

## Diseño y evaluación de primers para el estudio de la expresión del gen *PepT1* en células del epitelio intestinal de juveniles de tilapia (*Oreochromis sp.*) por RT-PCR

Design and evaluation of primers for the study of gene expression of *PepT1* in intestinal epithelial cells of juvenile tilapia (*Oreochromis sp.*) by RT-PCR

**Biol. Juan Manuel  
Vera Delgado, M.Sc.**

Instituto de Investigación Científica,  
Escuela de Ingeniería en Acuicultura  
y Pesquerías, Universidad Técnica de  
Manabí; Portoviejo, Manabí, Ecuador  
jmvera@utm.edu.ec  
yiyoverapigsa@gmail.com

### RESUMEN

El péptido transportador 1 (*PepT1*) es una proteína de membrana que facilita la captación de di/tri péptidos en el intestino. Estudios funcionales y estructurales han proporcionado información detallada sobre las características del gen *PepT1* y varios aspectos de su regulación en vertebrados superiores, sin embargo, la información en vertebrados inferiores, donde se incluyen los peces, es limitada. *PepT1* juega una importante función en la absorción de oligopéptidos y por lo tanto en el crecimiento de los peces. Los resultados de alineación de secuencias, usando el programa ClustalW, mostraron que *PepT1* en tilapia (*Oreochromis sp.*) consiste de 21 exones, cubriendo una región genómica de unos 8 938 nucleótidos; mientras, la región codificante corresponde a 2 274 nucleótidos. Diferentes primers fueron diseñados basados en las regiones más homólogas de los alineamientos ClustalW. Seis pares de cebadores fueron seleccionados para el experimento de RT-PCR y el ARN extrayéndolo del intestino de juveniles de tilapia. Los amplicones esperados se obtuvieron por cada par de cebadores, en virtud de diversas temperaturas de hibridación y tiempo de amplificación.

**Palabras clave:** *PepT1*; *SLC15A1*; tilapia; *Oreochromis niloticus*; primers; RT-PCR.

### ABSTRACT

The peptide transporter 1 (*PepT1*) is a membrane protein that facilitates uptake of di/tri-peptides in the intestine. Structural and functional studies have provided detailed information on the characteristics of *PepT1* gene and various aspects of its regulation in higher vertebrates, however, the information in lower vertebrates, where fish are included, is limited. *PepT1* plays an important function in the oligopeptide absorption and thus the growth of the fish. The results from sequence alignment using the ClustalW program showed that tilapia (*Oreochromis sp.*) *PepT1* consists of 21 exons, covering a genomic region of about 8938 nucleotides, while the coding region corresponds to 2274 nucleotides. Different primers were designed based on the most homologous regions in the ClustalW alignments. Six pairs of primers were selected for RT-PCR experiment and RNA was extracted from the intestine of juvenile tilapia. The expected amplicons were obtained by each pair of primers, under various annealing temperature and amplification time.

**Key words:** *PepT1*; *SLC15A1*; tilapia; *Oreochromis niloticus*; primers; RT-PCR.



Recibido: 30 de septiembre, 2014  
Aceptado: 17 de noviembre, 2014

## 1. INTRODUCCIÓN

**L**a digestión y absorción de proteínas a través del lumen intestinal de vertebrados, fueron pensadas originalmente para exigir la hidrólisis de proteínas en aminoácidos individuales libres (FAAs), que fueran posteriormente absorbidos desde el lumen intestinal. Sin embargo, ahora está claro que di y tripéptidos cortos, así como las FAAs, se absorben a través de vías múltiples y distintas (Daniel, 2004; Thwaites y Anderson, 2007; Gilbert et al., 2008b).

El transportador responsable de oligopéptidos que absorbe el intestino ha sido identificado como un miembro de la familia de transportadores de soluto 15 (SLC15), por lo que se le conoce también como SLC15A1, comúnmente llamado PepT1 (Meredith y Boyd, 2000; Daniel y Kottra, 2004; Ronnestad et al., 2007). Los estudios fisiológicos y moleculares han demostrado que el oligopéptido transportador intestinal es exclusivo del borde en cepillo de la membrana de la mucosa intestinal (Bakke et al., 2010; Ronnestad et al., 2007; Verri, et al., 2011).

