



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR**

Efecto del ayuno en el balance energético y los niveles de asprosina en *Danio rerio* (Hamilton, 1822).

Alumno: **Eduardo Castillo Sánchez**

Tutor IATS: **Esther Leal Cebrián**

Tutor UCV: **Pablo Sanchís Benlloch**

Curso académico: 2021-2022



AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia y transmitir mi enorme y más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me tendieron su mano en este largo camino y han colaborado en la consecución de metas anteriores y en este trabajo de investigación.

En primera instancia, a mi tutor, el Doctor Pablo, por su confianza ciega en mí y los valores que me has transmitido, gracias por tu ayuda, ofrecimiento constante y disponibilidad en la planificación y organización de este Trabajo de Fin de Grado.

En segundo lugar, agradecer a la Universidad Católica de Valencia por todos estos años de enseñanza y por la oportunidad de conocer a esta gran familia. Me siento muy afortunado de haber podido desarrollar mis conocimientos y años académicos en un entorno como este. Gracias a todos los profesionales que formáis parte de esta familia, vuestra sonrisa y vuestro granito de arena hace que todo sea mucho mejor.

También, deseo mostrar una enorme gratitud hacia el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal por abrirme las puertas al mundo de la investigación y por darme la oportunidad de la realización de la estancia de prácticas, siempre fuiste un lugar especial para mí que he tenido oportunidad de conocer desde dentro. Gracias a todo el equipo profesional y humano que forma parte de este organismo, por facilitarme el día a día y ponerme al terreno como diría Ximet. Con especial mención, a mi tutora, la Doctora Esther, gracias por la confianza y el trato recibido, la paciencia, implicación y coordinación, por todo el trabajo y algún que otro consejo y, en definitiva, al equipo que hemos hecho. Miles de gracias se me quedarían cortas, he aprendido como un niño a tu lado.

Por último, a mi familia, mis padres, abuelos y a mi hermano por la educación y los valores que me habéis transmitido, lo sois todo para mí. Y, con especial honor, a mi tío Juan, que con el corazón y orgullo le dedico este trabajo.

A todos ellos, mil gracias.

Efecto del ayuno en el balance energético y los niveles de asprosinina en *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DEL PEZ CEBRA.....	15
1.2. BALANCE ENERGÉTICO: CONTEXTO GENERAL Y SU VISIÓN EN ACUICULTURA	19
1.3. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DE LA INGESTA EN PECES	21
1.4. ASPROSINA	23
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1. ANIMALES EXPERIMENTALES.....	29
3.2. INSTALACIONES.....	31
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	32
3.4. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS.....	33
3.5. OBTENCIÓN DE PLASMA	33
3.6. EXTRACCIÓN DE ARN.....	33
3.7. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)	35
3.8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (PCRq).....	35
3.9. COMPROBACIÓN DE LOS CEBADORES DISEÑADOS PARA EL RECEPTOR <i>PTPRD</i>	37
3.10. CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE.....	38
3.11. ESTADÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS	39

Efecto del ayuno en el balance energético y los niveles de asprosina en *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

4.1.	PARÁMETROS BIOMÉTRICOS	39
4.2.	NIVELES DE GLUCOSA PLASMÁTICA.....	41
4.3.	NIVELES DE EXPRESIÓN DE ASPROSINA Y EL RECEPTOR <i>PTPRD</i>	42
4.4.	COMPROBACIÓN DE LOS CEBADORES DISEÑADOS PARA EL RECEPTOR <i>PTPRD</i>	47
5.	DISCUSIÓN.....	48
6.	CONCLUSIONES	54
7.	LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	55
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de peces cebrá de machos y hembras.....	16
Figura 2. Diagrama de las posibles situaciones en la regulación de la ingesta de alimento.....	19
Figura 3. Vista del sistema gástrico-cerebral implicado en la regulación del consumo de alimentos en peces.....	22
Figura 4. Ejemplos de pacientes con síndrome de Marfan.....	24
Figura 5. Mecanismo de actuación de la asprosina a nivel hepático.....	26
Figura 6. Descripción del proceso de actuación de la asprosina en el hipotálamo.	27
Figura 7. Circuito de recirculación de agua en los tanques de experimentación.	32
Figura 8. Parámetros de temperatura (°C) y tiempo (min) seguidos para la RT-PCR.	37
Figura 9. Parámetros biométricos medidos la semana previa al comienzo del experimento.....	39
Figura 10. Muestreo del peso (g) de todos los grupos (n=12) al inicio del experimento.	39
Figura 11. Parámetros biométricos (peso y talla) al día 2 de ayuno.....	40
Figura 13. Parámetros biométricos (peso y talla) al día 7 de ayuno.....	41
Figura 14. Comparativa de los niveles de glucosa plasmática entre los grupos controles y ayunados de cada día de muestreo.	41
Figura 15. Valores obtenidos de los niveles de glucosa en sangre para todos los grupos de experimentación en los diferentes tiempos de ayuno..	42
Figura 16. Curva de amplificación del gen de la asprosina.	42
Figura 17. Curva de disociación o de Melting.	43
Figura 18. Respectivos valores de los niveles de ARNm para la asprosina en la grasa mediante PCRq.	43
Figura 19. Niveles de expresión de ARNm de asprosina en la grasa por RT-PCR.....	44

Figura 20. Representación de los niveles de ARNm de asprosina en el hígado cuantificados mediante PCR cuantitativa.....	44
Figura 21. Niveles de expresión de ARNm de la asprosina en el hígado por RT-PCR.	45
Figura 22. Niveles de expresión de ARNm del receptor de asprosina en el cerebro por RT-PCR...	46
Figura 23. Niveles de expresión de ARNm del receptor de asprosina en el cerebro por RT-PCR.....	46
Figura 24. Banda longitudinal de expresión del gen del receptor de asprosina en el cerebro.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de los piensos utilizados y sus tamaños de pellet para cada estadio de crecimiento.....	30
Tabla 2. Nucleótidos que componen los primers utilizados.....	37

ABREVIATURAS

A	ayunado
aa	aminoácidos
ADN	ácido desoxirribonucleico
AgRP	proteína relacionada con el agoutí
a.m	ante meridiem
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
B	bazo
BBB	barrera hematoencefálica
BOE	Boletín Oficial del Estado
Br	cerebro
C	control
CART	tránsito regulado por cocaína y anfetaminas
CCK	colecistoquinina
CEE	Comunidad Económica Europea
cm	centímetros
Crh	hormona adrenocorticotropa
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
Cu	cobre
°C	grados centígrados
D	día
DHA	ácido docosahexaenoico

Efecto del ayuno en el balance energético y los niveles de asprosinina en *Danio rerio* (Hamilton, 1982)

dL	decilitro
DNAsa	desoxirribonucleasa
dNTPs	nucleósido trifosfato
DTT	ditiotreitól
E	ojo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Ej.	ejemplo
EU	Europa
FBN-1	fibrilina-1
Fbpase	fructosa 2,6-bifosfatoo
Fe	hierro
FW	forward
G	grasa
g	gramos
g	fuerza g
GABA	neurotransmisor ácido gamma aminobutírico
Gal	galanina
Ghrl	grelina
Glp	péptido similar al glucagón
GOD	glucosa oxidasa
Grp	péptido liberador de gastrina
Gu	intestino
H	corazón
h	horas

Efecto del ayuno en el balance energético y los niveles de asprosinina en *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

I	yodo
IATS	Instituto de Acuicultura de Torre la Sal
kb	kilobase
KDa	kilodaltons
Kg	kilogramos
L	litro
M	molar
m	metro
m ³	metro cúbico
Mch	hormona activadora de melanina
MFS	síndrome de Marfan
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
Mn	manganeso
Msh	hormona estimuladora de melanocitos
Mu	músculo
mV	milivoltio
μl	microlitros
μm	micromolar
n	tamaño muestral
NH ⁺ ₄	amonio
nm	nanómetro

Efecto del ayuno en el balance energético y los niveles de asprosinina en *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

NO ⁻²	nitritos
NO ⁻³	nitratos
NPY	neuropéptido Y
OLFR734	receptor olfatorio en ratones 734
OR4M1	receptor olfativo Familia 4 Subfamilia M Miembro 1
Ox	orexina
p	valor de p consignado
P	piel
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCRq	reacción en cadena de la polimerasa PCRa cuantitativa
Pepck	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
Pk	piruvato quinasa
PKA	proteína quinasa A
POD	peroxidasa
POMC	propiomelanocortina
ppm	partes por millón
Ptprd	fosfatasa delta de proteína tirosinareceptor tipo D proteína tirosina fosfatasa
Pyy	péptido YY
R	riñón
RFU	unidades de fluorescencia relativas
RNAse	ribonucleasa
Rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR en tiempo real

Efecto del ayuno en el balance energético y los niveles de asprosinina en *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

SEM	error estándar de la media
S. L	sociedad limitada
SNC	sistema nervioso central
sp.	especie
T ^a	temperatura
Trh	hormona liberadora de tirotrópina
U.S o USA	Estados Unidos
UV	ultravioleta
Vit.	vitaminas
Vol.	volumen
W	vatio

RESUMEN

El estudio del balance energético de los peces es esencial en acuicultura para la obtención de un producto de calidad mejorando la rentabilidad del sector. Es importante remarcar que no solo afecta a los peces, sino que es de vital importancia en todos los seres vivos, de tal modo que los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extrapolar a otros organismos, logrando favorecer el entendimiento de procesos que se ven involucrados durante periodos de inanición, donde se ha visto afectada la salud. Nuestros estudios han demostrado como el ayuno afecta no solamente al peso, sino que también existen modificaciones en hormonas, receptores y otras sustancias que son esenciales para el correcto funcionamiento del organismo. El ayuno prolongado durante una semana afecta al balance energético del pez cebra, reduciendo significativamente su peso corporal. Los valores de glucosa plasmáticos que se han obtenido disminuyen como consecuencia del ayuno, aunque durante una semana han permanecido estables, demostrando que todavía no se ha llegado a provocar una situación crítica en los animales. Los niveles de asprosinina en hígado y grasa son bastante estables y no se ven modificados ante una semana de ayuno prolongado, sin embargo, los niveles del receptor de asprosinina, *Ptprd*, en el cerebro han sufrido variaciones como consecuencia de periodos de inanición. Por tanto, 4 y 7 días de ayuno son suficientes para incrementar los niveles de expresión del receptor en el cerebro, que ha indicado una mayor sensibilidad a dicha hormona y aumentado la especificidad de las neuronas al receptor, mejorando la eficiencia de su respuesta.

PALABRAS CLAVE: *Danio rerio*, pez cebra, balance energético, ayuno, asprosinina, *Ptprd*.

ABSTRACT

The study of fish energy balance is essential in aquaculture to obtain a quality product and improve the profitability of the sector. It is important to emphasize that it does not only affect fish, but is of vital importance in all living organism, so that the results obtained in this work can be extrapolated to other organisms, thus favoring the understanding of processes that are involved during fasting periods, which in turn can affect health. Our results have shown how fasting affects not only weight, but also induces changes in hormones, receptors and other substances that are essential for the correct functioning of the organism. In zebrafish, one-week prolonged fasting affects energy balance, significantly reducing their body weight. Plasma glucose values decrease as a consequence of fasting, although they remain stable for a week, demonstrating that a critical situation has not yet been provoked in the animals. Asprosin levels in liver and fat are quite stable and are not modified after a week of prolonged fasting, although, the levels of the Ptpd asprosin receptor undergo variations as a consequence of fasting periods in the brain. Indeed, 4 and 7 days of fasting are sufficient to increase the expression levels of the receptor in the brain, has indicated a greater sensitivity to this hormone and increased the specificity of the neurons to the receptor, improving the efficiency of their response.

KEYWORDS: *Danio rerio*, zebrafish, energy balance, starvation, asprosin, Ptpd.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIONES DEL PEZ CEBRA

Especie y hábitat

El pez cebra (*Danio rerio*) (Hamilton, 1822) es un pez teleósteo eurihalino tropical de agua dulce perteneciente a la familia Cyprinidae. Habitan principalmente en humedales, ríos, zonas poco profundas y en aguas tranquilas (McClure et al., 2006; Lawrence, 2007). Preferentemente, se establecen en zonas con densa vegetación, alto grado de luminosidad y aguas moderadamente alcalinas (Lawrence, 2007); sobre sustratos arcillosos, limosos y rocosos (mayoritariamente cantos rodados) (Engeszer et al., 2007). En la actualidad, residen a lo largo de Norte América y de territorios del Pacífico Central (IUCN, 2010), aunque es endémico del sur de Asia, a lo largo de los sistemas fluviales de India, Nepal, Bangladesh, Pakistán y Myanmar (Engeszer et al., 2007; Lawrence, 2007; Spence et al., 2007, 2008; Sundin et al., 2019).

Morfología

Los individuos de esta especie se caracterizan por una morfología fusiforme comprimida lateralmente, un color plateado, azul y dorado, con ojos prominentes en comparación con su cabeza, así como la presencia de 5 - 9 bandas longitudinales de color azul oscuro, que recorren desde el opérculo hasta el final de la aleta caudal homocerca (Duff et al., 2019). De igual modo, presentan una única aleta dorsal y dos finos barbillones (típico de los ciprínidos). Tienen una pequeña boca supraterritorial, que desarrolla una coloración más rojiza en machos y plateada en hembras (en ejemplares adultos) alrededor del opérculo; de igual manera, presentan dimorfismo sexual y diferencias en cuanto a coloración y morfología, tal y como se aprecia en la figura 1 (Duff et al., 2019). Las hembras son de mayor tamaño y ventralmente más redondeadas. Presentan líneas longitudinales que alternan bandas azules y plateadas. Por el contrario, los machos adquieren tonalidades corporales más amarillentas (sobre todo en los flancos y aletas), un menor tamaño, aunque muestran una disposición más estilizada y un pedúnculo caudal más alargado (en detrimento adquieren mayor velocidad de natación que las hembras) (Conradsen y McGuigan, 2015) y las rayas laterales suceden en hileras azules y doradas (Duff et al., 2019). Alcanzan un tamaño máximo que ronda 3 centímetros de longitud y exhiben un comportamiento gregario en la naturaleza (Spence et al., 2008; Lawrence, 2011; Tsang et al., 2017; Cassar et al., 2020). Además, el pez cebra es una especie euriterma, por lo que toleran amplios rangos de temperatura (Tsang et al., 2017); desde 26 a 32°C en su hábitat natural

(Engeszer et al., 2007; Spence et al., 2007, 2008; Liew y Orbán, 2014) que concuerdan con los datos obtenidos en cautividad (Cortemeglia y Beitinger, 2005; Spence et al., 2006). La mayor parte de laboratorios simulan condiciones ambientales similares o iguales a las del ambiente primigenio (Cortemeglia y Beitinger, 2005; Liew y Orbán, 2014; Tsang et al., 2017).

En etapas avanzadas de desarrollo, poseen circuitos cerebrales que han desencadenado actividades y comportamientos complejos (e.j. memoria y aprendizaje, depredación, relaciones sociales (dominancia)) (Cassar et al., 2020).

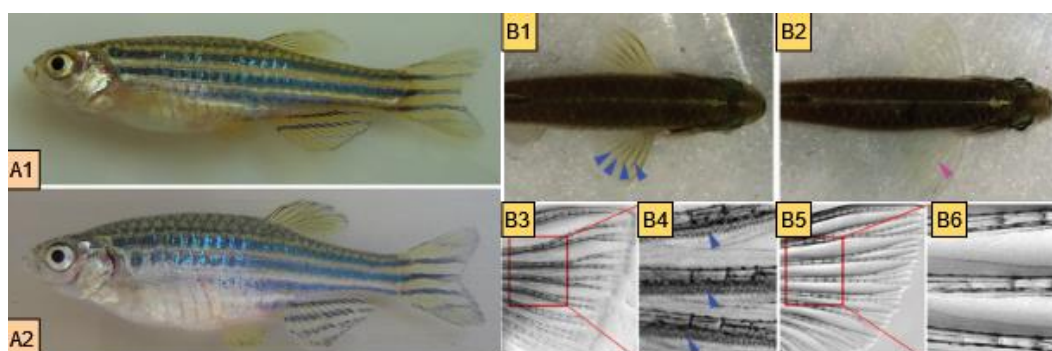


Figura 1. Morfología de peces cebras de machos y hembras. A) Plano dorsal de ejemplares macho (A1) y hembra (A2) de *D.rerio*. (Avdesh et al. 2012). B) Diferenciación machos y hembras a través de los tubérculos reproductores (marcas azules, machos; rosas, hembras). Vista de planta de las aletas pectorales de ejemplares macho (B1) y hembra (B2), donde los tubérculos se observan como superficies longitudinales queratinizadas marrones en machos y en hembras, se aprecian de manera translúcida. A nivel microscópico, en machos (B3) y (B4), se muestran estos componentes a lo largo y justo debajo de los radios centrales de la aleta dorsal. Por otro lado, en hembras (B5) y (B6), se ha apreciado la falta de estas estructuras, que permiten de manera sencilla discernir a fin de identificar el sexo correspondiente. (McMillan et al., 2015).

Alimentación

Acerca de la alimentación, los peces cebras son omnívoros eurípagos (Teame et al. 2019), que se alimentan por toda la columna de agua, generalmente de zooplancton, insectos o fases larvianas acuáticas de insectos terrestres (mayormente dípteros) (Lawrence, 2011; Spence et al., 2007, 2008). Sin embargo, también incorporan a su dieta pequeños crustáceos, huevos de cladóceros, fitoplancton y en escasas ocasiones, detritus, algas, materia orgánica y protozoos (McClure et al., 2006; Spence et al., 2007).

Reproducción

Son organismos ovíparos asincrónicos (Lawrence, 2007), que se disponen para su protección y beneficio (menor riesgo de predación, defensa del territorio, aumento de la tasa reproductiva y mayor eficiencia alimentaria) en cardúmenes de poca densidad (alrededor de 5 - 20 ejemplares) (Pritchard et al., 2001; Lawrence, 2011), en los cuáles ambos sexos alcanzan la madurez sexual aproximadamente a los 3 meses (Darrow y Harris, 2004; Gerlach, 2006; Liew y Orbán, 2014). En estado natural, los periodos reproductivos concuerdan con la época de monzones (de abril a agosto) (Sundin et al., 2019) y ofrecen gran variabilidad de recursos y nichos (Spence et al., 2006, 2007; Engeszer et al., 2007). Durante el periodo de desove (da comienzo tras 6 - 12 semanas post-fertilización) (Sessa et al., 2008), las hembras expulsan de 5 a 25 huevos repetidas veces a diario (300 huevos por semana) (Quint et al., 2022). Estos se depositan una vez han sido fertilizados por el esperma de los machos sobre el sustrato sin protección parental (Lawrence, 2011; Liew y Orbán, 2014). Suelen reproducirse durante la fase lumínica (Spence et al., 2006; Lawrence, 2011), aunque existen otros estudios que muestran tendencias de desove al atardecer (Spence et al., 2008). Además, las diferentes fases del apareamiento se han descrito y difieren del sexo, de tal modo que en machos se producen persecuciones y a continuación una natación, primero en círculos y finalmente en zigzag, mientras que, en hembras, se producen acercamientos y se disponen cara a cara (Darrow y Harris, 2004).

Con respecto a los huevos, son demersales y no se fijan sobre ninguna superficie hasta su eclosión (24 - 72h). Posteriormente, las larvas se adhieren sobre áreas no colonizadas mediante células especializadas situadas en el cráneo, donde una vez maduras expanden sus fronteras hacia otros territorios (Engeszer et al., 2007; Lawrence, 2011). Así mismo, se ha observado que la liberación de feromonas en el agua por parte de ambos sexos, que se detectan a través del olfato, actúan como señales coordinativas que regulan la competencia intraespecífica y afectan al éxito reproductivo, pudiendo inhibir la reproducción de otros ejemplares del mismo sexo (Gerlach, 2006). De esta manera, las hembras liberan del ovario esteroides sexuales (17 β -estradiol y glucurónido de testosterona) (Lambert y Van der Hurk, 1983), que son detectados por el macho y dan lugar al inicio del cortejo. Por otra parte, los machos liberan a través de los testículos, glucurónidos de testosterona, los cuáles aumentan la reproducción de las hembras (mayor número de óvulos, y cantidad, frecuencia y viabilidad de los gametos fecundados) (Chen y Galloway, 1975; Gerlach, 2006; Lawrence, 2011). Su vida media se encuentra entre 3 y 5 años (Lieschke y Currie, 2007).

