



**Universidad
Andrés Bello**

Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

“Estudio *in vivo* del efecto de dexametasona sobre la vía de crecimiento IGF-I/AKT/TOR y atrofia del músculo esquelético en el lenguado fino (*Paralichthys adspersus*)”

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al
Grado de Magíster en Biotecnología.

Director de Tesis: Dr. Alfredo Molina
Facultad Ciencias Biológicas
Universidad Nacional Andrés Bello

Co-Director: Dr. Cristián Valenzuela
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional Andrés Bello

Marcia Carolina Fuentes Valenzuela

Santiago, Chile. Enero, 2018.



Universidad
Andrés Bello

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias Biológicas
Ingeniería en Biotecnología

" Estudio *in vivo* del efecto de dexametasona sobre la vía de crecimiento IGF-I/AKT/TOR y atrofia del músculo esquelético en el lenguado fino (*Paralichthys adspersus*)"

MARCIA CAROLINA FUENTES VALENZUELA

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Alfredo Molina Sirguiado, en el laboratorio de Biotecnología Molecular, Universidad Nacional Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dr. Alfredo Molina Sirguiado
Director de Tesis

Dr. Cristian Valenzuela Ibarra
Co-Director de Tesis

Dr. Claudio Cabello Verrugio
Comisión de Tesis

Dr. Ariel Reyes Zambrano
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE

Año 2018

*A los ángeles que
nos guían desde el cielo...*

Agradecimientos

Primero dar las gracias al Dr. Alfredo Molina por la oportunidad de incorporarme a su laboratorio y grupo de investigación para el desarrollo de mi tesis de pregrado y magister. A los fondos que financiaron mi investigación, el proyecto FONDECYT regular N°1130545 y el proyecto FONDAP INCAR 15110027.

A mi co-tutor Dr. Cristian Valenzuela, por aceptarme como su primera alumna tesista, por todos los comentarios críticos e infaltables ayudas realizadas en este largo proceso. Gracias por todas las monsters que compartimos.

A mi grupo de laboratorio: Rodrigo, Jorge, Carolina, Joaquín, Claudio, por las innumerables horas que pasamos juntos, los almuerzos compartidos y las rabias que pasamos día a día, por sobre todo a Polett que me soporta todos los días en el mismo puesto de trabajo y sabemos que no es fácil.

A mi actual jefe Dr. Juan Antonio Valdés quien siempre nos ha brindado todo el apoyo y las herramientas en nuestro camino académico.

A mis compañeras de Universidad Maite, Sandra, Debi, Tabita y Daniela por todas las noches de estudio, informes, trabajos y noches sociales que compartimos que hacían más ameno el día a día universitario.

A mis infaltables amigas Emma y Pola, por estar siempre a mi lado, compartir mis mejores y peores momentos, las interminables conversaciones de la vida, gracias por todo lo que me han brindado.

A quien en este último tiempo se convirtió en mi partners Maxi, quien ha soportado mis peores momentos de estrés frente a mi tesis y ha tenido la paciencia de acompañarme siempre. Gracias.

Finalmente quiero agradecer a las personas más importantes en mi vida, mi familia.

Soy la persona más afortunada en tener dos mamás Marcia y Viviana que me han entregado el cariño, la paciencia, los valores y el amor durante todos estos años, sin sus consejos, enseñanzas y retos no sería la persona que soy hoy en día. Gracias a mi Tata quien ha sido el mejor papá, por defenderme cada vez que me retan y por consentirme siempre. Y a mi tía Maritza por su apoyo incondicional durante todo este tiempo. Gracias por todos los esfuerzos realizados para que yo pudiera estudiar y ser una profesional

A mi tía Bea, tío Moises y Dennis por estar siempre conmigo y darme todo el apoyo necesario en la universidad.

Y a mi tía Karina y Tío Richard, por estar siempre para mí y entregarme lo más lindo que tengo que son mis sobrinos favoritos mi Cata y Benja que alegran mis días, los hacen más dulces y felices.

Gracias familia por ser el mayor apoyo, en toda esta etapa, esta tesis va dedicada a todos ustedes.