Hay varios transportadores de aminoácidos (AA) asociados con el borde en cepillo de la membrana del tracto digestivo, pero sólo un péptido transportador, PepT1, ha sido identificado. Es una proteína unida a la membrana plasmática caracterizada por su baja afinidad, alta capacidad de cotransportar protones en combinación con di y tripéptidos (pero no simples aminoácidos o péptidos que contienen 4 o más aminoácidos) para absorción en la dieta. Se expresa principalmente en el intestino, utilizando el gradiente electroquímico de protones para conducir transporte cuesta arriba, un proceso que es independiente de Na<sup>+</sup> y electrogénico (Leibach y Ganapathy, 1996; Rubio-Aliaga y Daniel, 2002; Daniel, 2004; Daniel y Kottra, 2004).

Diversos estudios han proporcionado información detallada sobre las características moleculares, estructurales y funcionales de PepT1, así como diversos aspectos de su regulación en los vertebrados superiores. En cambio, la

información en los vertebrados inferiores donde se incluyen los peces, es muy limitada. Para otras especies no está claro si PepT1 juega un papel en aumento o disminución del crecimiento del animal, por ejemplo en *Caenorhabditis elegans* la delección de PepT1 resultó en una reducción de su tamaño corporal, mientras que en ratones la falta del PepT1 anula las funciones de desarrollo normal (Verri et al., 2011).

En los peces, los estudios se han dirigido a la secuencia, estructura, función, expresión, localización (tejido/órgano) y/o aspectos de la regulación de PepT1 por los tratamientos dietéticos, hormonales y/o factores ambientales (Bakke et al., 2010).

In vitro (Reshkin y Ahearn, 1991) e in vivo (Boge et al., 1981; Dabrowski et al., 2003, 2005) se evidencia el papel de soporte de oligopéptidos en la digestión de proteínas en peces y cómo pequeños péptidos son absorbidos más eficientemente que aminoácidos individuales libres (FAAs) (Boge et al., 1981; Reshkin y Ahearn, 1991). Los transportadores PepT1 son potencialmente una manera óptima para absorber aminoácidos en peces. Conocida la primera caracterización molecular en profundidad de PepT1 en el pez cebra (Verri et al., 2003), múltiples estudios han confirmado muchas similitudes entre transportadores de peces y mamíferos. Curiosamente, una relación entre el aumento de pH y la tasa máxima de transporte de dipéptidos se ha confirmado en varias especies de peces de agua dulce (Verri et al., 2003; Ronnestad et al., 2010), pero no tiene lugar para los transportadores de mamíferos. Es posible que esta característica del transportador PepT1 en peces, haya evolucionado para permitir que PepT1 funcione en un ambiente intestinal más básico, creado por un tracto gastrointestinal agástrico (Verri et al., 2003) o generalmente un intestino más alcalino (Ronnestad et al., 2010) que el de los mamíferos.

El ambiente alcalino intestinal en peces aclimatados en agua de mar puede resultar en un aumento aún mayor de la capacidad máxima de transporte, con el incremento del pH, en comparación con peces de agua

dulce. Sin embargo, la evidencia sugiere que transportadores PepT1 en peces de agua de mar no aumentan la tasa máxima de transporte con el aumento del pH (Sangaletti *et al.*, 2009), lo que expresa la posibilidad de variación específica de la especie en las propiedades de transporte, o la expresión de isoformas de transportadores alternativos en aguas dulce y de mar.

Hasta donde se sabe, sólo un estudio ha examinado el efecto de los cambios en la salinidad del ambiente en la expresión de PepT1. Kalujnaia *et al.* (2007) mostraron que la expresión de PepT1 en el intestino de la anguila aclimatada en agua dulce (*Anguilla anguilla*), disminuyó 70 % en el momento de aclimatación al agua de mar. Esto podría reflejar la necesidad de un máximo de regulación de la expresión de PepT1 en un ambiente de agua dulce para mantener un nivel similar de la capacidad de transporte o un cambio hacia el uso de una no identificada isomorfa alternativa en agua de mar; sin embargo, los efectos específicos de la salinidad externa sobre las características funcionales de PepT1 son desconocidos en la actualidad.

En peces teleósteos y en vertebrados superiores, PepT1 es fuertemente estimulado por un potencial eléctrico transmembranal (Ostaszewska, *et al.*, 2010), el cual se mantiene por el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que a su vez obtiene energía o depende del gradiente electroquímico de protones generado por la H<sup>+</sup>-ATPasa y/o Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (Segura *et al.*, 2010 y Ronnestad *et al.*, 2007).