Acuariofilia

Estos peces se utilizan comúnmente en acuarios recreativos debido a numerosas características como son, entre otras: carácter gregario (ideal para acuarios comunitarios), omnívoros, pequeño tamaño, coloración viva y líneas similares a las cebras terrestres, bajo coste, tiempo de generación corto y alta fecundidad, elevada tolerancia y resistencia frente a distintas condiciones ambientales (óptimo para principiantes en acuariofilia) y un carácter tranquilo que permiten su uso junto a un gran número de especies (mispeces.com, 2022). Los parámetros estándares ambientales en los acuarios oscilan entre 18 y 25°C de temperatura, una dureza de 90 - 357ppm (partes por millón) y un pH entre 6 y 8 (gluglupet.com, 2022).

Usos en investigación

A partir de 1981 (NHGRI, 2022) gracias a los trabajos del Dr. George Streisinger y su equipo se han establecido como organismo modelo en vertebrados (Lawrence, 2011), útil para extrapolar los resultados a mecanismos funcionales de órganos y enfermedades humanas (Lieschke y Currie, 2007; Menke et al., 2011; Quint et al., 2022), debido al alto grado de genes ortólogos que comparten con humanos (alrededor de un 70%) (Howe et al., 2013; Baldrige et al., 2021). De tal forma, se utilizan en investigación en múltiples campos, como la biomedicina (Lawrence, 2007; Roscioli et al., 2012; Chen y Galloway, 2017; Fontana et al., 2018), biología molecular (Olson et al. 2010; Wolman y Granato, 2012), genética (Raby et al. 2020; Baldrige et al. 2021), toxicología (Hill et al., 2005; Komoike y Matsuoka, 2016; Horzmann y Freeman, 2018; Cassar et al., 2020), endocrinología (Segner, 2009; Bourque y Houvras, 2011) y metabolismo (Teame et al., 2019). Entre las características más relevantes que presentan como modelo destacan: organismo prolífico (cuestión que aumenta el rendimiento, mejora los análisis y las posibilidades estadísticas) (Lawrence, 2007, 2011; Eames et al., 2017), de pequeño tamaño (Hill et al. 2005), facilidad de captación de moléculas a pequeña escala (Lawrence, 2011), facultad de regeneración de múltiples tejidos y órganos (Poss, 2010; Gemberling et al., 2013), crecimiento acelerado (Quint et al., 2022), transparencia durante la embriogénesis temprana, hecho que permite el estudio de órganos y su funcionamiento a través de la percepción visual y de una manera no invasiva (Hill et al., 2005; Lawrence, 2007; Cassar et al., 2020), gran disponibilidad de cepas *wild-type* y mutantes en genes específicos de interés (Lawrence, 2011) y presenta la secuenciación del genoma completo (~1,4x10⁹ pares de bases) (Wellcome Trust Sanger Institute, 2009) (Bourque y Houvras, 2011; Fontana et al., 2018; Duff et al., 2019; Baldrige et al., 2021).

1.2. BALANCE ENERGÉTICO: CONTEXTO GENERAL Y SU VISIÓN EN ACUICULTURA

Uno de los factores que más influyen en la acuicultura hace referencia al balance energético. Este concepto relaciona, el aporte de energía que principalmente deriva de la ingesta de alimentos y el gasto energético necesario para que se realicen las funciones vitales del organismo. En tal sentido, las tres situaciones posibles del equilibrio energético se representan en la figura 2 (López et al., 2007).

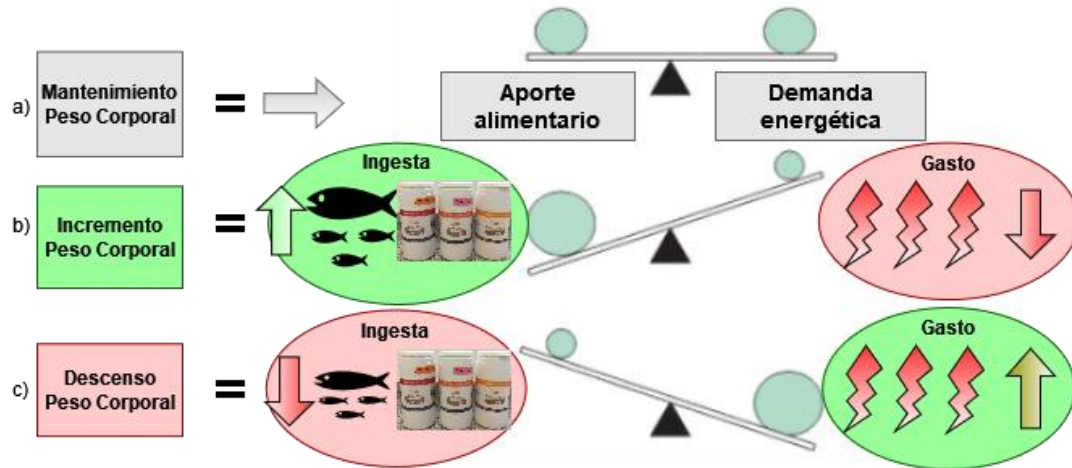


Figura 2. Diagrama de las posibles situaciones en la regulación de la ingesta de alimento. a) Equilibrio o balance energético neutral; b) Balance de energía positivo; c) Estado energético negativo. Modificado de (López et al., 2007).

Así pues, la situación de balance positivo existe cuando el aporte energético (valor calórico) que es provocado por la ingesta de alimentos es mayor al requerimiento metabólico del organismo, ocasionando un incremento de peso corporal y de las reservas energéticas, así como un mayor rendimiento en las jaulas de cultivo (reduciendo el tiempo de cultivo, maximizando la producción y disminuyendo los costes pienso, de personal y de equipos) (López et al., 2007). Sin embargo, un balance negativo, muestra una tendencia energética donde la demanda metabólica supera la entrada dietética de energía, dando lugar a una disminución de la masa corporal, pudiendo llegar a paralizar el crecimiento (si se prolonga durante mucho tiempo). Provoca la utilización de las reservas corporales como fuente de energía (Conde-Sieira y Soengas, 2017), lo cual interfiere en la economía de la acuicultura incrementando los costes del producto e incluso produciendo pérdidas insuperables a causa de la imposibilidad de venta de los animales (López et al., 2007). El equilibrio se produce cuando el índice del balance energético es igual a 0 (presenta cantidades iguales de gasto que de entrada de energía) (López et al., 2007). Esta situación de homeostasis, representada por un crecimiento más pausado sería la ideal en estado

salvaje, pero en acuicultura interesa que se maximice la eficiencia en la producción para obtener la máxima rentabilidad posible (Assan et al., 2021), es decir, lograr el crecimiento óptimo (talla y peso) con inversiones económicas y temporales mínimas (Steffens, 1987).

Se deben tener en cuenta, la multitud de factores que intervienen en dicho balance, entre los que destacan aspectos sociales (dominancia, calidad nutricional del alimento), fisiológicos (niveles de reservas, estrés, presencia de patologías, estadio reproductor, consumo de oxígeno, capacidad de absorción intestinal, tasa metabólica basal, talla) y abióticos (temperatura, porcentaje de oxígeno, pH, fotoperiodo, salinidad y presencia de contaminantes, entre otros) (Assan et al., 2021; López et al., 2007). También, se generan sinergias entre ellos. El descenso de los niveles de nutrientes, desencadenado por el ayuno, ralentiza el metabolismo. Concretamente, disminuye el consumo de oxígeno en carpas (*Cyprinus carpio*) y anguilas (*Anguilla japonica*) (Egusa, 1958; Meske et al., 1968; Steffens, 1987). Asimismo, tras 15 días de ayuno, se reduce el peso del hígado un 40% en carpas como respuesta al agotamiento de glucosa en sangre, que, tras ese periodo, se obtiene vía gluconeogénesis (Steffens, 1987). Sin embargo, la ingesta produce un aumento en la tasa de utilización de oxígeno (15 - 40%) en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Albrecht, 1974) y en carpas (Chiba, 1965). Por otra parte, las condiciones fotoluminiscentes varían los niveles de ingesta según la especie. En tal sentido, en peces gato (*Clarias gariepinus*) 24h de oscuridad aumentan la ingesta y mejoran la eficiencia en la conversión alimenticia (Asriqah et al., 2018); no obstante, en otras especies como el pez gato del Mekong (*Lophiosilurus alexandri*), 24h de luz continuada muestran las mayores tasas de ingesta de alimentos (Kitagawa et al., 2015).

En general la mayoría de los peces son poiquiloterms (Tsang et al., 2017; Van de Pol et al., 2017; Volkoff y Rønnestad, 2020), es decir, las condiciones ambientales concretan en gran medida la temperatura corporal del organismo y, por tanto, afectan a la velocidad de las reacciones químicas y fisiológicas, a diferencia de los mamíferos y las aves (son endoterms) (Van de Pol et al., 2017). Por esta razón, conviene remarcar la importancia de esta variable en la tasa metabólica estándar, la homeostasis energética, el éxito de depredación y los movimientos locomotores (Van de Pol et al., 2017; Volkoff y Rønnestad, 2020; Assan et al., 2021). Dicho de otra forma, los procesos fisiológicos de los organismos se ven afectados según la época del año en la que se encuentren (situaciones con diferente temperatura) (Assan et al., 2021). En invierno generalmente concuerda con la época reproductiva, por lo que la energía se dispondrá en mayor medida para estas actividades y, en consecuencia, apenas una pequeña cantidad sobrante se invertirá para el crecimiento, natación, alimentación y metabolismo. Así mismo, las bajas

temperaturas merman la capacidad del funcionamiento normal del organismo (situadas por debajo del rango óptimo de tolerancia de la mayoría de teleósteos) (Volkoff y Rønnestad, 2020; Assan et al., 2021). Por el contrario, el verano no suele concordar con el periodo reproductivo por lo que la demanda energética en este aspecto son menores. Por ello, incrementan la energía utilizada para otras funciones fisiológicas, así como, su tasa metabólica debido a las altas temperaturas (tasa ingestión alimento, mayor movimiento y tasa de utilización de metabolitos) (Volkoff y Rønnestad, 2020; Assan et al., 2021).

Cabe destacar que la ingesta es el único parámetro que se ha modificado de manera controlada en cuestiones relacionadas con el balance energético (Assan et al., 2021), por tanto, es importante en acuicultura que mantengan bajo control la cantidad, calidad y tipo de alimento, y garanticen unas condiciones óptimas de crecimiento y reproducción (Peres et al., 2014; Assan et al., 2021), así como, la máxima calidad del producto.

1.3. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DE LA INGESTA EN PECES

El mantenimiento de la homeostasis energética en los organismos es un proceso biológico complejo e intrincado, en el que se mantienen constantes regularmente, los depósitos de grasa y el peso corporal (Morton et al., 2014; Delgado et al., 2017), junto con los términos de consumo y demanda (Liu et al., 2020). En ella se distinguen dos ciclos: uno positivo al comienzo de la ingesta (relacionado con la experiencia, el estado energético general y nivel de nutrientes del alimento), mientras que el negativo se ajusta con las diferencias previas y posteriores a la absorción intestinal (modifican el metabolismo) (Delgado et al., 2017; Assan et al., 2021). La estabilidad en el balance de energía se logra a tres niveles: a corto plazo (cuya regulación es diaria y se modifica dependiendo de la cantidad de alimento); a medio plazo (modulación incluyendo varios días) y a largo plazo (compensación que abarca semanas, meses e incluso años) (Langhans y Scharrer, 1992; Delgado et al., 2017). Las desviaciones entre las calorías demandadas y el aporte nutricional por parte de los alimentos en animales y humanos se regulan a largo plazo a pesar de las continuas fluctuaciones a corto plazo (Langhans and Scharrer 1992). Las decisiones sobre qué y cuánto comer se toman diariamente de manera inconsciente en los seres vivos (Langhans et al., 1992; Morton et al., 2014), pero se ven implicados numerosos procesos específicos y canales de señalización que integran la información recibida por los sistemas centrales y periféricos (Langhans y Scharrer, 1992; Conde-Sieira y Soengas, 2017; Delgado et al., 2017), es decir, funciona como una red que integra la vía de señalización de los órganos implicados y los receptores sensoriales (Delgado et al., 2017; Assan et al., 2021).

Los sistemas de regularización implicados se clasifican en: sistema de saciedad gástrico-cerebral (a corto plazo) y sistema adiposo (reservas) + saciedad (a largo plazo) (Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017) y se describen con más detalle en la figura 3. En general, estos mecanismos (que engloban adaptaciones metabólicas) siempre tienden a recuperar los valores normalizados de peso corporal (Langhans y Scharrer, 1992).

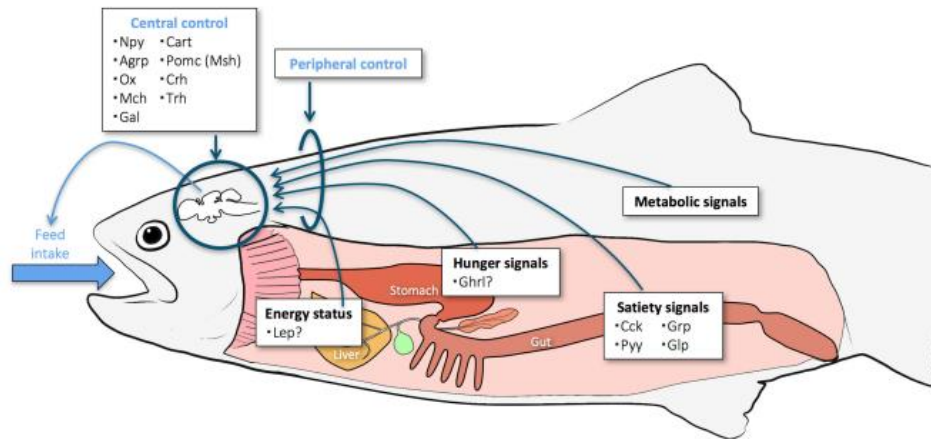


Figura 3. Vista del sistema gástrico-cerebral implicado en la regulación del consumo de alimentos en peces. Se engloban los diferentes mecanismos implicados en el control central y periférico; y con más detalle los diferentes neuropéptidos y vías de señalización (saciedad, hambre, metabólicas y reservorio). Npy, neuropéptido Y; CART, transcripto regulado de cocaína-anfetamina; AgRP, proteína relacionada con el agoutí; POMC, proopiomelanocortina; Ox, orexina; Crh, hormona adrenocorticotropa; Msh, hormona estimuladora de melanocitos; Mch, hormona activadora de melanina; Trh, hormona liberadora de tirotrópina; Gal, galanina; Lep, leptina; Ghrl, grelina; Cck, colecistoquinina; Pyy, péptido YY; Grp, péptido liberador de gastrina; Glp, péptido similar al glucagón. (Rønnestad et al., 2017).

De tal manera, la regulación de la ingesta a corto plazo se gestiona mediante el circuito de saciedad, en el cual intervienen diversos factores fisiológicos, sociales y extrínsecos encargados de enviar la información necesaria al sistema nervioso central (SNC) (Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017). Según sea la información periférica recibida, el cerebro la integra y es capaz de activar circuitos neuronales anabólicos o catabólicos para incrementar o reducir la ingesta (Woods y Begg, 2016; Conde-Sieira y Soengas, 2017; Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017; Ceylan y Saygin, 2020), respectivamente. Si la información recibida por el cerebro es que se necesita promover el apetito, las neuronas especializadas, localizadas principalmente en el hipotálamo (Delgado et al., 2017), se encargan de producir neuropéptidos orexigénicos como NPY y AgRP, que estimularán la ingesta (Yokobori et al., 2012; Woods y Begg, 2016; Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017; Yan et al., 2017; Beutler y Knight, 2018; Lockie et al., 2018; Liu

et al., 2020; Luís et al., 2020; Ceylan y Saygin, 2020; Soengas, 2021). Conjuntamente participa el sistema digestivo, el cual secreta a su vez péptidos gastrointestinales como la grelina en el estómago y activas enzimas lipogénicas en el hígado y tejido adiposo (Jönsson et al., 2007; Lockie et al., 2018). Si, por el contrario, la información recibida implica que el organismo ya está saciado y necesita reducir la ingesta, el cerebro sintetiza péptidos anorexigénicos como el CART o POMC (Kobayashi et al., 2008; Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017; Beutler y Knight, 2018; Ceylan y Saygin, 2020; Liu et al., 2020; Luís et al., 2020; Soengas, 2021), que fomentan la distensión estomacal y la secreción de péptidos gastrointestinales como la CCK (Woods y Begg, 2016; Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017), por parte del intestino. Los péptidos gastrointestinales liberados se detectan por el cerebro a través del nervio vago, cerrando así el circuito a corto plazo. Sin embargo, dicho sistema no es suficiente y es necesaria la intervención de un circuito a largo plazo para lograr un balance adecuado y una correcta regulación de la ingesta, manteniendo de forma más o menos constante el peso durante periodos largos (meses y/o años) (Langhans y Scharrer, 1992; Delgado et al., 2017). Por ello, el circuito de largo plazo se compone del anterior explicado (sistema de saciedad), pero incluye la información proveniente de las reservas energéticas del organismo, de tal manera que es un circuito más complejo, pero a su vez, necesario para llevar a cabo una regulación adecuada. Las reservas energéticas del organismo son fundamentales para el crecimiento, reproducción y otras funciones de elevada importancia para los organismos. Por tanto, la grasa junto con otros tejidos como el páncreas e intestino secretan cantidades variables de diversas hormonas como por ejemplo la leptina, la insulina y el péptido YY (Yan et al., 2017; Alsaif et al., 2022), capaces de llegar al cerebro, el cual las integra y libera los neuropéptidos necesarios para controlar el apetito (Conde-Sieira y Soengas, 2017; Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017; Soengas, 2021).

1.4. ASPROSINA

La asprosina es una hormona englobada dentro de la familia de las adipocinas (células señaladoras de los adipocitos) que se secretan por el tejido adiposo (Beutler y Knight, 2018; Kocaman y Kuloğlu, 2020; Muthu y Reinhardt, 2020; Luís et al., 2020; Yuan et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021; Ovali y Bozgeyik, 2022). Descubierta recientemente por Romere y otros autores en 2016 (Romere et al. 2016), se codifica en la región C-terminal de la fibrilina-1 (FBN-1) (Jacquinet et al., 2014; Romere et al., 2016; Beutler y Knight, 2018; Hoffmann et al., 2020; Kocaman y Kuloğlu, 2020; Luís et al., 2020; Muthu y Reinhardt, 2020; Mazur-Bialy, 2021; Ovali y Bozgeyik,

2022), una glicoproteína de 30KDa y 140 aa (Lönnqvist et al., 1998; Romere et al., 2016; Kocaman y Kuloğlu, 2020; Muthu y Reinhardt, 2020; Yuan et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021; Zhang et al., 2021), que compone las fibras elásticas del tejido conectivo (junto a la elastina) (Quint et al. 2022). Estudios recientes han relacionado las mutaciones producidas a nivel génico en FBN-1 con una afección del tejido conjuntivo denominada síndrome de Marfan (MFS, sus siglas en inglés), que afecta mayormente a la estructura del esqueleto de los organismos (Lönnqvist et al., 1998; Graul-Neumann et al., 2010; Goldblatt et al., 2011; Horn y Robinson, 2011; Takenouchi et al., 2013; Jacquinet et al., 2014; Passarge et al., 2016; Romere et al., 2016; Muthu y Reinhardt, 2020; Quint et al., 2022); se aprecian con más detalle en la figura 4. Sus síntomas asociados son: ectopia lenticular, alta miopía, hipofagia, desnutrición extrema, elongación de articulaciones y extremidades, flacidez e hiperlaxitud (Duerrschmid et al. 2017; Quint et al. 2022).