Indice

1.-Resumen	11
2.-Introducción.....	12
2.1.- Acuicultura en Chile.....	12
2.2.-Crecimiento del músculo esquelético: sistema endocrino	13
2.3.-Mecanismos de atrofia muscular.....	14
2.4 Estrés, corticosteroides y su implicancia en el músculo esquelético.	17
2.5.- Estrés y atrofia muscular.	19
2.6.- Estrés mediado por glucocorticoides sintéticos (Dexametasona).....	23
3.-Hipótesis	26
4.-Objetivo General	26
4.1.-Objetivos Específicos	26
1.- Evaluar el efecto de dexametasona en los niveles de transcrito de los receptores de corticosteroides y sus genes blanco.	26
5.-Materiales y Métodos.	27
5.1.-Animales y mantención	27
5.2.- Estrategia experimental para inducción del estrés farmacológico.....	27
5.3.-Muestreo del tejido muscular y plasma	28
5.4.-Medición niveles de cortisol plasmático.....	29
5.5.-Medición niveles de glucosa plasmática.....	29
5.6.-Extracción de RNA y síntesis de cDNA	29
5.7.-Diseño y evaluación de partidores.....	30
5.8.- PCR en tiempo real	31
5.9 Extracción y cuantificación de proteínas.....	33
5.10.-Western blot	33
5.11.-Cortes Histológicos.....	34
5.12.-Tinción hematoxilina eosina	35
5.13.-Medición del área de la fibra muscular	35
5.14.- Análisis Estadístico.....	35
6.- Resultados	36
6.1.-Efecto de la administración de dexametasona y mifepristona sobre los niveles de cortisol y glucosa en el plasma del lenguado fino.....	36
6.3.-Análisis de los receptores de corticosteroides y sus genes blanco <i>redd1</i> y <i>klf15</i>	38

6.4.-Efecto del tratamiento farmacológico sobre la activación de la vía IGF-I/Akt/TOR.....	42
6.5.-Efecto del estrés farmacológico sobre el sistema ubiquitin/proteosoma.	44
6.6.-Efecto del estrés farmacológico sobre el sistema autofagia/lisosoma.....	46
6.7.-Efecto del estrés farmacológico sobre el tamaño de las fibras musculares ...	48
7.-Discusión	50
7.1.-Efecto del estrés farmacológico sobre los niveles plasmáticos de cortisol y glucosa.	50
7.2.-Evaluar el efecto del estrés farmacológico sobre los niveles de transcrito de los receptores de corticosteroides y sus genes blanco.	52
7.3.-Efecto del estrés farmacológico sobre la vía de crecimiento en músculo de lenguado fino.	53
7.4.-Efecto del estrés farmacológico sobre los mecanismos de atrofia muscular..	54
8.-Conclusiones.	57
9.-Proyecciones	58
10.- Modelo representativo propuesto en este estudio.	59
11.-Bibliografía.....	60
12.-Anexo.....	74

Indice de tablas y figuras

- Figura 1:** Vía de señalización de IGF I “Hipertrofia” y sistema de atrofia muscular, mediada por IGF-I.
- Figura 2:** Sistema de atrofia muscular inducido por glucocorticoides.
- Figura 3:** Red secundaria que activa la atrofia muscular por glucocorticoides.
- Figura 4:** Niveles de cortisol y glucosa en el plasma de peces tratados con glucocorticoides sintéticos.
- Figura 5:** Perfil de expresión de los receptores de corticosteroides y contenido proteico de GR2 en el músculo esquelético en Lenguados Finos tratados farmacológicamente.
- Figura 6:** Perfil de expresión de genes blancos de Grs: *klf15* y *redd1*
- Figura 7:** Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre la vía de crecimiento IGF-1/AKT/TOR.
- Figura 8:** Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre el sistema ubiquitin/proteosoma.
- Figura 9:** Efecto del estrés farmacológico sobre el sistema autofagia/lisosoma.
- Figura 10:** Área fibra muscular de Lenguados finos tratados con glucocorticoides sintético.
- Figura 11:** Mecanismo de acción de respuesta al estrés en peces tratados con mifepristona.

Tabla 1: Partidores utilizados en esta Tesis.

Tabla 2: Lista de anticuerpos utilizados para Western blot en esta tesis.

