCP1 es la isoforma propia de tejidos con capacidad de acúmulo graso, aunque el nivel de depósitos grasos no determina por sí mismo el nivel de expresión. De hecho, no se detectó una expresión significativa en el tejido adiposo visceral, pero sí en el hígado que además de acumular cantidades importantes de grasa (hasta el 15-20% en peso húmedo en la dorada) es un tejido metabólicamente activo y con un alto riesgo de estrés oxidativo, como ya se menciona en el **apartado 7.3.1**. Este patrón de expresión es extrapolable a vertebrados tetrápodos, ya que la UCP1 –con función termogénica– se expresa en el tejido adiposo marrón de mamíferos, pero es indetectable o cuasi indetectable en el tejido adiposo blanco (Oliver y cols., 2001).

La relación existente entre las UCPs y la capacidad oxidativa es sí cabe más evidente con la UCP3, habiéndose observado que la expresión de esta proteína es de dos a veinte veces más alta en el músculo blanco que en el músculo rojo y corazón. Por lo que, tal y como se ha descrito en varios modelos de vertebrados tetrápodos (Hesselink y cols., 2001; Russel y cols., 2003; Schrauwen y cols., 2001b), existe una correlación negativa entre la expresión de UCP3 y la capacidad oxidativa, que es mayor en los tejidos aerobicos (músculo rojo y corazón) que en los típicamente glucolíticos (músculo blanco).

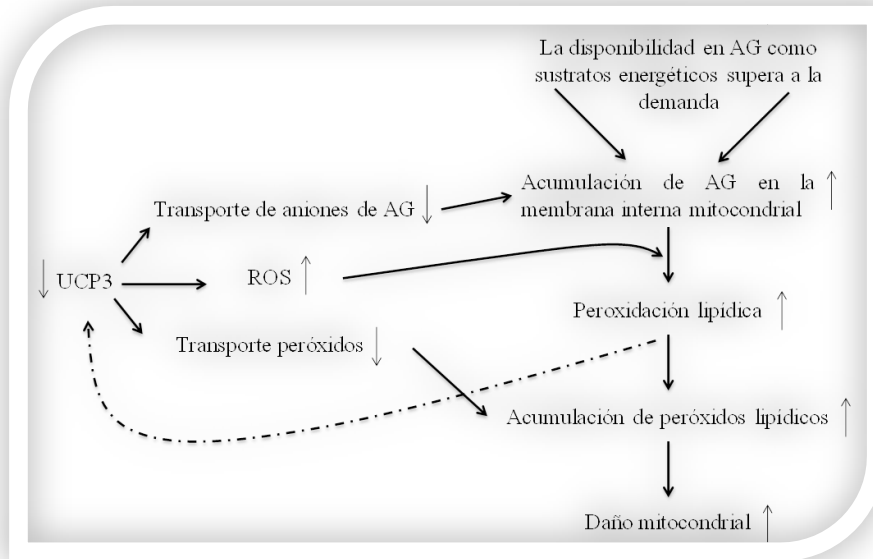
Tanto la UCP1 como la UCP3 están sujetas a una regulación específica por factores bióticos y abióticos que directa o indirectamente alteran la disponibilidad energética y el metabolismo lipídico en general. Así pues, la expresión hepática de UCP1 disminuye significativamente con el estrés crónico por confinamiento (**Figura 5A, capítulo 5**). Por el contrario, aumenta significativamente con la edad y en cierta medida con el engrasamiento hepático asociado a dietas deficientes en ácidos grasos esenciales (**Figuras 3A y 4A, capítulo 5**). Más controvertida es la regulación a nivel estacional, pero de forma global la expresión hepática de UCP1 aumenta cuando lo hace la disponibilidad de sustratos oxidativos (ácidos grasos).

De forma similar, la expresión de UCP3 aumenta de forma significativa con la edad y con dietas deficientes en ácidos grasos esenciales (**Figuras 3B y 4B, capítulo 5**), por lo que cobra fuerza la hipótesis inicialmente propuesta por Skulachev (1991) y revisada por Schrauwen (2006), según la cual la función ancestral de las UCPs sería proteger a la célula del daño oxidativo causado por la acumulación mitocondrial de peróxidos lipídicos cuando la disponibilidad en ácidos grasos como sustratos energéticos supera a la demanda (**Figura 7.7**).

De acuerdo con la hipótesis o modelo formulado, es un hecho reconocido en mamíferos que la expresión de UCP3 aumenta con el ayuno, como resultado de la movilización de reservas grasas y del incremento de los niveles circulantes de ácidos grasos libres (Boss y cols., 1998; Brun y cols., 1999). Es por ello que en el **capítulo 6** se abordó de forma específica la regulación con el nivel de ingesta de la expresión de la UCP3 de dorada a nivel de corazón y músculo esquelético. El modelo experimental contempló tres regímenes de alimentación: i) ración máxima a saciedad visual (grupo R<sub>100</sub>), ii) 70% de la ración máxima (grupo R<sub>70</sub>) y iii) 70% de la ración máxima con una fase finalizadora de ración de mantenimiento (grupo R<sub>70-20</sub>). Los resultados mostraron una reducción del crecimiento con la disminución de la ración que estuvo acompañada de cambios en los niveles circulantes de GH e IGFs que evidencian un estado de resistencia hepática a la acción anabólica de la GH (Pérez-Sánchez y cols., 1995; 2002). Asimismo, se observó un incremento de los niveles

circulantes de ácidos grasos libres con la pérdida de grasa muscular en los animales de ración restringida. En este escenario metabólico, también se observó un fuerte incremento de la expresión de UCP3 en músculo rojo y, en especial, en el corazón. Por el contrario, los niveles de ARNm codificantes para la UCP3 en músculo blanco no mostraron cambios significativos con la disminución de la ingesta. Por consiguiente, la expresión de la UCP3 en tejidos glucolíticos sería más constitutiva que en un músculo aeróbico. Sin embargo, en vertebrados tetrápodos se ha descrito el aumento de UCP3 en tejidos predominantemente glucolíticos en respuesta al ayuno. Esta aparente discrepancia no es fácil de explicar, aunque posiblemente es consecuencia del menor metabolismo basal de los peces y por tanto un menor riesgo de estrés oxidativo en comparación con los vertebrados homeotermos. De modo que, ante el despilfarro energético que supone el desacople de la respiración mitocondrial, la regulación a nivel de UCPs por la ración está inicialmente limitada a tejidos con una mayor capacidad oxidativa a la vez que una menor expresión basal de UCP3 (músculo rojo y corazón). Por el contrario, a nivel de músculo blanco se da como primera opción una regulación a nivel de sustrato para asegurar con ello una rápida metabolización de los sustratos energéticos, hipótesis apoyada por las medidas de actividad de enzimas claves de la glucólisis, ciclo de Krebs y  $\beta$ -oxidación.

**Figura 7.7.** Hipótesis unificada de la implicación de la UCP3 en la protección frente al daño oxidativo producido por la acumulación de ácidos grasos (AG). Línea discontinua, activación de la UCP3 (Schrauwen y cols., 2006).



## 7.4 Regulación postranscripcional y respiración mitocondrial

El análisis transcripcional (**apartado 7.3**) se ha completado con medidas de producción de proteína y respiración mitocondrial. En primer lugar, ello supuso un análisis detallado de las secuencias de GRP75/mortalina y UCPs. En el caso de la GRP75/mortalina, los alineamientos de las secuencias humanas y de dorada demostraron un alto grado de conservación de la proteína en general y de los epítomos antigénicos en particular (**Figura 2, capítulo 3**). Por lo que se testó un anticuerpo comercial (GR-02, Oxford Biomedical Research) producido contra la GRP75/mortalina humana, lo que permitió identificar mediante Western blot una banda con el peso molecular esperado (75 KDa). Es más, en el modelo de estrés crónico por confinamiento se puso de relieve una clara correlación positiva entre los niveles de mRNA y proteína, lo que viene a corroborar la robustez de la GRP75/mortalina como marcador de estrés en dorada (**Figura 6, capítulo 3**).

En esta misma línea, estudios de proteómica mediante electroforesis bidimensional han puesto de relieve un aumento a nivel de proteína de la GRP75/mortalina hepática en peces ayunados de pez cebra (Enyu y Shu-Chien, 2011), por lo que esta proteína mitocondrial codificada por genes nucleares también responde en peces al estrés nutricional. Resultados similares se han descrito en larvas de lucioperca, al haberse comprobado como niveles bajos de inclusión de fosfolípidos en la dieta desencadenan una respuesta celular de estrés que incluye un aumento de la GRP75/mortalina y la glutatión S-transferasa, a la vez que una menor expresión de otros agentes antioxidantes como la PRDX1 (Hamza y cols., 2010).

Más complejo es el análisis de la expresión a nivel de proteínas de las UCPs, ya que un primer análisis *in silico* de las secuencias aminoacídicas revela la falta de reacción cruzada de los anticuerpos comerciales anti-UCPs de mamíferos con la UCP1 y la UCP3 de dorada. De hecho, estos anticuerpos están dirigidos

contra las regiones divergentes de los dominios transmembrana y C-terminal, cuya identidad con las regiones correspondientes de dorada es del orden del 27-59%, aumentando hasta el 61-70% (78-84% homología) cuando se considera la proteína entera (**Tabla 7.1**). Es por ello, que en una primera aproximación consideramos el uso de un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la UCP1 humana entera con reacción cruzada con la UCP2 y la UCP3 (UCP1/2/3 FL-307:sc-28766, Santa Cruz Biotechnologies). Los resultados han sido presentados recientemente en el VIII Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada y han puesto de relieve que este anticuerpo presenta una reacción no específica contra una proteína de un tamaño mayor que el esperado (45-47 kDa) en preparaciones de mitocondrias de hígado y músculo (Bermejo-Nogales y cols., 2012). Por consiguiente, se optó por producir anticuerpos específicos contra péptidos sintéticos de la UCP1 y la UCP3 de dorada.

