

¿Existe alguna Relación entre la Expresión de Nocturnina y la Alimentación en los Peces?

What's the Relationship between Nocturnin Expression and Feeding in Fishes?

Diego Madera, Ayelén M. Blanco y Miguel Gómez-Boronat

Tutora:

María Jesús Delgado Saavedra

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

La nocturnina es una desadenilasa implicada en la regulación postranscripcional de la expresión de ciertos genes. En este estudio se pretende analizar la relación entre la expresión de *nocturnina* (*noc*) y la alimentación en el carpín. Para ello se llevaron a cabo tres ensayos experimentales. En primer lugar, se ha investigado el perfil periprandial de la expresión de *noc*, que mostró tras la ingesta niveles de expresión aumentados o reducidos en función de si se trata de *noc-a* o de *noc-b*. En segundo lugar, se evaluó la influencia de la privación del alimento exponiendo a los peces a situaciones de ayuno de corta (7 días) y larga duración (30 días). Los resultados muestran que el ayuno tiene efectos opuestos en la expresión de *noc-a* y *noc-b*. Por último, realizamos un ensayo en el que tras un ayuno de 48 horas se reinstaura o no la alimentación, observando una disminución de los transcritos de *noc-a* y un aumento de los de *noc-b* en el grupo no realimentado. En conclusión, el presente trabajo demuestra que la alimentación es un importante modulador de la expresión de nocturnina en el carpín.

Palabras clave: nocturnina, alimentación, ayuno, peces, expresión génica.

Abstract

Nocturnin is a deadenylase involved in post transcriptional regulation of the expression of some genes. The relationship between nocturnin (*noc*) expression and feeding has been investigated in goldfish. With this goal, we carried out three experimental approaches. Firstly, a periprandial profile of nocturnin expression was performed. It was shown that after feeding the nocturnin levels were either increased or decreased depending on the type of nocturnin (a or b). Secondly, the effect of fasting was studied by exposing fish to short fasting (7 days) and long fasting (30 days). The results show that fasting has opposite effects on *noc-a* and *noc-b* expression. Finally, we have test in which we subjected two groups of fish to 48 hours fasting, after this period one of them was fed back while the other continued under fasting conditions. We observed that in the group that was not re-fed the expression of *noc-a* decreased while in *noc-b* increased. Therefore, this study shows that feeding regulates nocturnin expression in goldfish.

Keywords: nocturnin, feeding, fasting, fish, gene expression.

Trabajo presentado en las XII Jornadas Complutenses, XI Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XVI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.

Agradecimientos: Al Grupo de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid, Neuroendocrinología de Peces, donde se ha realizado el presente estudio.

Introducción

La nocturnina es un péptido con actividad desadenilasa, implicado en la regulación postranscripcional de algunos genes (Stubblefield, Terrien y Green, 2012). Estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación han revelado la existencia de dos moléculas de nocturnina (a y b) en el carpín (*Carassius auratus*), derivadas de la duplicación genómica experimentada por los teleosteos. A diferencia de los mamíferos, en los que se ha implicado a la nocturnina en una gran variedad de funciones (Stubblefield et al., 2012), en los peces no se ha publicado ningún estudio en relación con estos péptidos, desconociéndose en la actualidad sus potenciales actividades biológicas. Por tanto, el objetivo de este trabajo es investigar la posible relación funcional entre la alimentación y la *nocturnina* en un pez modelo muy utilizado en investigación, el carpín (*Carassius auratus*).

Material y métodos

Los experimentos se realizaron con carpines mantenidos en el laboratorio en condiciones de fotoperiodo 12 h de luz: 12 h de oscuridad y alimentados diariamente a las 12,00 h. Se abordaron los siguientes diseños experimentales:

Perfil periprandial de nocturnina. Se cuantificó la expresión de *noc-a* y *-b* en grupos de 7 peces muestreados a 3 horas y 1 hora antes de la alimentación, en el momento de la alimentación, y a 1 hora y 3 horas tras la ingestión de alimento.

Efecto del ayuno. Se utilizaron 3 grupos de peces (n=8/grupo), uno control alimentado diariamente, y 2 grupos expuestos a condiciones de ayuno, uno durante 7 días y el otro durante 30 días, cuantificando la expresión de *noc-a* y *-b* al final del tratamiento.

Modelo de ayuno y realimentación. Utilizamos 3 grupos de peces: uno control alimentado diariamente, y los dos restantes se mantuvieron en ayuno de 48 horas. Transcurrido este período uno de los grupos recibió alimento y el otro no.