Abreviaciones

Akt	Protein kinase B (PKB)
Atrogin1	Muscle atrophy F-box protein (MAFBx)
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
cDNA	DNA complementario
CIMARQ	Centro de investigaciones marinas de Quintay
CRs	Receptores de corticosteroides
Dex	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FOXO1	Forkhead box O1
FOXO3	Forkhead box O3
GC	Glucocorticoides
GH	Growth hormone
GHR	Growth hormone receptor
GR	Receptor de glucocorticoide
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGF-IR	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
KLF15	Krüppel-like factor 15
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
MC	Mineralocorticoide
Mif	Mifepristona
MR	Receptor de mineralocorticoide
mTOR	Target of rapamicyn
MuRF1	Muscle-specific RING finger-1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nGRE	Elemento negativos de respuesta a glucocorticoides
OCT	Optimum cutting temperature
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
qPCR	Quantitative or real time PCR
REDD1	Regulated in development and DNA damage responses 1
RNA	Ácido desoxirribonucleico

1.-Resumen

El lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*) es un pez endémico de gran potencial económico, debido a su carne blanca, de textura firme y baja en ácidos grasos, lo cual lo convierte en un fuerte candidato para la diversificación de la acuicultura chilena. Desfavorablemente, las condiciones y rutinas de cultivo actuales, conllevan a una situación de estrés provocando una lenta tasa de crecimiento de las especies cultivadas. En mamíferos la respuesta a estrés es mediada por glucocorticoides, los cuales al unirse a sus receptores intracelulares de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) disparan una cascada de señalización. Sin embargo en vertebrados inferiores este proceso no ha sido descrito en detalle. Con el objetivo de “Estudiar *in vivo* el efecto de dexametasona unida a los receptores de glucocorticoides sobre la vía de crecimiento de IGF-I/AKT/TOR y los mecanismos de atrofia muscular en lenguado fino”, siendo Dexametasona (DEX) un glucocorticoide sintético se diseñó un ensayo *in vivo* con leguados juveniles, a los cuales se les administró una dosis de Dex en presencia y ausencia de Mifepristona (Mif; un antagonista de los GRs), analizando los niveles de transcrito y de proteínas de los componentes de la vía de crecimiento IGF-I/AKT/TOR y de moléculas clave involucradas en la atrofia del músculo esquelético luego de 72 horas post administración con cada fármaco. Los individuos tratados con Dex no mostraron resultados concluyentes sobre las vías de crecimiento y atrofia muscular, sin embargo, los individuos tratados con Mif aumentaron los niveles de expresión de los genes involucrados en estas vías. Lo cual sugiere que el bloqueo de GR inducido por Mif podría estar favoreciendo la interacción de glucocorticoides con MR y desencadenando la activación de vías de crecimiento y atrofia en el músculo esquelético de peces. Por último, los MR pasarían a formar un nuevo punto de interés, presentando nuevas interrogantes y posibles soluciones para enfrentar el proceso de estrés en la acuicultura chilena.

2.-Introducción

2.1.- Acuicultura en Chile

La acuicultura Chilena ha mostrado un alto crecimiento en su producción en los últimos años, generando el 1,7% de la producción de piscicultura alimentaria mundial (FAO 2016). Chile se posiciona como el segundo productor mas importante a nivel mundial de salmónidos con un 31% de la producción anual mundial (FAO, 2014). A pesar del fuerte crecimiento en la producción de salmónidos, este se ha visto afectado por diferentes brotes de enfermedades, lo que ha golpeado fuertemente la producción en el periodo 2009-2010 y nuevamente durante su proceso de recuperación y expansión en el periodo de producción 2011-2012 (FAO 2016). Esto demuestra la clara necesidad de diversificar la acuicultura chilena, con el fin de disminuir la dependencia a la salmonicultura y consolidar la industria a nivel mundial. Invertir en el desarrollo de nuevas tecnologías para el cultivo de especies nativos constituye una excelente opción para la diversificación del sector.

En este contexto, la diversificación se ha centrado en la producción de moluscos (principalmente mejillones) y peces de agua dulce, todas especies cuya producción está dirigida principalmente a los mercados de exportación (FAO 2014). Una de las especies con mayor potencial para la diversificación, es el lenguado fino (*Paralichthys adspersus*), una especie endémica que se distribuye en las costas del Pacífico Sur- Oriental (Alvial y Manríquez, 1999; Silva y Oliva, 2010). Este pez plano presenta un gran potencial comercial debido a que es altamente cotizado en el mercado por poseer un filete de textura firme y blanco, con un alto contenido en proteínas y bajo en ácidos grasos (Alvial y Manríquez, 1999; Fuentes *et al.* 2012). A diferencia de otros vertebrados, el músculo esquelético en peces representa casi un 50% de su masa corporal, llegando a alcanzar en algunas especies hasta un 70% (Johnston, 1982). Esto se debe a que en los peces existe formación de nuevas fibras musculares continuamente hasta su edad adulta, presentando un crecimiento continuo durante todo su ciclo de vida, a diferencia de los mamíferos y aves en donde su crecimiento se detiene poco después de su nacimiento (Rowlerson y Veggetti, 2001).

