

EFFECTO DE LA INGESTIÓN DE ALIMENTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES CIRCADIANOS EN CINCO TEJIDOS PORCINOS

Cardoso T.F.^{1,2}, Quintanilla R.³, Castelló A.^{1,4}, Mármol-Sánchez E.¹, Ballester M.³, Jordana J.⁴, Amills, M.^{1,4*}

¹Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193; ²Fundación CAPES, Ministerio de Educación de Brasil, Brasilia - DF 70040-020, Brasil; ³IRTA, Genética y Mejora Animal, Torre Marimon, Caldes de Montbui 08140; ⁴Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193.
marcel.amills@uab.cat

INTRODUCCIÓN

En mamíferos, el reloj circadiano central se halla localizado en una estructura hipotalámica denominada núcleo supraquiasmático, y su regulación y ritmicidad dependen fundamentalmente de la exposición a la luz (Partch et al., 2014). Por otra parte, hay una serie de relojes periféricos distribuidos en los distintos tejidos y órganos cuyo funcionamiento se halla regulado por el aporte de nutrientes, la temperatura y otros factores (Oike et al., 2014). La estructura, regulación y función de las proteínas integradas en los relojes circadianos se ha estudiado ampliamente en humano y ratón, y se sabe que la inactivación de los genes que las codifican tiene efectos muy importantes sobre el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos (Ribas-Latre y Eckel-Mahan 2016; Gooley y Chua 2014). No obstante, poco se conoce sobre la biología de los relojes circadianos en las especies domésticas. En un trabajo previo, Cardoso et al. (2017) compararon los patrones de expresión de mRNA en el músculo esquelético de cerdas Duroc en ayuno (T0) y al cabo de 5 h. (T1) y 7 h. (T2) de recibir alimento. Los resultados de este experimento demostraron que la ingestión de alimento afecta de forma importante a la expresión de diversos genes circadianos, observándose las mayores diferencias de expresión en la comparación T0 vs T2. El objetivo del presente trabajo consiste en extender este análisis de expresión diferencial a cuatro tejidos adicionales (hipotálamo, hígado, duodeno y tejido adiposo dorsal) con distintas características anatómicas, funcionales y metabólicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajeron muestras de músculo, hipotálamo, hígado, duodeno y tejido adiposo dorsal de 12 cerdas T0 y 12 cerdas T2 sacrificadas en el matadero experimental del IRTA en Monells (Girona). Dichas muestras se sumergieron en la solución conservante RNAlater y, posteriormente, se extrajo el RNA total mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen) y se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). A partir de 1 µg de RNA, se sintetizó el DNA complementario con el preparado High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µL. Se estableció un control negativo carente de transcriptasa reversa para cada tejido. Se diseñaron cebadores para amplificar los siguientes genes circadianos: *ARNTL*, *BHLHE40*, *CRY2*, *NPAS2*, *NR1D1*, *PER1*, *PER2* y *SIK1*. La cuantificación de la expresión de estos genes se realizó mediante PCR cuantitativa en una plataforma QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Como controles endógenos, se seleccionaron cuatro genes: *ACTB*, *TBP*, *HPRT1* y *B2M*. La composición de las reacciones de PCR fue: 3.75 µl de cDNA, 7.5 µl del preparado SYBR Select Master Mix, y 300 nM de cada cebador en un volumen final de 15 µl. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. El perfil térmico fue: 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante un minuto. La expresión de los ocho genes circadianos se normalizó tomando como referencia la mediana geométrica de la expresión de los controles endógenos (*ACTB*, *TBP*, *HPRT1*, y *B2M*) y se cuantificó