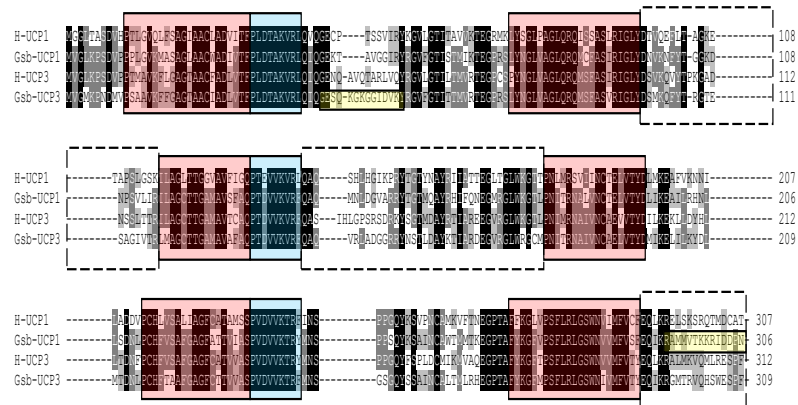
**Tabla 7.1.** Porcentajes de identidad y similitud (paréntesis) entre las secuencias antigénicas y divergentes de UCP1 y UCP3 de humanos y dorada contra las que están producidas la mayor parte de anticuerpos comerciales.

	2° y 3° Dominio Transmembrana			3° y 4° Dominio Transmembrana			Extremo C-terminal		
	Gsb-UCP1	H-UCP3	Gsb-UCP3	Gsb-UCP1	H-UCP3	Gsb-UCP3	Gsb-UCP1	H-UCP3	Gsb-UCP3
H-UCP1	40	28	25	59	46	45	27	38	22
	(60)	(57)	(65)	(67)	(56)	(56)	(61)	(50)	(66)
Gsb-UCP1		50	36		53	48		38	38
		(60)	(68)		(66)	(70)		(61)	(50)
H-UCP3			45			51			55
			(75)			(71)			(72)



La **Figura 7.8** muestra la localización de los péptidos sintéticos de UCP1 (RAMMVTKKRIDDPN) y UCP3 (GESQKGGKGGIDVKY) de dorada contra los que se han producido anticuerpos policlonales de conejo. Estos anticuerpos se diseñaron en base a regiones potencialmente antigénicas y con las mayores divergencias entre parálogos. Así, el epítipo para la UCP1 se localiza en el extremo C-terminal y posee alta antigenicidad (0,96), probabilidad de superficie (1,71) e hidrofobicidad (0,77); mientras que el epítipo para la UCP3 se localiza entre el primer y segundo dominio transmembrana  $\alpha$ -hélice, también con una alta antigenicidad (1,69), probabilidad de superficie (1,40) e hidrofobicidad (0,72). A cada uno de estos péptidos antigénicos se añadió una cisteína al extremo N-terminal (UCP1) o al extremo C-terminal (UCP3) y el péptido resultante se conjugó con la hemocianina de la lapa californiana (KLH). El protocolo de inmunización con dos conejos comportó cuatro inyecciones a intervalos de 20 días durante dos meses. El sangrado final se realizó una semana después de la última inmunización y los anticuerpos UCP1 y UCP3 fueron purificados en columnas de afinidad, liofilizados y resuspendidos a una concentración final de 0,8-1,3 mg/ml.

**Figura 7.8.** Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de UCP1 y UCP3 humanas y de dorada, mostrando los dominios transmembrana  $\alpha$ -hélices (cuadrados rojo), los motivos característicos de los transportadores mitocondriales (cuadrados azul), los epítipos de los anticuerpos anti-UCP1 y anti-UCP3 de dorada (cuadrados amarillo) y la localización de las secuencias antigénicas divergentes de los anticuerpos comerciales (cuadrados línea discontinua).

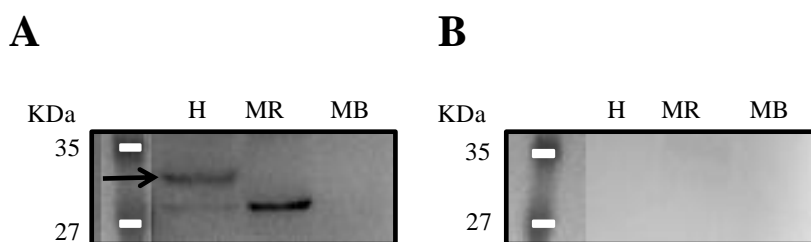


Los anticuerpos así generados se testaron con muestras de mitocondrias de hígado, músculo rojo y músculo blanco. Desafortunadamente, el anticuerpo anti-UCP3 da una reacción no específica en músculo con una banda de un tamaño mayor al esperado (40 KDa) y que no desaparece con el control de pre-absorción. Por el contrario, el anticuerpo anti-UCP1 da una banda específica de hígado que es del tamaño esperado (33-34 KDa) y además desaparece con el control de pre-absorción correspondiente (**Figura 7.9**).

Estos diferentes resultados se pueden atribuir a una menor afinidad del anticuerpo anti-UCP3, aunque no podemos descartar una menor abundancia de la UCP3 en relación a la UCP1 en las diferentes preparaciones de mitocondrias de hígado y músculo esquelético. De hecho, la UCP1 se encuentra en grandes concentraciones (hasta un 10% de las proteínas de membrana) en el tejido adiposo marrón de roedores (Heaton y cols., 1978), mientras que la concentración de UCP2 en bazo es del orden de 100 veces menor (Pecqueur y cols., 2001), y la de UCP3 entre 200 y 700 veces menos (Harper y cols., 2002).

En todo caso, todo ello confirma las dificultades metodológicas que comporta la obtención de anticuerpos específicos contra las diferentes isoformas de UCPs, de modo parecido a como ocurre en mamíferos (Eduardo Rial, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, comunicación personal).

**Figura 7.9.** Western blot representativo de mitocondrias (10 µg) de hígado (H), músculo rojo (MR) y músculo blanco (MB) utilizando el anticuerpo anti-UCP1 de dorada como anticuerpo primario (A). Ausencia de señal con el control pre-absorción (B).



Las mediciones de respiración y desacople mitocondrial son otra forma de evaluar la actividad y regulación de las UCPs, aspecto éste que ha sido abordado en el marco de la presente Tesis Doctoral en el **capítulo 6**.

Tal y como se discute en el **apartado 7.3.2**, el goteo de protones asociado al desacoplamiento respiratorio está en gran parte mediado por las UCPs y supone un despilfarro energético que como mal menor es ventajoso ante un estado de claro riesgo oxidativo. En peces, el efecto biológico del desacople mitocondrial se ha relacionado principalmente con cambios de temperatura (Guderley y St Pierre, 1999; Hilton y cols., 2010; Jastroch y cols., 2007; Johnston y cols., 1998), exposición a tóxicos (Soares y cols., 2007) y variaciones en la composición de la dieta (Eya y cols., 2010; Guderley y cols., 2008). Sin embargo, hay que reseñar que hasta la fecha estos trabajos no han abordado de forma global la regulación de la actividad de las UCPs. Ello da un valor añadido a esta Tesis Doctoral, al haberse correlacionado por primera vez en un vertebrado no tetrápodo, el desacople de la respiración en mitocondrias aisladas de corazón, con la inducción de la expresión de UCP3 y un incremento de los niveles circulantes de ácidos grasos libres, que tal y como se ha propuesto en levaduras y vertebrados tetrápodos actuarían como activadores de las UCPs (Jiménez-Jiménez y cols., 2006).

Metodológicamente, los estudios de bioenergética de mitocondrias comportan varias limitaciones. En primer lugar, es necesario trabajar con muestras recién extraídas, por lo que en un tiempo máximo de tres-cuatro horas se han de aislar y procesar las mitocondrias para los ensayos de respiración. A esto hay que añadir la dificultad de obtener un buen rendimiento en la extracción sin pérdida aparente de funcionalidad, lo que de forma rutinaria se analiza a través de mediciones de la actividad citrato sintasa. Con respecto a esto, hay que reseñar que el músculo blanco posee una cantidad relativamente baja de mitocondrias, por lo que normalmente se necesitan más de 40 gramos de tejido para llevar a cabo unas pocas mediciones, tal y como lo indican Burpee y cols. (2010) para varias especies de peces.

Comparativamente con el músculo blanco, el rendimiento de la extracción con muestras de músculo rojo e hígado es 5-10 veces mayor (Eya y cols., 2010; 2011; Guderley y cols., 1997). En esta diferente recuperación influyen factores tales como el número de mitocondrias en el tejido de partida, además de la textura del tejido y grado de deposición grasa, que en el caso del hígado puede ser un factor importante aunque con una contribución variable dependiendo de la especie y fase de desarrollo. Por consiguiente, aunque a diferencia del hígado, se requiere una digestión previa con proteasas, el músculo cardíaco es el tejido que permite obtener mayores rendimientos dada la alta concentración de mitocondrias en este tejido. Así pues, con la metodología adaptada a dorada, se obtienen del orden de 0,5 mg de proteína a partir de 500 mg de músculo cardíaco, lo que supone un rendimiento dos veces mayor que con el obtenido con muestras de hígado y músculo rojo. Por lo tanto, no es de extrañar que tanto en la presente Tesis Doctoral como en la mayoría de trabajos de la bibliografía, el corazón sea el órgano diana por excelencia en estudios clásicos de bioenergética de mitocondrias.