Figura 4. Ejemplos de pacientes con síndrome de Marfan. A) Extremidades inferiores de un paciente de 20 años. (Goldblatt et al., 2011). B) Manos de un enfermo de 8 meses de edad. (Jacquinet et al., 2014). C) Comparativa de las diferentes vistas del cuerpo de una mujer a los 10 años (derecha) y a los 24 años (izquierda). (Graul-Neumann et al., 2010).

La síntesis de esta hormona-proteína da comienzo desde su precursor FBN-1 (que, a su vez, es procesado por la pre-proteína Profibrilina) (Lönnqvist et al., 1998; Romere et al., 2016; Quint et al., 2022). De este modo, a través de enzimas proteolíticas, se escinden las cadenas peptídicas que conforman la asprosinina, que son liberadas y secretadas desde la grasa corporal; y transportadas por el torrente sanguíneo (Romere et al., 2016; Mazur-Bialy, 2021). Romere y otros (2016), hallaron como los adipocitos (células que conforman la grasa) maduros almacenan altos niveles de asprosinina, aunque no es así para los pre-adipocitos (Romere et al., 2016; Mazur-Bialy, 2021). La asprosinina presenta un intrincado papel en el SNC y en los órganos de señalización periféricos, así como, en el metabolismo (Kocaman y Kuloğlu, 2020; Muthu y Reinhardt, 2020;

Yuan et al., 2020). El mecanismo de actuación se produce en dos tejidos: hígado y cerebro (Romere et al., 2016; Duerrschmid et al., 2017; Muthu y Reinhardt, 2020); concretamente, en el hipotálamo (Mazur-Bialy, 2021). Por un lado, en el hígado se unen a la superficie de los hepatocitos de manera sensible y dependiente donde presentan un potente efecto glucogénico y regulan la homeostasis de glucosa (Graul-Neumann et al., 2010; Duerrschmid et al., 2017; Luís et al., 2020; Ovali y Bozgeyik, 2022), aumentando los niveles de producción de glucosa hepática y, a su vez, la secreción de insulina por parte de las células β -pancreáticas (Romere et al., 2016; Mazur-Bialy, 2021; Ovali y Bozgeyik, 2022), como se observa en la figura 5. Para comprobar esta sinergia, plantean el caso contrario secuestrando la asprosinina (impiden su unión en los receptores celulares hepáticos) dando como resultados escasos valores de glucosa y, por consiguiente, de insulina en plasma sanguíneo (Romere et al., 2016). De igual manera, se encuentran capacitadas para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE o BBB en inglés, *blood brain barrier*) y una vez allí, actuar sobre las neuronas hipotálamicas (Beutler y Knight, 2018; Yuan et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021; Ovali et al., 2022). Es así como, inician la actividad de las neuronas AgRP con efecto orexigénico (Beutler y Knight, 2018; Hoffmann et al., 2020; Yuan et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021). Consecuentemente, provocan un efecto antagonista e inhibitorio en las neuronas POMC (anorexigénicas) (Hoffmann et al., 2020; Yuan et al., 2020), dependiente del neurotransmisor GABA (o ácido gamma aminobutírico), provocando un descenso del consumo por parte del metabolismo y una mayor ingestión de alimentos (Duerrschmid et al., 2017; Yuan et al., 2020). La disfuncionalidad de las neuronas AgRP por métodos de ablación química, repercuten y paralizan la actuación sobre la alimentación de esta hormona (Duerrschmid et al., 2017). En definitiva, la asprosinina aumenta con los periodos de ayuno y viceversa y, además, la glucosa genera una retroalimentación negativa reduciendo los niveles en plasma de esta hormona (Romere et al., 2016; Luís et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021).

Se ha comprobado en humanos una amplia expresión génica de FBN-1 en todos los tejidos, con mayor importancia en el sistema vascular y los adipocitos (Romere et al., 2016). Los niveles de asprosinina crecen con el ayuno en mamíferos y, además, inyecciones intraperitoneales generan un aumento de los valores de glucosa e insulina en plasma sanguíneo (Romere et al., 2016; Luís et al., 2020). Los estudios en ratones y humanos con MFS presentan fenotipos similares y han constatado que la administración de esta hormona restaura el metabolismo (Romere et al., 2016; Luís et al., 2020). En humanos y ratones, los individuos obesos exhiben valores más elevados en comparación con sus respectivos con un peso corporal equilibrado (Duerrschmid et al., 2017; Ugur y Aydin, 2019; Mazur-Bialy, 2021). De igual modo, en ratones con sobrepeso la

administración de anticuerpos anti-asprosina (monoclonales, producidos por una sola célula) secuestra esta hormona y de este modo, reducen la ingesta y, por ende, el grado de obesidad (Duerrschmid et al., 2017; Mazur-Bialy, 2021). En este contexto, la asprosina además de otras funciones, traduce y transfiere la situación energética del individuo desde el tejido adiposo hasta el sistema nervioso central, regulando la homeostasis energética mediante su actuación a través del sistema de melanocortinas (Cerdá-Reverter et al., 2011; Mazur-Bialy, 2021). Exhibe rutinas circadianas que denotan un descenso acusado de sus niveles en plasma previos a los horarios habituales de ingesta, mientras el ayuno durante la noche en humanos y roedores aumenta los niveles de asprosina en movimiento (Romere et al., 2016; Zhang et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021).

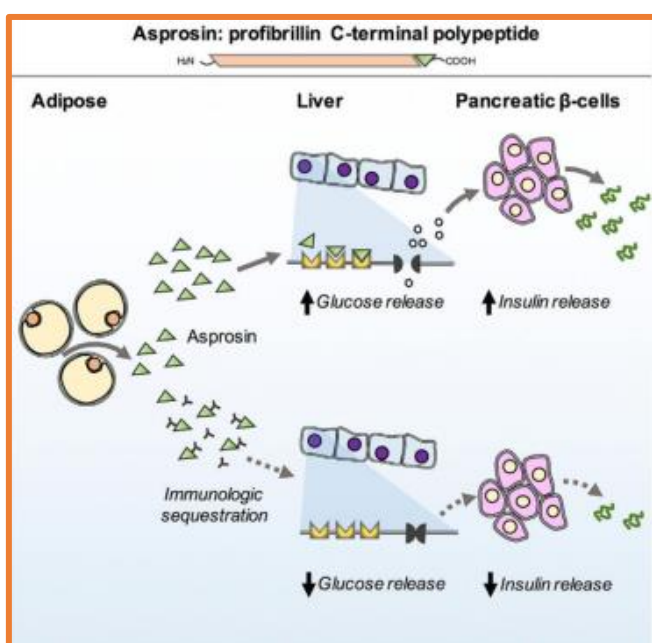


Figura 5. Mecanismo de actuación de la asprosina a nivel hepático. En la parte superior, se observa la cadena polipeptídica que conforma la hormona asprosina. En la parte inferior, se muestra el mecanismo de acción de esta hormona, desde el tejido adiposo hasta las células hepáticas. (Romere et al., 2016).

Anteriormente, ha sido descubierto un receptor de asprosina en ratones nombrado como OLF734 (Li et al., 2019; Liu et al., 2020; Muthu y Reinhardt, 2020; Yuan et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021; Ovali y Bozgeyik, 2022) (su ortólogo en humanos es OR4M1) (Hoffmann et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021; Ovali y Bozgeyik, 2022), que se encarga de estimular la liberación de glucosa hepática mediante la unión de esta hormona a la superficie de las células del hígado. A su vez, para activar este mecanismo, se acoplan positivamente vía Proteína G-AMPC-PKA (He et al., 2016; Kajimura, 2017; Hoffmann et al., 2020; Kocaman y Kuloğlu, 2020; Liu et al., 2020; Luís et al., 2020; Yuan et al., 2020; Mazur-Bialy, 2021; Ovali y Bozgeyik, 2022). También, inyecciones

intraperitoneales de asprosina en ratones wild-type generan incrementos acusados en los niveles de glucosa en sangre, los cuales se restauran 60min después (Li et al., 2019; Ceylan y Saygin, 2020). Este año se ha descubierto en ratones un receptor de asprosina, tal y como se representa en la figura 6, denominado *Ptprd*, con niveles elevados en neuronas AgRP. Este es quién controla y regula los efectos positivos de asprosina en la ingesta (actividad orexigénica) y, por tanto, el equilibrio del balance energético corporal (Mazur-Bialy, 2021; Mishra et al., 2021). En roedores, inyecciones de este receptor muestran un transporte desde el torrente sanguíneo hasta el hipotálamo, donde retiene las moléculas de asprosina gracias a la formación del complejo PTPRD-LBD. Esta situación disminuye el apetito y, por ende, el peso corporal; pudiendo llevar a hipofagia, escasez de tejido adiposo, anorexia y transiciones hacia un menor gasto metabólico (Mishra et al., 2021).

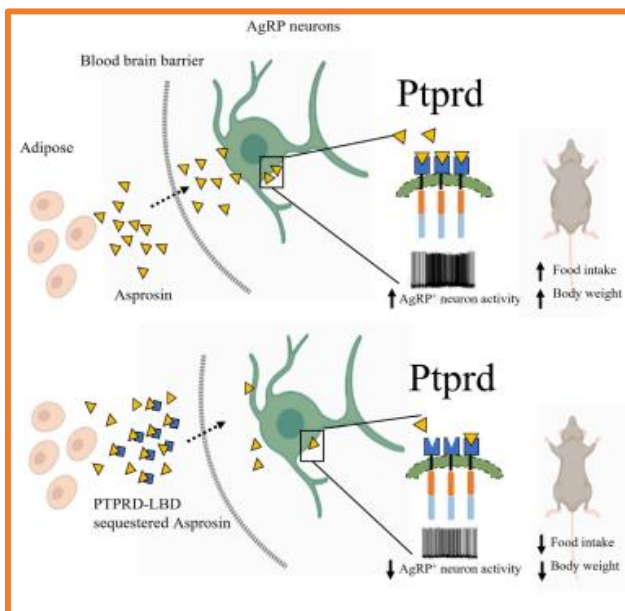


Figura 6. Descripción del proceso de actuación de la asprosina en el hipotálamo. Liberación de asprosina desde el tejido adiposo hasta el cerebro (atravesando la barrera hematoencefálica) y posterior unión al receptor *Ptprd*. (Mishra et al., 2021).

Cabe destacar que la asprosina solamente se ha estudiado en mamíferos hasta la fecha, aunque ensayos iniciales no publicados a nivel computacional, evidencian su sustentación evolutivamente en esta especie (Leal E, Angotzi AN, Godino A y Cerda-Reverter JM, resultados no publicados). Así pues, en este estudio esa premisa es un hecho fehaciente clave por el cuál se han investigado los efectos del ayuno en el balance energético, mostrando hincapié en los mecanismos de actuación del péptido asprosina y su receptor en el cerebro de peces cebra.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

La idea principal es estudiar el efecto del ayuno en el balance energético, así como indagar en la expresión de asprosina y su receptor en diferentes tejidos involucrados en dicho proceso en ejemplares adultos de pez cebra.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los efectos del ayuno en el peso y talla de los peces.
- Estudiar los efectos del ayuno en los niveles plasmáticos de glucosa.
- Analizar los niveles de expresión génica de asprosina tanto en grasa como en hígado en peces alimentados y ayunados en diferentes periodos de tiempo (2,4 y 7 días).
- Evaluar los efectos del ayuno en los niveles de expresión del receptor de asprosina en el cerebro en diferentes periodos de tiempo (2,4 y 7 días).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos fueron llevados a cabo en el animalario del IATS, que ha sido aprobado como centro zoológico para ensayos experimentales de animales *wild-type* y mutantes (Código 36271-42-A), por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España; en concordancia con el Real Decreto Español 951/1997, por la que fue autorizada la Ley 9/2003, de 25 de abril, sobre la utilización de organismos modificados genéticamente; Boletín Oficial del Estado (BOE), 1997. El presente estudio ha sido evaluado y aprobado por el Comité Bioético del CSIC, por el Comité Ético de Experimentación Animal del IATS (número de proyecto PID2019-103969RB-C33) y por la Comisión de Bienestar de los Animales de Experimentación del gobierno autonómico (*Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Comunidad Valenciana*), en acuerdo con la legislación de la Unión Europea, de España y de la Comunidad Valenciana para la defensa del bienestar animal (Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, referente a la protección de animales de experimentación para fines científicos, junto con la Directiva Europea 86/609/CEE; Real Decreto Español 53/2013, de 1 de febrero, relativo a las normas para la protección de los animales de experimentación y con otros fines; Decreto Valenciano 13/2007 del *Consell*, de 26 de enero, en acuerdo a la protección de los animales de experimentación y otros fines científicos).

3.1. ANIMALES EXPERIMENTALES

Peces cebra (n= 72) de la cepa (AB KIJ8F3) de 5 meses de edad provenientes de las dependencias de la Universidad de Uppsala, Suecia, fueron mantenidos en condiciones de fotoperiodo natural (12h luz:12h oscuridad) con una temperatura de 27 a 29°C, un pH entre 7 - 7.5; una dureza de 35 - 45 ppm y un nivel de nutrientes: nitritos (NO_2^-) \leq 2 mg/L y nitratos (NO_3^-) \leq 50 mg/L; y amonio (NH_4^+) \leq 1mg/L, concordando con métodos estandarizados en esta especie (National Research Council (U.S.), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals et al., 2011); según Varga et al. (2018) y los intervalos de (Avdesh et al., 2012; Tsang et al., 2017), aunque advirtieron sobre la diversidad de métodos específicos acordes a cada necesidad de laboratorio concreta. Previo a su manipulación los animales fueron anestesiados mediante exposición al frío y cuando fue preciso fueron sacrificados por medio de una decapitación rápida.

Los requisitos alimentarios y el tamaño del pellet fueron determinados acordes a los diferentes estadios de madurez, como se aprecia en la tabla 1. En este caso, fueron dados dos turnos de

comida, alternando piensos comerciales (ZEBRAFEED, Sparos Lda, Olhão, Portugal), a las 9:00am (con el que se suplementaron las carencias nutricionales del alimento vivo, sobre todo de ácido docosahexaenoico (DHA) y vitamina C (Lawrence, 2011)) y alimento vivo; en este caso, *Artemia franciscana* (INVE TECHNOLOGIES, Dendermonde, Bélgica), a las 13:00am.

Tabla 1. Composición nutricional de los piensos utilizados y sus tamaños de pellet para cada estadio de crecimiento.

Estadio de madurez	Tamaño pellet (µm)	Composición nutricional (de mayor a menor cantidad)
Larvas	< 100 µm	Harina de pescado, gluten de trigo, proteína de pescado hidrolizada, harina de crustáceos, proteína de guisante, gelatina, aceite de algas (<i>Schizochytrium sp.</i>) y aceite de pescado. 1. Valores en % sobre el total: <ul style="list-style-type: none"> - Proteína cruda (68%) - Grasa cruda (13%) - Ceniza bruta (13%) - Fibra cruda (1,8%) 2. Vitaminas (g) y elementos traza (mg/kg): <ul style="list-style-type: none"> - Vit D₃: 7,5e-5 - Vit. E: 1,2 - Vit. C: 1,9 - Betaína: 10,8 - Fe: 9 - I: 0,8 - Zn: 11,3 - Cu: 13,5 - Mn: 14,4
Alevines	100 – 200 µm	
Juveniles	200 – 400 µm	
Adultos	400 – 600 µm	

*Vit, vitamina; Fe, hierro; I, yodo; Zn, zinc; Cu, cobre; Mn, manganeso.

Para la alimentación con *A. franciscana*, es necesario el seguimiento de unos pasos previos a su introducción en los acuarios. En este sentido, por un lado, fue llevado a cabo un proceso de decapsulación de los quistes (formas de resistencia de esta especie), cuyo objetivo es destruir el corion (envuelta superficial). Para ello, fue necesario hidratar aproximadamente 1h, lavar y escurrir los quistes). A continuación, para llevar a cabo la reacción (exotérmica) necesaria para este proceso, fueron añadidos los reactivos de acuerdo con la cantidad inicial de quistes a

decapsular, en este caso, para 200 g: fueron adicionados 600ml de lejía (Hipoclorito sódico 150, VISASOL S.L, Valencia, España), 2L de agua de mar y 30g de sosa cáustica (DIRANZO, Valencia, España). Una vez mezclados, se mantuvieron con aireación un total de 5min para completar la reacción química. Posteriormente, fue filtrada la mezcla para recoger los quistes decapsulados y realizada una limpieza con agua de mar, para desprender los posibles restos de reactivos. En última instancia, las formas de resistencia se mantuvieron en salmuera al 300% (300g en 1L de agua de mar) para conseguir su deshidratación y estado de latencia. Por otro lado, los quistes se almacenaron a 10°C en salmuera, para su conservación (máximo 1 mes) y posterior utilización cuando fueran requeridos. Seguidamente, los tanques de incubación se mantuvieron desinfectados por medio de un enjuagado con agua y jabón y un lavado (posterior a cada recolección), con el objetivo de mantener unas condiciones higiénicas del material utilizado. Además, los tanques incubadores fueron rellenados con agua de mar ($T^a = 27^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8$ y dureza = 25 – 30ppm) y mantenidos con fuerte oxigenación y luminosidad, donde posteriormente fueron depositados de 2 - 3g de quistes por litro de agua e incubados hasta alcanzar el momento de eclosión (24 - 36h). Una vez transcurrido este tiempo, los nauplios decapsulados fueron filtrados mediante una malla de 50 μm y se mantuvieron en reposo 5min para conseguir mediante decantación separar las envolturas de los quistes (permanecen en la superficie como consecuencia de su reducida densidad) de los nauplios (presa viva que sedimenta). Finalmente, fueron recolectados. Pero todavía no pueden ser suministrados a los peces en estas condiciones, por lo que es necesario un lavado de los nauplios con agua de ósmosis, con el objetivo de eliminar la sal proveniente de su cultivo y que no fueran modificados los parámetros químicos del agua de los acuarios donde residen los animales (debido a que esta especie se desarrolla en agua dulce). Los ejemplares de artemia fueron recolectados y adicionados a cada acuario por medio de pipetas Pasteur (5ml) (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania).

3.2. INSTALACIONES

Los animales fueron mantenidos en un sistema cerrado de recirculación de agua que sigue el modelo de la figura 7. Consistió en un depósito de agua conectado a los tanques y albergaba el agua necesaria que fue recirculada por la totalidad de tanques individuales impulsados a lo largo del circuito por mediación de una bomba de 55W (EHEIM compactON 3000, Deizisau, Alemania). En su interior, contenía unas sondas paramétricas (Nahita, Auxilab, Navarra, España) que mostraban los parámetros *in situ* de conductividad (ppm), temperatura (°C) y pH, que fueron controlados y registrados diariamente en un calendario de actividad. Además, fue colocado un

calentador (EHEIM thermocontrol, Deizisau, Alemania) que permitía incrementar la temperatura del agua en caso de ser necesario para ajustarla a los intervalos deseados. Con respecto a los filtros utilizados, con los que fueron adecuadas las condiciones del agua antes de su llegada al depósito, estaban compuestos por dos tipos: físico y biológico. Un primer filtrado «físico» con perlón (SERA, Heinsberg, Alemania), con el que fue separado el material más voluminoso y un segundo filtrado «biológico», con «bio-bolas» (Burriana, España) que albergaban bacterias, con el objetivo de regular el nivel de nutrientes y materia orgánica presentes en los rangos pretendidos. En última instancia, el agua precalentada fue conducida a un tubo donde se encontraba una lámpara ultravioleta para su desinfección y finalmente, fue repartida por la totalidad de tanques experimentales antes de retornar al depósito.