con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando el grupo T0 como calibrador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1**, puede observarse que la expresión de los 8 genes circadianos no experimentó ningún cambio significativo en el hipotálamo antes y después de comer. En cambio, se observó expresión diferencial T0 vs T2 en cuatro (grasa dorsal y duodeno), seis (músculo esquelético) y siete (hígado) genes integrados en relojes circadianos periféricos (**Tabla 1**). Los cambios de expresión antes citados no serían atribuibles a la acción del reloj central situado en el hipotálamo, ya que en dicho tejido no se observó ningún cambio significativo de expresión. Bien al contrario, los cambios de expresión en duodeno, grasa dorsal, músculo e hígado se deberían muy probablemente al aporte de nutrientes. De hecho, se sabe que la ingestión de alimento es el principal activador de los relojes circadianos periféricos mientras que su efecto sobre el reloj central, regulado principalmente por la exposición a la luz, es mínimo (Damiola et al., 2000; Hirota y Fukada, 2004).

Por otra parte, se observó que los genes que demostraban expresión diferencial T0 vs T2 variaban dependiendo del tejido que se considerase. Por ejemplo, en músculo y duodeno cuatro genes presentan expresión diferencial, pero sólo dos (*NPAS2* y *SIK1*) fueron compartidos por ambos tejidos (**Tabla 1**). Por el contrario, el grado de solapamiento entre los genes diferencialmente expresados en el músculo (6 genes) y en el hígado (7 genes) fué mucho mayor (*BHLHE40*, *NPAS2*, *PER1*, *PER2* y *SIK1*), tal como puede verse en la **Tabla 1**. Las diferencias entre tejidos en cuanto a patrones de expresión de genes circadianos podrían deberse a que cumplen funciones metabólicas distintas y a que están sometidos a distintos factores reguladores. Por ejemplo, Mukherji et al. (2013) han demostrado que la ausencia de microbioma intestinal altera de forma muy marcada la producción cíclica de corticosterona en el íleo, provocando la aparición de hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina. Por otra parte, diversos metabolitos microbianos (p.e. ácidos grasos de cadena corta) pueden afectar a la expresión de los genes circadianos causando obesidad debido a una alteración de los ritmos circadianos central y periférico (Leone et al., 2015). A su vez, el tracto gastrointestinal puede secretar grandes cantidades de melatonina extrapineal, una hormona que contribuye a la sincronización de los relojes circadianos. En un estudio reciente en el que se compararon los patrones de expresión de genes circadianos en el hígado y el estómago de ratones, se observó que éstos son distintos (Mazzocchi et al., 2012). Storch et al. (2002) también demostró que la amplitud de las oscilaciones circadianas de la expresión génica en el hígado y en el corazón son sustancialmente distintas, evidenciando la existencia de una regulación circadiana tejido-específica.

Finalmente, el análisis de la **Tabla 1** permite determinar que los genes *NPAS2* y *ARNTL* suelen presentar un aumento de su expresión después de ingerir alimento en los cinco tejidos bajo estudio (**Tabla 1**), mientras que los genes *CRY2*, *PER1* (excepto grasa dorsal) y *PER2* (excepto hipotálamo) presentan una disminución de sus niveles transcripcionales en T2. La existencia de un cierto antagonismo en cuanto a la expresión de los genes *NPAS2/ARNTL* y *PER/CRY* resulta esperable. De hecho, los heterodímeros *NPAS2/ARNTL* estimulan la expresión de las proteínas *PER* y *CRY*, y una vez éstas alcanzan un cierto umbral de expresión citosólico, son translocadas al núcleo donde reprimen la expresión de los genes *NPAS2/ARNTL* (Partch et al., 2014).

La principal conclusión que puede derivarse de los resultados de este experimento es que la nutrición afecta a la expresión de los genes circadianos en los tejidos regulados por relojes periféricos, mientras que no parece tener un efecto significativo en el reloj central hipotalámico. Un objetivo de futuro consistiría en determinar si la variabilidad de los genes circadianos se halla asociada a la variación de caracteres de interés productivo en porcino.