Tales estudios están basados en mediciones de consumo de oxígeno en diferentes estados respiratorios. En ausencia de sustrato y ADP, se da un consumo mínimo de oxígeno que se corresponde con el estado 1. Tras la adición de sustrato (por ejemplo, succinato, malato, piruvato), aumenta el consumo de oxígeno y se pasa al estado 2. El estado 3 supone un incremento adicional del consumo de oxígeno como consecuencia de la adición de ADP. Cuando todo el ADP es transformado a ATP, la respiración se ralentiza (estado 4) y supone una medida del goteo de protones. Este estado también puede conseguirse de manera artificial mediante la utilización de inhibidores de la fosforilación oxidativa, como la oligomicina, que es un inhibidor de la ATP sintasa. El ratio del control respiratorio (RCR) se calcula como el cociente entre el estado 3 y el 4, comprobándose la integridad de las mitocondrias mediante la adición de agentes desacopladores, como el trifluorocarbonilcianuro fenilhidrazona (FCCP) que bloquea la síntesis de ATP al tiempo que permite que continúe la respiración (ver **Figura 2, capítulo 6**).

## 7.5. Meta-análisis de la respuesta de estrés mitocondrial

El estudio de la regulación de la chaperona mitocondrial GRP75/mortalina y de las UCPs de dorada se ha abordado desde una perspectiva multifactorial, al considerar conjuntamente aspectos de filogenia y de regulación transcripcional y postranscripcional en conjunción con parámetros hormonales, bioquímicos y de bioenergética. Con ello se ha pretendido validar el uso de marcadores de estrés oxidativo y lipotoxicidad, considerando a la mitocondria como un orgánulo clave en la evaluación de la salud y bienestar de peces en cultivo. En este contexto, es importante reseñar que los marcadores mitocondriales analizados ofrecen una información complementaria e integradora de especial interés cuando se considera una determinada especie, tejido y factor de estrés (**Figura 7.10**).

En el caso concreto de la GRP75/mortalina, el hígado es el órgano con una expresión marcadamente inducible en la respuesta al estrés por confinamiento, el estrés nutricional y la escasa adaptación general a las condiciones de cultivo. De acuerdo con ello, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran una mayor expresión de la GRP75/mortalina en modelos de estrés agudo y de estrés crónico por confinamiento, que ha sido demostrada tanto a nivel de mensajero como de proteína, estando en consonancia la respuesta con la intensidad del estímulo. Asimismo, la expresión hepática de GRP75/mortalina puede considerarse una medida del grado de estrés producido por las condiciones de cultivo en especies con un bajo grado de domesticación. De hecho, cuando se comparan entre sí dos especies con un potencial de crecimiento similar, pero con un comportamiento marcadamente estresable en el caso del dentón, se observa como una peor adaptación a las condiciones de cultivo va ligada a una mayor expresión de la GRP75/mortalina hepática. En la misma línea, es conocido el mayor riesgo oxidativo con la exposición a xenobioticos. En nuestro caso, todas las dietas testadas contenían niveles trazas de biocontaminantes, pero el organismo está dotado de unos sensores

suficientemente sensibles como para detectar la mayor carga de biocontaminantes de las dietas basadas en materias primas de origen marino, lo que va acompañado de una mayor expresión de la GRP75/mortalina en un tejido clave para los procesos de detoxificación y metabolización de xenobióticos (Saera-Vila y cols., 2009a).

Una extrapolación similar se puede hacer con el intestino, ya que éste tejido constituye la primera barrera de defensa frente a un amplio espectro de agentes infecciosos y, por tanto, está expuesto tanto al daño ocasionado por el patógeno como al derivado de una respuesta excesiva del hospedador frente al agente infeccioso. Es por ello, que asumiendo que la GRP75/mortalina es un marcador general de bienestar animal, no es de extrañar que la expresión de esta chaperona molecular esté aumentada en peces expuestos a retos infecciosos como el mixosporidio *E. leei* (Mixozoa: Myxosporea) (Sitjà-Bobadilla y cols., 2008). Este parásito intestinal es causante de una infección crónica muy persistente y difícil de erradicar cuando la temperatura del agua es superior a las 18 °C, por lo que tras un deterioro progresivo del intestino se produce una pérdida de peso y anorexia, seguida de caquexia y finalmente de la muerte del animal (Sitjà-Bobadilla y cols., 2007).

Por lo que respecta a las UCPs, la UCP1 se expresa mayoritariamente en hígado, de forma que es un buen marcador de un excesivo acúmulo graso que acaba siendo un factor de riesgo (efecto lipotóxico) cuando la capacidad de deposición y/o oxidación se ve superada por el aporte de ácidos grasos derivados de la dieta o de otros tejidos de reserva. En el hígado de los mamíferos no se expresa de forma significativa la UCP1, quedando posiblemente relegada esta función protectora a la UCP2; al haberse especializado la UCP1 de mamíferos en una función termogénica que se produce básicamente en el tejido adiposo marrón al disipar en forma de calor la energía almacenada como grasa. Por el contrario, el tejido adiposo blanco, tanto en ectotermos como endotermos, tiene una alta capacidad de acúmulo graso con bajas tasas metabólicas, por lo que no está sujeto a un alto riesgo oxidativo y el nivel de expresión de UCPs es bajo en comparación con otros tejidos del

organismo, tal y como se ha evidenciado en la presente Tesis Doctoral.

Por consiguiente, en base a lo expuesto anteriormente, la inducción de la expresión hepática de UCP1 debe verse como una respuesta adaptativa ante el riesgo oxidativo de un flujo excesivo de lípidos. Un caso extremo serán los miembros de la familia *Gadidae*, con hígados con un contenido graso que puede superar fácilmente el 70% en peso húmedo (Nanton y cols., 2003; Shahidi y Dunajski, 1994). En todo caso, en especies de zonas templadas como la dorada, el hígado muestra importantes variaciones estacionales de contenido graso (Mingarro y cols., 2002), que explicarían el carácter estacional de la regulación de la UCP1 en esta especie, aunque hoy por hoy es difícil determinar si el factor directriz es el fotoperiodo o la temperatura.

El patrón de expresión tisular de la UCP1 es claramente distinto del descrito para la UCP3, aunque los mecanismos que rigen su regulación son aparentemente similares, lo que está en consonancia con la idea de que la función ancestral de las UCPs tiene mucho que ver con el estrés oxidativo y el metabolismo lipídico. De acuerdo con ello, la expresión de UCP3 aumenta con la redistribución de la grasa corporal y la mayor disponibilidad a nivel muscular de sustratos energéticos, especialmente ácidos grasos. En el caso del músculo blanco, ello se ha puesto de manifiesto en modelos de edad, deficiencias nutricionales en ácidos grasos esenciales y cambios estacionales de deposición grasa, por lo que no es de extrañar que diferentes autores consideren a las UCPs como dianas de interés terapéutico en el tratamiento de diferentes desordenes metabólicos/lipídicos como la obesidad y la diabetes (Brand y Esteves, 2005; Schrauwen y cols., 2001a; Zhang y cols., 2001).

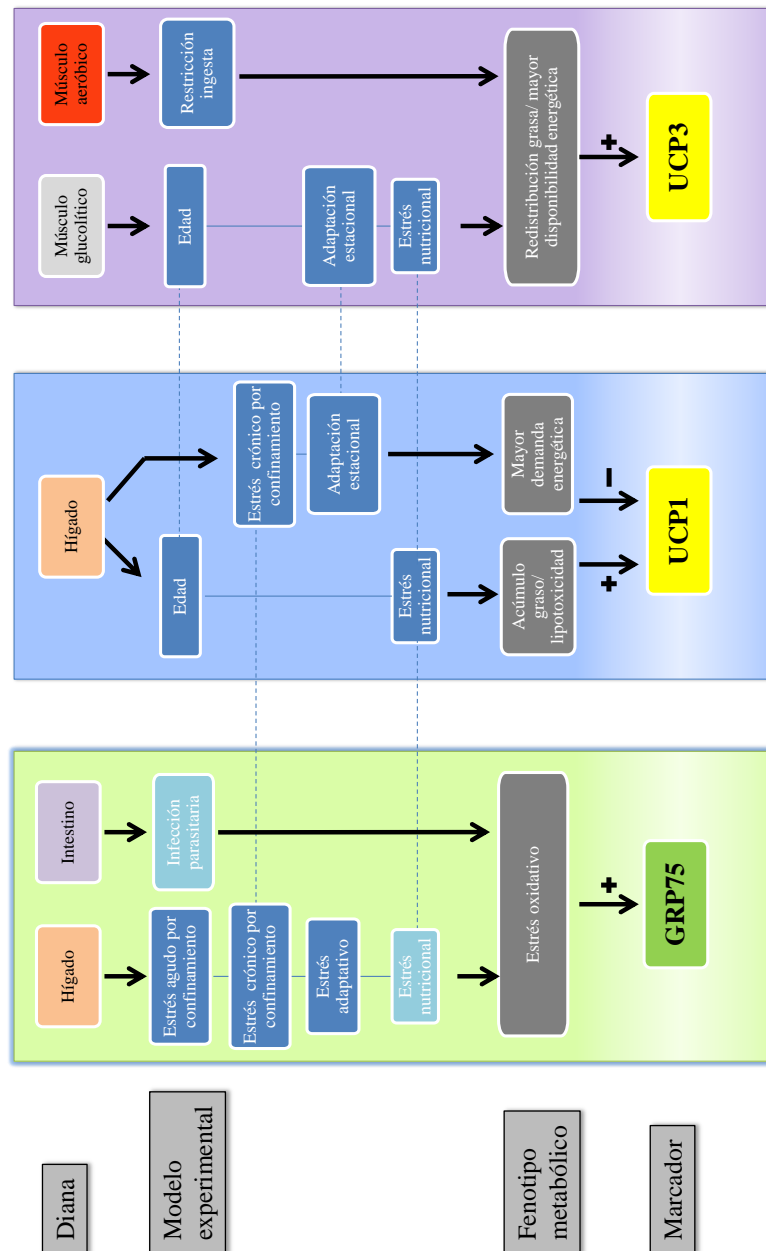
Sin embargo, la capacidad oxidativa varía notablemente de un tejido muscular a otro, por lo que no es de extrañar su diferente regulación, lo que en nuestro caso se puso de relieve con el modelo de restricción del alimento. De acuerdo con ello, el desacople respiratorio mediado por las UCPs no debe ser la primera opción de regulación, por lo que en la medida que exista

un margen de maniobra ante un mayor flujo de sustratos energéticos se deberá aumentar la capacidad oxidativa antes que el desacople respiratorio. En este sentido, la regulación a nivel de sustrato propuesta, en el **apartado 7.3.2**, para el músculo blanco debe verse como una ventaja evolutiva, especialmente para especies de zonas templadas que de forma natural están sujetas a un patrón de crecimiento y disponibilidad de nutrientes marcadamente estacional.