En todos los experimentos, se extrajeron muestras de bulbo intestinal e hígado en las que se cuantificó la expresión génica de *noc-a* y *noc-b* mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), empleando *ef-1 α* como gen de referencia. La extracción de RNA, el tratamiento con DNasa, la síntesis de cDNA y las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron siguiendo protocolos previamente descritos (Blanco, Gómez-Boronat, Redondo, Valenciano y Delgado, 2016). El método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ fue utilizado para determinar la expresión relativa del mRNA. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un test de análisis de varianzas (ANOVA) y un test post-hoc de comparaciones múltiples (Student Newman Keuls).

Resultados

El **perfil periprandial** de expresión de nocturnina se muestra en la Figura 1, donde se observa un incremento postprandial (a 1 h post-ingesta) de *noc-a* en bulbo intesti-

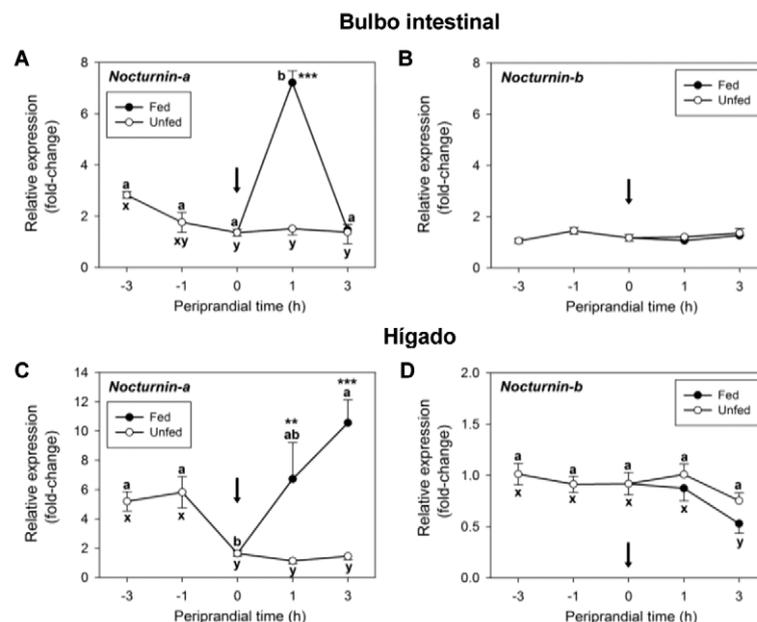


Figura 1. Perfil periprandial de expresión génica de *nocturnina a* (izquierda) y *nocturnina b* (derecha) en bulbo intestinal (A, B) e hígado (C, D) del carpín. Los datos se expresan como la media \pm error. Las flechas indican la hora de la alimentación. Diferentes letras indican diferencias significativas entre puntos de muestreo. Los asteriscos expresan diferencias significativas respecto al control (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

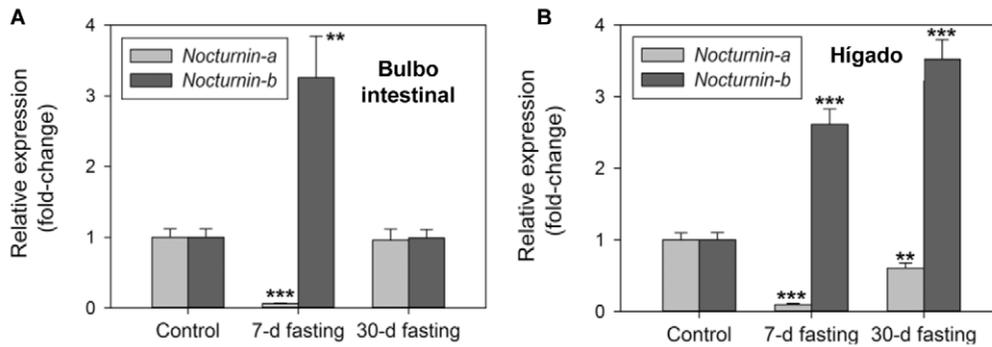


Figura 2. Efecto del ayuno de 7 y 30 días en la expresión génica de *nocturnina* en bulbo intestinal (A) e hígado (B) del carpín. Los datos se expresan como la media + error. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

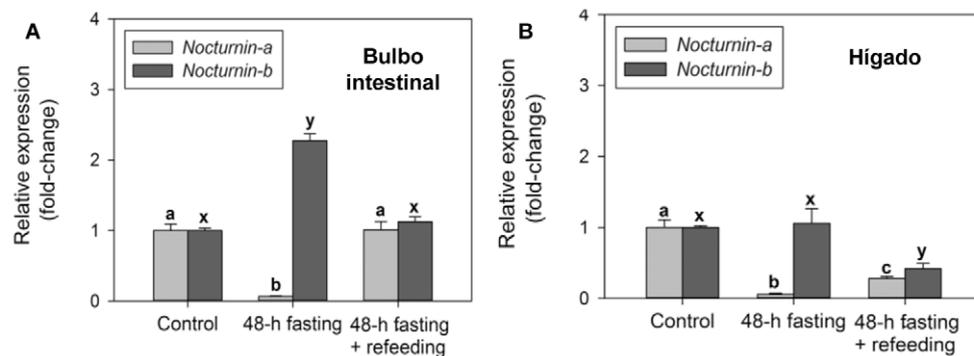


Figura 3. Expresión de *nocturnina a* y *b* en bulbo intestinal (A) e hígado (B) del carpín. Los datos se expresan como la media + error. Diferentes letras expresan diferencias entre grupos.

