

Melanocortinas y su función intestinal en peces

Esther Leal Cebrián (IATS, CSIC), Rita Angotzi (IATS, CSIC), Alejandra Godino-Gimeno (IATS, CSIC), Silvia Gregorio (CCMar), Josep Rotllant (IIM-CSIC), Alfonso Saera-Vila (Sequentia Biotech), Juan Fuentes (CCMar), Jose Miguel Cerdá Reverter (IATS, CSIC)

Abstract

Overexpression of agouti-signalling protein (ASIP) in transgenic zebrafish increases food intake levels and linear growth. A higher feed intake is unnecessary in transgenic fish to enable larger and heavier growth. A plausible explanation may rely on the enhanced feeding efficiency mediated by improved nutrient absorption in transgenic animals. Transcriptomic results suggested that amino acid, monocarboxylates, ionic and vitamin transmembrane transport was substantially modified. Enrichment analysis revealed an inhibition of intestinal lipid metabolism and down-regulation of KEGG pathways related to membrane integrity suggesting an augmented intestinal laxity that may result in enhanced paracellular transport. Electrophysiological experiments showed that *asip1* overexpression decrease membrane tissue resistance (Rt), indicating a modification of the intestinal barrier function in ASIP1 transgenic animals. Paracellular permeability was higher in ASIP fish. Both the decrease in Rt and the increase in permeability point to an ASIP1-dependent decrease in the tissue barrier function. Electrogenic amino acid transport was enhanced in transgenic fish providing a strong indication that ASIP1 fish can extract more amino acids from their diet at similar feeding levels. Both transcriptomic and electrophysiological results support that *asip1*-overexpressing zebrafish display improved nutrient absorption and by extension a higher feed efficiency which explains enhanced growth in the absence of augmented food intake.

Resumen

La sobreexpresión de la proteína de señalización agoutí (ASIP) en peces cebra transgénicos incrementa los niveles de ingesta y el crecimiento, además, los peces ASIP1 no necesitan comer más para crecer más. Una posible explicación de lo anteriormente expuesto, podría ser una mejora de la eficiencia alimentaria mediada por una absorción de nutrientes más eficaz en los peces ASIP1. Para comprobar esta hipótesis realizamos dos tipos de experimentos. Por un lado, realizamos una comparación de la transcriptómica intestinal de ambos genotipos y subsecuentemente analizamos la integridad y transporte intestinal mediante el uso de cámaras Ussing. Los resultados transcriptómicos sugieren que el transporte de membrana de aminoácidos, monocarboxilados, iones y vitaminas está sustancialmente modificado. El enriquecimiento de algunos genes muestra una inhibición del metabolismo lipídico intestinal y una disminución en la regulación de las vías KEGG relacionadas con la integridad de membrana, apuntando a un incremento de la laxitud intestinal, que quizá interfiera en el transporte paracelular. Experimentos electrofisiológicos mostraron que la sobreexpresión de *asip1* redujo la resistencia de la membrana (Rt) y acrecentó la permeabilidad paracelular, revelando una modificación de la función de la barrera intestinal en los peces ASIP1. El transporte electrogénico de aminoácidos se vio incrementado en los peces transgénicos sugiriendo que los peces ASIP1 pueden extraer más aminoácidos de la dieta con similares niveles de ingesta. Los resultados transcriptómicos y electrofisiológicos apoyan la idea que la sobreexpresión de *asip1* mejora la absorción de nutrientes y por ende la eficiencia alimentaria, lo cual explicaría el mayor crecimiento obtenido en ausencia de necesitar mayores cantidades de alimento en los peces transgénicos.