Por consiguiente, y a modo de resumen final, los marcadores analizados, junto con otros de estrés oxidativo como las PRDXs, ofrecen una información complementaria e integradora que por sí sola puede resultar difícil de interpretar, pero que tomada en conjunto es relevante a la hora de diseñar la estrategia más adecuada frente a unos determinados riesgos de estrés oxidativo, que en gran parte son reflejo del historial nutricional y de los cambios metabólicos que de forma cíclica ocurren a lo largo del ciclo biológico. En la medida que aumente el grado de conocimiento, ello puede ser una ventaja selectiva frente a otros sistemas de producción y competidores potenciales con las implicaciones científico-prácticas que ello comporta.



**Figura 7.10.** Esquema resumen de la respuesta de la GRP75/mortalina y de UCP1 y UCP3 de dorada en los diferentes modelos experimentales analizados.





## CAPÍTULO 8

### Conclusiones



**PRIMERA:** la GRP75/mortalina de dorada presenta un alto grado de homología e identidad con sus ortólogos de vertebrados tetrápodos.

**SEGUNDA:** el análisis filogenético de la familia de las Hsp70 muestra una separación temprana de la rama mitocondrial de la GRP75/mortalina.

**TERCERA:** el ARNm que codifica para la GRP75/ mortalina aumenta con el estrés por confinamiento, el estrés nutricional, un escaso grado de domesticación y la exposición a retos infecciosos.

**CUARTA:** la expresión hepática de la GRP75/mortalina es marcadamente inducible y la magnitud de la respuesta es dependiente de la intensidad del estímulo en modelos de estrés por confinamiento.

**QUINTA:** la expresión hepática de la GRP75/mortalina a nivel de ARNm está altamente correlacionada con la de proteína.

**SEXTA:** el análisis filogenético de las UCPs refleja la actual jerarquía de los vertebrados, aunque la adquisición reciente de la función termogénica ha hecho que el clado de la UCP1 no constituya una rama monofilética

**SÉPTIMA:** la UCP1 se expresa mayoritariamente en hígado y de forma secundaria a nivel intestinal.

**OCTAVA:** la UCP3 se expresa en corazón y músculo esquelético de forma inversamente proporcional a la capacidad oxidativa del tejido.

**NOVENA:** la expresión hepática de UCP1 es inducible y aumenta con la mayor deposición grasa asociada a modelos de edad y deficiencias en ácidos grasos esenciales.

**DÉCIMA:** la expresión hepática de UCP1 está expuesta a cambios estacionales y disminuye con el aumento de la demanda energética en modelos de estrés crónico por confinamiento y de cambios de estación.

**UNDÉCIMA:** la expresión de UCP3 en corazón y músculo esquelético aumenta con la redistribución de la grasa corporal y una mayor disponibilidad de sustratos energéticos cuando otros mecanismos alternativos no son capaces de minimizar el riesgo de lipotoxicidad y estrés oxidativo.

**DUODÉCIMA:** la GRP75/mortalina y las UCPs forman parte de un sistema integral que confiere a la mitocondria un papel clave en la respuesta celular frente a un amplio rango de agentes estresantes.

## CAPÍTULO 9

### **Bibliografía general**





Adam-Vizi, V., Chinopoulos, C., 2006. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 27, 639-645.

Aksakal, E., Ekinci, D., Erdoğan, O., Beydemir, S., Alim, Z., Ceyhun, S.B., 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Livestock Sci* 141, 69-75.

Alberici, L.C., Vercesi, A.E., Oliveira, H.C.F., 2011. Mitochondrial energy metabolism and redox responses to hypertriglyceridemia. *J Bioenerg Biomembr* 43, 19-23.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> edition. Garland Science. New York.

Alvarez-Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 171-198.

Andersson, S.G.E., Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C.G., 2003. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci* 358, 165-177.

Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., Kurland, C.G., 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133-140.

Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70, 200-214.

APROMAR, 2011. La acuicultura marina de peces en España. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, APROMAR. Cádiz. 76 pp.

Arthur, J.R., Bondad-Reantaso, M.G., Hewitt, C., Campbell, M.L., Hewitt, C.L., Phillips, M.J., Subasinghe, R.P., 2009. Understanding and applying risk analysis in aquaculture: a manual for decision-makers. FAO, Documento técnico de pesca y acuicultura n° 519/1. Roma. 113 pp. Roma.

Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *App Anim Behav Sci* 104, 199-235.

Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 C. *J Therm Biol* 32, 227-234.

Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol* 42, 517-525.

Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu rev fish dis* 1, 3-26.

Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2010. Tissue-specific robustness of fatty acid signatures in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed practical diets with a combined high replacement of fish meal and fish oil. *J Anim Sci* 88, 1759-1770.

Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Bermejo-Nogales, A., Saera-Vila, A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2009. The time course of fish oil wash-out follows a simple dilution model in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of vegetable oils. *Aquaculture* 288, 98-105.

Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Sitjà-Bobadilla, A., Bell, J.G., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2008. High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *Br J Nutr* 100, 992-1003.

Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldach-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2007. Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267, 199-212.

Berg, F., Gustafson, U., Andersson, L., 2006. The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: A genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genet* 2, 1178-1181.

Bermejo-Nogales, A., Borrel-Roda, M., Pérez-Sánchez, J., 2012. Development and validation of rabbit polyclonal antibodies raised against uncoupling proteins (UCPs) of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Avances en endocrinología comparada. Vol. VI. Departamento fisiología. Universidad Complutense de Madrid. Madrid pp. (pendiente de publicación).

Bishop, T., Brand, M.D., 2000. Processes contributing to metabolic depression in hepatopancreas cells from the snail *Helix aspersa*. J Exp Biol 203, 3603-3612.

Björnsson, B.T., Johansson, V., Benedet, S., Einarsdottir, I.E., Hildahl, J., Agustsson, T., Jönsson, E., 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. Fish Physiol Biochem 27, 227-242.

Boss, O., Samec, S., Kühne, F., Bijlenga, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Giacobino, J.-P., Muzzin, P., 1998. Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. J. Biol. Chem. 273, 5-8.

Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., Giacobino, J.P., 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett. 408, 39-42.

Bostock, J., 2011. The application of science and technology development in shaping current and future aquaculture production systems. J Agr Sci 149, 133-141.

Brand, M.D., Chien, L.F., Ainscow, E.K., Rolfe, D.F.S., Porter, R.K., 1994. The causes and functions of mitochondrial proton leak. BBA- Bioenergetics 1187, 132-139.

Brand, M.D., Esteves, T.C., 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. Cell Metab 2, 85-93.

Braun, N., de Lima, R.L., Baldisserotto, B., Dafre, A.L., de Oliveira Nuñez, A.P., 2010. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. Aquaculture 301, 22-30.

Brown, J.C.L., Staples, J.F., 2011. Mitochondrial metabolic suppression in fasting and daily torpor: Consequences for reactive oxygen species production. *Physiol Biochem Zool* 84, 467-480.

Brown, J.C.L., Gerson, A.R., Staples, J.F., 2007. Mitochondrial metabolism during daily torpor in the dwarf Siberian hamster: role of active regulated changes and passive thermal effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1833-R1845.

Brown, K.H., 2008. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. *J Fish Biol* 72, 355-374.

Brun, S., Carmona, M.C., Mampel, T., Viñas, O., Giralt, M., Iglesias, R., Villarroya, F., 1999. Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett.* 453, 205-209.

Burpee, J., Bardsley, E., Dillaman, R., Watanabe, W., Kinsey, S., 2010. Scaling with body mass of mitochondrial respiration from the white muscle of three phylogenetically, morphologically and behaviorally disparate teleost fishes. *J Comp Physiol* 180B, 967-977.

Cairns, M.T., Johnson, M.C., Talbot, A.T., Pernmasani, J.K., McNeill, R.E., Houeix, B., Sangrador-Vegas, A., Pottinger, T.G., 2008. A cDNA microarray assessment of gene expression in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a handling and confinement stressor. *Comp Biochem Physiol* 3D, 51-66.

Calduch-Giner, J., Davey, G., Saera-Vila, A., Houeix, B., Talbot, A., Prunet, P., Cairns, M., Pérez-Sánchez, J., 2010. Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *BMC Genomics* 11, 193.

Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream, (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp Biochem Physiol* 136B, 1-13.

- Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: Molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269-3273.
- Cara, J.B., Aluru, N., Moyano, F.J., Vijayan, M.M., 2005. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. *Comp Biochem Physiol* 142B, 426-431.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Choi, J., Forster, M.J., McDonald, S.R., Weintraub, S.T., Carroll, C.A., Gracy, R.W., 2004. Proteomic identification of specific oxidized proteins in ApoE-knockout mice: Relevance to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 36, 1155-1162.
- Cochrane, K., De Young, C., Soto, D., Bahri, T., 2009. Climate change implications for fisheries and aquaculture: overview of current scientific knowledge. FAO, Documento técnico de pesca y acuicultura n° 530. Roma. 212 pp.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2007. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquac Res* 39, 1-9.
- Coulibaly, I., Gahr, S.A., Palti, Y., Yao, J., Rexroad, C.E., 2006. Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 7.
- Craven, S.E., French, D., Ye, W., de Sauvage, F., Rosenthal, A., 2005. Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood* 105, 3528-3534.
- Daugaard, M., Rohde, M., Jaattela, M., 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581, 3702-3710.
- Deane, E.E., Kelly, S.P., Luk, J.C.Y., Woo, N.Y.S., 2002. Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream. *Mar biotechnol* 4, 193-205.

Deane, E.E., Woo, N.Y.S., 2005. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 776-783.

DeCoursey, T.E., Morgan, D., Cherny, V.V., 2002. The gp91<sup>phox</sup> component of NADPH oxidase is not a voltage-gated proton channel. *J Gen Physiol* 120, 773-779.

Delaney, M.A., Klesius, P.H., 2004. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 236, 633-644.

Deocaris, C., Kaul, S., Wadhwa, R., 2008. From proliferative to neurological role of an hsp70 stress chaperone, mortalin. *Biogerontology* 9, 391-403.

Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M.G., Massari, A., Mandich, A., Marino, G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275, 319-328.

DiMauro, S., 2004. Mitochondrial diseases. *BBA - Bioenergetics* 1658, 80-88.

Dumont, M., Beal, M.F., 2011. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 51, 1014-1026.

EFSA, 2008a. Scientific opinion of the panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon. *EFSA J* 736, 1-31.

EFSA, 2008b. Scientific opinion of the panel on animal health and welfare on a request from the European Commission on animal welfare aspects of husbandry systems for farmed European seabass and Gilthead seabream. *EFSA J* 844, 1-21.

EFSA, 2009. Scientific opinion of the panel on animal health and welfare on a request from european commission on general approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish. *EFSA J* 954, 1-16.

- Emre, Y., Hurtaud, C., Ricquier, D., Bouillaud, F., Hughes, J., Criscuolo, F., 2007. Avian UCP: The killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins. *J Mol Evol* 65, 392-402.
- Engelsma, M.Y., Huising, M.O., van Muiswinkel, W.B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H.F.J., Verburg-van Kemenade, B.M.L., 2002. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 467-479.
- Enyu, Y.L., Shu-Chien, A.C., 2011. Proteomics analysis of mitochondrial extract from liver of female zebrafish undergoing starvation and refeeding. *Aquacult Nutr* 17, E413-E423.
- Estensoro, I., Benedito-Palos, L., Palenzuela, O., Kaushik, S., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 2011. The nutritional background of the host alters the disease course in a fish-myxosporean system. *Veterinary Parasitology* 175, 141-150.
- Eya, J.C., Ashame, M.F., Pomeroy, C.F., 2010. Influence of diet on mitochondrial complex activity in channel catfish. *N Am J Aquacult* 72, 225-236.
- Eya, J.C., Ashame, M.F., Pomeroy, C.F., 2011. Association of mitochondrial function with feed efficiency in rainbow trout: Diets and family effects. *Aquaculture* 321, 71-84.
- Fanouraki, E., Mylonas, C.C., Papandroulakis, N., Pavlidis, M., 2011. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *Gen Comp Endocrinol* 173, 313-322.
- FAO, 2007. Instrumentos de la FAO sobre bioseguridad. . Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- FAO, 2008. FISHSTAT Plus: Universal software for fishery statistical time series. Versión 2.3.
- FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO Fisheries department. Roma.
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Köllner, B., Ototake, M., Nakanishi, T., 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* 20, 209-226.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., LeviMeyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S.,

Ricquier, D., Warden, C.H., 1997. Uncoupling protein-2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15, 269-272.

Forman, H.J., Torres, M., 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J Respir Crit Care Med.* 166, S4-8.

Gallagher, D., Belmonte, D., Deurenberg, P., Wang, Z., Krasnow, N., Pi-Sunyer, F.X., Heymsfield, S.B., 1998. Organ-tissue mass measurement allows modeling of REE and metabolically active tissue mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275, E249-E258.

Gamperl, A.K., Vijayan, M.M., Boutilier, R.G., 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: Techniques and applications. *Rev Fish Biol Fisher* 4, 215-255.

Gómez-Requeni, P., Caldach-Giner, J., Vega-Rubín de Celis, S., Médale, F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2005. Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Brit J Nutr* 94, 353-361.

Goodyer, C.G., Zogopoulos, G., Schwartzbauer, G., Zheng, H., Hendy, G.N., Menon, R.K., 2001. Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5' flanking region. *Endocrinology* 142, 1923-1934.

Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341, 111-118.

Guerriero, G., Di Finizio, A., Ciarcia, G., 2002. Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp Biochem Physiol A Mol Int Physiol* 132, 205-211.

Guderley, H., 1997. Plasticity of the properties of mitochondria from rainbow trout red muscle with seasonal acclimatization. *Fish Physiol Biochem* 16, 531-541.

Guderley, H., Kraffe, E., Bureau, W., Bureau, D.P., 2008. Dietary fatty acid composition changes mitochondrial



phospholipids and oxidative capacities in rainbow trout red muscle. *J Comp Physiol* 178B, 385-399.

Guderley, H., St Pierre, J., 1999. Seasonal cycles of mitochondrial ADP sensitivity and oxidative capacities in trout oxidative muscle. *J Comp Physiol* 169B, 474-480.

Hamza, N., Silvestre, F., Mhetli, M., Khemis, I.B., Dieu, M., Raes, M., Cahu, C., Kestemont, P., 2010. Differential protein expression profile in the liver of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae fed with increasing levels of phospholipids. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 5, 130-137.

Harper, J.A., Stuart, J.A., Jekabsons, M.B., Roussel, D., Brindle, K.M., Dickinson, K., Jones, R.B., Brand, M.D., 2002. Artfactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem J* 361, 49-56.

Heaton, G.M., Wagenvoord, R.J., Kemp, A., Nicholls, D.G., 1978. Brown adipose tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem* 82, 515-521.

Hesselink, M.K.C., Keizer, H.A., Borghouts, L.B., Schaart, G., Kornips, C.F.P., Slieker, L.J., Sloop, K.W., Saris, W.H.M., Schrauwen, P., 2001. Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *FASEB J.* 15, 1071-1073.

Hilton, Z., Clements, K., Hickey, A., 2010. Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. *J. Comp. Physiol. B* 180, 979-990.

Hughes, D., Jastroch, M., Stoneking, M., Klingenspor, M., 2009. Molecular evolution of UCP1 and the evolutionary history of mammalian non-shivering thermogenesis. *BMC Evol Biol* 9, 4.

Hughes, J., Criscuolo, F., 2008. Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. *BMC Evol Biol* 8, 306.

Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandøe, P., Turnbull, J.F., 2006. Current issues in fish welfare. *J Fish Biol* 68, 332-372.

Huntingford, F.A., Kadri, S., 2009. Taking account of fish welfare: lessons from aquaculture. *J Fish Biol* 75, 2862-2867.

Iwama, G.K., Nakanishi, T., 1997. *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic press. San Diego.

Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.H.B., Vijayan, M.M., 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev Fish Biol Fisher* 8, 35-56.

Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K., 2004. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology* 207, 15-19.

Jastroch, M., Wuertz, S., Kloas, W., Klingenspor, M., 2005. Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol. Genomics* 22, 150-156.

Jastroch, M., Buckingham, J.A., Helwig, M., Klingenspor, M., Brand, M.D., 2007. Functional characterisation of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain. *J Comp Physiol B* 177, 743-752.

Jiménez-Jiménez, J., Zardoya, R., Ledesma, A., García de Lacoba, M., Zaragoza, P., Mar González-Barroso, M., Rial, E., 2006. Evolutionarily distinct residues in the uncoupling protein UCP1 are essential for its characteristic basal proton conductance. *J Mol Biol* 359, 1010-1022.

Jin, J., Hulette, C., Wang, Y., Zhang, T., Pan, C., Wadhwa, R., Zhang, J., 2006. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: Relevance to Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics* 5, 1193-1204.

Johnston, I.A., Calvo, J., Guderley, H., Fernandez, D., Palmer, L., 1998. Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *J Exp Biol* 201, 1-12.

Kajimura, S., Hirano, T., Visitacion, N., Moriyama, S., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF

binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. J Endocrinol 178, 91-99.

Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. Environ Health Perspect 106, 375-384.

Koban, M., Yup, A.A., Agellon, L.B., Powers, D.A., 1991. Molecular adaptation to environmental temperature: heat-shock response of the eurythermal teleost *Fundulus heteroclitus*. Mol Mar Biol Biotechnol 1, 1-17.

Koehler, C.M., 2000. Protein translocation pathways of the mitochondrion. FEBS Lett 476, 27-31.

Krauss, S., Zhang, C.Y., Lowell, B.B., 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 248-261.

Lam, S.H., Winata, C.L., Tong, Y., Korzh, S., Lim, W.S., Korzh, V., Spitsbergen, J., Mathavan, S., Miller, L.D., Liu, E.T., Gong, Z., 2006. Transcriptome kinetics of arsenic-induced adaptive response in zebrafish liver. Physiol Genomics 27, 351-361.

Lee, H.C., Wei, Y.H., 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. Int J Biochem Cell Biol 37, 822-834.

Liang, X.F., Ogata, H.Y., Oku, H., Chen, J., Hwang, F., 2003. Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major* Comp Biochem Physiol 136A, 655-661.

