

## ¿Es la Hora de Alimentación un Sincronizador del Reloj Circadiano de la Adrenal en Peces?

Is the Feeding Time a Synchronizer of the Adrenal Circadian Clock in Fish?

Nuria Saiz, Ayelén Melisa Blanco y Miguel Gómez-Boronat

Tutora:

Esther Isorna Alonso

Universidad Complutense de Madrid

### *Resumen*

Se ha investigado el posible papel de la hora de la alimentación en la sincronización del reloj molecular de la glándula adrenal de los peces. Carpines aclimatados a fotoperiodo 12L:12D recibieron la ración diaria de alimento en dos momentos del ciclo diario, a mitad del periodo de luz (ML) y a mitad del periodo de oscuridad (MD). Los resultados revelan que el horario de alimentación sincroniza los genes reloj de la adrenal, base molecular del oscilador biológico. Los registros realizados de la actividad locomotora confirman esta sincronización, con una notoria actividad anticipatoria a la comida en ambos grupos. La ritmicidad observada en los niveles de cortisol circulantes apunta a la utilidad de esta hormona como marcador rítmico de salida del reloj biológico de la adrenal de los peces.

*Palabras clave: adrenal, circadiano, teleósteos, cortisol, actividad locomotora.*

### *Abstract*

The possible role of feeding time on the synchronization of the molecular clock in the fish adrenal gland was investigated. Goldfish acclimated to 12D:12L photoperiod received the daily ration of food at two times of daily cycle, the mid-light (ML) and mid-darkness (MD). The results reveal that the feeding time synchronizes clock genes in the adrenal gland, being these the molecular basis of biologic oscillator. Locomotor activity confirm this synchronization, with a pronounced food anticipatory activity exhibited by both groups. The rhythmicity observed on circulating cortisol suggest this hormone is a rhythmic output of the biological clock in the adrenal gland of fish.

*Keywords: adrenal, circadian, cortisol, locomotive activity, teleosts.*

---

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 UCM Neuroendocrinología de Peces, en el que se ha realizado el presente estudio.

## Introducción

El sistema circadiano permite a los organismos anticiparse y adaptarse a los cambios en su ambiente externo e interno. En los peces teleosteos, la organización funcional de este sistema se basa en la presencia de osciladores o “relojes” localizados en diferentes órganos, que integran diferentes entradas (factores ambientales externos y señales endógenas), generando múltiples salidas en forma de ritmos diarios endocrinos, de metabolitos, comportamentales, etc. La base molecular de estos osciladores es común en toda la filogenia y reside en ritmos de expresión de genes muy conservados, que forman bucles de retroalimentación con una periodicidad próxima a las 24 h. Elementos reguladores positivos de estos bucles son las proteínas CLOCK y BMAL, activadores de la transcripción de PER y CRY, que a su vez son elementos reguladores negativos que inhiben la transcripción de los anteriores. Estudios muy recientes sugieren que el tejido interrenal puede ser uno de estos osciladores periféricos (Isorna, de Pedro, Valenciano, Alonso-Gómez y Delgado, 2017), pero se desconoce qué factores externos pueden actuar como sincronizadores del mismo. El objetivo del presente estudio es investigar si el horario de alimentación puede actuar como sincronizador del reloj biológico de la interrenal de los peces.

## Material y métodos

El estudio se ha realizado con una especie de teleosteo muy común en investigación científica, el carpín dorado (*Carassius auratus*). Dos grupos experimentales de peces (42/grupo) se mantuvieron en fotoperiodo 12h luz:12h oscuridad (12L:12D) y con dos horarios de alimentación, uno de ellos se alimentó diariamente a mitad del periodo de luz (ML, *zeitgeber time* 6, ZT6) y el otro a mitad del

periodo de oscuridad (MD, ZT18). Tras 1 mes de exposición a estas condiciones experimentales, los peces se sacrificaron extrayendo muestras de sangre y el tejido interrenal en 6 puntos de muestreo a lo largo de un ciclo completo de 24 h (en intervalos de 4 h).