La absorción de péptidos es energéticamente costosa y podría predecirse que es regulado descendientemente durante la inanición. Sin embargo, como la baja regulación de este transportador durante la hambruna se traduciría en la asimilación menos eficaz de las proteínas con la realimentación, la expresión de PepT1 podría ser mantenida o incluso aumentada durante el ayuno, a la espera de volver a la alimentación. En efecto, la expresión de PepT1 aumenta con el ayuno (Thamotharan *et al.*, 1999; Ihara *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2008) en los estudios de privación a corto plazo en mamíferos. También se ha observado sobrerregulación de PepT1 en peces, después de un corto período de

ayuno (7 días) (Hakim *et al.*, 2009), aunque esto no se ha observado permanentemente (Terova *et al.*, 2009). Independientemente, la privación prolongada de alimentos (20-35 días) resultó en una baja regulación de la expresión de PepT1 en peces (Hakim *et al.*, 2009; Terova *et al.*, 2009). Curiosamente, se ha demostrado que los niveles de RNAm de PepT1 aumentan más allá de los parámetros de control tras la reanudación de la alimentación, lo cual se correlaciona con un período de crecimiento aumentado y de consumo de alimento (Terova *et al.*, 2009).

Datos actuales mencionan que se secuenció el gen PepT1 en pez cebra *Danio rerio*, *Chionodraco hamatus* y bacalao *Gadus morhua* (Verri *et al.*, 2003; Ronnestad *et al.*, 2007b; Ostaszewska *et al.*, 2010). El cDNA PepT1 del bacalao del Atlántico tiene 2 838 pb de largo, que codifica una proteína putativa de 729 aminoácidos (Ronnestad *et al.*, 2007b).

La expresión y función del oligopéptido transportador PepT1, en respuesta a cambios en la salinidad del medio ambiente, ha recibido poco estudio a pesar del importante papel que desempeñan estos dipéptidos en la nutrición en piscina. Se ha clonado y secuenciado dos nuevos ADNc de longitud completa de la especie *Fundulus heteroclitus*, que codifican para el oligopéptido transportador de tipo PepT1 y examinaron su expresión y propiedades funcionales en peces aclimatados en agua dulce y agua de mar, en respuesta al ayuno y a la realimentación. El análisis filogenético de secuencias de vertebrados SLC15A1 confirma la presencia de dos isoformas de PepT1, denominadas SLC15A1a y SLC15A1b, en peces.

Similar a otros vertebrados con SLC15A1s, estas isoformas tienen 12 dominios transmembranales y aminoácidos esenciales para la función de PepT1 que están conservados. El análisis reveló una nueva expresión específica ambiental de las isoformas SLC15A1 en *F. heteroclitus*, con sólo SLC15A1b, expresado en peces aclimatados al agua de mar, y ambas isoformas en peces aclimatados al agua dulce.

El ayuno y la realimentación indujeron cambios en la expresión de ARNm SLC15A1a y SLC15A1b.

A corto plazo, el ayuno resultó en alta regulación de los niveles de RNAm PepT1, mientras que el ayuno prolongado resultó en baja regulación. La reanudación de la alimentación resultó en alta regulación de niveles de PepT1 por encima del pre ayuno. Los experimentos, al utilizar la técnica in vitro en el saco intestinal, sugieren que las isoformas de PepT1 difieren en características funcionales (Bucking y Schulte, 2011).

El presente documento, trata de mostrar un estudio inicial del péptido transportador 1 (PepT1) en tilapias, debido a que las investigaciones a nivel mundial han sido dirigidas hacia otras especies de peces, siendo entonces uno de los primeros estudios de expresión del citado gen en *Oreochromis sp.*, utilizando la técnica de extracción de ARN de intestinos de juveniles del citado pez y proceder a la RT-PCR.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño de iniciadores (primers)

Basado en el alineamiento de las secuencias

codificantes del gen péptido transportador 1 (PepT1) de *O. niloticus*, se realizó el diseño de iniciadores que cumplan los parámetros termodinámicos para que sean utilizados en PCR convencional. Para el mismo gen se dispone de dos secuencias de referencia (XM\_003447363.1; XM\_003459630), las cuales se diferencian en ciertas regiones. Por esta razón se diseñó primers con un mínimo grado de degeneración.

La secuencia XM\_003459630 fue considerada para la búsqueda de posibles primers usando el programa Primer-BLAST, indicando como secuencias de referencia al grupo teleosteos. Se obtuvo 25 pares de primers, los cuales fueron analizados para determinar la posición con respecto a los exones y su homología entre las dos secuencias y la de otras secuencias del gen PepT1, principalmente de peces. El alineamiento de las secuencias, usando el programa ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)), permitió establecer que el gen PepT1 en tilapia está constituido por 21 exones, cubriendo una región genómica de unos 8 938 nucleótidos; la región codificante corresponde a solo 2 274 nucleótidos (tabla 1).

**Tabla 1.** Lista de secuencias del gen PepT1 (slc15a1) utilizados para comparación en el diseño de los primers degenerados.

