

Implicación del sistema de melanocortinas en la fisiología de la piel del pez cebra (*D.rerio*)

Leal E.^a, Angotzi AR.^a, Gregório SF.^b, Ortiz-Delgado JB.^c, Rotllant J.^d, Fuentes J.^b, Tafalla C.^e, Cerdá-Reverter JM.^a

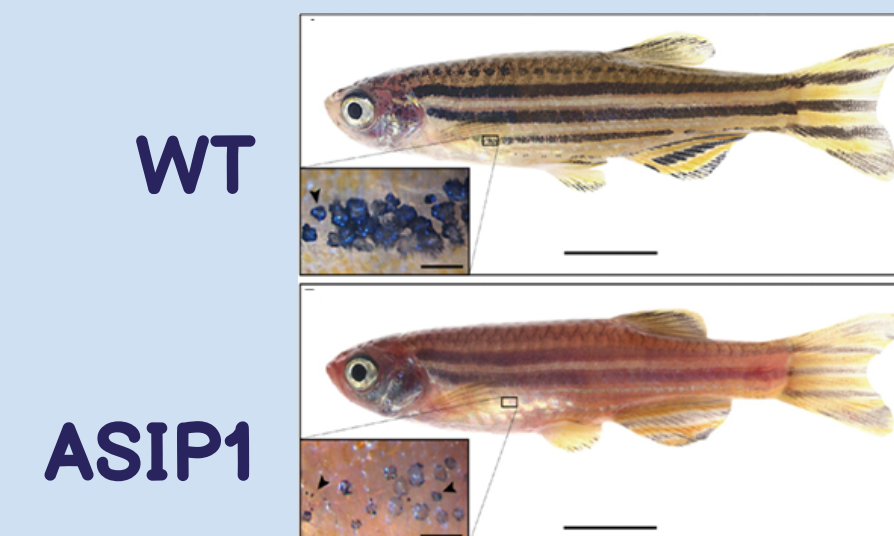
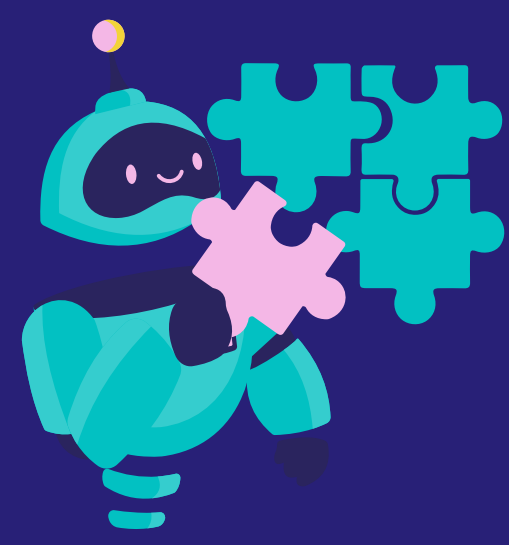
^a Departamento de fisiología y biotecnología de peces, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, (IATS), CSIC, 12595, Castellón, España

^b Centro de Ciencias Marinas (CCMar), Universidade do Algarve Campus de Gambelas, 8005-139, Faro, Portugal

^c Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN), CSIC Campus Universitario Río San Pedro, 11510, Puerto Real, Cádiz, España