El crecimiento muscular en peces se ve mediado por dos mecanismos: la hipertrofia, que involucra el aumento de tamaño de las fibras musculares preexistentes; y la hiperplasia, que es el reclutamiento de nuevas fibras (Weatherley y Gill 1985; Higgins y Thorpe, 1990). Es por estas características y dinámica de crecimiento, que los peces se presentan como un modelo único para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento del músculo esquelético.

2.2.-Crecimiento del músculo esquelético: sistema endocrino

El desarrollo del músculo esquelético es regulado por el sistema endocrino. El principal eje regulador corresponde al sistema hormona de crecimiento/factor de crecimiento tipo insulina 1 (GH/IGF-I) (Wood *et al.* 2005). La acción de GH se inicia cuando se une a su receptor de membrana (receptor de la hormona de crecimiento (GHR)), provocando la activación de moléculas río abajo, las cuales inducen la expresión, síntesis y secreción de IGF-I (Davey *et al.* 2001). Además, GH tiene un efecto en el músculo esquelético, uniéndose a su receptor y activando la vía JAK2/STAT5 (Janus Kinasa 2/Signal transducer and activator of transcription 5), promoviendo la síntesis y secreción de IGF-I. Este último posee una actividad autocrina-paracrina, siendo considerado como el principal promotor del crecimiento del músculo esquelético (Yakar *et al.* 1999; Fuentes *et al.* 2012a).

En mamíferos, el factor de crecimiento IGF induce diversas respuestas celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, migración, y supervivencia celular (Duan *et al.* 2010). Además, IGF-I ejerce estas acciones biológicas principalmente a través de la unión y la activación del receptor de IGF de tipo I (IGF-IR). La unión del IGF-IR/ligando induce su autofosforilación, activando múltiples cascadas de fosforilaciones que involucran segundos mensajeros, como la activación por mitógenos de la vía de señalización de proteínas kinasas (MAPK) y la activación de la vía de transducción de señales fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (AKT) (Wood *et al.* 2005).

La segunda vía corresponde a PI3K/AKT/TOR (TOR del inglés target of rapamicin), La activación de esta vía conduce a la síntesis de proteínas, produciéndose la hipertrofia en células musculares (Egerman y Glass, 2014). Específicamente, AKT fosforilada conduce a la activación de TOR, una

serina/treonina quinasa que estimula la síntesis proteica, regulando río abajo la fosforilación de p70S6K y 4EBP1, moléculas implicadas en el inicio de la traducción y en la etapa de elongación de la cadena polipeptídica (Glass *et al.* 2010). Por lo tanto, todas estas moléculas se encuentran regulando el mantenimiento de la masa muscular. Se ha demostrado que IGF-I influencia de manera positiva la regulación de la masa muscular y el tamaño de las fibras musculares a través de la síntesis de proteínas (Escobar *et al.* 2011). Sin embargo, el crecimiento muscular esquelético es un proceso dinámico controlado por el balance entre la síntesis y la degradación de proteínas (McCarthy y Esser, 2010).

2.3.-Mecanismos de atrofia muscular

El proceso gatillado por un aumento en la tasa de degradación de proteínas y/o una disminución en la síntesis de estas, es conocido como atrofia muscular (Glass, 2003). La atrofia muscular es un mecanismo que conlleva a la disminución, tanto en el diámetro de las fibras musculares, como en la generación de fuerza y la resistencia a la fatiga (Higashino *et al.* 2013). Este mecanismo se encuentra principalmente mediado por dos vías altamente conservadas; la vía ubiquitin/proteosoma y la vía de la autofagia/lisosoma (Mammucari *et al.* 2007; Sandri *et al.* 2004). Al activarse la vía de IGF-I, AKT bloquea los factores de transcripción FOXOs (Sandri *et al.* 2004) mediante la fosforilación de uno de sus residuos conservados, impidiendo su acción sobre sus genes blancos (Brunet *et al.* 1997). Cuando los factores FOXOs no se encuentran fosforilados, estos translocan al núcleo promoviendo la inhibición del crecimiento o la apoptosis (Ramaswamy *et al.* 2002). Además, los factores FOXOs desfosforilados inducen la expresión de dos atrogenes llamados *murf1* (muscle ring - finger protein 1) y *atrogen1* (Muscle Atrophy F-box (MAFbx)) que codifican ubiquitin E3 ligasas, responsables de la degradación proteica a través del sistema ubiquitin/proteosoma (Sandri *et al.* 2004). En el lenguaje fino en periodos de estrés se ha detectado la regulación positiva de *atrogen1* y *murf1* (Fuentes *et al.* 2012) (**Fig.1**).