nal, que revierte a las 3 h de la alimentación, mientras que el incremento de la expresión post-ingesta en el hígado se prolonga hasta las 3 h post-ingesta (Fig. 1A, C). El perfil periprandial de la *noc-b* no presenta variaciones significativas en su expresión entre los peces que recibieron alimento y el grupo que no, tanto en el bulbo intestinal como en el hígado (Fig. 1B, D), si bien en el hígado la expresión de este regulador disminuye significativamente a las 3 horas post-ingesta.

Los resultados obtenidos con los **modelos de ayuno** estudiados se representan en la Figura 2. En el bulbo intestinal, un ayuno de 7 días reduce significativamente los niveles de *noc-a*, mientras que aumenta los de *noc-b*. Sin embargo, tras 30 días de ayuno, los niveles de expresión de ambas *nocturninas* no varían con respecto a los controles (Fig. 2A). En el hígado, observamos que en los dos modelos de ayuno (a corto plazo y a largo plazo), la expresión de *noc-a* se reduce significativamente, mientras que aumenta la de *noc-b* (Fig. 2B).

En la Figura 3 se muestran los resultados del **protocolo experimental de 48 h de ayuno seguido de realimentación**. La exposición a un ayuno de 48 horas disminuye la expresión de *noc-a* en el bulbo intestinal, efecto que se revierte con la realimentación, y el efecto contrario se obser-

va para la *noc-b* (Fig. 3A). En el hígado, observamos que los niveles de *noc-a* se reducen significativamente tras 48 horas de ayuno, y la realimentación revierte sólo parcialmente dicho efecto. Los niveles de *noc-b* no se modifican por el ayuno, pero descienden en el grupo de peces realimentados (Fig. 3B).

Discusión

Los resultados de este trabajo constituyen los primeros hallazgos que relacionan la expresión de *nocturnina* con la alimentación y el metabolismo en los peces. El perfil de expresión observado para la *nocturnina* en el carpín es característico de moléculas orexigénicas, incrementos de *noc-b* en diferentes situaciones de ayuno, en concordancia con resultados previos en ratón (Gilbert, Douris, Tongjai, y Green, 2011). Aunque no hemos investigado esta posibilidad de regulación de la ingesta por *nocturnina*, podríamos pensar en la *noc-b* como una posible molécula implicada en la estimulación del apetito, lo que explicaría la reducción de sus niveles de expresión tras la ingesta. Sin embargo, encontramos una relación opuesta para la *noc-a*, pues la ingesta induce su expresión, en coincidencia con resultados previos en algu-

nas especies de mamíferos (Hussain y Pan, 2015). De esta forma, podemos pensar en claras diferencias funcionales entre ambas nocturninas del carpín, aunque desconocidas a día de hoy. Las marcadas respuestas de expresión de *noc-a* en relación con distintos modelos de ayuno/alimentación encontradas en el carpín, sugieren una posible participación de esta molécula en procesos metabólicos, como la adipogénesis y otras rutas del metabolismo lipídico, como se ha demostrado para los mamíferos (Hussain y Pan, 2015; Stubblefield et al., 2012).

Conclusión

La expresión de nocturnina en órganos gastrointestinales del carpín está modulada por la alimentación, pero existe una respuesta diferencial de las dos nocturninas (*a* y *b*) presentes en este teleosteo.

Referencias

- Blanco, A. M., Gómez-Boronat, M., Redondo, I., Valenciano, A.I., & Delgado, M. J. (2016). Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 186, 727-738. <http://doi.org/10.1007/s00360-016-0986-0>
- Gilbert, M. R., Douris, N., Tongjai, S., & Green, C. (2011). Nocturnin expression is induced by fasting in the white adipose tissue of restricted fed mice. *PLOS ONE*, 6, e17051.
- Hussain, M. M., & Pan, X. (2015). Circadian regulators of intestinal lipid absorption. *The Journal of Lipid Research*, 56, 761-770. <http://doi.org/10.1194/jlr.R051573>
- Stubblefield, J. J., Terrien, J., & Green, C. B. (2012). Nocturnin: At the crossroads of clocks and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23, 326-333. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.007>