Número de accesión	Descripción de la secuencia	Tamaño (pb)
XM_003447363	>PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> slc15a1 mRNA	2223
EU160494	> <i>Sebastes nebulosus</i> intestinal (SLC15A1) mRNA	2640
JN615008	> <i>Fundulus heteroclitus macrolepidotus</i> PEPT1 (SLC15A1a) mRNA	2784
JX122768	> <i>Epinephelus aeneus</i> (PepT1) mRNA	2500
GQ906471	> <i>Perca flavescens</i> oligopeptide transporter 1 mRNA	2956
FJ237043	> <i>Dicentrarchus labrax</i> (Pept1) mRNA	3014
AY170828	> <i>Chionodraco hamatus</i> intestinal PEPT1 (slc15a1) mRNA	2845
XM_003459630	>PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> slc15a1 mRNA	2274
NM_001146682	> <i>Salmo salar</i> (slc15a1) mRNA	2629
AY921634	> <i>Gadus morhua</i> peptide transporter (PepT1) mRNA	2838
JN896885	> <i>Cyprinus carpio</i> PepT1 (pepT1) mRNA	3118
JQ411137	> <i>Carassius auratus</i> red var. slc15A1 protein mRNA	2640
JN088166	> <i>Ctenopharyngodon idella</i> (slc15A1) mRNA	2761
NM_198064	> <i>Danio rerio</i> slc15, member 1b (slc15a1b) mRNA	2637
AY300011	> <i>Danio rerio</i> (slc15a1) mRNA	2636
NM_204365	> <i>Gallus gallus</i> slc15, member 1 (SLC15A1) mRNA	2914

Fuente: Dr. Emmerik Motte, PhD., 2012.

Los diferentes iniciadores diseñados y las secuencias seleccionadas mediante el análisis de las regiones con mayor homología en los alineamientos ClustalW, permitieron seleccionar varios juegos con la finalidad de amplificar fragmentos, para el análisis de la expresión en las pruebas de RT-PCR. Cada primer fue evaluado en términos de propiedades termodinámicas con el programa OligoAnalyzer de la página web de IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Los primers seleccionados para el estudio se detallan en la tabla 2. Mediante el análisis en BLAST, los primers mantienen su especificidad con el Gen *PepT1*.

### 2.2. Recolección y preservación de muestras

Se trabajó con juveniles de tilapia (*Oreochromis sp.*) de 3 a 5 gramos de peso. El experimento fue efectuado con peces que permanecieron en acuario y fueron alimentados con balanceado de uso comercial (pellet 1/16 al 32 % de proteína); después de una hora de haberlos alimentado se procedió a sacrificar los especímenes mediante disección, cortando el intestino desde el inicio del ciego pilórico hasta la parte anterior al ano. El intestino, vaciado de cualquier resto de material alimenticio, fue lavado con solución salina al 0,85%. Se conservó el tejido de cada pez en 500 µL de RNAlater conforme la cantidad extraída (ca. 100 mg/150 µl) y se colocó en refrigeración por 2 horas aproximadamente;

luego, fue guardado a -18°C hasta su análisis. Se utilizaron submuestras para la extracción posterior de ARN.

### 2.3. Extracción de ARN

A los tubos que contienen la submuestra de intestino, se añadió 1 000 µL de tampón de lisis (TRIzol) y realizó el macerado sobre hielo seco. Tras añadir 200 µL de cloroformo, se mezcló vigorosamente invirtiendo los tubos durante 1 minuto, luego de lo cual se los mantuvo en reposo 10 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos en hielo o a -20°C para que los tubos estén bien fríos. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos en frío, transfiriendo la fase superior (250 a 300 µL) a un nuevo micro tubo libre de ARNasa. Se agregó 500 µL de Isopropanol (solución de precipitación), mezclando e invirtiendo 10 veces los micro tubos y dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos en hielo. Se microcentrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos, eliminando la solución de precipitación sin desprender el sedimento de ARN. Se agregó 1 000 µL de solución de lavado (etanol al 75 %) y se lavó las paredes del tubo, microcentrifugando a 10 000 rpm por 5 minutos, se eliminó completamente la solución de lavado, dejando secar durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento en 20 µL de agua ultra pura (solución de resuspensión), manteniéndolo sobre hielo.

**Tabla 2.** Lista de iniciadores diseñados y seleccionados para los estudios de la expresión del péptido transportador 1.