REFERENCIAS

Cardoso, T.F. 2017. BMC Genomics 18 (1):603 • Chomzynski, P. y Sacchi N. 1987. Anal. Biochem. 162 (1):156–59 • Damiola, F. 2000. Genes Dev. 14 (23):2950–61 • Gooley, J.J. 2014. J. Genet. Genomics. 41 (5):231–50 • Hirota, T. y Fukada Y. 2004. Zoo. Sci. 21 (4):359–68 • Leone, V. 2015. Cell Host Microbe 17 (5):681–89 • Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Methods. 25 (4):402–8 • Mazzocchi, G. 2012. Chronobiol. Int. 29 (10):1300–1311 • Mukherji, A. 2013. Cell 153 (4):812–27 • Oike, H. 2014. Curr. Nutr. Rep. 3 (3):204–12 • Partch, C.L. 2014. Trends Cell. Biol. 24 (2):90–99 • Ribas-Latre, A., y Eckel-Mahan, K. 2016. Mol. Metab. 5 (3):133–52 • Storch, K-F. 2002. Nature 417 (6884):78–83.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL2013-48742-C2-2-R concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). M. Ballester ha sido financiada con un contrato Ramón y Cajal (RYC-2013-12573) del MINECO. Los autores agradecen a Selección Batallé S.A., y muy especialmente a J. Reixach, haber proporcionado el material animal, y a los técnicos de la granja experimental de porcino y del matadero experimental de IRTA-Monells su colaboración en la fase experimental y la obtención de las muestras biológicas.

Table 1: Expresión diferencial de genes circadianos en ayuno (T0) y 7 h después de comer (T2) en cinco tejidos porcinos¹.

Gen	Grasa dorsal		Duodeno		Hipotálamo		Hígado		Músculo	
	q	log ₂ (Rq)	q	log ₂ (Rq)	q	log ₂ (Rq)	q	log ₂ (Rq)	q	log ₂ (Rq)
<i>ARNTL</i>	0.00	2.12	0.02	1.16	0.41	0.36	0.00	1.40	0.27	0.56
<i>BHLHE40</i>	0.02	1.18	1.00	0.55	0.75	-0.17	0.01	-0.94	0.00	-1.11
<i>CRY2</i>	0.74	-0.24	1.00	-0.41	0.72	-0.19	0.17	-0.47	0.01	-1.32
<i>NPAS2</i>	0.02	0.68	0.02	1.05	0.12	0.71	0.00	2.07	0.00	1.02
<i>NR1D1</i>	0.02	-1.08	0.03	-1.48	1.00	-0.15	0.00	-1.93	1.00	0.29
<i>PER1</i>	1.00	0.16	1.00	-0.05	0.50	-0.48	0.01	-1.05	0.00	-1.22
<i>PER2</i>	1.00	-0.14	1.00	-0.48	1.00	0.10	0.03	-1.06	0.00	-1.46
<i>SIK1</i>	1.00	0.00	0.04	1.57	1.00	0.10	0.00	-1.84	0.00	-2.60

¹Los genes con una expresión diferencial significativa antes (T0) y 7 h. después de ingerir alimento (T2) se indican en negrilla (q = q-valor calculado mediante FDR). Un valor positivo de log₂(Rq) denota un incremento de la expresión en T2, mientras que un valor negativo indica una disminución de la expresión en T2.

EFFECT OF FOOD INTAKE ON THE EXPRESSION OF CIRCADIAN GENES IN FIVE PORCINE TISSUES

ABSTRACT: In this study, we have evaluated the changes promoted by food intake in the expression of eight genes related with the maintenance of circadian rhythms in five porcine tissues. Our data indicate that four (dorsal fat and duodenum), six (skeletal muscle) and seven (liver) genes integrated into or modulating peripheral clocks are differentially expressed before and after feeding. In contrast, none of the eight analysed genes shows a significant differential expression in hypothalamus, the tissue where the central clock resides. This result indicates that the differential expression of clock genes in the four aforementioned tissues is induced by nutrition and not by the central clock entrained by light.

Keywords: Clock genes, food ingestion, nutrition, RT-qPCR, pig.