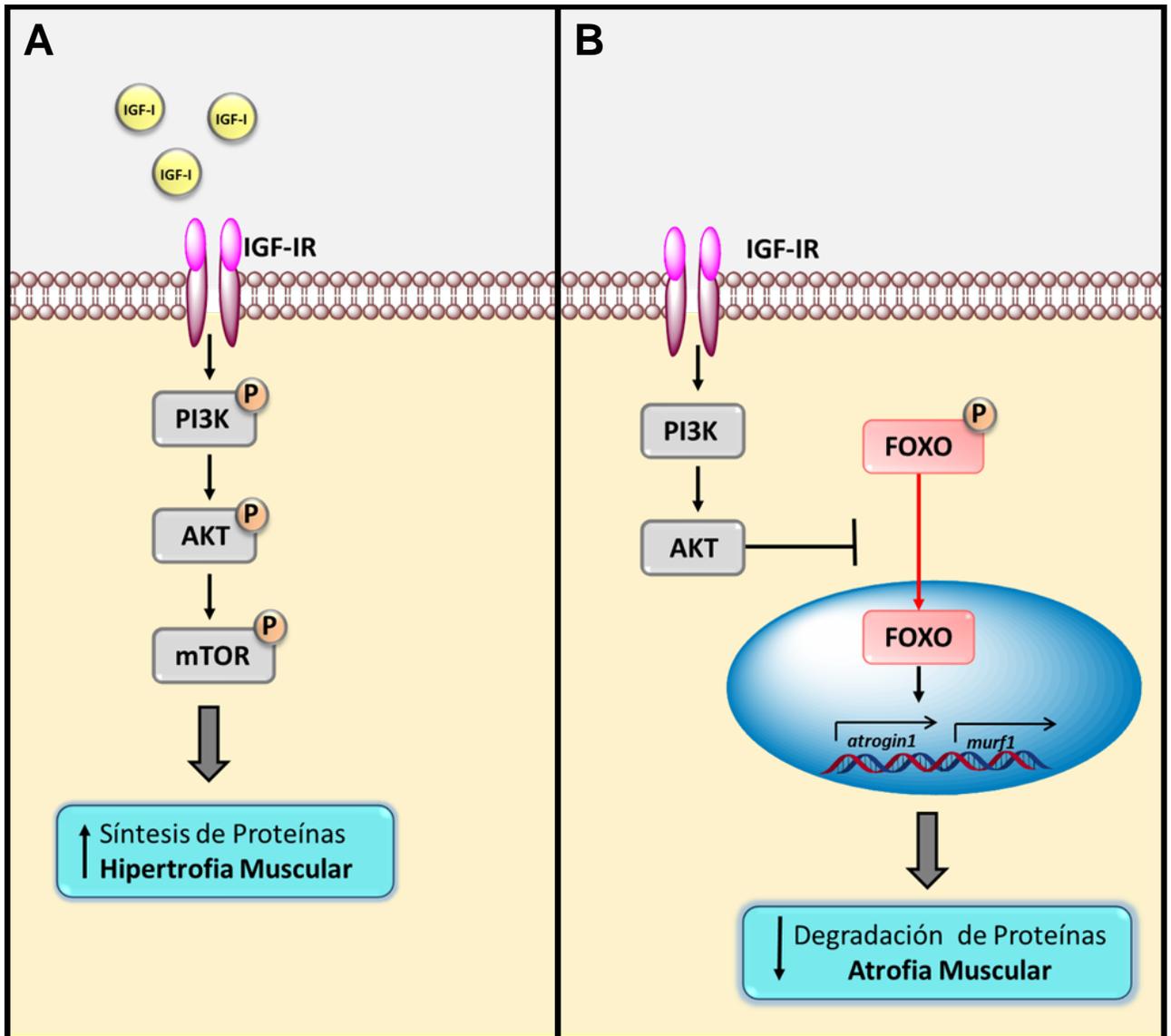


Figura 1: Vía de señalización de IGF I “Hipertrofia” y sistema de atrofia muscular, mediada por IGF-I.