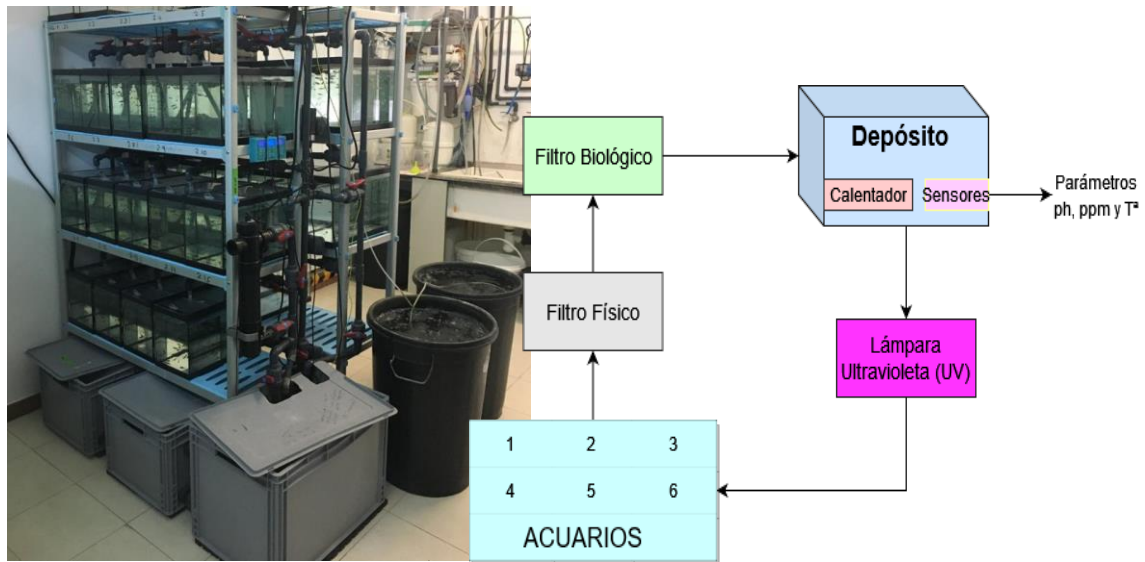


Figura 7. Circuito de recirculación de agua en los tanques de experimentación. En la imagen izquierda, se observa el sistema de recirculación de agua utilizado en el experimento con *D. rerio*. En la parte derecha, el diagrama con los diferentes elementos que componen este circuito; depósito, filtro físico, filtro biológico, lámpara UV y acuarios individuales. Por Eduardo Castillo.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se planteó un experimento *in vivo* que fue desarrollado durante dos meses y 14 días, del 4 de marzo al 18 de mayo, con el objetivo de estudiar el efecto del ayuno en el balance energético en pez cebra. Los ejemplares fueron capturados del tanque principal con 5 meses de desarrollo inicial. Para ello, fue realizado un muestreo previo para seleccionar el peso y la talla de los animales y así evitar diferencias significativas previas entre los grupos experimentales. Los peces seleccionados fueron dispuestos en 6 tanques rectangulares de vidrio de 0,02 m³ (0,41 x 0,21 x 0,26 m). Cada grupo de animales estuvo compuesto por 12 ejemplares, fueron escogidos 3

tiempos de muestreo (2, 4 y 7 días) y en cada muestreo fueron seleccionados dos grupos, uno formado por peces controles (alimentados al 2%) mientras que el otro grupo permaneció en ayuno continuado. Previamente fue realizado un estudio biométrico de la totalidad de animales para evitar diferencias significativas entre grupos. En cada muestreo fue efectuado de nuevo el estudio biométrico y la posterior extracción de los tejidos deseados en este estudio (sangre, grasa, hígado y cerebro) de peces alimentados y ayunados.

3.4. EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Los tejidos (grasa, hígado y cerebro) fueron sustraídos manualmente y homogeneizados junto con Trizol (250µl) (TRIZOL Reagent, Life Technologies, Carlsbad, USA) (actúa como desnaturalizante proteico), mediante una jeringuilla (Henke-Ject, Henke Sans Wolf, Tuttlingen, Alemania) y agujas (BD Microlance™ 3, Becton Dickinson S.A, Huesca, España). Las muestras fueron almacenadas a -80°C y mantenidas a baja temperatura durante su procesado.

3.5. OBTENCIÓN DE PLASMA

En cada muestreo fue extraída sangre de animales alimentados y ayunados para la obtención de plasma sanguíneo y con la que fueron analizados los niveles de glucosa plasmáticos. Para ello, los animales fueron anestesiados y sacrificados mediante exposición en hielo, seguidamente, fue efectuado un corte adyacente a la aleta caudal mediante un bisturí y cada pez fue introducido en un eppendorf de 1,5ml agujereado para permitir el paso de la sangre a otro eppendorf de 5ml que contenía 5µl de ácido etilendiaminotetraacético o EDTA (EDTA disodium salt dihydrate, Panreac, ITW Company, Darmstadt, Alemania) (anticoagulante). Mediante centrifugación (3000 rpm, 4°C durante 3min) fue procedida la recogida de sangre del pez. Dicho procedimiento fue repetido dos veces para la obtención de mayor volumen de sangre. Finalmente, la sangre obtenida fue centrifugada nuevamente en las mismas condiciones, pero ampliando el tiempo a 30min para la correcta separación del plasma sanguíneo. El plasma obtenido fue recolectado en un eppendorf nuevo y almacenado a -20°C hasta posteriores análisis.

3.6. EXTRACCIÓN DE ARN

Previo a la extracción del ARN, las muestras de tejidos de cada individuo fueron descongeladas en hielo y permanecieron así durante toda la extracción exceptuando pasos críticos que se

realizaron a temperatura ambiente siguiendo las condiciones óptimas para dicho proceso. Inicialmente, fueron incorporados 50µl de cloroformo (triclorometano, Panreac Química, Barcelona, España) que fue homogeneizado (vórtex) y mantenido en reposo 5 min a temperatura ambiente para conseguir la separación de la muestra en dos fases; una superior (con ácidos nucleicos) y otra inferior (compuesta por lípidos y proteínas), separadas ambas dos por una interfase proteica. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas (12000 g y 4°C, durante 15min), para la correcta separación de las fases, permitiendo así recuperar la fase superior y trasvasarla a otro eppendorf (1,5ml) al cual fueron añadidos 125µl de isopropanol (2-propanol, Panreac Química, Barcelona, España) (deshidrata y precipita el ARN) y Glicoblu (en la proporción descrita por el fabricante) (GlicoBlue™ Blue Coprecipitant, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania) (tiñe las cadenas de ARN). Las muestras fueron almacenadas toda la noche a -80°C para mejorar el proceso de precipitación. Al día siguiente, fueron descongeladas en hielo y dispuestas en la centrifuga (12000 g y 4°C durante 10min) para posteriormente eliminar el sobrenadante. Fueron añadidos 500µl de etanol 75% (Panreac Applichem, ITW Reagents, Darmstadt, Alemania) (lavado de la muestra y disminución de la solubilidad ARN). Así pues, fueron centrifugadas a 7500 g y 4°C durante 7,5min. El sobrenadante fue eliminado y para conseguir la completa evaporación del alcohol restante de los tubos y evitar contaminaciones de la muestra, fueron dispuestas 30' en un incubador (Orbital Shaker-Incubator ES-20, BioSan, Riga, Letonia) a 37°C. Transcurrido el periodo de evaporación el ARN se resuspendió en agua bidestilada autoclavada (25µl para hígado y cerebro y 12µl para grasa) y con ayuda de un termobloque (57°C durante 7min) (VWR digital Heatblock II, USA) fue disuelto para su posterior medición en el espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania). En última instancia, las muestras fueron almacenadas a -80°C.

Fue llevado a cabo un tratamiento con DNAsa para mejorar la pureza del ARN y así eliminar los posibles restos de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico que pudiesen haber permanecido durante la extracción. Así pues, fue añadido 1µl de DNAsa en cada muestra y se incubó a temperatura ambiente 45min (tiempo de actuación de la enzima). Posteriormente, las muestras fueron precipitadas con el objetivo de eliminar la acción de la enzima mediante su dilución en etanol 80% (2.5% vol.) y acetato de sodio (3M) (1/10 vol.). Posteriormente se incubaron a -80°C durante toda la noche para favorecer la precipitación. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron descongeladas y centrifugadas (12000 rpm y 4°C, durante 30min). El sobrenadante fue eliminado y el pellet lavado de nuevo con etanol 80% (5µl), el cual fue centrifugado a 12000 rpm, 4°C y 10min. Por último, el ARN fue resuspendido y disuelto en agua bidestilada autoclavada (25µl para cerebro e hígado y 12µl para grasa) y finalmente, fue medida de nuevo

su concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en el espectrofotómetro mencionado con anterioridad. En última instancia, el ARN obtenido de cada muestra fue almacenado a -80°C para evitar su degradación.

3.7. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Para la formación y ensamblaje de la cadena complementaria de ADN que fue fabricada a partir de ARN, fueron dispuestos en eppendorf (1,5ml) $1\mu\text{g}$ de ARN por muestra (más el volumen necesario de agua bidestilada autoclavada hasta llegar a un volumen final de $11\mu\text{l}$), adicionados $10\mu\text{M}$ Oligo dT ($1\mu\text{l}$) (cadena poli T con 20T que se une al extremo 3', es decir, a la cadena poli A del ARNm) y 10mM dNTPs ($1\mu\text{l}$) (contiene las bases nitrogenadas para formar ADN; adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G)). Todo ello fue incubado a 65°C durante 5min (VWR digital Heatblock II, USA) y posteriormente fue dejado enfriar en hielo 2min). Seguidamente, fueron colocados $7\mu\text{l}$ por muestra de una mezcla con los siguientes reactivos: tampón ($4\mu\text{l}$) (first strand buffer 5X, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA), $1\mu\text{l}$ de DTT o reactivo de Cleland ($0,1\text{M}$) (Ditiotreitol, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Canada) con la que fue estabilizada la enzima utilizada, $1\mu\text{l}$ de inhibidores ribonucleicos (RNAsin, Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) (ayuda a la protección frente a las RNAsas) y por último, fue añadido $1\mu\text{l}$ de la enzima transcriptasa reversa (Superscript III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA), que fue la encargada de sintetizar el ADNc.

La reacción en cadena de la polimerasa (o sus siglas en inglés PCR, *polymerase chain reaction*) por la enzima proporcionada para la formación de la cadena complementaria de ADN, fue llevada a cabo en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) durante 2h y 15min. El programa utilizado prosigue los siguientes pasos: 1h a 50°C , 1h a 37°C y 15min a 70°C . El ADNc sintetizado fue preservado a -20°C para posteriores análisis.

3.8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (PCRq)

Mediante protocolos autorizados en dicha técnica (Simon, 2003), fueron analizados los niveles de expresión de tres genes: el gen de la proteína β -actina, como gen de referencia ya que fue encontrado en análisis previos en todos los tejidos a concentraciones similares y fue utilizado en estudios preliminares (Cleveland et al., 2009; Zhang et al., 2021); el gen de la hormona-proteína asprosinina y el gen del receptor de asprosinina, *Ptprd* (tirosina fosfatasa). Los cebadores empleados (primers) fueron diseñados específicamente para estos genes por el grupo control de ingesta del IATS, como se observa en la tabla 2. Previamente a la utilización de dichos cebadores se

comprobó la eficiencia de éstos, de tal modo que fue utilizado un ADNc proveniente de una mezcla de todas las muestras del experimento. Tras la realización de diluciones seriadas fue obtenida una eficiencia adecuada que permitió su uso en todas las muestras procesadas previamente. Seguidamente, para comprobar la especificidad de los primers del receptor de asprosina, fueron corridas en un gel de electroforesis muestras de diversos tejidos que ya fueron amplificadas mediante PCRq utilizando los cebadores diseñados por el grupo (Detallado en el punto 3.9).

En las placas para la PCR en tiempo real (Fast PCR Plate full skirt, SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania) fueron añadidos: cebadores específicos de cada gen (2,5 µM), SYBR (12,5µl) (Absolute qPCR SYBR Green Fluorescein Mix, Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania) (fue utilizado como colorante para la detección del ADN bicatenario que fue formado en el transcurso de la PCR cuantitativa), el ADNc sintetizado previamente y agua bidestilada (autoclavada). En cada placa fueron dispuestas todas las muestras de un mismo tejido realizando duplicados y los genes de interés fueron amplificados y cuantificados a través de un termociclador en tiempo real (CFX Connect Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Singapur); al mismo tiempo, fue utilizado un software con el que fueron leídos los datos de la PCRq (Bio-Rad CFX Maestro). El proceso de amplificación fue realizado en un total de 2h donde los programas utilizados son similares a excepción de la temperatura de amplificación que era dependiente de los cebadores utilizados, de tal modo que mientras que para la actina y asprosina fue necesaria una temperatura de 60°C, para el receptor de asprosina fue incrementada a 62°C, con la finalidad de obtener mayor especificidad. Como se describe en la figura 8, el programa que fue empleado aplicó los siguientes pasos: 95°C durante 15min, 60°C a lo largo de 30min, 72°C durante 30min, 95°C a lo largo de 30min y por último, 60°C durante 10min.

En última instancia, de la PCRq fueron obtenidas dos tipos de curvas modelo: una curva de amplificación (fue detectada la cantidad de fluorescencia, o sus siglas en inglés RFU, *Relative fluorescence unit*) y una curva de Melting (o de disociación) (con la que fue expresada la temperatura óptima de hibridación de los nucleótidos que componen los primers para los genes en estudio).

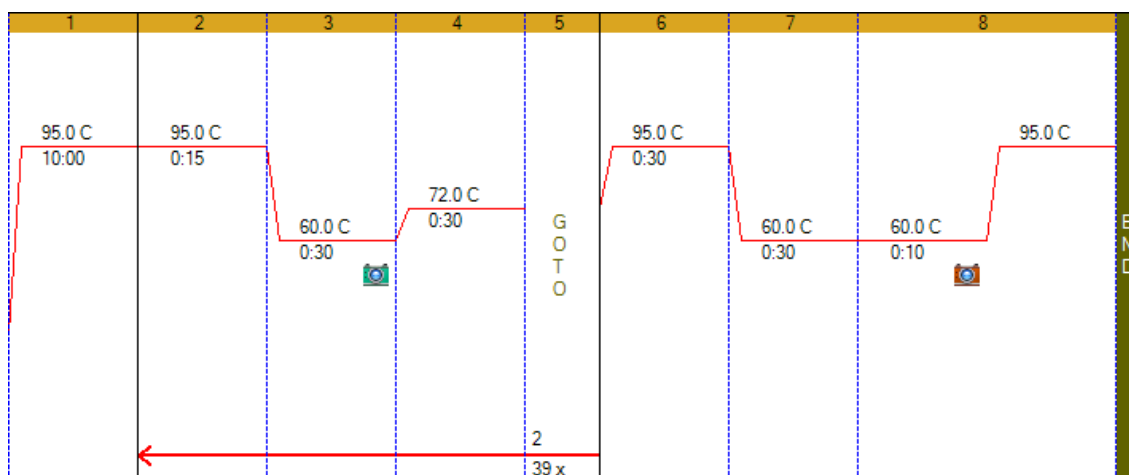


Figura 8. Parámetros de temperatura (°C) y tiempo (min) seguidos para la RT-PCR. Mediante el termociclador fueron amplificados y cuantificados los genes de interés (β -actina, asprosinina y *Ptprd*). Por Eduardo Castillo.

Tabla 2. Nucleótidos que componen los primers utilizados. Orden de los nucleótidos que forman las cadenas de los primers (anterior o forward, FW) y (posterior o reverse, RV) utilizados para la amplificación de los genes de interés.

Genes	Forward primer (FW)	Reverse primer (RV)
β -actina	5'-GATGAGGAATCGCTGCCCT-3'	5'-GTCCTTCTGTCCCATGCCAA-3'
Asprosinina	5'-GATGAGGAATCGCTGCCCT-3'	5'-GTCCTTCTGTCCCATGCCAA-3'
Receptor de asprosinina	5'-ATGATGCCAACCGGTCACCTGCCCAT-3'	5'-GTCACCTGTGGCTTGGCAAACGAAGGAT-3'

3.9. COMPROBACIÓN DE LOS CEBADORES DISEÑADOS PARA EL RECEPTOR *PTPRD*

Fue realizado un gel de electroforesis con las muestras cuantificadas previamente por PCRq para comprobar la especificidad de los primers. Para la formación del gel fue utilizada agarosa sólida al 1% (0,5g) (NuSieve GTG Agarose, Cambiex Bio Science Rockland, Rockland, USA) junto con tampón TAE 1X (50ml) (reactivos: TRIS, Acetato y EDTA, en las proporciones adecuadas) (ambos compuestos fueron calentados para mejorar la disolución de la agarosa). Después, una vez enfriado, fueron añadidos 3 μ l de GelRed (GelRed™ Nucleic Acid, BIOTIUM, Fremont, CA, Estados Unidos) (tiñe los ácidos nucleicos). La mezcla de estos compuestos fue solidificando (durante 30min) a temperatura ambiente. El molde fue colocado en el sistema de electroforesis donde fueron adicionados 10 μ l de muestra a cada pocillo (compuesta por: agua (4 μ l), muestra (5 μ l) y loading buffer (LB) (1 μ l, aumenta su densidad) (Gel Loading Buffer, Invitrogen, Thermo Fisher

Scientific, Vilnius, Lituania) (enrasando hasta la línea de referencia con tampón TAE). Además, en otro pocillo fue adicionado un marcador de referencia (1Kb) (Plus DNA Ladder, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA). Finalmente, el sistema (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) fue conectado a la corriente y se dejó corriendo el gel alrededor de 1h a 80 mV.

3.10. CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE

Los niveles de glucosa en plasma fueron analizados mediante un kit comercial (Spinreact, Girona, España) compuesto por una serie de reactivos (GLUCOSE-LQ: tampón TRIS, fenol, glucosa oxidasa (GOD), Peroxidasa (POD) y 4-aminofenazona) y un patrón primario acuoso de glucosa (100 mg/dL) (GLUCOSE CAL). Fue realizada una curva patrón por duplicado mediante diluciones seriadas de plasma (1, 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) con la que fue obtenida la recta de regresión y, por ende, la fórmula utilizada posteriormente para calcular la concentración de glucosa de cada muestra. Fueron incluidos blancos por triplicado compuestos solo por el reactivo. Para la preparación de las muestras fueron añadidos 105µl de reactivo más 5µl de cada muestra. En última instancia, la placa fue incubada 10min a 37°C (VWR digital Heatblock II, USA). Los valores de absorbancia de las muestras de glucosa en plasma sanguíneo fueron medidos a una longitud de onda de 505nm mediante un lector de placas (Infinite M-Plex, TECAN, Männedorf, Suiza).

3.11. ESTADÍSTICA

Los resultados obtenidos en este experimento fueron analizados de dos formas; mediante un ANOVA de una vía para evaluar las diferencias significativas entre las medias de todos los grupos y a través de la prueba t de Student se analizaron las diferencias significativas entre los peces alimentados y ayunados en los distintos tiempos de muestreo en los parámetros biométricos, los niveles de glucosa y los niveles de expresión de los diferentes genes analizados. Los análisis estadísticos y la representación gráfica fueron llevadas a cabo haciendo uso del software GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos). Las diferencias fueron consideradas significativas en $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. PARÁMETROS BIOMÉTRICOS

La semana anterior al experimento, los peces se clasificaron de manera equitativa en seis grupos. Como se aprecia en la figura 9, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las medias del conjunto experimental en los parámetros biométricos que se midieron.

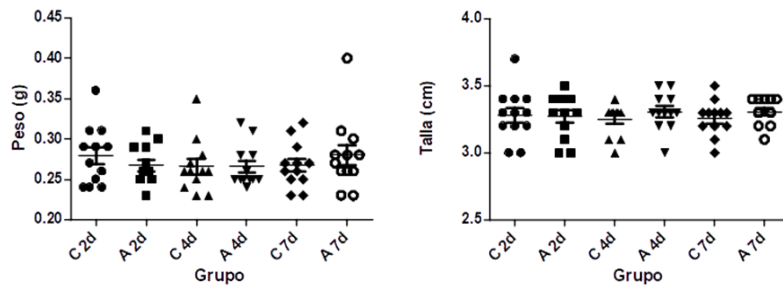


Figura 9. Parámetros biométricos medidos la semana previa al comienzo del experimento. A la izquierda, se observan los pesos de todos los animales separados en los grupos muestrales. A la derecha, se presentan las tallas intergrupales. Los datos se representan con su media \pm error estándar de la media (SEM). Peso: p-valor= 0,7755; Talla: p-valor= 0,8796.