**Registro diario de actividad locomotora:** La actividad locomotora diaria se midió mediante un actímetro compuesto por fotocélulas infrarrojas y un sistema de adquisición de datos (Adq 16, Micronec), como se describe en Feliciano, Vivas, de Pedro, Velarde e Isorna (2011). Las fotocélulas se colocaron en dos posiciones, unas cercanas al fondo de la pecera y otras cercanas al comedero, registrando pulsos en intervalos de 10 min.

**Cuantificación de la expresión de genes reloj:** En el tejido interrenal se analizó la expresión de los genes reloj *per1a*, *per1b*, y *clock1a* mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia y el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para determinar la expresión relativa de ARNm (Feliciano et al., 2011).

**Análisis de cortisol:** A partir de las muestras de sangre extraídas por punción venosa, se cuantificaron los niveles plasmáticos de cortisol mediante ELISA (DeMeditec) (Azpeleta, Martínez, Delgado, Isorna y De Pedro, 2010).

**Análisis estadístico:** Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA seguido de un test post-hoc de comparaciones múltiples (Student-Newman Keuls). Se empleó el análisis matemático Cosinor para determinar el ajuste significativo de los datos a una función sinusoidal (Sánchez-Breña et al., 2015).

## Resultados

La Figura 1 muestra las variaciones diarias de la expresión relativa de los genes reloj *gper1a*, *gper1b* y *gclock1a*

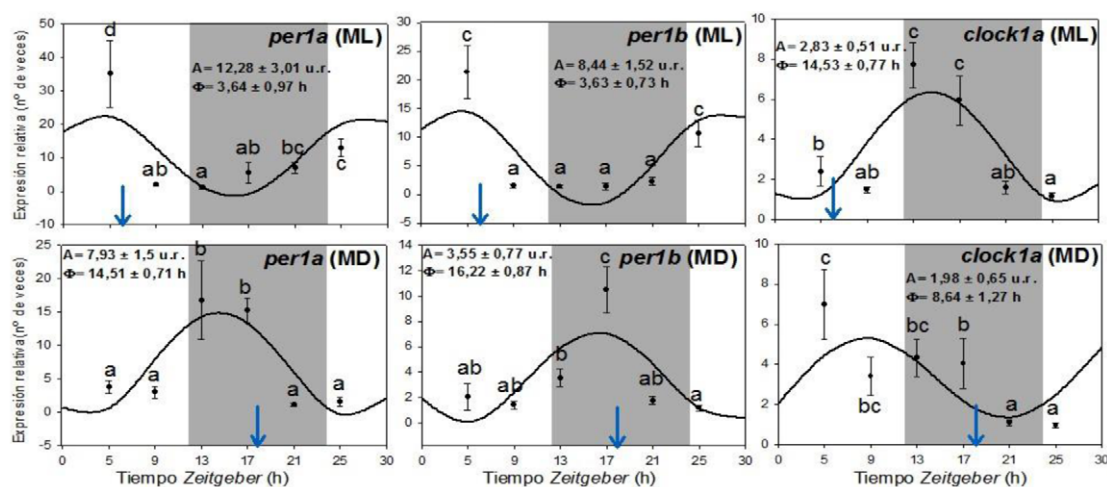


Figura 1. Expresión relativa de genes reloj en la glándula adrenal del carpín. Los datos se expresan como la media ± error estándar. Las flechas indican la hora de la alimentación. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad. A = Amplitud. Φ = Acrofase. Diferentes letras indican diferencias significativas entre puntos de muestreo.