^d Instituto de Investigaciones Marinas (IIM), CSIC, 36208, Vigo, España

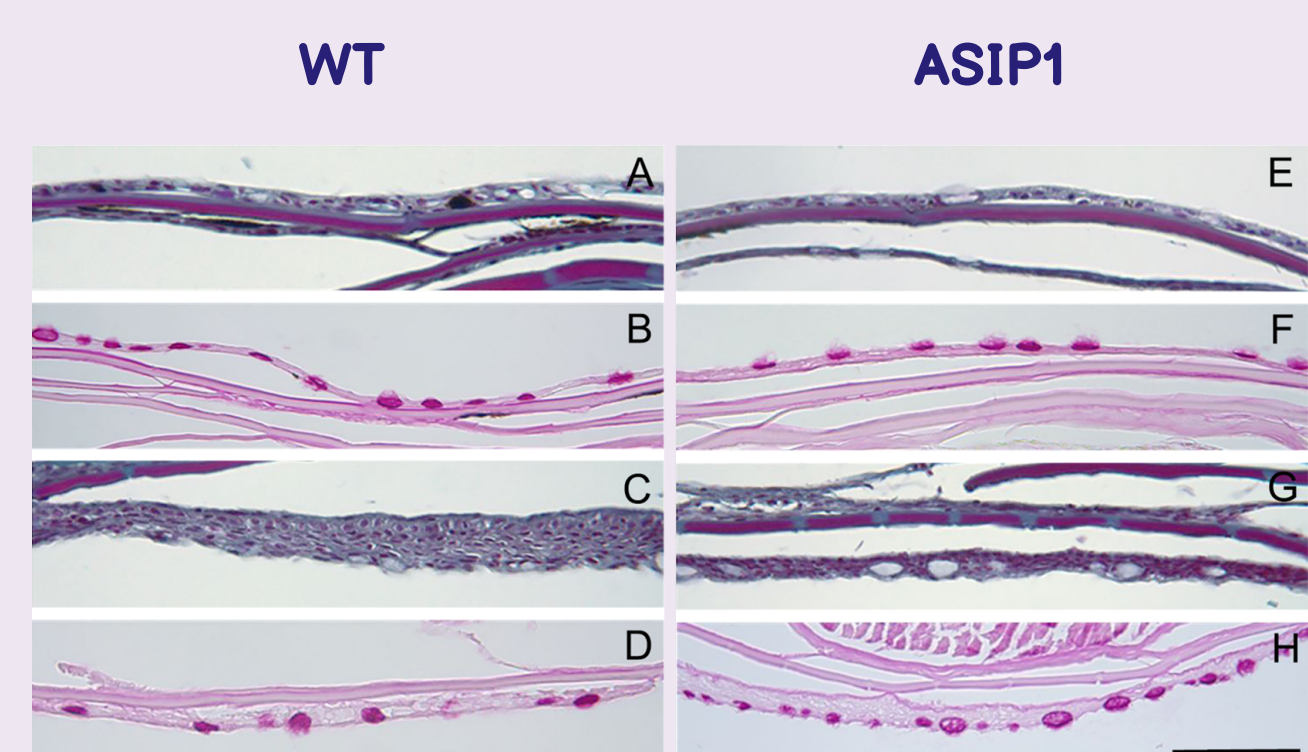
^e Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), INIA-CSIC, Valdeolmos, 28130, Madrid, España



Introducción

La proteína de señalización ASIP (ASIP) se expresa principalmente en la piel, donde compete por la unión al receptor de melanocortinas 1 (MC1R). Nuestros estudios en peces muestran que la unión ASIP1/MC1R modifica el patrón de pigmentación dorso-ventral de la piel, provocando una proliferación de iridóforos y reduciendo el número de melanóforos. El sistema de melanocortinas regula procesos inflamatorios, siendo un componente importante en la respuesta inmune innata. α -MSH activa numerosas vías moleculares mediante la señalización de AMPc que median los efectos antiinflamatorios de las melanocortinas, inhibiendo los efectos proinflamatorios de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α , junto con la secreción de IL-10. Sin embargo, en peces solo hay estudios *in vitro* en los cuales α -MSH estimula la fagocitosis y el estallido respiratorio en leucocitos de carpa y trucha.

Morfología epitelial



Secciones histológicas de piel dorsal (A,B,E,F) y ventral (C,D,G,H) teñidas con hematoxilina-eosina y hematoxilina-VOF (n=4). La escala representa 100 μ m.

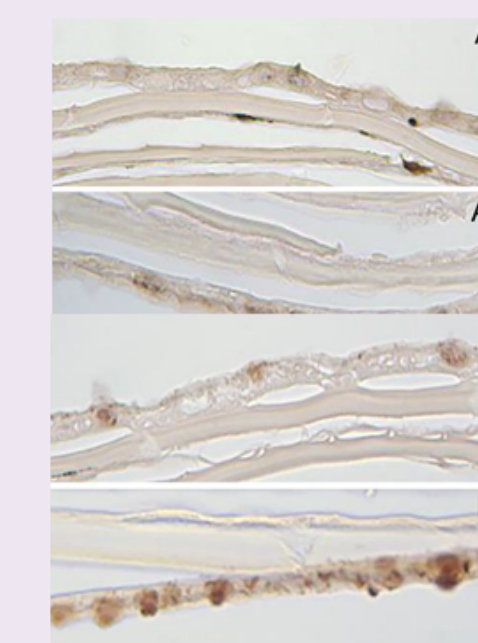
Cuantificación de lectinas y mucinas epiteliales