Tras la acomodación se pesaron todos los animales de cada grupo para obtener un peso de partida equitativo entre todos los grupos, en la talla no se registraron debido a que en una semana que es la duración total del experimento, los animales no presentan diferencias significativas, por lo que, de este modo, evitan el estrés causado innecesariamente. Como se puede observar en la figura 10, de manera preliminar no se encontraron diferencias significativas entre grupos en el peso de los individuos ($P > 0,05$), por lo cual podemos concluir que todos partieron de un peso similar en el inicio del experimento. La media de peso es de $0,27 \pm 0,03$ (gramos) y la talla de $3,28 \pm 0,14$ (centímetros).

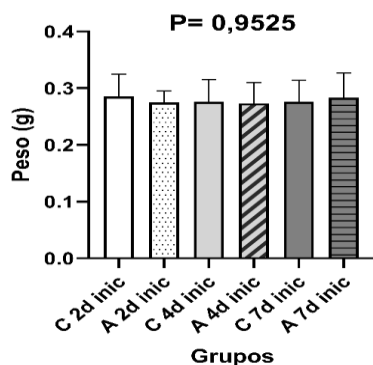


Figura 10. Muestreo del peso (g) de todos los grupos (n=12) al inicio del experimento. Se observan las diferencias de peso entre las medias de los grupos muestrales. Los datos se expresan con la media \pm SEM. El peso presenta un p-valor= 0,9525. La media de peso se encuentra en $(0,28 \pm 0,04$ g).

En el primer día de muestreo (48h), como se muestra en la figura 11, no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ambos grupos (controles y ayunados), tanto para el peso como para la talla en la totalidad de individuos muestreados. La media del peso es de $(0,27 \pm 0,034 \text{ g})$ y de la talla es $(3,29 \pm 0,16 \text{ cm})$.

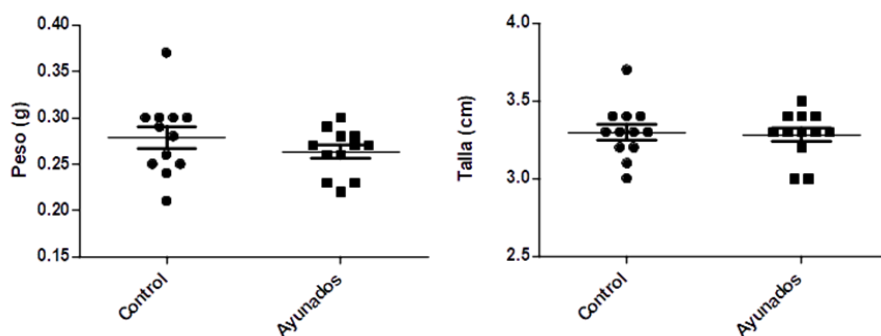


Figura 11. Parámetros biométricos (peso y talla) al día 2 de ayuno. Valores individuales de los parámetros biométricos de los grupos experimentales (control (n= 12) y ayunados (n= 12)) al día 2 del comienzo del experimento. Se representa conjuntamente la media \pm SEM. P-valor (peso)= 0,2656; P-valor (talla)= 0,8065.

Nuevamente, como se aprecia en la figura 12, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) intergrupales en ambos parámetros biométricos al segundo día de muestreo (controles y ayunados 96 horas). El peso medio es $(0,27 \pm 0,04 \text{ g})$ y la talla es $(3,37 \pm 0,15 \text{ cm})$.

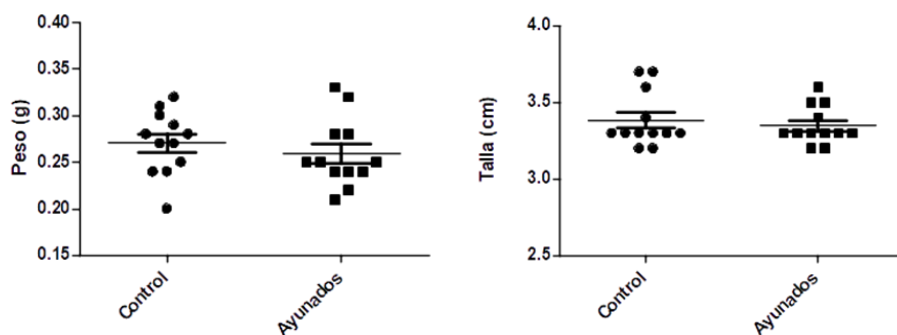


Figura 12. Parámetros biométricos (peso y talla) al día 4 de ayuno. Niveles por individuo al cuarto día del comienzo del experimento en los grupos en estudio (control (n=12) y ayunado 96h (n= 12)). Se representan los datos con su media \pm SEM. P-valor peso:= 0,4283; P-valor talla:= 0,6030.

Los muestreos de los parámetros biométricos (peso y talla) en los grupos experimentales finalizaron al séptimo día de ayuno, donde como se observa en la figura 13, no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0,05$) para la talla (cm) de los individuos mientras que para el peso (g) se apreciaron diferencias significativas ($P = 0.0325$) entre ambos grupos (controles y

ayunados), es decir, el peso de los individuos controles es superior (de manera significativa) en comparación con el grupo de ayunados al finalizar el experimento. La media de peso es ($0,28 \pm 0,04$ g) mientras que para la talla es ($3,33 \pm 0,12$ cm).

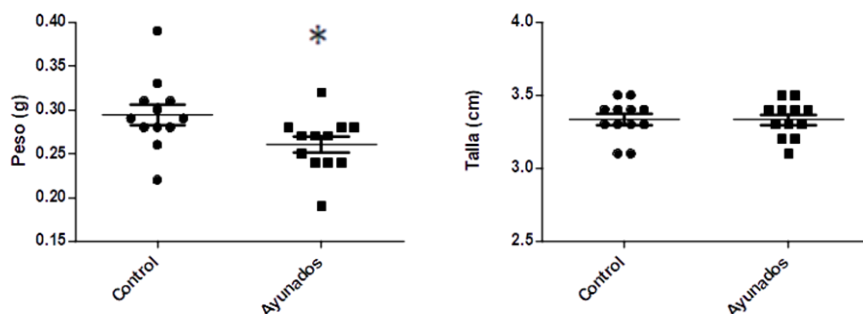


Figura 13. Parámetros biométricos (peso y talla) al día 7 de ayuno. Valores de peso y talla al finalizar el experimento de ayuno (día 7) en el grupo control ($n=12$) y ayunado ($n=12$). Los datos se mostraron con su valores medios \pm SEM. P-valor (peso)= 0,0325; P-valor (talla)= 1,0000. El * indica las diferencias significativas ($P < 0,05$).

4.2. NIVELES DE GLUCOSA PLASMÁTICA

Después de cada muestreo (2, 4 y 7 días) se evaluaron los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo. Como se puede apreciar en la figura 14, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) intergrupales al segundo, cuarto y séptimo día de ayuno, con valores más elevados en los grupos controles (12 a 14 mg/dl) con respecto a los ayunados (entre 8 y 9,5 mg/dl). Sin embargo, los niveles de glucosa permanecieron estables entre los peces alimentados y los ayunados, no observándose diferencias significativas tras incrementar los días de ayuno.

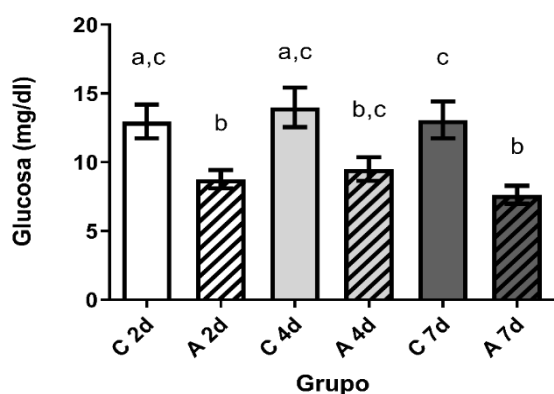


Figura 14. Comparativa de los niveles de glucosa plasmática entre los grupos controles y ayunados de cada día de muestreo. Se representa la media \pm SEM. Los valores promedios de glucosa encontrados en los controles: C 2d ($12,10 \pm 4,89$); C 4d ($13,99 \pm 4,74$); C 7d ($12,63 \pm 4,54$) y en los ayunados: A 2d ($9,09 \pm 2,39$); A 4d ($10,33 \pm 3,94$); A 7d ($7,90 \pm 2,25$) (en mg/dl). El tamaño muestral de cada grupo es de 12 peces. Las diferencias significativas se consideraron en $P < 0,05$.

Tras los resultados obtenidos mediante la prueba estadística aplicada anteriormente, decidimos necesario conocer si el ayuno afectaba a los niveles de glucosa plasmática en cada día de muestreo. Por ello, como se puede observar en la figura 15, aplicamos la prueba t de Student para comparar el efecto del ayuno entre las medias de ambos tratamientos obteniendo diferencias significativas ($P < 0,05$) a los 2 ($p= 0,0069$), 4 ($p= 0,0138$) y 7 días ($p= 0,0016$) de ayuno.

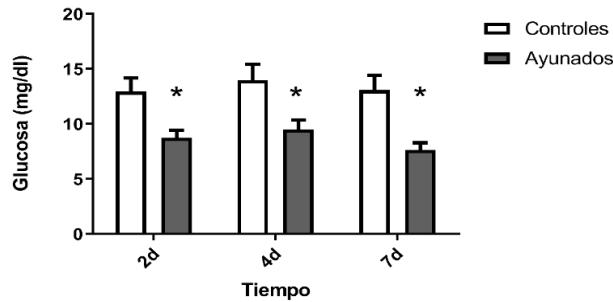


Figura 15. Valores obtenidos de los niveles de glucosa en sangre para todos los grupos de experimentación en los diferentes tiempos de ayuno. Se representan los valores de glucosa plasmática (eje y) frente a los distintos días ayunados. Los datos se muestran con la media \pm SEM. Las diferencias se consideraron significativas con $P < 0,05$. El * indica diferencias significativas entre los grupos de experimentación.

4.3. NIVELES DE EXPRESIÓN DE ASPROSINA Y EL RECEPTOR *PTPRD*

La figura 16 y figura 17 representan un ejemplo de la curva de amplificación y de disociación respectivamente de las muestras analizadas mediante PCR a tiempo real (RT-PCR). En ellas se puede observar una correcta amplificación de los genes estudiados, así como, la aparición de dos picos que muestran las diferentes temperaturas de disociación de dos genes diferentes (asprosinina y su receptor en el cerebro).

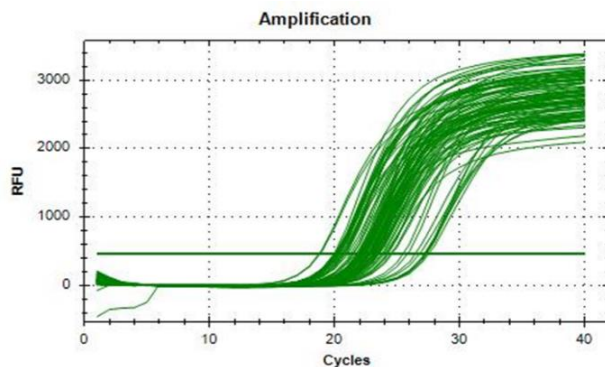


Figura 16. Curva de amplificación del gen de la asprosinina. Se muestran el número de ciclos (eje x) frente a la fluorescencia (eje y) (en RFU o *Relative fluorescence unit*, en inglés).

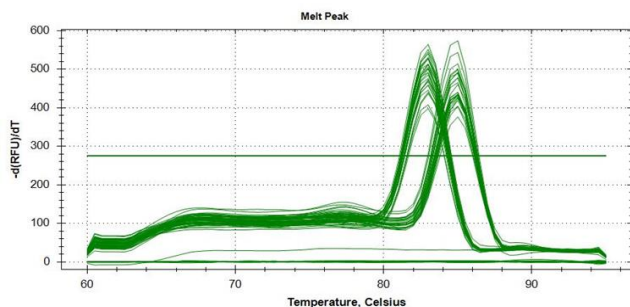


Figura 17. Curva de disociación o de Melting. Se representan la temperatura (°C) (eje x) junto a las unidades de fluorescencia (RFU) (eje y) para el gen de asprosinina y el de su receptor, Ptprd. Los picos que se observaron son indicativos de la presencia de dos genes distintos en la placa (izquierdo, asprosinina y derecho, receptor Ptprd).

En primer lugar, como se muestra en la figura 18, se compararon los niveles de ARNm para la asprosinina en la grasa de los grupos muestrales mediante una prueba ANOVA de una vía ($P=0,0002$). Tras los primeros dos y cuatro días, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos de experimentación. Sin embargo, tras 7 días de ayuno, los resultados muestrales señalaron diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a los controles y al grupo ayunado 2 días. La media de los grupos controles es de ($0,86 \pm 0,080$) y la de los ayunados de ($0,89 \pm 0,079$) (g).

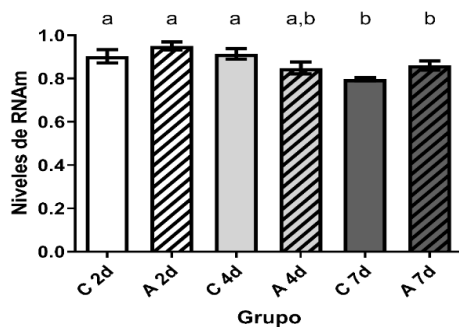


Figura 18. Respectivos valores de los niveles de ARNm para la asprosinina en la grasa mediante PCRq. Se representan los niveles de expresión de ARNm de asprosinina en la grasa que se obtuvieron por medio de RT-PCR mediante una prueba ANOVA de una vía. Los datos son la media \pm SEM. C 2d (control a dos días) ($0,90 \pm 0,09$); A 2d (ayunados dos días) ($1,0 \pm 0,06$); C 4d (control a cuatro días) ($0,90 \pm 0,06$); A 4d (ayunados cuatro días) ($0,80 \pm 0,08$); C 7d (control a siete días) ($0,80 \pm 0,02$); A 7d (ayunados siete días) ($0,86 \pm 0,06$). Las diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

Además, como se aprecia en la figura 19, tras analizar los resultados de los niveles de expresión de asprosinina en la grasa a través de una prueba t de Student, no se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos experimentales en los dos primeros días de muestreo

(grupos control y ayunados 2 días, $p= 0,1937$; grupos control y ayunados 4 días, $p= 0,1168$). Solamente al séptimo día se obtuvo que los peces ayunados elevaron los niveles de expresión de asprosinina significativamente con respecto a los peces alimentados ($p= 0,0129$).

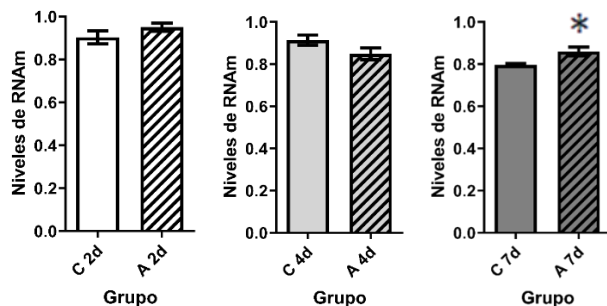


Figura 19. Niveles de expresión de ARNm de asprosinina en la grasa por RT-PCR. Comparativa intergrupala ($n= 8$) (de cada día de muestreo) para los niveles de amplificación que se obtuvieron mediante PCRq para la hormona asprosinina en el tejido adiposo mediante pruebas t de Student. Los datos se mostraron con su media \pm SEM. C 2d (control a dos días) ($0,90 \pm 0,09$); A 2d (ayunados dos días) ($1,0 \pm 0,06$); C 4d (control a cuatro días) ($0,90 \pm 0,06$); A 4d (ayunados cuatro días) ($0,80 \pm 0,08$); C 7d (control a siete días) ($0,80 \pm 0,02$); A 7d (ayunados siete días) ($0,86 \pm 0,06$). Las diferencias se consideraron significativas con $P < 0,05$. El * indica diferencias significativas entre los grupos de experimentación.

De igual manera en segunda instancia, tal y como se muestra en la figura 20, se compararon entre sí los niveles de amplificación del ARNm de los grupos experimentales (controles y ayunados) en el hígado para la asprosinina por medio de un ANOVA de una vía ($p= <0,0001$). Los niveles de asprosinina en el hígado se mantuvieron bastante estables no existiendo diferencias significativas entre los peces alimentados y ayunados. Sin embargo, en los últimos días de muestreo (4 y 7) los valores obtenidos en todos los tratamientos excepto en el C7d fueron menores significativamente que los hallados a día 2. La media de los grupos controles es de ($0,85 \pm 0,058$) mientras que en los grupos ayunados es de ($0,84 \pm 0,041g$).

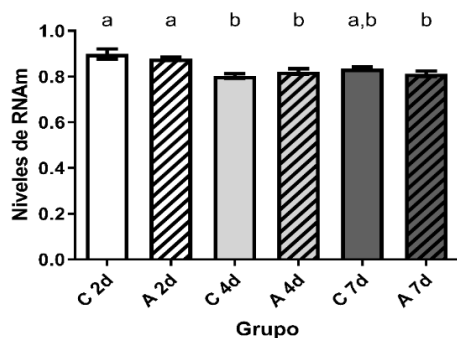


Figura 20. Representación de los niveles de ARNm de asprosinina en el hígado cuantificados mediante PCR cuantitativa. Se representan los valores de ARNm para la asprosinina (eje y) en todos los grupos muestrales (eje x) ($n= 8$) mediante una prueba ANOVA de una vía. Los datos se mostraron con su media \pm

SEM. C 2d (control a dos días) ($0,90 \pm 0,064$); A 2d (ayunados dos días) ($0,88 \pm 0,021$); C 4d (control a cuatro días) ($0,80 \pm 0,030$); A 4d (ayunados cuatro días) ($0,82 \pm 0,035$); C 7d (control a siete días) ($0,83 \pm 0,021$); A 7d (ayunados siete días) ($0,81 \pm 0,032$). Las distintas letras indican significación ($P < 0,05$).

A continuación, como se observa en la figura 21, por medio de una prueba t de Student se equipararon las medias de los grupos muestrales (controles y ayunados) en cada día de muestreo y no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos (C y A 2d, $p = 0,3989$; C y A 4d, $p = 0,2579$; C y A 7d, $p = 0,1175$).

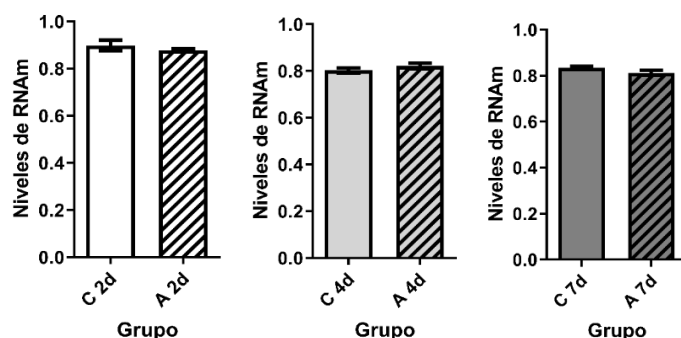


Figura 21. Niveles de expresión de ARNm de la asprosinina en el hígado por RT-PCR. Valores de ARNm para la asprosinina (eje y) de los grupos muestrales (control y ayunados) ($n=8$) de cada día de muestreo (eje x) mediante una prueba t de Student. Los datos se mostraron con su media \pm SEM. C 2d (control a dos días) ($0,90 \pm 0,064$); A 2d (ayunados dos días) ($0,88 \pm 0,021$); C 4d (control a cuatro días) ($0,80 \pm 0,030$); A 4d (ayunados cuatro días) ($0,82 \pm 0,035$); C 7d (control a siete días) ($0,83 \pm 0,021$); A 7d (ayunados siete días) ($0,81 \pm 0,032$). Las diferencias significativas se consideran con $P < 0,05$.