A). Eje IGF-I/AKT/TOR, la vía se encuentra activada por lo tanto se desencadena la traducción y síntesis de proteínas desencadenando la Hipertrofia. B) Activación de los factores FOXOs /atrogen1 / murf1 que desencadena la degradación de proteínas mediante el sistema ubiquitin/proteosoma desencadenando la atrofia muscular. Modificado desde Glass *et al.* 2003.

Otro mecanismo involucrado en promover la atrofia muscular es la autofagia, fenómeno que se activa por el agotamiento de los nutrientes o la falta de factores de crecimiento (Lum *et al.* 2005). La vía autofagia/lisosoma implica la formación de una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma, que cumple un rol crucial en el recambio de los componentes celulares, contribuyendo de forma directa a la degradación proteica mediante la activación de un complejo regulatorio (Levine 2011). Una de las principales proteínas involucradas es la proteína de cadena ligera asociada a los microtúbulos 3 (LC3), la cual está involucrada en la formación del fagosoma (Furuno *et al.* 1990; Sandri *et al.* 2013). Otra molécula fundamental en el proceso de autofagia es BNIP3 (BCL2/adenovirus e1B 19-kDa protein-interacting protein 3), la cual está directamente relacionada con la activación de la autofagia dirigida o también llamada autofagia específica (Sandri *et al.* 2013).

Los factores de transcripción FOXOs desempeñan un papel importante en la activación del sistema ubiquitin/proteosoma, sin embargo, estos se encuentran también implicados en la activación del sistema autofagia /lisosoma, donde FOXO3 regula la expresión de los genes autofágicos *lc3* y *bnip3*. Esto sugiere que FOXO3 controla las dos principales vías catabólicas celulares existentes, la vía ubiquitin/proteosoma y la vía de la autofagia/lisosoma, de manera independiente (Sandri *et al.* 2004; Mammucari *et al.* 2007).

En peces, al igual que en mamíferos, IGF-I induce la fosforilación de los factores de transcripción FOXOs, los cuales se encuentran en su forma inactivada, por lo cual no promueven la formación del sistema ubiquitin/proteosoma y la posterior degradación de proteínas (Seilliez *et al.* 2010). En el lenguado fino, la deficiencia basal de IGF- I en el músculo esquelético produce una alta expresión de *atrogen1* y *murf1*, afectando el crecimiento somático (Fuentes *et al.* 2012b). Además, en los últimos años se ha evidenciado que el proceso autofágico en el músculo esquelético de peces cumple un rol fundamental en la degradación de proteínas y, por lo tanto, en la generación de nutrientes a partir de componentes celulares, cuando el organismo se ve enfrentado a condiciones de inanición (Valenzuela *et al.* 2015). El crecimiento muscular es dinámico y es altamente afectado por diversos factores como enfermedades, estrés, entre otros (Gordon *et al.* 2013).

El estrés es uno de los principales factores que afecta directamente el crecimiento muscular, este implica un amplio rango de situaciones en las que el individuo se ve sometido o desafiado a situaciones adversas. De esta manera se desencadena el desequilibrio en los procesos de síntesis y degradación de proteínas, promoviendo la atrofia muscular.

2.4 Estrés, corticosteroides y su implicancia en el músculo esquelético.

La pérdida excesiva de masa muscular o atrofia muscular, mayoritariamente se ve asociada a enfermedades, miopatías, distrofias musculares, sepsis, caquexia entre otras (Gordon *et al.* 2013). Durante la atrofia muscular, los sistemas proteolíticos se activan y las proteínas contráctiles son degradados (Schiaffino *et al.* 2013). Uno de los principales factores que afecta al músculo, promoviendo la atrofia es el estrés, el cual modula diversos mecanismos fisiológicos, los cuales incluyen cambios a niveles genéticos, proteicos, metabólicos, energéticos, inmunológicos, endocrinos, nerviosos e incluso cambios de comportamiento, con el fin de superar la situación adversa y luego compensar los desequilibrios producidos por el estrés (Tort, 2011). La respuesta al estrés se desarrolla en tres etapas: 1) la respuesta primaria se inicia cuando el estresor es censado por el sistema nervioso central, desencadenándose una serie de señales que finaliza con la secreción de hormonas., 2) la respuesta secundaria se inicia cuando la hormona se une a su receptor desencadenando la expresión de diversos genes. Finalmente, 3) la respuesta terciaria es desarrollada por una acumulación de la respuesta secundaria, lo que conlleva a cambios fenotípicos (Barton, 2002).