Liao, W.Q., Liang, X.F., Wang, L., Fang, L., Lin, X.T., Bai, J.J., Jian, Q., 2006. Structural conservation and food habit-related liver expression of uncoupling protein 2 gene in five major Chinese carps. J Biochem Mol Biol 39, 346-354.

Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat shock proteins. Annu Rev Genet 22, 631-677.

Liu, Y., Liu, W., Song, X.D., Zuo, J., 2005. Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS

accumulation following glucose deprivation in PC12 cells. *Mol Cell Biochem* 268, 45-51.

Margulis, L., 1996. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1071-1076.

Mark, F.C., Lucassen, M., Pörtner, H.O., 2006. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. *Comp Biochem Physiol* 1D, 365-374.

Martin, N., Kraffe, E., Guderley, H., 2009. Effect of day length on oxidative capacities of mitochondria from red muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol* 152A, 599-603.

Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192, 1-15.

Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fisher* 15, 75-88.

Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, R., Astola, A., Pendón, C., Martínez Valdivia, M., Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen Comp Endocrinol* 128, 102-111.

Minowada, G., Welch, W.J., 1995. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 95, 3-12.

Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Mitchell, P., 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Philosophic. Soc.* 41, 445.

Moerth, C., Schneider, M.R., Renner-Mueller, I., Blutke, A., Elmlinger, M.W., Erben, R.G., Camacho-Hübner, C., Hoeflich, A., Wolf, E., 2007. Postnatally elevated levels of insulin-like growth factor (IGF)-II fail to rescue the Dwarfism of IGF-I-

deficient mice except kidney weight. *Endocrinology* 148, 441-451.

Monteiro, G., Horta, B.B., Pimenta, D.C., Augusto, O., Netto, L.E.S., 2007. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4886-4891.

Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol Biochem* 20, 53-60.

Moon, E.Y., Noh, Y.W., Han, Y.H., Kim, S.U., Kim, J.M., Yu, D.Y., Lim, J.S., 2006. T lymphocytes and dendritic cells are activated by the deletion of peroxiredoxin II (Prx II) gene. *Immunol Lett* 102, 184-190.

Mourente, G., Tocher, D.R., Diaz, E., Grau, A., Pastor, E., 1999. Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture* 179, 309-324.

Mourente, G., Good, J.E., Thompson, K.D., Bell, J.G., 2007. Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Br J Nutr* 98, 770-779.

Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.

Nanton, D.A., Lall, S.P., Ross, N.W., McNiven, M.A., 2003. Effect of dietary lipid level on fatty acid  $\beta$ -oxidation and lipid composition in various tissues of haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Comp Biochem Physiol* 135B, 95-108.

Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2003. *Bioenergetics* Third edition. Academic Press. London. 288 p.

Nicholls, D.G., Locke, R.M., 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64.

Ojima, N., Yamashita, M., Watabe, S., 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 51-57.

Osuna-Jiménez, I., Williams, T.D., Prieto-Álamo, M.J., Abril, N., Chipman, J.K., Pueyo, C., 2009. Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish Shellfish Immunol* 26, 699-706.

Pagel-Langenickel, I., Bao, J., Pang, L., Sack, M.N., 2010. The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance. *Endocr Rev* 31, 25-51.

Pankhurst, N.W., 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *Gen Comp Endocrinol* 170, 265-275.

Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., L'vi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F.d., Miroux, B., 2001. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276, 8705-8712.

Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol* 65, 337-360.

Pérez-Sánchez, J., Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Sitjà-Bobadilla, A., 2011. Molecular characterization and expression analysis of six peroxiredoxin paralogous genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Insights from fish exposed to dietary, pathogen and confinement stressors. *Fish Shellfish Immunol* 31 (2), 294-302.

Pérez-Sánchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., Valdivia, M.M., 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 243-258.

Pérez-Sánchez, J., Le Bail, P.Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117-128.

- Peterson, B.C., Small, B.C., 2005. Effects of exogenous cortisol on the GH/IGF-I/IGFBP network in channel catfish. *Dom Anim Endocrinol* 28, 391-404.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., Carragher, J.F., Le Bail, P.Y., 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* *Gen Comp Endocrinol* 83, 86-93.
- Prunet, P., Sturm, A., Milla, S., 2006. Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts. *Gen Comp Endocrinol* 147, 17-23.
- Rassow, J., Pfanner, N., 2000. The protein import machinery of the mitochondrial membranes. *Traffic* 1, 457-464.
- Rhee, S.G., Chae, H.Z., Kim, K., 2005. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Bio Med* 38, 1543-1552.
- Rigoulet, M., Yoboue, E.D., Devin, A., 2011. Mitochondrial ROS generation and its regulation: Mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Antioxid Redox Signal* 14, 459-468.
- Ritossa, F., 1962. New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571-573.
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J Fish Dis* 33, 789-801.
- Rodolfo, C., Ciccocanti, F., Di Giacomo, G., Piacentini, M., Fimia, G.M., 2010. Proteomic analysis of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Proteomics* 7, 519-542.
- Rolfe, D.F.S., Newman, J.M.B., Buckingham, J.A., Clark, M.G., Brand, M.D., 1999. Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am J Physiol Cell Physiol* 276, C692-C699.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead

sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei ) after handling and confinement stress. Gen Comp Endocrinol 121, 333-342.

Rotllant, J., Balm, P.H.M., Ruane, N.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2000a. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: Differential regulation of adrenocorticotropin hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. Gen Comp Endocrinol 119, 152-163.

Rotllant, J., Arends, R.J., Mancera, J.M., Flik, G., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2000b. Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. Fish Physiol Biochem 23, 13-22.

Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Adad, M.E., Tort, L., 1997. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. Aquaculture 156, 279-290.

Rotwein, P., 1991. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. Growth Factors 5, 3-18.

Russell, A.P., Wadley, G., Hesselink, M.K.C., Schaart, G., Lo, S., Léger, B., Garnham, A., Kornips, E., Cameron-Smith, D., Giacobino, J.P., Muzzin, P., Snow, R., Schrauwen, P., 2003. UCP3 protein expression is lower in type I, IIa and IIx muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects. Pflugers Arch 445, 563-569.

Saera-Vila, A., Benedito-Palos, L., Sitjà-Bobadilla, A., Nacher-Mestre, J., Serrano, R., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2009<sup>a</sup>. Assessment of the health and antioxidant trade-off in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed alternative diets with low levels of contaminants. Aquaculture 296, 87-95.

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Prunet, P., Pérez-Sánchez, J., 2009<sup>b</sup>. Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement. Differential stress response of growth hormone receptors. Comp Biochem Physiol 154A, 197-203.



Saera-Vila, A., 2009c. Duplicación, organización genómica y regulación transcripcional de los receptores de la hormona del crecimiento de peces. Aspectos básicos y aplicados en dorada, *Sparus aurata*. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València. Valencia. 201 pp.

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2007. Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region. *J Endocrinol* 194, 361-372.

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol* 142, 193-203.

Saito, S., Saito, C.T., Shingai, R., 2008. Adaptive evolution of the uncoupling protein 1 gene contributed to the acquisition of novel nonshivering thermogenesis in ancestral eutherian mammals. *Gene* 408, 37-44.

Schaffer, J.E., 2003. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14, 281-287.

Schoonheim, P.J., Chatzopoulou, A., Schaaf, M.J.M., 2010. The zebrafish as an in vivo model system for glucocorticoid resistance. *Steroids* 75, 918-925.

Schrauwen, P., Hoeks, J., Hesselink, M.K.C., 2006. Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: Involvement in fatty acid metabolism? *Prog. Lipid. Res.* 45, 17-41.

Schrauwen, P., Hesselink, M.K.C., Blaak, E.E., Borghouts, L.B., Schaart, G., Saris, W.H.M., Keizer, H.A., 2001a. Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50, 2870-2873.

Schrauwen, P., Hoppeler, H., Billeter, R., Bakker, A.H.F., Pendergast, D.R., 2001b. Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int J Obes* 25, 449-456.

Schwartz, T.S., Murray, S., Seebacher, F., 2008. Novel reptilian uncoupling proteins: molecular evolution and gene expression during cold acclimation. *Proc R Soc B* 275, 979-985.

Scott, A.P., Ellis, T., 2007. Measurement of fish steroids in water: a review. *Gen Comp Endocrinol* 153, 392-400.

Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32.

Shahidi, F., Dunajski, E., 1994. Lipid fatty acids, growth and compositional characteristics of farmed cod (*Gadus morhua*). *J Food Lipids* 1, 265-271.

Sheder, D.L., Williams, T.D., Lyons, B.P., Chipman, J.K., 2006. Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray. *Mar Environ Res* 62, 33-44.

Shoshan-Barmatz, V., Gincel, D., 2003. The voltage-dependent anion channel: Characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem. Biophys.* 39, 279-292.

Sitjà-Bobadilla, A., Caldach-Giner, J., Saera-Vila, A., Palenzuela, O., Álvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2008. Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol* 24, 610-619.

Sitjà-Bobadilla, A., Diamant, A., Palenzuela, O., Alvarez-Pellitero, P., 2007. Effect of host factors and experimental conditions on the horizontal transmission of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) to gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., and European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J Fish Dis* 30, 243-250.

Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387-400.

- Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., 1999. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 9, 637-640.
- Skulachev, V.P., 1991. Fatty-acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative-phosphorylation. *FEBS Lett* 294, 158-162.
- Soares, S.S., Gutiérrez-Merino, C., Aureliano, M., 2007. Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in *Sparus aurata* heart. *Aquat Toxicol* 83, 1-9.
- Stark, R., Roden, M., 2007. Mitochondrial function and endocrine diseases. *Eur J Clin Invest* 37, 236-248.
- Stolte, E.H., Nabuurs, S.B., Bury, N.R., Sturm, A., Flik, G., Savelkoul, H.F.J., Lidy Verburg-van Kemenade, B.M., 2008. Stress and innate immunity in carp: Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. *Mol Immunol* 46, 70-79.
- Stuart, J.A., Cadenas, S., Jekabsons, M.B., Roussel, D., Brand, M.D., 2001. Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochim Biophys Acta* 1504, 144-158.
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M., Brand, M.D., 1999. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim Biophys Acta* 1413, 50-54.
- Sung, Y.Y., MacRae, T.H., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2011. Stress response for disease control in aquaculture. *Rev Aquaculture* 3, 120-137.
- Sunyer, J.O., Gómez, E., Navarro, V., Quesada, J., Tort, L., 1995. Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following daily acute stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 2339-2346.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., Anderson, R.L., 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1, 23-28.
- Thorne, M.A.S., Burns, G., Fraser, K.P.P., Hillyard, G., Clark, M.S., 2010. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. *Mar Genomics* 3, 35-44.

- Tian, L., Caib, Q., Wei, H., 1998. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med* 24, 1477-1484.
- Tintos, A., Míguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2006. Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. *J Fish Biol* 68, 251-263.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Van der Eecken, A., Evjemo, J.O., Diaz, E., Bell, J.G., Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y., 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult Nutr* 8, 195-207.
- Todorčević, M., Škugor, S., Krasnov, A., Ruyter, B., 2010. Gene expression profiles in Atlantic salmon adipose-derived stromovascular fraction during differentiation into adipocytes. *BMC Genomics* 11.
- Tort, L., Sunyer, J.O., Gómez, E., Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet Immunol Immunopathol* 51, 179-188.
- Trenzado, C.E., Morales, A.E., Palma, J.M., de la Higuera, M., 2009. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. *Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149, 440-447.
- Truscott, K.N., Brandner, K., Pfanner, N., 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13, R326-R337.
- Trzcionka, M., Withers, K.W., Klingenspor, M., Jastroch, M., 2008. The effects of fasting and cold exposure on metabolic rate and mitochondrial proton leak in liver and skeletal muscle of an amphibian, the cane toad *Bufo marinus*. *J Exp Biol* 211, 1911-1918.
- Tseng, Y.-C., Chen, R.-D., Lucassen, M., Schmidt, M.M., Dringen, R., Abele, D., Hwang, P.-P., 2011. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish. *PLoS ONE* 6, e18180.

- Unger, R.H., Zhou, Y.T., 2001. Lipotoxicity of  $\beta$ -cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 50, S118.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox Environ Safe* 64, 178-189.
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E.L., Parrinello, N., 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210, 231-243.
- Veiseth-Kent, E., Grove, H., Færgestad, E.M., Fjæra, S.O., 2010. Changes in muscle and blood plasma proteomes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) induced by crowding. *Aquaculture* 309, 272-279.
- Vela-Vallejo, S., González-Posada, J.O., 2007. *Acuicultura: La revolución azul*. Madrid.
- Verburg-Van Kemenade, B.M.L., Stolte, E.H., Metz, J.R., Chadzinska, M., 2009. Chapter 7: Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish. in: Nicholas J. Bernier, Glen Van der Kraak, Anthony P. Farrell, J.B. Colin (Eds.). *Fish Physiology*. Academic Press. 313-364 pp.
- Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J.S., Lowell, B.B., 1997. UCP3: An uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 79-82.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 116, 89-95.
- Wallace, D.C., 2004. Mitochondrial Genome, Overview. in: J.L. William, M.D. Lane (Eds.). *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier. New York. 709-715 pp.
- Wdzięczak, J., Zaleśna, G., Wujec, E., Pérès, G., 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp Biochem Physiol* 73B, 361-365.

Wedemeyer, G.A., Barton, B.A., McLeay, D.J., 1990. Stress and acclimation. *In* Schreck, C.B. and Moyle, P.B. (eds.), *Methods for fish biology*, pp. 451-489. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

Wei, Y.H., Rhani, Z., Goodyer, C.G., 2006. Characterization of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid variants in human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1901-1908.

Welch, W.J., 1992. Mammalian stress response. Cell physiology, structure, function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72, 1063-1081.

Welch, W.J., Feramisco, J.R., 1982. Purification of the major mammalian heat-shock proteins *J Biol Chem* 257, 14949-14959.

Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* 77, 591-625.

Wilkinson, R.J., Porter, M., Woolcott, H., Longland, R., Carragher, J.F., 2006. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comp Biochem Physiol* 145A, 214-224.

Yamashita, M., Hirayoshi, K., Nagata, K., 2004. Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: Molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene* 336, 207-218.

Zarate, J., Bradley, T.M., 2003. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. *Aquaculture* 223, 175-187.

Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55, 167-174.

Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., Zheng, X.X., Wheeler, M.B., Shulman, G.I., Chan, C.B., Lowell, B.B., 2001. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745-755.

## RESÚMENES





En la acuicultura intensiva existe una práctica creciente encaminada a maximizar tanto el crecimiento como la productividad de los peces mediante altas densidades de producción, dietas altamente energéticas y elevados regímenes de alimentación. Sin embargo, debido al interés en aumentar los mecanismos de control y mejora del bienestar animal, es necesario encontrar nuevos marcadores que evalúen la actividad piscícola. En este sentido, el uso de marcadores mitocondriales de estrés oxidativo y lipotoxicidad constituyen una herramienta indispensable para evaluar los riesgos sobre el bienestar de los peces. Es importante reseñar que cada uno de estos marcadores ofrece una información complementaria e integradora de especial interés cuando se considera una determinada especie, tejido y factor de estrés. Uno de esos mecanismos es la chaperona mitocondrial de la familia de las proteínas de choque térmico 70 (proteína regulada por la glucosa 75, GRP75/mortalina), que protege a los componentes mitocondriales de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Un segundo mecanismo es el llevado a cabo por las proteínas desacopladoras (UCP), una familia de transportadores mitocondriales que desacoplan la fosforilación oxidativa mediante la descarga neta del gradiente de protones y la disminución de la producción de ROS en un ambiente rico en ácidos grasos.

La caracterización molecular de la GRP75/mortalina y las UCPs en dorada (*Sparus aurata*) reveló un alto grado de conservación de los rasgos estructurales y parentesco evolutivo de estas familias de proteínas. En el caso de la GRP75/mortalina, esto permitió el uso de anticuerpos heterólogos para el análisis de expresión a nivel de proteína. Sin embargo, para la UCP1 y UCP3 fue necesario la evaluación de la actividad mediante medidas de respiración mitocondrial y la producción de anticuerpos específicos.

En cuanto al análisis funcional, en el caso de la GRP75/mortalina, el hígado es el órgano con una expresión marcadamente inducible en la respuesta al estrés por confinamiento y la escasa adaptación general a las condiciones de cultivo. De acuerdo con ello, los resultados obtenidos muestran una mayor expresión de la GRP75/mortalina en modelos de estrés agudo y de estrés crónico por confinamiento, que ha sido demostrada tanto a nivel de mensajero como de proteína, estando en consonancia la respuesta con la intensidad del estímulo. Asimismo, la expresión hepática de GRP75/mortalina puede considerarse una medida integradora del estado general del animal y/o del grado de domesticación. De hecho, cuando se comparan entre sí dos especies con un potencial de crecimiento similar, pero con un comportamiento marcadamente estresable en el caso del dentón (*Dentex dentex*), se observa como una

peor adaptación a las condiciones de cultivo va ligada a una mayor expresión de la GRP75/mortalina hepática.

Respecto al análisis funcional de las UCPs, la UCP1 se expresa principalmente en hígado mientras que la UCP3 lo hace en el músculo esquelético y cardíaco, siendo su expresión inversamente proporcional a la capacidad oxidativa del tejido. Asimismo, tanto la UCP1 como la UCP3 están sujetas a una regulación específica por factores que directa o indirectamente alteran la disponibilidad energética y el metabolismo lipídico en general. De forma que, los resultados mostraron que la UCP1 hepática se encuentra bajo una regulación negativa relacionada con el incremento de la demanda energética (estrés por confinamiento) y la reducción del aporte energético durante la adaptación estacional. Mientras, los niveles de expresión de UCP1 aumentan con el acúmulo de grasa que se produce con la edad y de forma menos evidente con una dieta deficitaria en ácidos grasos esenciales (EFA). Asimismo, la UCP3 parece encontrarse bajo una regulación positiva relacionada con la redistribución de la grasa hacia el músculo (edad, dieta deficitaria en EFA y engorde estacional). No obstante, para determinar la regulación por el nivel de ingesta de la expresión de la UCP3 se utilizó un modelo de restricción de alimento que contempla tres regímenes de alimentación: i) ración máxima a saciedad visual (grupo R<sub>100</sub>), ii) 70% de la ración máxima (grupo R<sub>70</sub>) y iii) 70% de la ración máxima con una fase finalizadora de ración de mantenimiento (grupo R<sub>70-20</sub>). El régimen de alimentación condujo a dos estados energéticos diferentes. El grupo R<sub>70</sub> mostró una condición metabólica saludable con un mejor rendimiento y mayores niveles circulantes de IGF-I que los peces alimentados a saciedad. Por el contrario, el grupo R<sub>70-20</sub> mostró un estado catabólico con bajos niveles de IGF-I en combinación con niveles altos de GH y ácidos grasos libres. En cuanto a los niveles de expresión, la UCP3 presentó una expresión constitutiva en el músculo glucolítico de forma que se inactiva rápidamente cuando la capacidad oxidativa se mejora. Por otro lado, en los músculos aeróbicos los mecanismos compensatorios de oxidación de sustratos son teóricamente menos operativos y el desacople de la respiración ajustaría el sistema de defensa antioxidante para proteger a la mitocondria frente a los efectos adversos de la lipotoxicidad.