Finalmente, como se puede apreciar en la figura 22, se compararon los valores medios de expresión de ARNm para el receptor de asprosinina en el cerebro (*Ptprd*) que se obtuvieron a través de una prueba ANOVA de una vía ($p < 0,0001$). Tras el periodo de abstinencia alimentaria, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos muestrales a los 2, 4 y 7 días. Al segundo día, los valores intergrupales difieren de los grupos restantes ($P < 0,05$). No obstante, al cuarto y séptimo día de muestreo se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos controles y los ayunados; excepto para el grupo ayuno (7 días) cuyos niveles son similares a los observados en los grupos controles (4 y 7 días) ($P > 0,05$). La media de los grupos controles es de ($0,870 \pm 0,042$ g) y la de los ayunados de ($0,883 \pm 0,0315$ g).

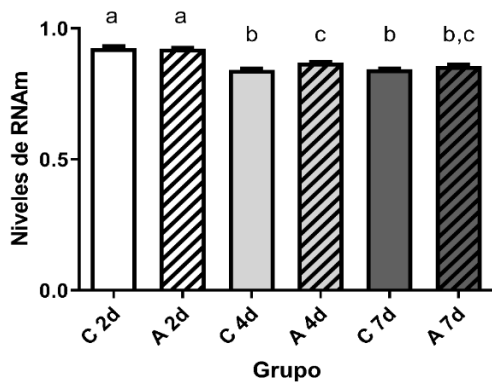


Figura 22. Niveles de expresión de ARNm del receptor de asprosinina en el cerebro por RT-PCR. Comparativa de los valores de ARNm del receptor *Ptprd* (eje y) de los grupos experimentales (n=8) de cada día de muestreo (eje x) por medio de un ANOVA de una vía. Los datos se mostraron con su media ± SEM. C 2d (control a dos días) (0,93 ± 0,017); A 2d (ayunados dos días) (0,92 ± 0,011); C 4d (control a cuatro días) (0,84 ± 0,013); A 4d (ayunados cuatro días) (0,87 ± 0,012); C 7d (control a siete días) (0,84 ± 0,008); A 7d (ayunados siete días) (0,86 ± 0,014). Las diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

De igual modo, como se muestra en la figura 23, las medias de los niveles intergrupales de ARNm (prueba t de Student) presentaron significación ($P < 0,05$) entre los controles y ayunados a los 4 y 7 días de ayuno (C 4d y A 4d, $p = 0,001$; C 7d y A 7d, $p = 0,0442$) mientras que los grupos experimentales a los 2 días de ayuno no mostraron diferencias significativas entre ellos (C 2d y A 2d, $p = 0,6790$) ($P > 0,05$).

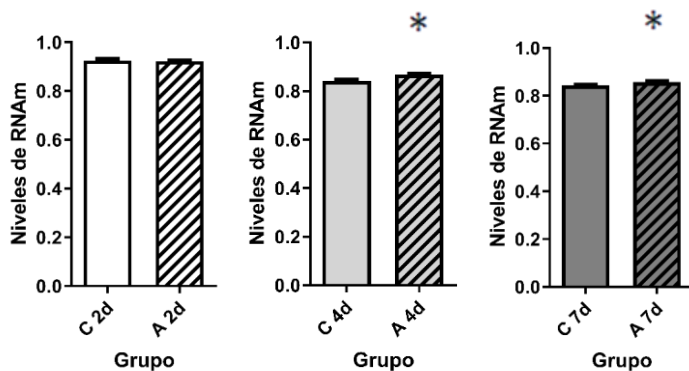


Figura 23. Niveles de expresión de ARNm del receptor de asprosinina en el cerebro por RT-PCR. Comparativa de los valores de ARNm del receptor *Ptprd* (eje y) de los grupos experimentales (controles y ayunados) (n=8) de cada día de muestreo (eje x) mediante pruebas t de Student. Los datos se mostraron con su media ± SEM. C 2d (control a dos días) (0,93 ± 0,017); A 2d (ayunados dos días) (0,92 ± 0,011); C 4d (control a cuatro días) (0,84 ± 0,013); A 4d (ayunados cuatro días) (0,87 ± 0,012); C 7d (control a siete días) (0,84 ± 0,008); A 7d (ayunados siete días) (0,86 ± 0,014). Las diferencias significativas se consideran con $P < 0,05$. El * indica diferencias significativas intergrupales.

4.4. COMPROBACIÓN DE LOS CEBADORES DISEÑADOS PARA EL RECEPTOR *PTPRD*

Los resultados del gel de electroforesis, tal y como se observa en la figura 24, mostraron amplificación de fragmentos de ADN (alrededor de 200 pares de bases (o sus siglas en inglés, bp) coincidiendo con el tamaño esperado del gen *Ptprd* en todos los tejidos analizados. Las bandas que se observaron en cada pocillo detallaron la especificidad relativa de los primers seleccionados frente al gen de interés (receptor), cuyo tamaño esperado era de 162pb. Además, se observa una segunda banda de tamaño mucho más reducido (menor a 100pb) en la mayoría de los tejidos analizados, dicha banda es consecuencia de una unión inespecífica de los cebadores entre ellos.

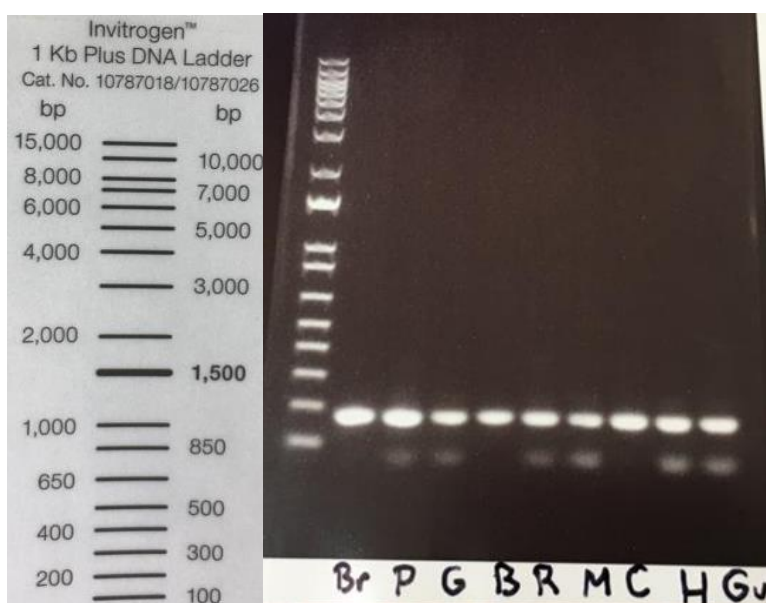


Figura 24. Banda longitudinal de expresión del gen del receptor de asprosina en el cerebro. Gel de electroforesis (agarosa 1%) para el receptor *Ptprd*, en algunos tejidos de pez cebra. A la izquierda, se encuentra el esquema desglosado de la totalidad de posibles bandas del marcador de referencia (1 Kb) mientras que a la derecha se encuentran las bandas que se expresaron del gen de estudio. Br, cerebro; P, piel; G, grasa; B, bazo; R, riñon; M, músculo; E, ojo; H, corazón y Gu, intestino.

5. DISCUSIÓN

La habilidad de los animales para adquirir un correcto balance energético es clave en su crecimiento, mantenimiento e incluso su supervivencia (Secor, 2001; Gingerich et al., 2010; Liew y Orbán, 2012; Karasov y Douglas, 2013; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021). Como ocurre en mamíferos, los peces requieren un suministro de energía (a través de la alimentación) para mantener sus condiciones fisiológicas y poder llevar a cabo sus procesos fundamentales, como son el crecimiento, metabolismo y reproducción (Gingerich et al., 2010; Karasov y Douglas, 2013; Steimberg, 2018; Gilannejad et al., 2020). La regulación endocrina del apetito muestra tres situaciones concretas: i) situaciones estándar de alimentación, donde se mantiene un equilibrio entre la ingesta y demanda energética; ii) situación de ayuno, se acrecentan los procesos catabólicos para garantizar la demanda basal de energía y iii) realimentación o hiperanabolismo, donde se modifican los mecanismos de obtención energética (de catabolismo a anabolismo) (Won et al., 2013). Los episodios extremos (altas/bajas temperaturas con menores recursos alimenticios) producen periodos de letargo en la naturaleza conocidos como estivación. En estos se modifican los requerimientos metabólicos y mecanismos de obtención de energía como estrategia de supervivencia y se describen en numerosas especies de peces, reptiles, anfibios y mamíferos (Geiser, 1988; Graham y Lee, 2004; Rial et al., 2010; Secor et al., 2010; Fu et al., 2011; Hvas, 2022).

La escasez de alimento provoca cambios en el metabolismo de los peces, y el peso es una de las condiciones que se modifica en periodos tempranos de inanición. Nuestros resultados muestran como un ayuno prolongado (7 d) provoca una reducción sustancial en el peso, no así en la talla debido a que los animales no se encontraban en la fase exponencial de crecimiento y, por tanto, sería necesario más tiempo para poder observarse diferencias durante esta etapa en la longitud. En este contexto se han publicado numerosos trabajos analizando las variaciones de peso producidas por periodos de ayuno continuados en múltiples especies de peces, encontrándose resultados muy diversos en función de la especie estudiada e incluso entre cepas de la misma especie. Contrariamente a nuestros resultados, 7d de ayuno no son suficientes para perder peso en carpas y pez dorado (*Carassius auratus*) (Liew y Orbán, 2012). En carpas holandesas (*Spinibarbus hollandi*) 7 días de ayuno son suficientes para obtener reducciones significativas de peso (Yang et al., 2019), resultados que concuerdan con nuestros estudios. Los resultados de (Chatzifotis et al., 2018) en corvinas (*Argyrosomus regius*) para periodos prolongados de ayuno (14 d y 60 d) concuerdan con descensos en el gasto de energía, en la movilización y empleo de combustibles metabólicos y, por ende, en el peso corporal de los grupos ayunados respecto a

los alimentados «*ad libitum*». Asimismo, en el estudio de (Park et al., 2015) con besugos (*Oplegnathus fasciatus*) se muestra una disminución significativa de peso tras 8 semanas de ayuno. En tal sentido, el trabajo de (Bar y Volkoff, 2012) muestran tres fases adaptativas en periodos de ayuno: i) estadio de transición (corto plazo), ii) estadio en el cual se utilizan los depósitos de grasa (medio plazo) y iii) estadio de oxidación de proteínas (largo plazo). Por esta razón, los primeros días de muestreo (2 y 4 d) en los peces ayunados no disminuyen los valores de peso corporal y se mantienen constantes hasta que la falta de alimento y, por tanto, el suministro de energía es menor que el gasto energético del animal, momento el cual, el pez comienza a emplear sus reservas energéticas y, por tanto, se reduce el peso corporal. Dicha situación de balance energético negativo se ha producido en el séptimo día de ayuno en la experiencia realizada. Resultados similares se han observado en un trabajo realizado por (Meyer et al. 2012), en el que curiosamente las reducciones en peso y talla como consecuencia del ayuno en peces cebra eran dependientes de la cepa utilizada. De tal modo, se observa una pérdida de peso a los 3 días de ayuno en la cepa TU (Tuebingen) pero en la cepa utilizada en nuestros ensayos (AB) la reducción se observó al séptimo día de ayuno (Meyer et al., 2012), concordando con nuestros resultados. Igualmente, en los ensayos de (Drew et al., 2008; Craig y Moon, 2011) 1 semana de ayuno es suficiente para provocar un descenso de peso corporal en peces cebra de aproximadamente el 10%. En especies como la palometa (*Cichlasoma dimerus*) es necesario un periodo de inanición de 1 mes para provocar reducciones significativas en el peso de los individuos (Delgadín et al., 2015). Asimismo, no se detectaron diferencias en la talla de los animales durante la etapa experimental, como hemos descrito nosotros previamente en los resultados. Numerosos estudios describen pérdidas de peso provocadas por periodos de ayuno tanto en peces de agua dulce como por ejemplo la trucha arcoíris (Pottinger et al., 2003; Jönsson et al., 2007; Montserrat et al., 2007; Cleveland et al., 2009; Bermejo-Poza et al., 2019; Karatas et al., 2021), el salvelino (*Salvelinus alpinus*) (Striberny y Jørgensen, 2017), el siluro (*Silurus meridionalis*) (Fu et al., 2011) y la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Fox et al., 2006) como en teleósteos marinos como la dorada (*Sparus aurata*) (Power et al., 2000), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Gingerich et al., 2010), el esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) (Hung et al., 1997), el salmón Atlántico (*Salmo salar*) (Hvas, 2022) y el fletán japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Park et al., 2015).

Además, es importante remarcar que la dieta influye en el metabolismo de la glucosa, de tal modo que se ha descrito una mayor velocidad en los teleósteos omnívoros respecto de los carnívoros (Enes et al., 2009; Schrama et al., 2012). Tras observar la reducción de peso, analizamos los niveles de glucosa plasmática en sangre, encontrando que los periodos de ayuno

muestran un descenso de dichos niveles a los 2 días de ayuno, aunque permanecen estables en el transcurso del tiempo. Dicha situación es debida a que los peces para mantener un equilibrio homeostático, movilizan primeramente la energía disponible para que se sostengan los niveles de glucosa estables y no alcanzar niveles críticos de dos formas: i) disminuyen la tasa de utilización de glucosa y ii) aumentan la tasa de glucogenólisis (Ince y Thorpe, 1976; Sangiao-Alvarellos et al., 2005; Polakof et al., 2006, 2012; Park et al., 2015; Chatzifotis et al., 2018; Yang et al., 2019), con el objetivo de realizar correctamente las funciones vitales requeridas por el organismo (Kocaman y Kuloğlu, 2020). Así pues, de manera preliminar utilizan las reservas de glucógeno disponibles en el hígado (hasta fin de existencias) y, una vez agotado, emplean grasa que se transforma en ácidos grasos libres y estos, a su vez, en glucosa (Fox et al., 2006; Park et al., 2015; Yang et al., 2019; Kocaman y Kuloğlu, 2020). Estudios previos que utilizan la misma cepa y periodo de ayuno de nuestro experimento concuerdan con los resultados obtenidos (Eames et al., 2010). La reducción de los valores de glucosa plasmática inducida por el ayuno se ha observado en diferentes especies de peces: corvina (Chatzifotis et al., 2018), tenca (*Tinca tinca*) (De Pedro et al., 2003), trucha arcoíris (Pottinger et al., 2003; Montserrat et al., 2007; Bermejo-Poza et al., 2019; Karatas et al., 2021), tilapia (Fox et al., 2006), salmón atlántico (Soengas et al. 1996), lubina (Zammit y Newsholme, 1979; Peres et al., 2014), dentón (*Dentex dentex*) (Pérez-Jiménez et al., 2012), dorada (Power et al., 2000), esturión blanco (Hung et al., 1997), cazón (*Squalus acanthias*) (Zammit y Newsholme, 1979) y sábalo de cola roja (*Brycon cephalus*) (Figueiredo-Garutti et al., 2002). No obstante, en lucios (*Esox Lucius*) no se describe un descenso en los niveles de glucosa en sangre hasta 3 meses de ayuno, esto se puede asociar a una baja tasa de gluconeogénesis por parte de esta especie (Ince y Thorpe, 1976). Esta situación se repite en la palometa (Delgadin et al., 2015). Cabe recalcar como se ha descrito anteriormente con las variaciones de peso, que los niveles de glucosa plasmáticos también se corrigen según la cepa empleada de pez cebra (Novak et al., 2005; Biga y Goetz, 2006; Drew et al., 2008; Biga y Meyer, 2009; Kinkel et al., 2010; Palstra et al., 2010), de tal modo que hay cepas como TU en la que tres días son suficientes para ver la reducción de glucosa y otras como la SJA (peces cebra provenientes del Zebrafish International Resource Center located de la Universidad de Oregon) en la cual no se observan dichas disminuciones ni tras 7 días de ayuno (Meyer et al., 2012). Queda demostrado que el ayuno reduce los niveles de glucosa plasmática prácticamente desde su inicio, pero se mantienen más o menos constantes, hecho que coincide con estudios anteriores en peces cebra (Craig y Moon, 2011; Eames et al., 2010, 2017) y también, con otras especies de peces (Zammit y Newsholme, 1979; Soengas et al., 1996; Kelley et al., 2001; Fox et al., 2006; Pérez-Jiménez et al., 2012; Chatzifotis et al., 2018; Yang et al., 2019).

En humanos, el peso corporal, los niveles de glucosa y los niveles de asprosina están relacionados, de hecho, se describe que el ejercicio muestra una correlación positiva entre el descenso de los niveles de glucosa y el aumento de los valores de asprosina (Wiecek et al., 2018). En este contexto, en estudios preliminares se describe como existen diferencias significativas en los niveles de asprosina entre los individuos obesos y con peso estándar (Ugur y Aydin, 2019; Zhang et al., 2020; Ceylan y Saygin, 2021; Alsaif et al., 2022); excepto en el experimento de (Long et al., 2019), quién observa como niños obesos presentan valores significativamente menores que los controles, sugiriendo que todavía se pueden encontrar en una fase compensatoria de la homeostasis energética. Ensayos humanos muestran como niveles altos de asprosina se correlacionan de manera positiva con valores de glucosa liberada (Wang et al., 2018).

Una de las enfermedades actuales que mayor incidencia y, por tanto, mayor preocupación está teniendo a nivel mundial es la diabetes, en la cual, numerosos péptidos son responsables en el mantenimiento de la homeostasis y la resistencia a la insulina (Luo et al., 2012; Yang et al., 2012). Uno de esos péptidos es la asprosina (Duerrschmid et al., 2017), cuyo efecto ha sido bloqueado mediante un anticuerpo neutralizante reduciendo la insulina en plasma y la producción de glucosa hepática, evidenciando lo anterior expuesto. De hecho, los estudios de (Goodarzi et al., 2021) proponen a la asprosina como un marcador directo del metabolismo de glucosa y de la resistencia de la insulina.

Como se ha comentado anteriormente, si la glucosa en sangre no alcanza niveles suficientes, la energía proviene del hígado y de la grasa. Dichos tejidos fueron objeto de estudio en este trabajo para analizar los niveles de expresión de asprosina. Solamente al séptimo día de ayuno se observó un incremento significativo de los niveles de asprosina en los peces ayunados respecto a los controles. Ensayos preliminares señalan la participación de la asprosina en la producción de glucosa hepática a través del AMPc como segundo mensajero (Romere et al., 2016), mediante la unión con del receptor OLF734 (Li et al., 2019). Sin embargo, nuestros resultados mostraron una variabilidad elevada en ambos tejidos en todos los grupos experimentales, por lo que desgraciadamente no son concluyentes en este estudio. Además, no hemos podido corroborar la presencia del receptor OLF734, ya que en nuestra especie de estudio dicho gen solamente tiene un 10% de similitud con el descrito en ratones y/o humanos. Por tanto, los resultados obtenidos podrían deberse a que dicha hormona, forma parte de la fibrilina-1 (FBN-1), una proteína funcional en numerosos tejidos, principalmente, en el tejido conjuntivo (Jacquinet et al., 2014; Romere et al., 2016; Wiecek et al., 2018; Zhang et al., 2021; Quint et al., 2022). Las moléculas de asprosina se procesan y liberan desde la región C-terminal hasta el torrente

sanguíneo, pero su función principal no es la ingesta sino el tejido conectivo por lo que prácticamente se puede considerar como un gen constitutivo. Esta hipótesis concuerda con experimentos de (Zhang et al., 2021) y resultados obtenidos por (Wang et al., 2019), quién señala que los niveles elevados de asprosina en individuos obesos son posibles gracias a una liberación de esta hormona desde múltiples órganos, no solamente desde el tejido adiposo. En ratas se ha localizado asprosina en hepatocitos en células tubulares del riñón, cardiomiocitos, células epiteliales del estómago, en células de Leydig en los testículos y en neuronas corticales del cerebro (Kocaman y Kuloğlu, 2020). Estudios realizados previamente en el grupo en pez cebra demuestran la presencia de la hormona en todos los tejidos de pez cebra analizados: hígado, grasa, riñón, testículos, ovarios, ojo, branquia, músculo, intestino, corazón, bazo y piel (resultados no publicados) así como presencia del receptor recientemente descrito *Ptprd* en (cerebro, bazo, grasa, ojo, corazón, hígado, piel, musculo e intestino), por lo que evidencia una vez más la similitud entre pez cebra y rata. Parece ser que la asprosina puede afectar al metabolismo de los organismos ejerciendo una función autocrina y paracrina en el tracto gastrointestinal, aunque dichos procesos todavía permanecen sin esclarecer (Kocaman y Kuloğlu, 2020). En mamíferos se ha demostrado que la asprosina se expresa y libera desde el tejido adiposo hacia el torrente sanguíneo y pasa la barrera hematoencefálica para actuar sobre el receptor *Ptprd* (Mishra et al., 2021). En tal sentido, en el estudio de Mishra y otros señalan como en mamíferos las neuronas AgRP ubicadas en el hipotálamo se encuentran conectadas con este receptor (Mishra et al., 2021), por tanto, a mayor número de receptores se estimula la función orexigénica de estas neuronas y a su vez, estimulan la ingesta. En peces, se observa como las neuronas AgRP presentan una función orexigénica equiparable a la descrita en mamíferos (Delgado et al., 2017; Rønnestad et al., 2017; Beutler y Knight, 2018; Ceylan y Saygin, 2020; Luís et al., 2020; Soengas, 2021), sugiriendo que en los peces este mecanismo esté actuando de la misma manera y se haya conservado evolutivamente. Para corroborar lo mencionado anteriormente, analizamos los niveles de expresión del receptor *Ptprd* en el cerebro y así analizar sus posibles variaciones a causa del ayuno. Nuestros resultados sugieren que a tiempos tempranos (día 2) de ayuno no existen variaciones en los niveles del receptor, sin embargo, tras aumentar el tiempo de ayuno (4 y 7 d) los niveles de expresión del receptor en los peces ayunados se incrementan significativamente. Como consecuencia de este incremento de la cantidad de receptor presente en el cerebro, se incrementa la sensibilidad a dicha hormona, es decir, aumenta la especificidad de las neuronas al receptor y responden de manera más eficaz.