Iniciador	Secuencia	# nt	Tm	Ubicación
1 fw	5'-GGCTACCCACTSAGYATCT-3'	19	54,9	Exón 2
Rev 1b	5'-TCAGCCCAGTCCATCCAGT-3'	19	58,4	Exón 9
Fw 2	5'-ACCACACAWTTGTGGCTCT-3'	19	54,6	Exón 3
Rev 2	5'-GGAGACCCACCATRGACA-3'	18	55,0	Exón 5
Rev 3	5'-CWACRTGWAAGGTCATGTTGTC-3'	22	52,8	Exón 4-5
22bfw	5'-CAGCCTGATCARATGCAGA-3'	19	53,7	Exón 11-12
23brev	5'-CAGGCARKGTTTKATCRAT-3'	19	50,4	Exón 13-14
16fw	5'-CTGGGCTTTGGCAGYTCWTA-3'	20	56,5	Exón 18
6brev	5'-TARGTGTAATAAGSCCAT-3'	20	48,3	Exón 21
11fw	5'-TGCACATGGCCYKGCAGAT-3'	19	60,3	Exón 19
5rev	5'-GACTTGCTGGGTGCCTGTGA-3'	20	60,2	Exón 19-20

## 2.4. Tratamiento con DNasa I

En los microtubos libres de Rnasa colocados sobre hielo, se ubicó 15 µL de ARN extraído, 2 µL de ADNasa buffer 10x, 1 µL de ADNasa I y 2 µL de agua ultrapura, incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se incubó a 65°C durante 10 minutos y fue conservado a -20°C hasta realizar la retrotranscripción (RT).

## 2.5. Protocolo de Retrotranscripción (RT)

Para la preparación de los mix de reacción de la RT se realizó una preparación común repartida a cada muestra para el análisis. Los reactivos y cantidades están detallados en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Reactivos del RT mix 1.

RT mix 1	1 tubo de reacción	Nº tubos de reacción
H <sub>2</sub> O libre Rnasa	5 µL	--- µL
Oligo d(T) 500 ng/uL	1 µL	--- µL
<b>Volúmen final</b>	<b>6 ul/tubo</b>	

Se transfirió 6 µL del RT mix 1 a cada microtubo de reacción que contenía 8 µL de ARN total extraído, incubando a 70°C durante 5 minutos y luego se colocó inmediatamente los tubos sobre hielo.

Tabla 4. Reactivos del RT mix 2.

RT mix 2	1 tubo de reacción	Nº tubos de reacción
MMLV 5X Buffer	5 µL	--- µL
dNTP's mix	1,25 µL	--- µL
Recomb. RNAsin (25 U/reacc.)	0,65 µL	--- µL
MMLV-RT (200 U/reacc.)	1 µL	--- µL
H <sub>2</sub> O libre Rnasa	3,1 µL	--- µL
<b>Volúmen final</b>	<b>11 µL</b>	

Transferido 11 µL del RT mix 2 a cada microtubo de reacción, se incubó en el termociclador a 40°C durante 60 minutos. Luego, se inactivó la reacción a 70°C por 15 minutos, utilizando 1 µL de ADNc para la RT-PCR.

## 2.6. Amplificación por PCR del ADNc de PepT1 (RT-PCR)

El ADNc obtenido fue amplificado por PCR (RT-PCR) usando los distintos iniciadores seleccionados, indicados en la tabla 2. El volumen final por tubo de reacción de PCR alcanzó 25 µL (Las condiciones de amplificación se ubican en la tabla 5). Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Tabla 5. Juegos de iniciadores y programas del termociclador.

Juego de Iniciadores	Programa termociclador
1 fw - Rev 1b 16fw - 6brev	Desnaturalización inicial: 94°C – 5' Amplificación 35 ciclos: 94°C – 30'' 55°C – 30'' 72°C – 45'' Extensión final amplicones: 72°C – 5'
Fw 2 - Rev 2 Fw 2 - Rev 3	Desnaturalización inicial: 94°C – 5' Amplificación 35 ciclos: 94°C – 30'' 58°C – 30'' 72°C – 30'' Extensión final amplicones: 72°C – 5'
11fw - 5rev	Desnaturalización inicial: 94°C – 5' Amplificación 35 ciclos: 94°C – 30'' 58°C – 30'' 72°C – 45'' Extensión final amplicones: 72°C – 5'
22bfbw - 23brev	Desnaturalización inicial: 94°C – 5' Amplificación 35 ciclos: 94°C – 30'' 58°C – 45'' 72°C – 45'' Extensión final amplicones: 72°C – 5'