Lectinas

Dorsal/Ventral	Wt Células mucosas	ASIP1 Células mucosas
ConA	0/0	0/0
WGA	2/2-3	2-3/3
UEA-I	0/0	0/0
SBA	2/2-3	2-3/3
SNA	2/2-3	2-3/3

ConA \rightarrow Concanavalin A
WGA \rightarrow Wheat germ agglutinin
UEA-I \rightarrow Ulex europaeus agglutinin-1
SBA \rightarrow Soybean Agglutinin
SNA \rightarrow Sambucus nigra

Afinidad:
0 \rightarrow Negativa
1 \rightarrow Débil
2 \rightarrow Moderada
3 \rightarrow Intensa



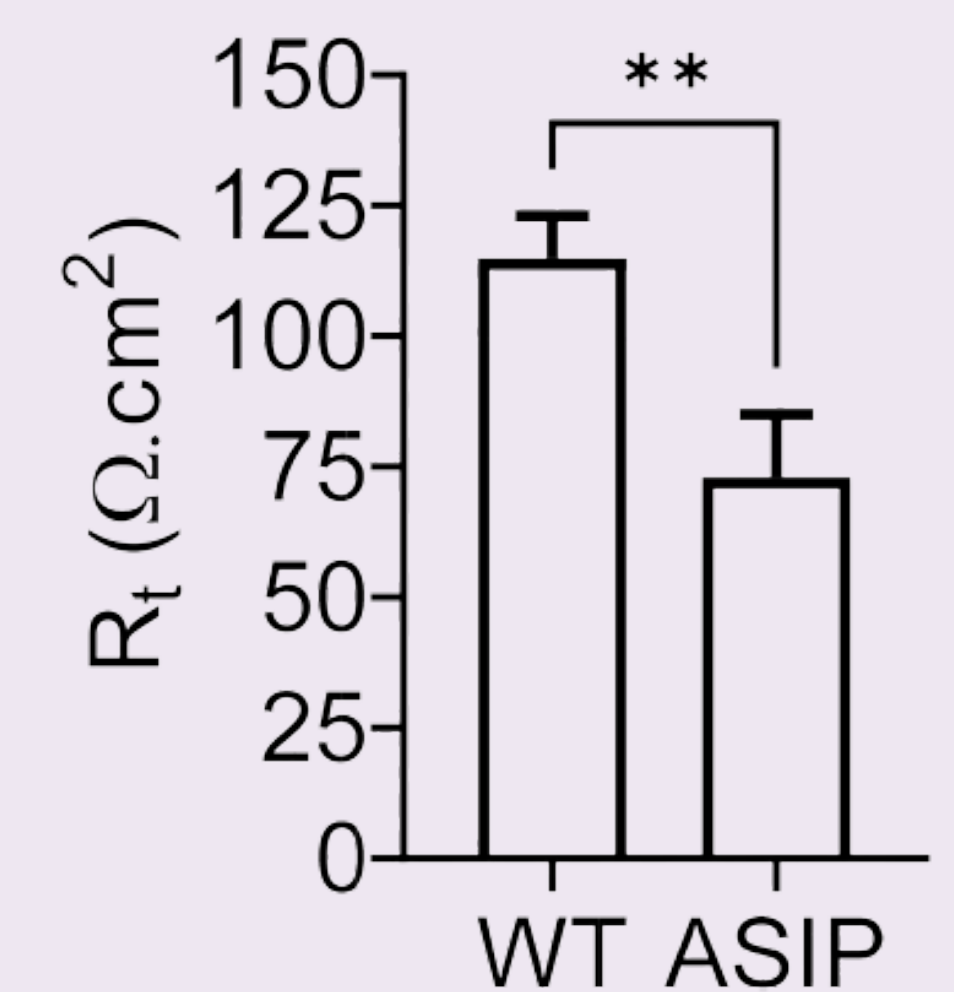
Mucinas

Dorsal/Ventral	Wt Células mucosas	ASIP1 Células mucosas
MsN/GP	2/2-3	2/3-3
MsC	2/2-3	2-3/3
MsMI	2/2-3	2-3/3