Con solo esa evidencia no podemos demostrar el mecanismo de acción de la asprosina, por ello, el grupo está desarrollando la producción de una proteína recombinante para realizar estudios más específicos sobre la función y mecanismo de acción de dicha hormona, no obstante, a pesar de no tener resultados concluyentes, todo parece indicar que sigue el mismo mecanismo de acción y que parece estar conservado evolutivamente, aunque son necesarios más estudios para dilucidar el mecanismo de acción entre la asprosina-receptor-neuronas AgRP en peces.

6. CONCLUSIONES

1. El ayuno continuado durante 7 días provoca una reducción significativa del peso, no así en la talla de peces cebra.
2. El ayuno provoca una reducción de los niveles de glucosa plasmáticos, aunque dicha reducción permanece constante tras una semana.
3. Existe una variabilidad en los niveles de expresión asprosinina en la grasa e hígado. El ayuno durante una semana no produce efectos en los niveles de ARNm de asprosinina en el hígado. Sin embargo, estos valores se incrementan en la grasa significativamente.
4. Los peces ayunados durante 4 y 7 días son capaces de elevar los niveles del receptor de asprosinina *Ptprd* en el cerebro de forma significativa con respecto a los peces alimentados.

7. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio son muy similares a los descritos en ratones, por tanto, parece ser que el mecanismo de acción de la asprosina se conserva evolutivamente. En los muestreos realizados extrajimos y conservamos hígado de todos los animales y sería conveniente el análisis de los niveles de expresión de diferentes genes referentes a enzimas gluconeogénicas en el hígado como, por ejemplo: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pepck), fructosa 2,6-bisfosfato (fbpase) y piruvato quinasa (pk). Para poder afirmar lo anterior expuesto merecería la pena realizar hibridaciones in situ con fluorescencia (FISH), localizando las zonas del cerebro que expresan el receptor Ptpd e intentar observar si existe co-localización con las neuronas AgRP, lo cual nos permitiría demostrar que existe una conexión entre el receptor y las neuronas orexigénicas. Paralelamente se podría crear una línea estable con células humanas (HEK293) transfectadas con asprosina de pez cebra y finalmente llevar a cabo ensayos de farmacología para poder entender la posible activación del receptor en presencia o ausencia de dicha hormona. Si se lograran resultados positivos quizá diseñar ensayos in vivo en pez cebra mediante inyecciones intracerebrales o intraperitoneales ayudarían a conocer el efecto de la asprosina tanto a nivel cerebral como periférico en la ingesta y, por ende, en el balance energético de los peces

8. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, M. (1974). "Der Sauerstoffverbrauch der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*)". *Binnenfischerei*. 21, 53–61.
- Alsaif, M., Field, C.J., Colin-Ramirez, E., Prado, C.M., Haqq, A.M. (2022). Serum Asprosin Concentrations in Children with Prader–Willi Syndrome: Correlations with Metabolic Parameters. *Journal of Clinical Medicine*. 11(8). doi: 10.3390/jcm11082268
- Asriqah, L., Nugroho, R.A., Aryani, R. (2018). Effect of various organic acid supplementation diets on clarias burchell, 1822: Evaluation of growth, survival and gariepinus feed utilization. *F1000Research*. 7. doi: 10.12688/F1000RESEARCH.15954.1
- Assan, D., Huang, Y., Mustapha, U.F., Addah, M.N., Li, G., Chen, H. (2021). Fish Feed Intake, Feeding Behavior, and the Physiological Response of Apelin to Fasting and Refeeding. *Frontiers in Endocrinology*. 12. doi: 10.3389/fendo.2021.798903
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D.M., Verdile, G., Martins, R.N. (2012). Regular care and maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments*. 69. doi: 10.3791/4196
- Baldrige, D., Wangler, M.F., Bowman, A.N., Yamamoto, S., Schedl, T., Pak, S.C., Postlethwait, J.H., Shin, J., Solnica-Krezel, L., Bellen, H.J., Westerfield, M. (2021). Model organisms contribute to diagnosis and discovery in the undiagnosed diseases network: Current state and a future vision. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 16(1). doi: 10.1186/s13023-021-01839-9
- Bar, N., Volkoff, H. (2012). Adaptation of the physiological, endocrine, and digestive system functions to prolonged food deprivation in fish. *Comparative Physiology of Fasting. Starvation, and Food Limitation*. 7(6), 69–89. doi: 10.1007/978-3-642-29056-5_6
- Bermejo-Poza, R., Fernández-Muela, M., de la Fuente, J., Pérez, C., de Chavarri, E.G., Díaz, M.T., Torrent, F., Villarroel, M. (2019). Physio-metabolic response of rainbow trout during prolonged food deprivation before slaughter. *Fish Physiology and Biochemistry*. 45(1), 253–265. doi: 10.1007/s10695-018-0559-0
- Beutler, L.R., Knight, Z.A. (2018). A Spotlight on Appetite. *Neuron*. 97(4), 739–741. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.050
- Biga, P.R., Goetz, F. (2006). Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *Physiology*. 291(5), 1327-1337. doi: 10.1152/ajpregu.00905.2005
- Biga, P.R., Meyer, J. (2009). Growth hormone differentially regulates growth and growth-related gene expression in closely related fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 154(4), 465–473. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.07.023
- Bourque, C., Houvras, Y. (2011). Hooked on zebrafish: Insights into development and cancer of endocrine tissues. *Endocrine-Related Cancer*. 18(5). doi: 10.1530/ERC-11-0099

- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J.L., Gamse, J.T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R.T., van Cruchten, S., Zon, L.I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95–118. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335
- Cerdá-Reverter, J.M., Agulleiro, M.J., Guillot, R.R., Sánchez, E., Ceinos, R., Rotllant, J. (2011). Fish melanocortin system. *European Journal of Pharmacology*. 660(1), 53–60. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.10.108
- Ceylan, H.I., Saygın, Ö. (2020). An investigation of the relationship between new fasting hormone asprosin, obesity and acute–chronic exercise: current systematic review. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 127(4), 373–384. doi: 10.1080/13813455.2020.1767652
- Chatzifotis, S., Clavero, S., Kounna, C., Soumalevris, A., Feidantsis, K., Antonopoulou, E. (2018). Effects of long-term feed deprivation on body weight loss, muscle composition, plasma metabolites, and intermediate metabolism of meagre (*Argyrosomus regius*) under different water temperatures. *Fish Physiology and Biochemistry*. 44(2), 527–542. doi: 10.1007/s10695-017-0451-3
- Chen, J.W., Galloway, J.L. (2017). Using the zebrafish to understand tendon development and repair. *Methods in Cell Biology*. 138, 299–320. doi: 10.1016/bs.mcb.2016.10.003
- Chiba, K. (1965). A study on the influence of oxygen concentration on the growth of juvenile common carp. *Freshwater Fisheries*. 4, 15, 35–47.
- Cleveland, B.M., Weber, G.M., Blemings, K.P., Silverstein, J.T. (2009). Insulin-like growth factor-I and genetic effects on indexes of protein degradation in response to feed deprivation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 297, 1332–1342. doi: 10.1152/ajpregu.00272.2009.-This
- Conde-Sieira, M., Soengas, J.L. (2017). Nutrient sensing systems in fish: Impact on food intake regulation and energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*. 10(JAN). doi: 10.3389/fnins.2016.00603
- Conradsen, C., McGuigan, K. (2015). Sexually dimorphic morphology and swimming performance relationships in wild-type zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*. 87(5), 1219–1233. doi: 10.1111/jfb.12784
- Cortemeglia, C., Beitingger, T.L. (2005). Temperature Tolerances of Wild-Type and Red Transgenic Zebra Danios. *Transactions of the American Fisheries Society*. 134(6), 1431–1437. doi: 10.1577/t04-197.1
- Craig, P.M., Moon, T.W. (2011). Fasted zebrafish mimic genetic and physiological responses in mammals: A model for obesity and diabetes?. *Zebrafish*. 8(3), 109–117. doi: 10.1089/zeb.2011.0702
- Darrow, K.O., Harris, W.A. (2004). Characterization and Development of Courtship in Zebrafish, *Danio rerio*. *ZEBRAFISH*. 1(1), 25-32. doi: 10.1089/154585404774101662
- De Pedro, N., Delgado, M.J., Gancedo, B., Alonso-Bedate, M. (2003). Changes in glucose, glycogen, thyroid activity and hypothalamic catecholamines in tench by starvation and

- refeeding. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 173(6), 475–481. doi: 10.1007/s00360-003-0355-7
- Delgadin, T.H., Pérez Sirkin, D.I., di Yorio, M.P., Arranz, S.E., Vissio, P.G. (2015). GH, IGF-I and GH receptors mRNA expression in response to growth impairment following a food deprivation period in individually housed cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 41(1), 51–60. doi: 10.1007/s10695-014-0005-x
 - Delgado, M.J., Cerdá-Reverter, J.M., Soengas, J.L. (2017). Hypothalamic integration of metabolic, endocrine, and circadian signals in fish: Involvement in the control of food intake. *Frontiers in Neuroscience*. 11(JUN). doi: 10.3389/fnins.2017.00354
 - Drew, R.E., Rodnick, K.J., Settles, M., Wacyk, J., Churchill, E., Powell, M.S., Hardy, R.W., Murdoch, G.K., Hill, R.A., Robison, B.D. (2008). Effect of starvation on transcriptomes of brain and liver in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Physiological Genomics*. 35(3), 283–295. doi: 10.1152/physiolgenomics.90213.2008
 - Duerrschmid, C., He, Y., Wang, C., Li, C., Bournat, J.C., Romere, C., Saha, P.K., Lee, M.E., Phillips, K.J., Jain, M., Jia, P., Zhao, Z., Farias, M., Wu, Q., Milewicz, D.M., Sutton, V.R., Moore, D.D., Butte, N.F., Krashes, M.J., Chopra, A.R. (2017). Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nature Medicine*. 23(12), 1444–1453. doi: 10.1038/nm.4432
 - Duff, N.M., Sommerfeld, R.E., Litvak, M.K. (2019). Discriminating Sex in Zebrafish (*Danio rerio*) Using Geometric Morphometrics. *Zebrafish*. 16(2), 207–213. doi: 10.1089/zeb.2018.1664
 - Eames, S.C., Franse, K.F., Kinkel, M.D. (2017). Analysis of pancreatic disease in zebrafish. *Methods in Cell Biology*. 138, 271–295. doi: 10.1016/bs.mcb.2016.08.005
 - Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E., Kinkel, M.D. (2010). Blood Sugar Measurement in Zebrafish Reveals Dynamics of Glucose Homeostasis. *ZEBRAFISH*. 7(2). doi: 10.1089/zeb.2009.0640
 - Egusa, S. (1958). On the oxygen consumption of the pond-cultured eel, *Anguilla japonica*. *Ichthyology*, 7, 49–56.
 - Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35(3), 519–539. doi: 10.1007/s10695-008-9259-5
 - Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M. (2007). Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*. 4(1), 21–40. doi: 10.1089/zeb.2006.9997
 - Figueiredo-Garutti, M., Navarro, I., Capilla, E., Souza, R., Moraes, G., Gutiérrez, J., Vicentini-Paulino, M. (2002). Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 132(2), 467–476. doi: 10.1016/s1095-6433(02)00094-6
 - Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Kalueff, A.V., Rosemberg, D.B. (2018). The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Experimental Neurology*. 299, 157–171. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.10.004

- Fox, B.K., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G. (2006). Effects of fasting on growth hormone, growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*. 148(3), 340–347. doi: 10.1016/j.ygcn.2006.04.007
- Fu, S.J., Pang, X., Cao, Z.D., Peng, J.L., Yan, G. (2011). The effects of fasting on the metabolic interaction between digestion and locomotion in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 158(4), 498–505. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.12.013
- Geiser, F. (1988). Journal of Comparative Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition?. *Complete Physiology*. 158(1), 25-37. doi: 10.1007/BF00692726
- Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., Poss, K.D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*. 29(11), 611–620. doi: 10.1016/j.tig.2013.07.003
- Gerlach, G. (2006). Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. *Animal Behaviour*. 72(5), 1119–1124. doi: 10.1016/j.anbehav.2006.03.009
- Gilannejad, N., Rønnestad, I., Lai, F., Olderbakk-Jordal, A.E., Gottlieb Almeida, A.P., Martínez-Rodríguez, G., Moyano, F.J., Yúfera, M. (2020). Daily rhythms of intestinal cholecystokinin and pancreatic proteases activity in Senegalese sole juveniles with diurnal and nocturnal feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 253. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.110868
- Gingerich, A.J., Philipp, D.P., Suski, C.D. (2010). Effects of nutritional status on metabolic rate, exercise and recovery in a freshwater fish. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 180(3), 371–384. doi: 10.1007/s00360-009-0419-4
- Goldblatt, J., Hyatt, J., Edwards, C., Walpole, I. (2011). Further evidence for a marfanoid syndrome with neonatal progeroid features and severe generalized lipodystrophy due to frameshift mutations near the 3' end of the FBN1 gene. *American Journal of Medical Genetics*. 155(4), 717–720. doi: 10.1002/ajmg.a.33906
- Goodarzi, G., Setayesh, L., Fadaei, R., Khamseh, M.E., Aliakbari, F., Hosseini, J., Moradi, N. (2021). Circulating levels of asprosin and its association with insulin resistance and renal function in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Molecular Biology Reports*. 48(7), 5443–5450. doi: 10.1007/s11033-021-06551-2
- Gluglupet (2022). Fichas técnicas de peces, Disponible en: https://www.gluglupet.es/blog/el-pez-cebra-danio-rerio-o-zebrafish-adeecuado-para-acuarofilos-principiantes_eb1454 [Consulta: 24-03-2022]
- Graham, J.B., Lee, H.J. (2004). Breathing air in air: In what ways might extant amphibious fish biology relate to prevailing concepts about early tetrapods, the evolution of vertebrate air breathing, and the vertebrate land transition?. *Physiological and Biochemical Zoology*. 77(5), 720–731. doi: 10.1086/425184

- Graul-Neumann, L.M., Kienitz, T., Robinson, P.N., Baasanjav, S., Karow, B., Gillissen-Kaesbach, G., Fahsold, R., Schmidt, H., Hoffmann, K., Passarge, E. (2010). Marfan syndrome with neonatal progeroid syndrome-like lipodystrophy associated with a novel frameshift mutation at the 3' terminus of the FBN1-gene. *American Journal of Medical Genetics*. 152(11), 2749–2755. doi: 10.1002/ajmg.a.33690
- He, L., Chang, E., Peng, J., An, H., McMillin, S.M., Radovick, S., Stratakis, C.A., Wondisford, F.E. (2016). Activation of the cAMP-PKA pathway antagonizes metformin suppression of hepatic glucose production. *Journal of Biological Chemistry*. 291(20), 10562–10570. doi: 10.1074/jbc.M116.719666
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*. 86(1), 6–19. doi: 10.1093/toxsci/kfi110
- Hoffmann, J.G., Xie, W., Chopra, A.R. (2020). Energy regulation mechanism and therapeutic potential of asprosin. *Diabetes*. 69(4), 559–566. doi: 10.2337/dbi19-0009
- Horn, D., Robinson, P.N. (2011). Progeroid facial features and lipodystrophy associated with a novel splice site mutation in the final intron of the FBN1 gene. *American Journal of Medical Genetics*. 155(4), 721–724. doi: 10.1002/ajmg.a.33905
- Horzmann, K.A., Freeman, J.L. (2018). *Making Waves: New Developments in Toxicology with the Zebrafish*. *Toxicology*. 5(10), 86-102. doi: 10.1093/toxsci/kfy044/4870163
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Stemple, D.L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446), 498–503. doi: 10.1038/nature12111
- Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H., Storebakken, T., Cui, Y. (1997). Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*. 151.
- Hvas, M. (2022). Swimming energetics of Atlantic salmon in relation to extended fasting at different temperatures. *Conservation Physiology*. 10(1). Doi: 10.1093/conphys/coac037
- Ince, B.W., & Thorpe, A. (1976). The effects of starvation and force-feeding on the metabolism of the Northern pike, *Esux Zucius*. *Journal Fish Bid*. 8.
- Jacquinet, A., Verloes, A., Callewaert, B., Coremans, C., Coucke, P., de Paepe, A., Kornak, U., Lebrun, F., Lomet, J., Piérard, G.E., Robinson, P.N., Symoens, S., van Maldergem, L., Debray, F.G. (2014). Neonatal progeroid variant of Marfan syndrome with congenital lipodystrophy results from mutations at the 3' end of FBN1 gene. *European Journal of Medical Genetics*. 57(5), 230–234. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.02.012
- Jönsson, E., Forsman, A., Einarsdottir, I.E., Kaiya, H., Ruohonen, K., Björnsson, B.T. (2007). Plasma ghrelin levels in rainbow trout in response to fasting, feeding and food composition, and effects of ghrelin on voluntary food intake. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 147(4), 1116–1124. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.03.024

- Kajimura, S. (2017). Adipose tissue in 2016: Advances in the understanding of adipose tissue biology. *Nature Reviews Endocrinology*. 13(2), 69–70. doi: 10.1038/nrendo.2016.211
- Karasov, W.H., Douglas, A.E. (2013). Comparative digestive physiology. *Comprehensive Physiology*. 3(2), 741–783. doi: 10.1002/cphy.c110054
- Karasov, W.H., Caviedes-Vidal, E. (2021). Adaptation of intestinal epithelial hydrolysis and absorption of dietary carbohydrate and protein in mammals and birds. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 253. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.110860
- Karatas, T., Onalan, S., Yildirim, S. (2021). Effects of prolonged fasting on levels of metabolites, oxidative stress, immune-related gene expression, histopathology, and DNA damage in the liver and muscle tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 47(4), 1119–1132. doi: 10.1007/s10695-021-00949-2
- Kelley, K.M., Haigwood, J.T., Perez, M., Galima, M.M. (2001). Serum insulin-like growth factor binding proteins β / IGF-BPs as markers for anabolic/catabolic condition in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 129(2-3), 229-236. doi: 10.1016/s1096-4959(01)00314-1
- Kinkel, M.D., Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E. (2010). Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*. 42. doi: 10.3791/2126
- Kitagawa, A.T., Costa, L.S., Paulino, R.R., Luz, R.K., Rosa, P.V., Guerra-Santos, B., Fortes-Silva, R. (2015). Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). *Applied Animal Behaviour Science*. 171(5), 211–218. doi: 10.1016/j.applanim.2015.08.025
- Kobayashi, Y., Peterson, B.C., Waldbieser, G.C. (2008). Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) messenger RNA level, food intake, and growth in channel catfish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 151(2), 219–225. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.06.029
- Kocaman, N., Kuloğlu, T. (2020). Expression of asprosin in rat hepatic, renal, heart, gastric, testicular and brain tissues and its changes in a streptozotocin-induced diabetes mellitus model. *Tissue and Cell*. 66. doi: 10.1016/j.tice.2020.101397
- Komoike, Y., Matsuoka, M. (2016). Application of Zebrafish Model to Environmental Toxicology. *Department of Hygiene and Public Health, Tokyo Women's Medical University*. 71, 227–235. doi: 10.1265/jjh.71.227
- Lambert, J., Van der Hurk, R. (1983). Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Canadian Journal of Zoology*. 61(11), 2381–2387. doi: 10.1139/z83-317
- Langhans, W., Scharrer, E. (1992). Metabolic Control of Eating, Energy Expenditure and the Bioenergetics of Obesity. *World Review Nutritional Diet*. 70.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*. 269(1–4), 1–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077
- Lawrence, C. (2011). *The Reproductive Biology and Spawning of Zebrafish in Laboratory Settings*