Introducción

El sistema de melanocortinas es uno de los sistemas hormonales más complejos de vertebrados. Su señalización está mediada por una familia de receptores acoplados a la proteína G (MC1R-MC5R). A su vez, existen antagonistas endógenos que compiten con los agonistas por la unión a dichos receptores, como son: la proteína de señalización agoutí (ASIP) y la proteína relativa a agoutí (AGRP). Nuestros estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de *asip1* en peces cebra transgénicos, modifica el patrón de pigmentación dorsoventral, reduciendo el número de melanóforos e incrementando el de iridóforos según Ceinos et al., (2015). Además, hemos verificado que los peces ASIP1 exhiben mayores niveles de ingesta y de crecimiento que los animales salvajes (WT). Estos mayores niveles de ingesta no conllevan obesidad, ya que su perfil lipídico es similar al de los individuos salvajes. Sin embargo, los peces ASIP1 no necesitan comer más para crecer más (Godino-Gimeno et al., 2021), sugiriendo que los peces ASIP1 podrían exhibir mayor eficiencia alimenticia. El notable crecimiento de los peces transgénicos podría deberse a un mayor desarrollo muscular a través de la estimulación del eje somatotrópico o bien, a una mejora de la función intestinal que promueva una absorción más eficiente resultando en mejores índices de conversión alimenticia. En este estudio, hemos analizado la segunda hipótesis comparando el transcriptoma intestinal de los peces ASIP1 y WT, examinando la permeabilidad intestinal y la capacidad electrogénica del transporte de aminoácidos.

Material y métodos

Animales: En los experimentos se utilizaron peces cebra (*Danio rerio*) salvajes (WT) de la cepa Tubingen (TU), y transgénicos sobreexpresando *asip1* [Tg(Xla.Eef1a1:Cau.ASIP1)iim04,] (Ceinos et al., 2015). **Secuenciación de ARN:** La secuenciación y análisis de resultados fue llevado a cabo por la empresa Sequentia Biotech SL (Barcelona). RNAs con RIN superiores a 7 y ratio 28S:18S superior a 1.8 fueron secuenciados mediante la plataforma Illumina NovaSeq

6000 (longitud 150bp). Los datos se normalizaron mediante el método TMM para estimar los niveles de producción relativa de los datos del RNA seq (Robinson et al., 2010). El enriquecimiento de las vías KEGG y términos de ontología génica (GO) fueron analizados mediante test hipergeométricos. La tasa de falsos positivos (FDR) fue estipulada a $p < 0.05$. Análisis de plasma: La sangre se extrajo mediante ablación de la cola con capilares heparinizados. El calcio y magnesio se midieron mediante test colorimétricos utilizando kits comerciales (Spinreact) y se analizaron mediante un lector de placas BioTek SynergyTM 4.

Análisis electrofisiológicos: Los estudios se realizaron mediante el uso de cámaras Ussing analizándose diferentes parámetros electrofisiológicos del intestino en ambos genotipos, incluyendo la resistencia epitelial, la permeabilidad y el transporte de aminoácidos según Fuentes et al., (2010).

Resultados y discusión

Clases funcionales de genes diferencialmente expresados (DEG) en machos: El análisis genómico reveló la presencia de 757 y 752 genes sobre- e infra-expresados en animales ASIP, respectivamente. Los análisis de enriquecimiento mostraron que 710 de estos genes están implicados en procesos asociados con el transporte de membrana incluyendo la familia de transportadores SLC. La sobre-expresión de *asip1* induce la sobre-expresión de genes relacionados con el transporte aniónico y de aminoácidos, pero inhibe procesos relacionados con el metabolismo lipídico (síntesis de colesterol y procesos metabólicos del colesterol, isoprenoides y esteroides críticos para la integridad de membrana)

Clases funcionales de DEG en hembras: En las hembras ASIP1 se encontraron 410 genes sobre-expresados y 231 infra-expresados en relación a los animales WT. El análisis ontológico indica diferencias en la integridad epitelial, mostrando una inhibición de procesos biológicos relacionados con la morfogénesis de la piel, ensamblaje del axonema y adhesiones celulares, entre otras. El metabolismo de ácidos orgánicos y aminoácidos incluyendo histidina, tirosina y triptófano, así como, el transporte de algunos iones y vitaminas también parece favorecido en animales ASIP1. Las vías KEGG mostraron una potenciación de procesos relacionados con el metabolismo de aminoácido incluyendo el de tirosina, triptófano, taurina, fenilalanina, alanina/aspartato/glutamato, glicina/serina/treonina y el metabolismo de histidinas. Los resultados concernientes al metabolismo de ácidos grasos fueron similares a los observados en hembras.