MsN/GP \rightarrow Neutral mucins/Glycoproteins
MsC \rightarrow Carboxylate mucins
MsMI \rightarrow Sulfated mucins

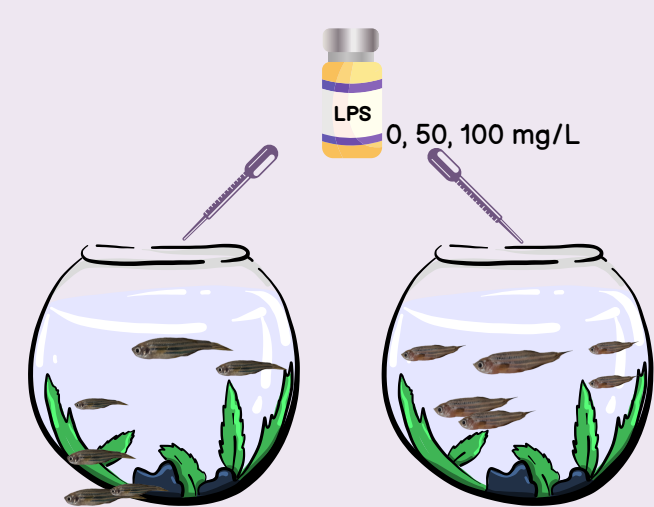
Tabla semicuantitativa mostrando la afinidad de lectinas y mucinas en la piel dorsal y ventral de ambos genotipos. Secciones histológicas mostrando residuos glucídicos unidos a glicoconjugados en piel dorsal (1) y ventral (2) de SBA en WT (A) y ASIP1 (B).

Resistencia tisular



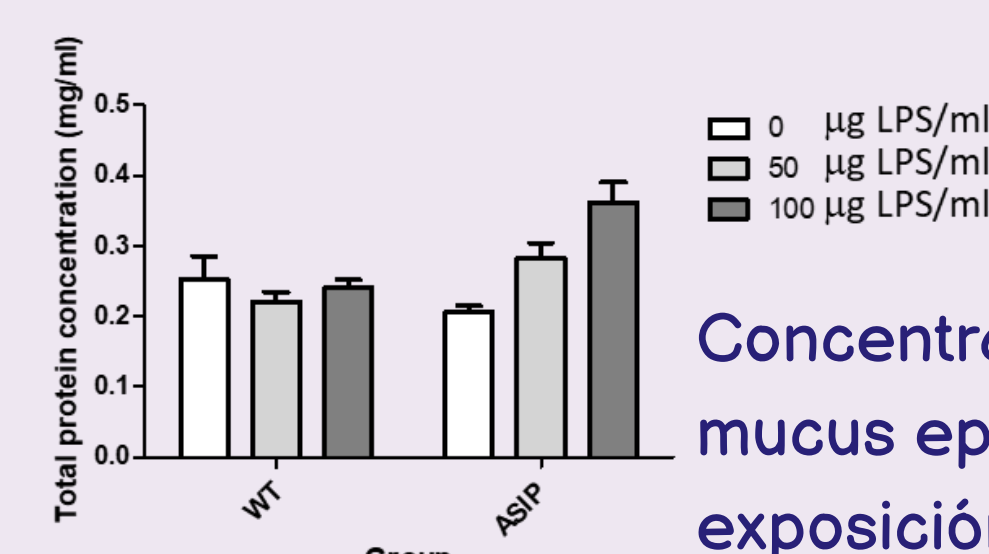
Resistencia eléctrica trans-epitelial. Cada columna representa la media \pm SEM (n=10). Los asteriscos muestran diferencias significativas (p < 0.001) tras un test t de Student.

Exposición a LPS



Exposición por baño a diferentes dosis de LPS E. coli O111:B4 (0, 50, 100 mg/L) durante 4 días.