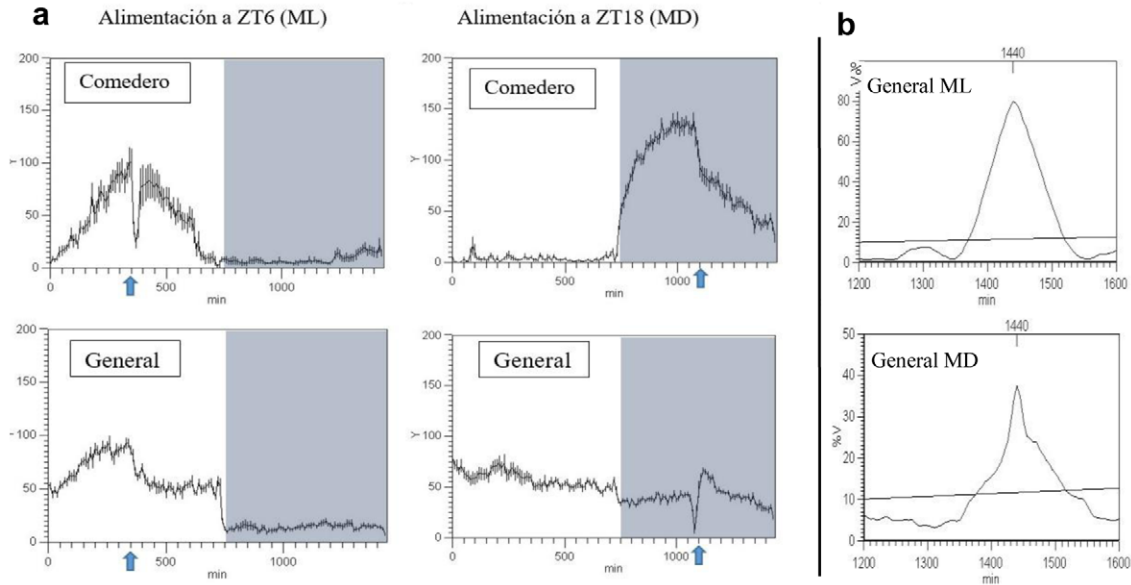


Figura 2. Registros de la actividad locomotora. Waveforms (a) y periodogramas (b) en los dos grupos experimentales (peces alimentados a mediodía, ML, y a medianoche, MD). Las flechas indican la hora de administración del alimento. La zona sombreada representa el periodo de oscuridad.

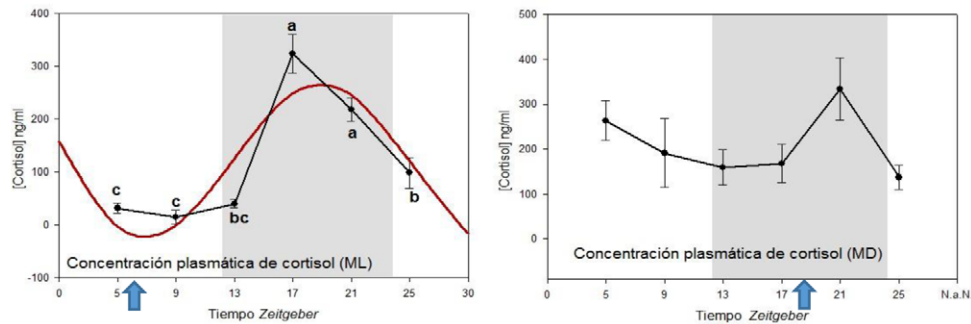


Figura 3. Niveles circulantes de cortisol en peces aclimatados a 12L:12D y alimentados a mediodía (ML) o a medianoche (MD). La curva indica el ajuste rítmico sinusoidal mediante análisis Cosinor. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre puntos de muestreo. Las flechas indican la hora de alimentación.

en carpines alimentados a mediodía (ML) o a medianoche (MD). La curva sinusoidal representa el ritmo cuando el análisis Cosinor demuestra que es significativo. Los genes del bucle negativo del reloj (*gper1a* y *gper1b*) muestran robustos patrones rítmicos de expresión diaria, con las acrofases en torno a la hora de la alimentación, de modo que estos ritmos se encuentran en inversión de fase en los peces del grupo MD respecto a los de ML. El gen del bucle positivo, *gclock1a*, también se expresa de forma rítmica, con un perfil en antifase respecto a la familia de genes *per* en condiciones de alimentación diurna (ML), situándose la acrofase en ZT14. En todos los casos, el desfase de 12 h en el horario de alimentación induce un desplazamiento equivalente del perfil rítmico de expresión de los genes reloj.