## 3. RESULTADOS

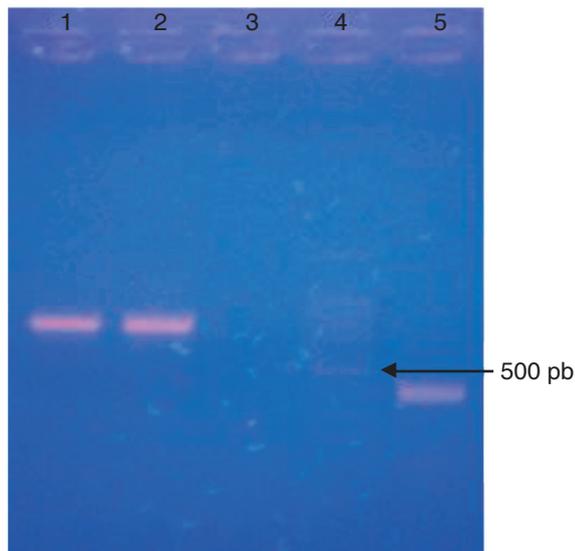
### 3.1. Amplicones de PepT1 obtenidos por RT-PCR

Realizada la RT-PCR de PepT1 usando los diferentes juegos de primers, se demuestra que los iniciadores diseñados funcionaron correctamente al obtener los fragmentos esperados (tabla 7). La eficacia radicó en la determinación idónea de la temperatura y tiempo de hibridación dentro de los ciclos de amplificación.

**Tabla 7.** Tamaño de los amplicones obtenidos.

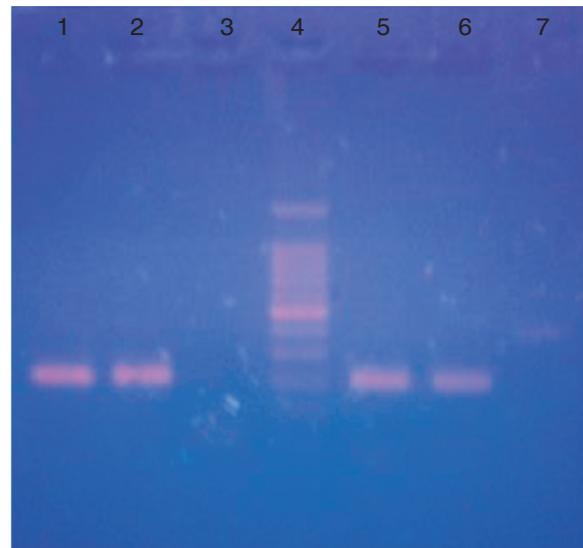
Juego de iniciadores	Tamaño amplicón (pb)
1 fw - Rev 1b	765
Fw 2 - Rev 2	223
Fw 2 - Rev 3	200
22bfw - 23brev	559
16fw - 6brev	385
11fw - 5rev	108

La figura 1 muestra el gel de agarosa donde se migraron los amplicones resultantes de los juegos de iniciadores 1fw-Rev1b y 16fw-6brev, usando el mismo programa de amplificación en el termociclador para obtener dichos fragmentos.



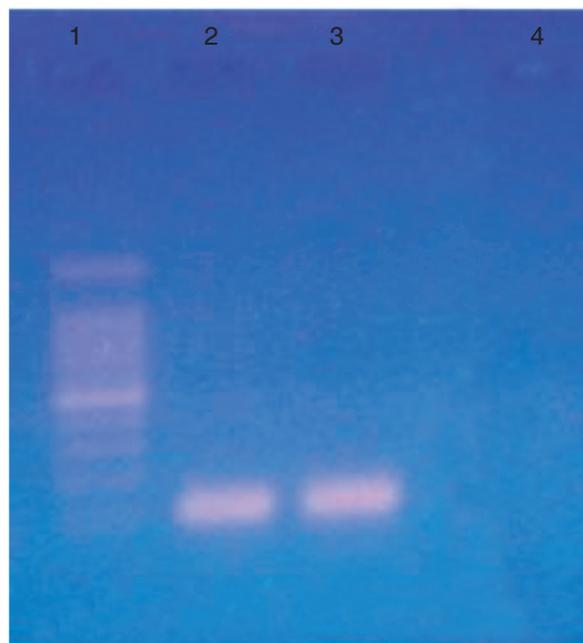
**Figura 1.** Par 1fw-Rev1b (765 pb), pozos 1 y 2; Control negativo (C-), pozo 3; MPM (100 pb), pozo 4; Par 16fw-6brev (385 pb), pozo 5.

Para los pares de iniciadores Fw2-Rev2 y Fw2-Rev3, la figura 2 muestra las bandas de amplificación en el gel de electroforesis según los tamaños especificados, tomando en cuenta que se usó el mismo programa en el termociclador.