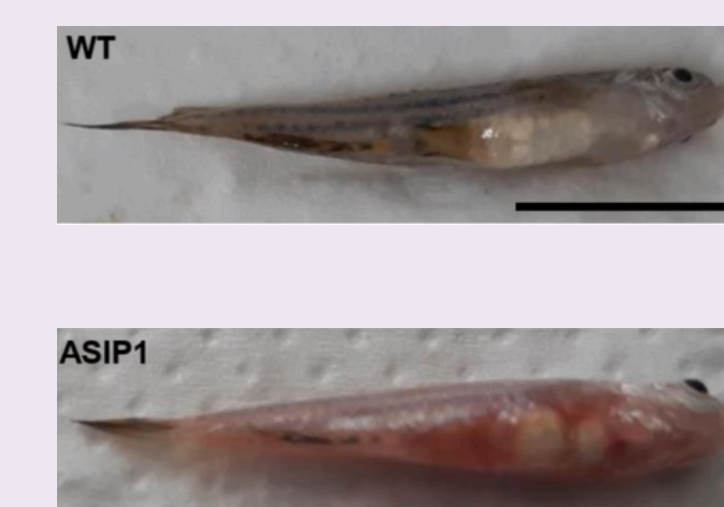
Proteínas en el mucus tras la exposición a LPS



Concentración de proteína total en el mucus epitelial tras 4 días de exposición a LPS. Se representa la media \pm SEM (n = 7). Análisis de un ANOVA de dos vías y las diferencias son significativas si p < 0.05.

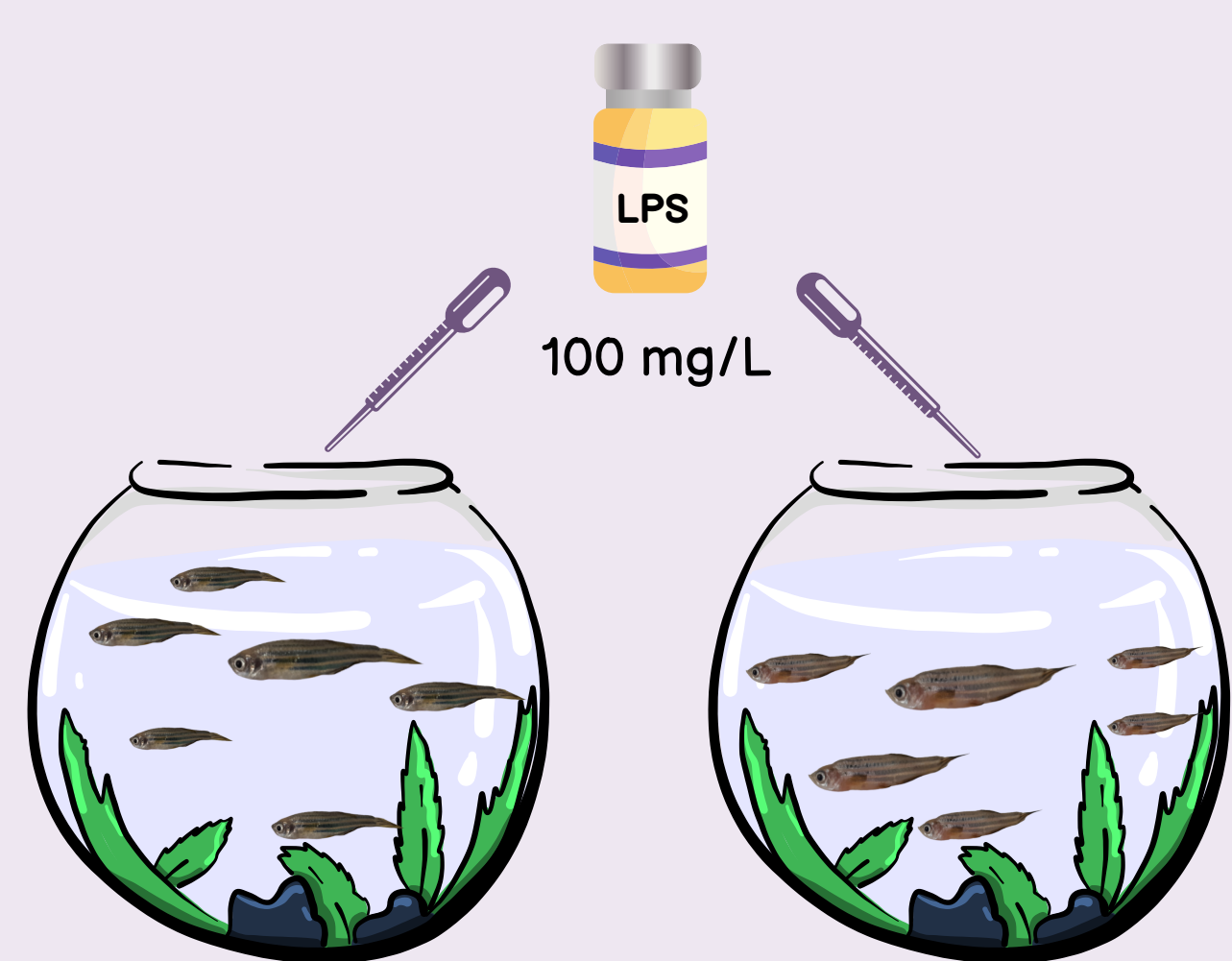
	P value
Interaction	0.0022
LPS dose	0.0072
Genotype	0.0153