Un resumen de los registros obtenidos de actividad locomotora se muestra en la Figura 2, diferenciando los perfiles de actividad general de los obtenidos en

las fotocélulas situadas bajo el comedero. Los carpines alimentados a mediodía muestran un claro patrón de actividad diurna, que se pierde cuando la alimentación se produce a medianoche. Los actogramas (waveform) obtenidos en las zonas de comederos muestran un incremento notable de la actividad locomotora previo al horario de alimentación (en ambos grupos de peces, ML y MD), que se corresponde con la actividad anticipatoria al alimento, y una caída aguda de actividad durante los 20-30 min mientras comen. Los periodogramas demuestran la ritmicidad de la actividad con un periodo de 24 h.

Los peces alimentados a medio día muestran un ritmo diario significativo de cortisol circulante, que no se observa en los peces alimentados a medianoche. En este último grupo los niveles basales de cortisol son más elevados que en el grupo ML, incrementando 10 veces la concentración mínima circulante.

### Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que el horario de alimentación actúa como un potente sincronizador del reloj circadiano situado en la glándula adrenal del carpín. Las alteraciones observadas en los perfiles rítmicos diarios de la expresión de genes reloj, y en particular su inversión de fase, sugieren que el reloj de la adrenal es un oscilador sincronizable por la alimentación (FEO, *food entrainable oscillator*), frente a los osciladores sincronizables por el ciclo luz/oscuridad (LEO, *light entrainable oscillator*) (Isorna et al., 2017), si bien no podemos descartar que sea sensible a ambos *zeitgebers*. La alimentación nocturna no sólo ha sido capaz de invertir el ritmo diario de expresión de los genes reloj, sino que también sincroniza los ritmos diarios de actividad locomotora general y asociada a la alimentación, induciendo la aparición de una actividad anticipatoria al alimento, propia de los FEOs. Otra consecuencia de la ingesta a medianoche y el cambio de fase de genes reloj es que el cortisol deja de tener un ritmo diario y sus niveles basales aumentan, probablemente debido al estrés causado por las la discrepancia entre señales ambientales externas.

### Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran que la glándula adrenal de los peces funciona como un oscilador

sincronizable por el horario de alimentación, que no sólo regula la expresión de la maquinaria molecular del reloj (genes *per* y *clock*) sino que también controla ritmos de salida de este oscilador, como los ritmos diarios de actividad locomotora y de cortisol circulante.

### Referencias

- Azpeleta, C., Martínez-Álvarez, R. M., Delgado, M. J., Isorna, E., & De Pedro, N. (2010). Melatonin reduces locomotor activity and circulating cortisol in goldfish. *Hormones and Behavior*, 57, 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.001>
- Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Velarde, E., & Isorna, E. (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Biological Rhythms*, 26, 24-33. <https://doi.org/10.1177/0748730410388600>
- Isorna, E., de Pedro, N., Valenciano, A. I., Alonso-Gómez, A. L., & Delgado, M. J. (2017). Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. *Journal of Endocrinology*, 232, R141-R159. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0330>
- Sánchez-Bretaña, A., Blanco, A. M., Unniappan, S., Kah, O., Gueguen, M.-M., Bertucci, J. I., ... Delgado, M. J. (2015). In situ localization and rhythmic expression of ghrelin and *ghs-r1* ghrelin receptor in the brain and gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*). *PLOS ONE*, 10(10), e0141043. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0141043>