Expresión de receptores de melanocortinas en el intestino: La expresión de receptores de melanocortinas en el sistema gastrointestinal de peces cebra es limitada, y la sobreexpresión de *asip1* solamente incrementó significativamente los niveles de expresión de MC5Ra independientemente del sexo.

Estudios electrofisiológicos: La integridad epitelial del intestino de los animales ASIP1 medida por la diferencia de potencial es menor que la de animales WT, sugiriendo una función de barrera intestinal disminuida en este genotipo. Esta disminución se corroboró mediante estudios de permeabilidad celular que mostraron un incremento de permeabilidad en animales ASIP1. Finalmente, los estudios de transporte de aminoácidos mostraron que en los animales ASIP1, la sólida estimulación de transportadores de aminoácidos resulta en una mayor eficiencia en el transporte de estos, sugiriendo que los animales ASIP1 pueden extraer más aminoácidos de la dieta en tiempos de post-ingesta similares.

En conclusión, este estudio muestra que la sobreexpresión de *asip1* directa o indirectamente regula la función de la barrera intestinal, incrementando la permeabilidad del epitelio y promoviendo el transporte electrogénico de aminoácidos. Estas observaciones sugieren que los peces ASIP1 tienen mejor absorción de nutrientes y mayor eficiencia alimenticia, lo cual podría explicar el mayor crecimiento mostrado en ausencia de cantidades superiores de ingesta. El significativo crecimiento de ASIP1 mediado por la mejora de la absorción de nutrientes y la eficiencia alimentaria, sugiere que el sistema de melanocortinas, específicamente la sobreexpresión de *asip1*, es clave para mejorar la maquinaria genética de los peces, lo cual sería muy beneficioso en acuicultura. Uno de los mayores problemas de la transgénesis es la posibilidad de escapes de dichos ejemplares y el desplazamiento de otras especies autóctonas. Sin embargo, nuestros estudios previos sugieren que los ASIP1 son menos agresivos cuando compiten con WT en luchas diádicas y gracias a la diferenciación en la pigmentación de la piel de dichos transgénicos (Ceinos et al., 2015), estos son fácilmente reconocibles tras posibles escapes. Otro de los problemas comerciales que afecta al consumo de pescado son las malformaciones pigmentarias, sin embargo, en este caso no se vería afectada la venta ya que dichos animales solo presentan diferenciaciones en la región dorsal y nunca en los flancos.

Bibliografía

- Ceinos R.M., et al., (2015). Pigment patterns in adult fish result from superimposition of two largely independent pigmentation mechanisms. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 196-209.
- Fuentes J., et al., (2010): Parathyroid hormone-related protein-stanniocalcin antagonism in regulation of bicarbonate secretion and calcium precipitation in a marine fish intestine. *Am J Physiol.* 299, R150-R158.
- Godino-Gimeno A., et al., (2020). Growth performance after agouti-signaling protein 1 (*asip1*) overexpression in transgenic zebrafish. *Zebrafish* 17, 373-381.
- Luo W. and Brouwer C. (2013). Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data

Alimentación y Nutrición

integration and visualization. *Bioinformatics*. 29, 1830-1831.

Robinson M.D., et al., (2010). R: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26, 139-140.

Agradecimientos

Proyecto PID2019-103969RB-C33 de la Agencia Estatal de Investigación (AEI).