- Li, E., Shan, H., Chen, L., Long, A., Zhang, Y., Liu, Y., Jia, L., Wei, F., Han, J., Li, T., Liu, X., Deng, H., Wang, Y. (2019). OLF734 Mediates Glucose Metabolism as a Receptor of Asprosin. *Cell Metabolism*. 30(2), 319-328.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.022
- Lieschke, G.J., Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*. 8(5), 353–367). doi: 10.1038/nrg2091
- Liew, H.J., Sinha, A.K., Mauro, N., Diricx, M., Blust, R., de Boeck, G. (2012). Fasting goldfish, *Carassius auratus*, and common carp, *Cyprinus carpio*, use different metabolic strategies when swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 163(3–4), 327–335. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.07.012
- Liew, W.C., Orbán, L. (2014). Zebrafish sex: A complicated affair. *Briefings in Functional Genomics*. 13(2), 172–187. doi: 10.1093/bfgp/elt041
- Liu, Y., Long, A., Chen, L., Jia, L., Wang, Y. (2020). The Asprosin–OLF734 module regulates appetitive behaviors. *Cell Discovery*. 6(1). doi: 10.1038/s41421-020-0152-4
- Lockie, S.H., Stark, R., Mequinion, M., Chang, S., Kong, D., Spanswick, D.C., Lawrence, A.J., Andrews, Z.B. (2018). Glucose availability predicts the feeding response to ghrelin in male mice, an effect dependent on AMPK in AgRP neurons. *Endocrine Society*. 7(4). doi: 10.1210/en.2018-00536/5092025
- Long, W., Xie, X., Du, C., Zhao, Y., Zhang, C., Zhan, D., Li, Z., Ning, Q., Luo, X. (2019). Decreased Circulating Levels of Asprosin in Obese Children. *Hormone Research in Paediatrics*. 24(4), 23-50. doi: 10.1159/000500523
- Lönnqvist, L., Reinhardt, D., Sakai, L., Peltonen, L. (1998). Evidence for furin-type activity-mediated C-terminal processing of profibrillin-1 and interference in the processing by certain mutations. *Human Molecular Genetics*. 7(13), 2039-2044. doi: 10.1093/hmg/7.13.2039
- López, M., Lelliott, C.J., Vidal-Puig, A. (2007). Hypothalamic fatty acid metabolism: A housekeeping pathway that regulates food intake. *BioEssays*. 29(3), 248–261. doi: 10.1002/bies.20539
- Luís, C., Fernandes, R., Soares, R., von Hafe, P. (2020). A state of the art review on the novel mediator asprosin in the metabolic syndrome. *Porto Biomedical Journal*. 5(6), e108. doi: 10.1097/j.pbj.000000000000108
- Luo, K.R., Chao, C.C., Hsieh, P.C., Lue, J.H., Hsieh, S.T. (2012). Effect of glycemic control on sudomotor denervation in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 35(3), 612–616. doi: 10.2337/dc11-1607
- Mazur-Bialy, A.I. (2021). Asprosin—a fasting-induced, glucogenic, and orexigenic adipokine as a new promising player. Will it be a new factor in the treatment of obesity, diabetes, or infertility? a review of the literature. *Nutrients*. 13(2), 1–10. doi: 10.3390/nu13020620
- McClure, M.M., McIntyre, P.B., McCune, A.R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*. 69(2), 553–570. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01125.x

- McMillan, S.C., Géraudie, J., Akimenko, M.A. (2015). Pectoral fin breeding tubercle clusters: A method to determine zebrafish sex. *Zebrafish*. 12(1), 121–123. doi: 10.1089/zeb.2014.1060
- Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*. 39(5), 759–775. doi: 10.1177/0192623311409597
- Meske, C.H., Woynarovichi, E., Kausch, H., Lohr, B., Szablewski, W. (1968). Hypophysierung von Aquarienkarpfen und kiinstliche Laicherbrfitung als Methode zur Zfichtung neuer Karpfenrassen* Hypophyseal Injections for Aquarium Carp and Artificial Spawning as a Method for Breeding new Races of Carp. *Theoretical and Applied Genetics*. 38(5).
- Meyer, B.M., Froehlich, J.M., Galt, N.J., Biga, P.R. (2012). *Inbred strains of zebrafish exhibit variation in growth performance and myostatin expression following fasting*. 13(2). doi: 10.1016/j.cbpa
- Mishra, I., Xie, W.R., Bournat, J.C., He, Y., Wang, C., Silva, E.S., Liu, H., Ku, Z., Chen, Y., Erokwu, B. O., Jia, P., Zhao, Z., An, Z., Flask, C.A., He, Y., Xu, Y., Chopra, A.R. (2021). Protein tyrosine phosphatase receptor δ serves as the orexigenic asprosin receptor. *Cell Metabolism*. 34(4), 549-563.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2022.02.012
- Mispeces (2022). Reportajes. Disponible en: <https://www.mispeces.com/reportajes/Pez-Cebra-un-animal-modelo-para-la-biomedicina-y-la-acuicultura/#.YkQO1udByUk> [Consulta: 18-03-2022].
- Montserrat, N., Gabillard, J.C., Capilla, E., Navarro, M.I., Gutiérrez, J. (2007). Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*. 150(3), 462–472. doi: 10.1016/j.ygcn.2006.11.009
- Morton, G.J., Meek, T.H., Schwartz, M.W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 15(6), 367–378). doi: 10.1038/nrn3745
- Muthu, M.L., Reinhardt, D.P. (2020). Fibrillin-1 and fibrillin-1-derived asprosin in adipose tissue function and metabolic disorders. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 14(2), 159–173). doi: 10.1007/s12079-020-00566-3
- National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., & Institute for Laboratory Animal Research (U.S.). (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.
- Novak, C.M., Jiang, X., Wang, C., Teske, J.A., Kotz, C.M., Levine, J.A. (2005). Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroscience Letters*. 383(1–2), 99–104. doi: 10.1016/j.neulet.2005.03.048
- Olson, B.D., Sgourdou, P., Downes, G.B. (2010). Analysis of a zebrafish behavioral mutant reveals a dominant mutation in *atp2a1/SERCA1*. *Genesis*. 48(6), 354–361. doi: 10.1002/dvg.20631

- Ovali, M.A., Bozgeyik, I. (2022). Asprosin, a C-Terminal Cleavage Product of Fibrillin 1 Encoded by the FBN1 Gene, in Health and Disease. *Molecular Syndromology*. doi: 10.1159/000520333
- Palstra, A.P., Tudorache, C., Rovira, M., Brittijn, S.A., Burgerhout, E., van den Thillart, G.E.E.J.M., Spaik, H.P., Planas, J.V. (2010). Establishing zebrafish as a novel exercise model: Swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression. *PLoS ONE*. 5(12). doi: 10.1371/journal.pone.0014483
- Park, I.S., Gil, H.W., Yoo, G.Y., Oh, J.S. (2015). Effects of Starvation in Rock Bream, *Oplegnathus fasciatus* and Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Development & Reproduction*. 19(2), 97–109. doi: 10.12717/dr.2015.19.2.097
- Passarge, E., Robinson, P.N., Graul-Neumann, L.M. (2016). Marfanoid-progeroid-lipodystrophy syndrome: A newly recognized fibrillinopathy. *European Journal of Human Genetics*. 24(9), 1244–1247. doi: 10.1038/ejhg.2016.6
- Peres, H., Santos, S., Oliva-Teles, A. (2014). Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 40(5), 1339–1347. doi: 10.1007/s10695-014-9928-5
- Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Hidalgo, M.C., García-Alcázar, A., Abellán, E., Morales, A.E. (2012). Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiology and Biochemistry*. 38(4), 1145–1157. doi: 10.1007/s10695-011-9600-2
- Polakof, S., Arjona, F.J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín Del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2006). Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 176(5), 441–452. doi: 10.1007/s00360-006-0065-z
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W. (2012). Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology*. 182(8), 1015–1045. doi: 10.1007/s00360-012-0658-7
- Poss, K. (2010). Cardiac Regeneration in the Zebrafish Model System. *Heart Development and Regeneration*. 34(8), 839–853. doi: 10.1016/B978-0-12-381332-9.00040-2
- Pottinger, T.G., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P. (2003). Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 136(6), 403–417. doi: 10.1016/S1096-4959(03)00212-4
- Power, D.M., Melo, J., Santos, C.R.A. (2000). The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology*. 56(2), 374–387. doi: 10.1006/jfbi.1999.1165
- Pritchard, V.L., Lawrence, J., Butlin, R.K., Krause, J. (2001). Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: The influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour*. 62(6), 1085–1088. doi: 10.1006/anbe.2001.1858

- Quint, W.H., Tadema, K.C.D., Crins, J.H.C., Kokke, N.C.C.J., Meester-Smoor, M.A., Willemsen, R., Klaver, C.C.W., Iglesias, A.I. (2022). Zebrafish: An In Vivo Screening Model to Study Ocular Phenotypes. *Translational Vision Science and Technology*. 11(3). doi: 10.1167/tvst.11.3.17
- Raby, L., Völkel, P., le Bourhis, X., Angrand, P.O. (2020). Genetic engineering of zebrafish in cancer research. *Cancers*. 12(8), 1–36. doi: 10.3390/cancers12082168
- Rial, R.V., Akaârir, M., Gamundí, A., Nicolau, C., Garau, C., Aparicio, S., Tejada, S., Gené, L., González, J., de Vera, L.M., Coenen, A.M.L., Barceló, P., Esteban, S. (2010). Evolution of wakefulness, sleep and hibernation: From reptiles to mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 34(8), 1144–1160. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.01.008
- Romere, C., Duerrschmid, C., Bournat, J., Constable, P., Jain, M., Xia, F., Saha, P.K., del Solar, M., Zhu, B., York, B., Sarkar, P., Rendon, D. A., Gaber, M.W., LeMaire, S.A., Coselli, J.S., Milewicz, D.M., Sutton, V.R., Butte, N.F., Moore, D.D., Chopra, A. R. (2016). Asprosina, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell*. 165(3), 566–579. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.063
- Rønnestad, I., Gomes, A.S., Murashita, K., Angotzi, R., Jönsson, E., Volkoff, H. (2017). Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Frontiers in Endocrinology*. 8(APR). doi: 10.3389/fendo.2017.00073
- Roscioli, T., Kamsteeg, E.J., Buysse, K., Maystadt, I., van Reeuwijk, J., van den Elzen, C., van Beusekom, E., Riemersma, M., Pfundt, R., Vissers, L.E.L.M., Schraders, M., Altunoglu, U., Buckley, M.F., Brunner, H.G., Grisart, B., Zhou, H., Veltman, J.A., Gilissen, C., Mancini, G.M. S., van Bokhoven, H. (2012). Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of α -dystroglycan. *Nature Genetics*. 44(5), 581–585. doi: 10.1038/ng.2253
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Láiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín Del Río, M.P., Mangera, J.M., Soengas, J.L. (2005). Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Journal of Experimental Zoology*. 303(9), 761–775. doi: 10.1002/jez.a.203
- Schrama, J.W., Saravanan, S., Geurden, I., Heinsbroek, L.T.N., Kaushik, S.J., Verreth, J.A.J. (2012). Dietary nutrient composition affects digestible energy utilisation for growth: A study on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a literature comparison across fish species. *British Journal of Nutrition*. 108(2), 277–289. doi: 10.1017/S0007114511005654
- Secor, S.M. (2001). Regulation of digestive performance: a proposed adaptive response. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 128(3), 565-577. doi: 10.1016/s1095-6433(00)00325-1
- Secor, S.M., Lignot, J.H. (2010). Morphological plasticity of vertebrate aestivation. *Progress in molecular and subcellular biology*. 49(2), 183–208. doi: 10.1007/978-3-642-02421-4_9
- Segner, H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149(2), 187–195. doi: 10.1016/j.cbpc.2008.10.099

- Sessa, A.K., White, R., Houvras, Y., Burke, C., Pugach, E., Baker, B., Gilbert, R., Look, A. T., Zon, L. I. (2008). The Effect of a Depth Gradient on the Mating Behavior, Oviposition Site Preference, and Embryo Production in the Zebrafish, *Danio rerio*. 5(4), 335-339. doi: 10.1089/zeb.2008.0535
- Simon, P. (2003). Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*. 19(11), 1439–1440. doi: 10.1093/bioinformatics/btg157
- Soengas, J., Strong, E., Fuentes, J., Veira, J. (1996). Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*. 15(6). doi: 499-511 10.1007/BF01874923
- Soengas, J. (2021). Integration of Nutrient Sensing in Fish Hypothalamus. *Frontiers in Neuroscience*. 15. doi: 10.3389/fnins.2021.653928
- Spence, R., Fatema, M.K., Reichard, M., Huq, K.A., Wahab, M.A., Ahmed, Z.F., Smith, C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*. 69(5), 1435–1448. doi: 10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x
- Spence, R., Fatema, M.K., Ellis, S., Ahmed, Z.F., Smith, C. (2007). Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*. 71(1), 304–309. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 83(1), 13–34. doi: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x
- Steffens, W. (1987). *Principios fundamentales de la alimentación en peces*.
- Steimberg, C. (2018). Diets and digestive tracts-your food determines your intestine. *Aquatic Animal Nutrition*. 1(1), 9–59. Cham: Springer.
- Striberny, A., Jørgensen, E.H. (2017). Feedback from Arctic charr: Feed flavour stimulation and re-feeding after feed deprivation stimulate genes encoding both orexigenic and anorexigenic neuropeptides. *General and Comparative Endocrinology*. 246, 71–80. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.03.012
- Sundin, J., Morgan, R., Finnøen, M.H., Dey, A., Sarkar, K., Jutfelt, F. (2019). On the Observation of Wild Zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*. 16(6), 546–553. doi: 10.1089/zeb.2019.1778
- Takenouchi, T., Hida, M., Sakamoto, Y., Torii, C., Kosaki, R., Takahashi, T., Kosaki, K. (2013). Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. *American Journal of Medical Genetics*. 161(12), 3057–3062. doi: 10.1002/ajmg.a.36157
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., Zhou, Z. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*. 9(3), 68–77. doi: 10.1093/af/vfz020
- Tsang, B., Zahid, H., Ansari, R., Lee, R.C.Y., Partap, A., Gerlai, R. (2017). Breeding zebrafish: a review of different methods and a discussion on standardization. *Zebrafish*. 14(6), 561–573. doi: 10.1089/zeb.2017.1477

- Ugur, K., Aydin, S. (2019). Saliva and blood asprosin hormone concentration associated with obesity. *International Journal of Endocrinology*. 7(5), 12-35. doi: 10.1155/2019/2521096
- Van de Pol, I., Flik, G., Gorissen, M. (2017). Comparative physiology of energy metabolism: Fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. *Frontiers in Endocrinology*. 8(MAR). doi: 10.3389/fendo.2017.00036
- Varga, Z. M., Ekker, S. C., & Lawrence, C. (2018). Workshop Report: Zebrafish and Other Fish Models - Description of Extrinsic Environmental Factors for Rigorous Experiments and Reproducible Results. *Zebrafish*, 15(6), 533–535. doi: 10.1089/zeb.2018.29006.zol
- Volkoff, H., Rønnestad, I. (2020). Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature*. 7(4), 307–320. doi: 10.1080/23328940.2020.1765950
- Wang, Y., Qu, H., Xiong, X., Qiu, Y., Liao, Y., Chen, Y., Zheng, Y., Zheng, H. (2018). Plasma asprosin concentrations are increased in individuals with glucose dysregulation and correlated with insulin resistance and first-phase insulin secretion. *Mediators of Inflammation*. 18. doi: 10.1155/2018/9471583
- Wang, C.Y., Lin, T.A., Liu, K.H., Liao, C.H., Liu, Y.Y., Wu, V.C.C., Wen, M.S., Yeh, T.S. (2019). Serum asprosin levels and bariatric surgery outcomes in obese adults. *International Journal of Obesity*. 43(5), 1019–1025. doi: 10.1038/s41366-018-0248-1
- Wiecek, M., Szymura, J., Maciejczyk, M., Kantorowicz, M., Szygula, Z. (2018). Acute anaerobic exercise affects the secretion of asprosin, irisin, and other cytokines - A comparison between sexes. *Frontiers in Physiology*. 9. doi: 10.3389/fphys.2018.01782
- Wolman, M., Granato, M. (2012). Behavioral genetics in larval zebrafish: Learning from the young. *Developmental Neurobiology*. 72(3), 366–372. doi: 10.1002/dneu.20872
- Won, E.T., Borski, R.J. (2013). Endocrine regulation of compensatory growth in fish. In *Frontiers Endocrinology*. 4(JUL). doi: 10.3389/fendo.2013.00074
- Woods, S.C., Begg, D.P. (2016). Regulation of the motivation to eat. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 27, 15–34. doi: 10.1007/7854_2015_381
- Yan, P., Jia, J., Yang, G., Wang, D., Sun, C., Li, W. (2017). Duplication of neuropeptide Y and peptide YY in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and their roles in food intake regulation. *Peptides*. 88, 97–105. doi: 10.1016/j.peptides.2016.12.010
- Yang, M., Zhang, Z., Wang, C., Li, K., Li, S., Boden, G., Li, N., Yang, G. (2012). Nesfatin-1 action in the brain increases insulin sensitivity through Akt/AMPK/TORC2 pathway in diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 61(8), 1959–1968. doi: 10.2337/db11-1755
- Yang, Y., Zhou, H., Shu, H., Zhong, D., Zhang, M., Xia, J.H. (2019). Effect of fasting and subsequent refeeding on the transcriptional profiles of brain in juvenile *Spinibarbus hollandi*. *PLoS ONE*, 14(3). doi: 10.1371/journal.pone.0214589
- Yokobori, E., Azuma, M., Nishiguchi, R., Kang, K.S., Kamijo, M., Uchiyama, M., Matsuda, K. (2012). Neuropeptide Y Stimulates Food Intake in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Neuroendocrinology*. 24(5), 766–773. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02281.x

- Yuan, M., Li, W., Zhu, Y., Yu, B., Wu, J. (2020). Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases. *Frontiers in Endocrinology*. 11. doi: 10.3389/fendo.2020.00064
- Zammit, V.A., Newsholme, E.A. (1979). Activities of Enzymes of Fat and Ketone-Body Metabolism and Effects of Starvation on Blood Concentrations of Glucose and Fat Fuels in Teleost and Elasmobranch Fish. *Biochemistry*. 184. 10.1042/bj1840313
- Zhang, X., Jiang, H., Ma, X., Wu, H. (2020). Increased serum level and impaired response to glucose fluctuation of asprosin is associated with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*. 11(2), 349–355. doi: 10.1111/jdi.13148
- Zhang, Y., Zhu, Z., Zhai, W., Bi, Y., Yin, Y., Zhang, W. (2021). Expression and purification of asprosin in *Pichia pastoris* and investigation of its increase glucose uptake activity in skeletal muscle through activation of AMPK. *Enzyme and Microbial Technology*. 144. doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109737