

Título de la tesis: Rol de PACAP, PRP y GHRH en la regulación neuroendocrina de GH en el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)

Autor: Dr. Mauricio Nestor Kraemer

Director: Dr. Luis Fabián Canosa

Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada-INTECH

Resumen:

El pejerrey es una especie muy bien considerada tanto deportiva como gastronómicamente en relación a las cualidades de su carne. Sin embargo, debido a que las tasas de crecimiento y supervivencia del pejerrey son inferiores a las de otros peces cultivados comercialmente, el cultivo intensivo del pejerrey se vuelve económicamente inviable. Así, el conocimiento de la regulación de la expresión y la liberación de hormonas relacionadas con el crecimiento del pejerrey ayudarían a mejorar su potencial en acuicultura. De este modo, el objetivo es estudiar la regulación neuroendocrina de GH y el efecto de los péptidos hipotalámicos sobre las células de la hipófisis de pejerrey.

Al analizar las secuencias de *prp-pacap* y *ghrh* se observó que presentan una estructura muy similar a la de otras especies de peces. Esto se pudo ver especialmente en *prp-pacap* que tiene mayor porcentaje de similitud, incluso se vio la presencia de *splicing* alternativo como ocurre en otras especies. El transcripto corto que así se genera carece de una región que codifica para PRP. También se pudo establecer que la secuencia de *prp-pacap* de pejerrey pertenece a un clado llamado *catfish-like*.

En los estudios de expresión de los mensajeros de ambos genes se vio que *prp-pacap* tiene una distribución amplia en el cerebro, mientras que *ghrh* se detectó solo en el diencefalo. Esto sugiere que GHRH tendría una función restringida a la regulación hipofisaria en contraposición a PACAP que tendría otras funciones además de la regulación hipofisaria.

En juveniles tempranos de pejerrey alimentados con alto contenido de lípidos en la dieta (21%) desde las primeras etapas larvales, la disminución de la transcripción del ARNm de *ghrII* (posiblemente, de origen extra-hepática) limitaría el papel clave de GH como promotor del crecimiento. Estos resultados, en combinación con la disminución de expresión de *prp-pacap*, señala la necesidad de los peces alimentados con alto contenido de lípidos en la dieta de aumentar su consumo de alimento con el fin de

contrarrestar algún desbalance nutricional generado y, por lo tanto, satisfacer sus requisitos nutricionales.

Por otro lado, peces tratados con estradiol mostraron un aumento de liberación de GH y de la expresión de *ghrh* de una manera dependiente de la concentración. Estos resultados son similares a lo observado en otras especies de peces, pero con la particularidad de que no hubo modificaciones en la expresión de *pacap*, mostrando que los mecanismos de regulación pueden variar entre diferentes especies de peces.

En ensayos *in vitro* con cultivos primarios de celulares hipofisarias PACAP indujo un aumento de la expresión de *gh* como ocurre en muchas otras especies, pero en nuestras condiciones experimentales no fue posible determinar un aumento de la liberación de GH al medio de cultivo. Sin embargo, las condiciones experimentales permitieron mostrar una disminución en la liberación de GH tanto en presencia de somatostatina (SS14), como de PRP. El efecto de SS14 era algo esperado ya que es uno de los principales inhibidores de la liberación de GH en todos los vertebrados, y sirve como control positivo que muestra la viabilidad de las células hipofisarias en las condiciones de cultivo. Sin embargo, el efecto inhibitorio observado con PRP fue inesperado. No hay reportes de dicho efecto para PRP en otras especies. Así, estos resultados abren nuevos enfoques de investigación.

Palabras Claves: Pejerrey, Hormona de Crecimiento, Neuroendocrinología, Péptidos hipotalámicos, IGF.

Abstract:

Pejerrey silverside (*Odontesthes bonariensis*) is a species highly appreciated both sportingly and gastronomically due to the qualities of its flesh. However, because its growth and survival rates are lower than those of other commercially farmed fish, intensive silverside culture is up today economically unviable. Thus, the knowledge of the regulation of gene expression and release of hormones related to the growth in silverside would help us to improve its potential for aquaculture. Thus, the objective is to study the neuroendocrine regulation of GH and the effect of hypothalamic peptides on the cells of pejerrey pituitary gland.

When analyzing the sequences of *prp-pacap* and *ghrh*, it was observed that they present a very similar structure to that of other species of fish. This could be seen

especially in *prp-pacap*, which has a higher percentage of similarity, even the presence of alternative splicing was seen as occurs in other species. The short transcript thus generated lacks a PRP coding region. It was also possible to establish that the *prp-pacap* sequence of silverside belongs to a so-called catfish-like clade.

In the expression studies it was found that *prp-pacap* has a wide distribution in the brain, while *ghrh* was detected only in the diencephalon. This suggests that GHRH would have a function restricted to pituitary regulation as opposed to PACAP which would have other functions in addition to pituitary regulation.

In early juvenile silversides fed high dietary lipids (21%) from early larval stages, decreased transcription of *ghrII* mRNA (possibly of extra-hepatic origin) would limit the key role of GH as a promoter growth. These results, in combination with the decreased expression of *prp-pacap*, indicate the need for fish under high lipid content diet to increase their feed intake to counteract some nutritional imbalance and, thus, meet their nutritional requirements.

On the other hand, fish treated with estradiol showed increased GH release and *ghrh* expression in a concentration-dependent manner. These results are like that observed in other species of fish, but with the particularity that there were no modifications in the expression of *pacap*, showing that the regulation mechanisms can vary between different species of fish.

In in vitro tests with primary pituitary cell cultures, PACAP induced an increase in *gh* expression as occurs in many other species, but in our experimental conditions it was not possible to determine an increase in GH release to the culture medium. However, the experimental conditions allowed showing a decrease in GH release both in the presence of somatostatin (SS14) and PRP. The effect of SS14 was expected since it is one of the main inhibitors of GH release in all vertebrates, and it serves as a positive control showing the viability of pituitary cells under culture conditions. However, the inhibitory effect observed with PRP was unexpected. There are no reports of such an effect for PRP in other species. Thus, these results open new research perspectives.

Keywords: Pejerrey, Growth Hormone, Neuroendocrinology, Hypothalamic Peptides, IGF.