**Figura 2.** Par Fw2-Rev2 (223 pb), pozos 1 y 2; Control negativo (C-), pozo 3; MPM (100 pb), pozo 4; Par Fw2-Rev3 (200 pb), pozos 5 y 6; Control negativo (C-), pozo 7.

En la figura 3 se observa los amplicones migrados en el gel de agarosa, usando el par 11fw-5rev.



**Figura 3.** MPM (100 pb), pozo 1; Par 11fw-5rev (108 pb), pozos 2 y 3; Control negativo (C-), pozo 4

Para el juego de iniciadores 22bfw-23brev, el gel de electroforesis de la figura 4 muestra el fragmento amplificado del tamaño específico.



Figura 4. MPM (100 pb), pozo 1; Control negativo (C-), pozo 2; Par 22bfw-23brev (559 pb), pozo 3.

#### 4. DISCUSIÓN

En la investigación con los juveniles de tilapia, se determinó la expresión de PepT1 en peces alimentados normalmente mediante la técnica de RT-PCR, haciendo la detección una hora después de haber sido nutridos; quedando para experimentaciones posteriores evaluar ayuno y realimentación. Se establece que los experimentos de evaluación del péptido transportador en *Oreochromis sp.*, son de los primeros realizados en esta especie en el ámbito mundial, ya que la mayoría de investigaciones han sido dirigidas a otras especies, tales como *Gadus morhua* o *Dicentrarchus labrax*.

El trabajo de bioinformática en el diseño de los primers específicos, que funcionaron adecuadamente en la amplificación de los fragmentos del gen PepT1 por RT-PCR, muestra la eficacia de la técnica implementada, pudiendo

ser replicada, con la posibilidad de generar nuevos resultados y discusiones sobre la expresión del péptido transportador en tilapia.

Amberg et al. (2008) muestran el primer estudio que analizó la expresión de PepT1 durante las primeras semanas de alimentación en larvas de peces marinos, en el que observaron la expresión de PepT1 antes de la eclosión del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*).

Los resultados de Bakke et al. (2010) muestran que PepT1 se expresa en todo el intestino de juveniles de bacalao del Atlántico, lo que confirma los resultados de estudios anteriores, tanto en adultos (Ronnestad et al., 2007) como en larvas (Amberg et al., 2008).

Al respecto, bajo condiciones experimentales, peces lubina (*Dicentrarchus labrax*) mostraron que la expresión de PepT1 en el intestino proximal disminuyó durante el ayuno y se incrementó durante la realimentación (Verri et al., 2011; Terova et al., 2009). Esta manifestación es lo contrario de lo que se observa en los mamíferos y las aves (Ogihara et al., 1999; Gilbert et al., 2008), lo que sugiere que PepT1 opera en apoyo directo al crecimiento de los peces.

#### 5. CONCLUSIONES

Se estableció que los seis pares de primers diseñados funcionaron de manera adecuada para la RT-PCR, teniendo en cuenta que, para los juegos de iniciadores, la temperatura y tiempo de hibridación dentro de los ciclos de amplificación varió, por lo cual se realizaron varias pruebas para optimizar los programas del termociclador, de acuerdo a la combinación de los pares de primers, y así obtener los amplicones específicos, demostrando de esta manera la especificidad de amplificar un gen de importancia en el crecimiento de peces, en este caso tilapia.