Como conclusión general, la GRP75/mortalina funciona como mecanismo de protección celular mientras que las UCPs disminuyen el riesgo de lipotoxicidad y ambos forman parte de la respuesta integrada para disminuir el estrés oxidativo. Por tanto, pueden utilizarse junto con otras proteínas mitocondriales para establecer límites en la práctica acuícola y particularmente en la dorada.

En l'aqüicultura intensiva hi ha una pràctica creixent encaminada a maximitzar tant el creixement com la productivitat dels peixos per mitjà d'altas densitats de producció, dietes altament energètiques i elevats règims d'alimentació. No obstant això, degut a l'interès a augmentar els mecanismes de control i millora del benestar animal, és necessari trobar nous marcadors que avaluen l'activitat piscícola. En aquest sentit, l'ús de marcadors mitocondrials d'estrès oxidatiu i lipotoxicitat constitueixen una ferramenta indispensable per avaluar els riscos sobre el benestar dels peixos. És important ressenyar que cada un d'estos marcadors oferix una informació complementària i integradora d'especial interès quan es considera una determinada espècie, teixit i factor d'estrès. Un d'eixos mecanismes és la chaperona mitocondrial de la família de les proteïnes de xoc tèrmic 70 (proteïna regulada per la glucosa 75, GRP75/mortalina), que protegeix als components mitocondrials de les espècies reactives d'oxigen (ROS). Un segon mecanisme és el dut a terme per les proteïnes desacobladores (UCP), una família de transportadors mitocondrials que desacoblen la fosforilació oxidativa per mitjà de la descàrrega neta del gradient de protons i la disminució de la producció de ROS en un ambient ric en àcids grassos.

La caracterització molecular de la GRP75/mortalina i les UCPs en orada (*Sparus aurata*) va revelar un alt grau de conservació dels trets estructurals i parentiu evolutiu d'estes famílies de proteïnes. En el cas de la GRP75/mortalina, açò va permetre l'ús d'anticossos heteròlegs per a l'anàlisi d'expressió a nivell de proteïna. No obstant això, per a la UCP1 i UCP3 va ser necessari l'avaluació de l'activitat per mitjà de mesures de respiració mitocondrial i la producció d'anticossos específics.

Quant a l'anàlisi funcional, en el cas de la GR75/mortalina, el fetge és l'òrgan amb una expressió marcadament induïble en la resposta a l'estrès per confinament i l'escassa adaptació general a les condicions de cultiu. D'acord amb això, els resultats obtinguts mostren una major expressió de la GRP75/mortalina en models d'estrès agut i d'estrès crònic per confinament, que ha sigut demostrada tant a nivell de missatger com de proteïna, estant d'acord la resposta amb la intensitat de l'estímul. Així mateix, l'expressió hepàtica de GRP75/mortalina pot considerar-se una mesura integradora de l'estat general de l'animal i/o del grau de domesticació. De fet, quan es comparen entre sí dos espècies amb un potencial de creixement semblant, però amb un comportament marcadament estressant en el cas del déntol (*Dentex dentex*), s'observa com una pitjor adaptació a les condicions de cultiu va lligada a una major expressió de la GRP75/mortalina hepàtica.

Respecte a l'anàlisi funcional de les UCPs, la UCP1 s'expressa principalment en fetge mentre que la UCP3 ho fa en el múscul esquelètic i cardíac, sent la seua expressió inversament proporcional a la capacitat oxidativa del teixit. Així mateix, tant la UCP1 com la UCP3 estan subjectes a una regulació específica per factors que directament o indirectament alteren la disponibilitat energètica i el metabolisme lipídic en general. D'esta manera, els resultats van mostrar que la UCP1 hepàtica es troba davall una regulació negativa relacionada amb l'increment de la demanda energètica (estrès per confinament) i la reducció de l'aportació energètica durant l'adaptació estacional. Mentrestant, els nivells d'expressió d'UCP1 augmenten amb l'acumul gras que es produïx amb l'edat i de forma menys evident amb una dieta deficitària en àcids grassos essencials (EFA). Així mateix, la UCP3 pareix trobar-se davall una regulació positiva relacionada amb la redistribució del greix cap al múscul (edat, dieta deficitària en EFA i engreixament estacional). No obstant això, per a determinar la regulació pel nivell d'ingesta de l'expressió de la UCP3 es va utilitzar un model de restricció d'aliment que contempla tres règims d'alimentació: i) ració màxima a sacietat visual (grup R<sub>100</sub>), ii) 70% de la ració màxima (grup R<sub>70</sub>) i iii) 70% de la ració màxima amb una fase final de ració de manteniment (grup R<sub>70-20</sub>). El règim d'alimentació va conduir a dos estats energètics diferents. El grup R<sub>70</sub>, va mostrar una condició metabòlica saludable amb un millor rendiment i majors nivells circulants d'IGF-I que els peixos alimentats a sacietat. Al contrari, el grup R<sub>70-20</sub> va mostrar un estat catabòlic amb baixos nivells d'IGF-I en combinació amb nivells alts de GH i àcids grassos lliures. Quant als nivells d'expressió, la UCP3 va presentar una expressió constitutiva en el múscul glucòlitic de manera que es inactiva ràpidament quan la capacitat oxidativa es millora. D'altra banda, en els músculs aeròbics els mecanismes compensatoris d'oxidació de substrats són teòricament menys operatius i el desacoble de la respiració ajustaria el sistema de defensa antioxidant per a protegir a la mitocondria enfront dels efectes adversos de la lipotoxicitat.

Com a conclusió general, la GRP75/mortalina funciona com a mecanisme de protecció cel·lular mentre que les UCPs disminueixen el risc de lipotoxicitat i ambdós formen part de la resposta integrada per a disminuir l'estrès oxidatiu. Per tant, poden utilitzar-se junt amb altres proteïnes mitocondrials per a establir límits en la pràctica aquícola i particularment en la orada.

There is an increasing trend in intensive aquaculture towards maximizing both fish growth and productivity with high densities, high energy diets and high feeding rates. However, due to the interest to improve control mechanisms and fish welfare, it is necessary to find new markers that evaluate aquaculture practices. In this sense, the use of mitochondrial markers of oxidative stress and lipotoxicity are an essential tool to evaluate the risks of fish welfare. It is important to stand out that each of these markers provides complement and integrative information of special interest when specific species, tissues and stressors are considered. One of these mechanisms is the mitochondrial chaperone of the heat shock protein 70 family (glucose regulated protein 75, GRP75/mortalin), that protects mitochondrial components from the reactive oxygen species (ROS). A second mechanism is carried out by the uncoupling proteins (UCP), a family of mitochondrial transporters that uncouple the oxidative phosphorylation through the net discharge of proton gradient and diminish ROS production in a fatty acid rich milieu.

Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) GRP75/mortalin and UCPs demonstrate a high conservation degree of structural features and evolutionary closely related families of proteins. For GRP75/mortalin, the high degree of amino acid similarity enables the use of heterologous antibodies for protein analysis. Conversely, measures of respiration uncoupling and production of specific antibodies were necessary for UCP1 and UCP3.

Functional analysis of GRP75/mortalin shows inducible expression pattern of liver transcripts in response to confinement stress and with low adaptation to culture conditions. Accordingly, high expression of GRP75/mortalin was found in acute and chronic confinement stress at the mRNA and protein level, and the magnitude of the response was in accordance with the intensity of the stressor. Likewise, the hepatic expression of GRP75/mortalin could be considered as an integrative measure of the general state of the animal and/or domestication degree. In fact, when two species with similar growth potential are compared, but a stressful behavior in the case of common dentex (*Dentex dentex*), it is observed that poorly adapted to culture conditions is associated to a high expression of hepatic GRP75/mortalin. Regarding UCPs functional analysis, UCP1 is primarily expressed in liver whereas UCP3 was detected in skeletal and cardiac muscles, and the expression was inversely correlated to the oxidative capacity of the tissue. Similarly, both UCP1 and UCP3 are specific-regulated through factors that direct or indirectly alters energy supply and lipid metabolism in general. So that, the results showed that hepatic UCP1 is under negative regulation related to the increase in energy demand (confinement stress) and the reduction of energy intake

during the seasonal adaptation. Meanwhile, UCP1 expression levels increase with fat deposition that occurs with age, and less evident with a diet deficient in essential fatty acids (EFA). Also, UCP3 appears to be under positive regulation related to the redistribution of lipids towards the muscle (age, diet deficient in EFA and seasonal fattening). However, to examine the effects of ration size on the regulation of UCP3 juvenile fish were fed at three different levels: i) full ration until visual satiety (R<sub>100</sub> group), ii) 70% of satiation (R<sub>70</sub> group) and iii) 70% of satiation with two finishing weeks at the maintenance ration (R<sub>70-20</sub> group). Ration size led to two different energy states. The thirty percent feed restriction improved fish performance, increasing feed conversion efficiency and circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I). Conversely, fish of the R<sub>70-20</sub> group showed a catabolic state with low circulating levels of IGF-I in combination with increased circulating concentrations of growth hormone and free fatty acids. Regarding expression levels, UCP3 is constitutively expressed in white glycolytic muscle so that is rapidly inactive when the oxidative capacity is improved. However, in aerobic muscles, the compensatory mechanisms are theoretically less operative, and respiration uncoupling would match the oxidative defense system to protect the mitochondria against lipid-induced oxidative stress.

In summary, GRP75/mortalin serves as a mechanism of cellular protection while UCPs decrease the risk of lipotoxicity and both are part of the integrated response to reduce oxidative stress. They can therefore be used along with other mitochondrial proteins to set limits on aquaculture practice and particularly in the gilthead sea bream.