Lesiones tras la exposición a LPS



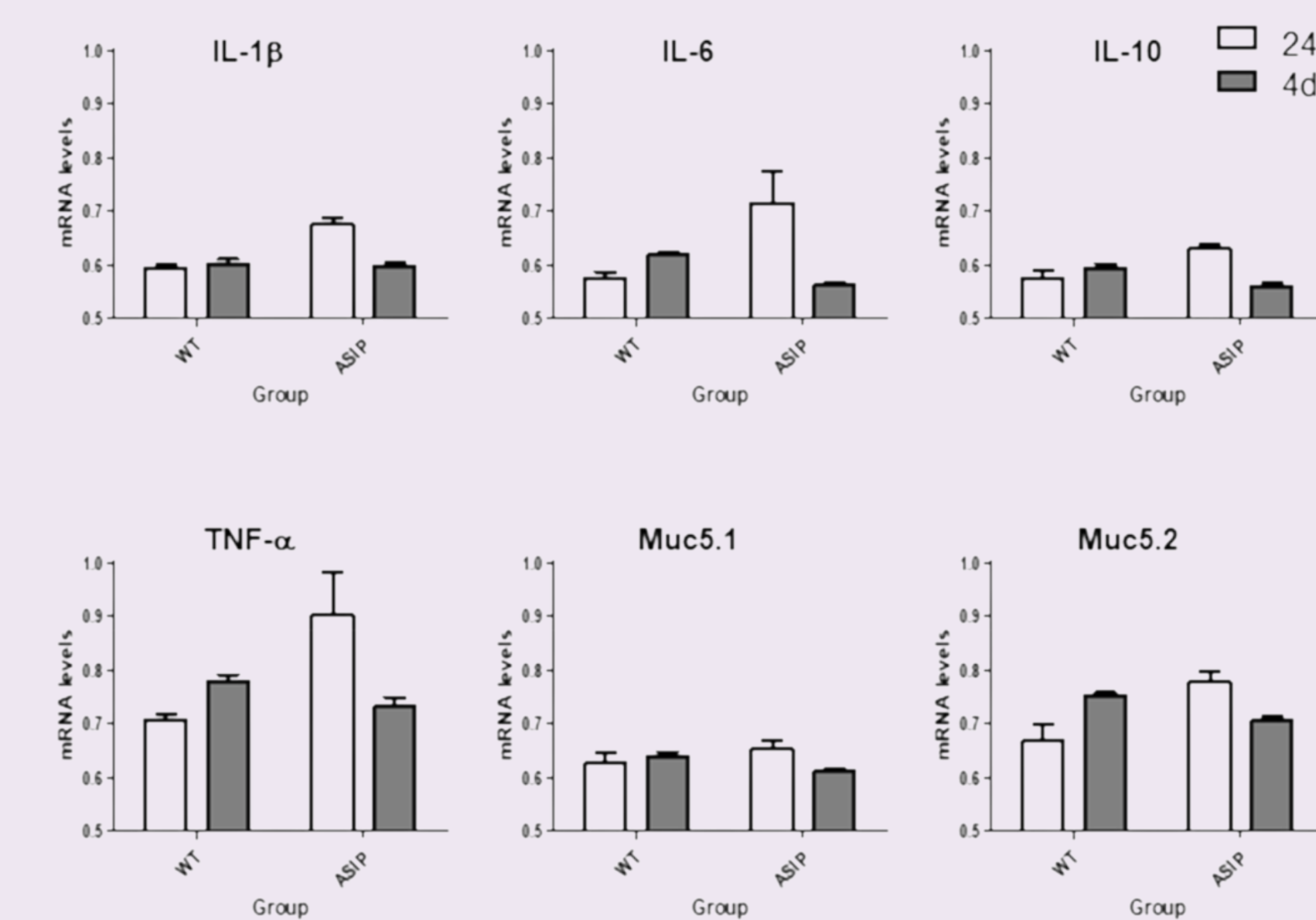
Exposición durante 5h a 100mg/L de LPS. Fotos tras 24h. La escala representa 1 cm.