Importante realizar pruebas de RT-qPCR con los primers diseñados y así poder establecer la cuantificación en tiempo real de la expresión del gen PepT1.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amberg J. J., Myr C., Kamisaka Y., Jordal A.E.O., Rust M.B., Hardy R.W., Koedijk R., Ronnestad I. (2008).** Expression of the oligopeptide transporter, PepT1, in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol., B.* 150, 177–182.
- Bakke S., Jordal, A.E.O., Gómez-Requeni P., Verri, T., Kousoulaki K., Aksnes A., Ronnestad I. (2010).** Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. and Physiol. B.* 156, 48-55.
- Boge, G., Rigal, A., Peres, G. (1981).** Rates of in vivo absorption of glycine and glycineglycine by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 69, 455–459.
- Bucking C., & Schulte P. M. (2011).** Environmental and nutritional regulation of expression and function of two peptide transporter (PepT1) isoforms in a euryhaline teleost. *Comp. Biochem. and Physiol., A.* 161, 379-387.
- Dabrowski, K., Terjesen, B.F., Zhang, Y.F., Phang, J.M., Lee, K.J. (2005).** A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in the early life of vertebrates. *J. Exp. Biol.* 208, 2885–2894.
- Dabrowski, K., Lee, K.J., Rinchar, J. (2003).** The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *J. Nutr.* 133, 4225–4229.
- Daniel, H. (2004).** Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 361–384.
- Daniel, H., Kottra, G. (2004).** The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 610–618.
- Gilbert, E. R., Li, H., Emmerson, D. A., Webb Jr, K. E. & Wong, E. A. (2008).** Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *J. Nutr.* 138, 262–271.
- Gilbert, E.R., Wong, E.A., Webb Jr., K.E. (2008b).** Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *J. Anim. Sci.* 86, 2135–2155.
- Hakim, Y., Harpaz, S., Uni, Z. (2009).** Expression of brush border enzymes and transporter in the intestine of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation. *Aquacultural* 290, 110–115.
- Ihara, T., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Bamba, T. (2000).** Regulation of PepT1 peptide transporter expression in the rat small intestine under malnourished conditions. *Digestion* 61, 59–67.
- Kalujnaia, S., McWilliam, I.S., Zaguinaiko, V.A., Feilen, A.L., Nicholson, J., Hazon, N., Cutler, C.P., Cramb, G. (2007).** Transcriptomic approach to the study of osmoregulation in the European eel *Anguilla anguilla*. *Physiol. Genomics.* 31, 385–401.
- Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1996).** Peptide transporters of the intestine and kidney. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 99–119.
- Meredith, D., Boyd, C.A.R. (2000).** Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 754–778.
- Ogihara, H., Suzuki, T., Nagamachi, Y., Inui, K. & Takata, K. (1999).** Peptide transporter in the rat small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids. *Histochem. J.* 31, 169–174.
- Ostaszewska, T., Kamaszewski, M., Grochowski, P., Dabrowski, K., Verri, T.,**

**Aksakal, E., Szatkowska, I., Nowak, Z., Dobosz, S. (2010).** The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 155, 107–114.

**Reshkin, S.J., Ahearn, G.A. (1991).** Intestinal glycyl-L-phenylalanine and L-phenylalanine transport in a euryhaline teleost. *Am. J. Physiol.* 260, R563–R569.

**Ronnestad, I., Murashita, K., Kottra, G., Jordal, A.E., Narawane, S., Jolly, C., Daniel, H., Verri, T. (2010).** Molecular cloning and functional expression of Atlantic salmon peptide transporter 1 in xenopus oocytes reveals efficient intestinal uptake of lysine-containing and other bioactive di- and tripeptides in teleost fish. *J. Nutr.* 140, 893–900.

**Ronnestad, I., Gavaia, P.J., Viegas, C.S.B., Verri, T., Romano, A., Nilsen, T.O., Jordal, A.-E.O., Kamisaka, Y., Cancela, M.L. (2007b).** Cloning, tissue expression and comparative aspects of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) oligopeptide transporter PepT1. *J. Exp. Biol.* 210, 3883–3896.

**Ronnestad I., Gavaia P.J., Viegas C.S.B., Verri T., Romano A., Nilsen T.O., Jordal A.E., Kamisaka Y., Cancela M.L. (2007).** Oligopeptide transporter PepT1 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): cloning, tissue expression and comparative aspects. *J. Exp. Biol.* 210, 3883–3896.

**Rubio-Aliaga, I., Daniel, H. (2002).** Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 434–440.

**Sangaletti, R., Terova, G., Peres, A., Bossi, E., Cora, S., Saroglia, M. (2009).** Functional expression of the oligopeptide transporter PepT1 from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 47–54.

**Segura, M., Chel, L., Betancur, D. (2010).** Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev Chil Nutr Vol.* 37, N°3, 386-391.

**Terova, G., Cora, S., Verri, T., Rimoldi, S., Bernardini, G. & Saroglia, M. (2009).** Impact of feed availability on PEPT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture.* 294, 288–299.

**Thamotharan, M., Bawani, S.Z., Zhou, X.D., Adibi, S.A. (1999).** Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (PepT-1) after a brief fast. *Metabol. Clin. Exp.* 48, 681–684.

**Thwaites, D.T., Anderson, C.M.H. (2007).** H<sup>+</sup>-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp. Physiol.* 92, 603–619.

**Verri, T., Terova, G., Dabrowski, K., and Saroglia, M. (2011).** Peptide transport and animal growth: the fish paradigm. *Biol. Lett.* 7, 597-600.

**Verri, T., Kottra, G., Romano, A., Tiso, N., Peric, M., Maffia, M., Boll, M., Argenton, F., Daniel, H., Storelli, C. (2003).** Molecular and functional characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) PepT1-type peptide transporter. *FEBS Lett.* 549, 115-122.