Exposición a LPS



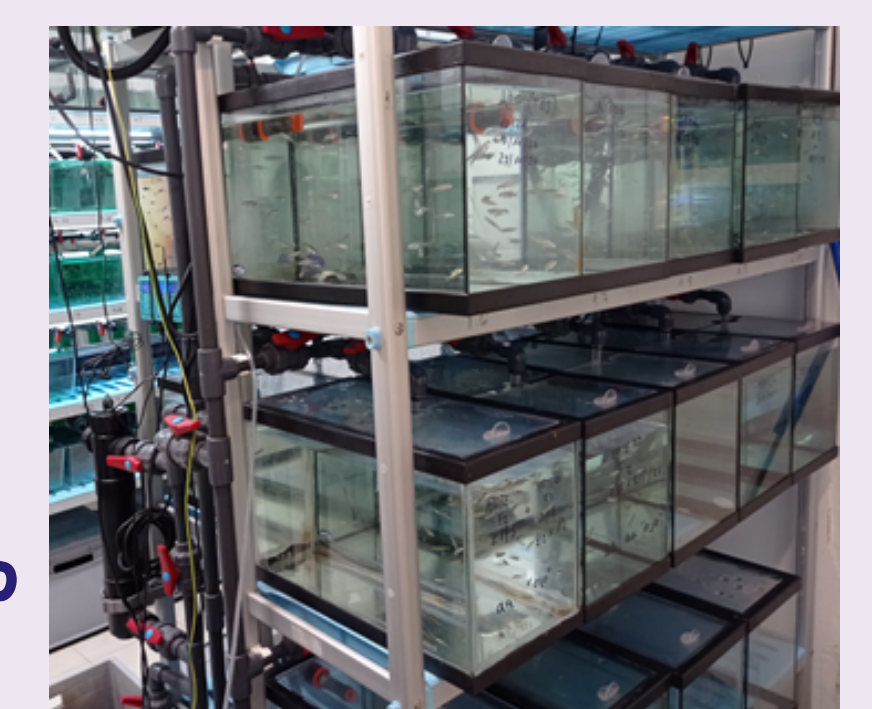
Exposición por baño a 100mg/L de LPS E. coli O111:B4 durante 24h o 4d.

Niveles de expresión génica en la piel tras la infección con LPS



P value	IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α	Muc5.1	Muc5.2
Interaction	0.0002	0.0029	0.0002	0.0075	0.038	0.0005
Time	0.0009	0.0893	< 0.0001	0.0584	0.0109	0.371
Genotype	< 0.0001	0.1213	0.0222	0.0285	0.1797	0.0305

Después de 4h de exposición a 100mg/L de LPS, los peces se transfirieron a agua limpia y las muestras de piel se extrajeron tras 24h y 4d. Los niveles de expresión se determinaron mediante qPCR. Se representa la media \pm SEM (n = 10) y el análisis mediante un ANOVA de dos vías, considerándose diferencias significativas si p < 0.05.



Sistema cerrado de peces cebra

Conclusiones

La sobreexpresión de ASIP1 disminuye la integridad del epitelio, siendo los animales más susceptibles a infecciones por reducción de la función de barrera. El LPS incrementa la concentración de proteínas en el mucus de los peces ASIP1 sugiriendo una mejor respuesta a la infección bacteriana. Los peces ASIP1 muestran una respuesta proinflamatoria más rápida y eficaz indicando que podría ayudar a superar las infecciones bacterianas más fácilmente que los WT. Las mejoras en la respuesta inflamatoria y la secreción de proteínas en el mucus de los peces ASIP1 como consecuencia del LPS, han podido ser adquiridas para contrarrestar la reducción de la integridad epitelial.

Agradecimientos

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