En mamíferos, una de las respuestas que se desencadena en este proceso es la liberación de corticosteroides, hormonas esteroidales, que son los principales moduladores del estrés. Los corticosteroides son liberados por la corteza suprarrenal y su concentración plasmática es controlada por el eje hipotálamo- hipófisis-glándula suprarrenal y se pueden clasificar en glucocorticoides (GC) y mineralocorticoides (MC) (Rhen y Cidlowski, 2005). Los GC sintetizados en la corteza suprarrenal juegan un papel importante en la adaptación y mantenimiento de la homeostasis interna del organismo. El GC activo más abundante es el cortisol, el cual afecta a casi todos los sistemas fisiológicos en el organismo (Charmandari *et al.* 2005). Su respuesta es

mediada por los receptores de glucocorticoides (GR), que se localizan predominantemente en el citoplasma en estado inactivo formando un complejo con proteínas chaperonas como HSP90 y HSP70, co-chaperonas como HOP y otras proteínas involucradas en su conformación (Tissing *et al.*, 2005).

Este receptor al disociarse del complejo de proteínas chaperonas se une a su ligando y transloca al núcleo de forma activa, induciendo o reprimiendo la transcripción de genes. (Kumar y Calhoun, 2008). Por otra parte, el principal MC es la aldosterona la cual tiene la capacidad de unirse a los receptores de mineralocorticoides (MR) (Charmandari *et al.* 2005). Los MRs en ausencia de su ligando, se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma, y al unirse a su ligando este transloca al núcleo promoviendo la expresión de diferentes genes (Pearce *et al.* 2002).

Por otra parte, la respuesta a estrés en peces, está mediada por la captación de señales en el hipotálamo, lo que desata la secreción del factor liberador de corticosteroides, este factor se une a su receptor en la adenohipófisis provocando la liberación de ACTH (Hormona adrenocorticotrópica), la cual estimula la secreción de corticosteroides por el riñón anterior (Alsop y Vijayan, 2009). Bajo condiciones de estrés, el cortisol es la principal hormona corticosteroide secretada en peces, jugando un papel clave en la adaptación en los cambios fisiológicos producidos por el estrés (Mommsen *et al.* 1999).

En peces, el cortisol regula diversas funciones fisiológicas como el metabolismo de los carbohidratos, el intercambio osmótico, y cambios en el sistema inmunológico. El cortisol actúa como glucocorticoide y como mineralocorticoide, debido a que los peces carecen de aldosterona sintetasa, enzima clave en la síntesis de aldosterona (Bury y Sturm 2007; Jiang *et al.* 1998; Mommsen *et al.* 1999). La acción del cortisol en peces es mediada a través de los receptores de corticosteroides (CRs), donde se han descrito dos tipos de GR (Para el cual existen dos formas GR1 y GR2) y MR (Kim *et al.*, 2011; Valenzuela *et al.* 2015). La intensidad de la acción de los CRs depende tanto de la magnitud como la duración del agente estresor (Tort, 2011). En peces, existen dos genes que codifican para GR, lo que se explica por un evento de duplicación completo del genoma ocurrido durante la evolución hace 350-400 millones de años (Bury y Sturm, 2007; Kim *et al.*

2011). La conservación de estos genes duplicados en diferentes peces, sugiere que no son redundantes, adquiriendo distintas funciones. Es por esto, que los distintos GR han mostrado diferencias significativas en la expresión de diferentes tejidos y sensibilidad al cortisol, presentando GR1 una mayor afinidad a éste (Greenwood *et al.* 2003; Teles, 2013). Como antes ya mencionamos los peces no producen aldosterona, sin embargo, los peces expresan GR y MR, donde el cortisol actúa como ligando para ambos receptores (Greenwood *et al.* 2003).

2.5.- Estrés y atrofia muscular.

El efecto de los glucocorticoides sobre la atrofia muscular se ha descrito detalladamente en mamíferos. Estas hormonas, una vez liberadas promueven la degradación de proteínas mediante el sistema ubiquitin/proteosoma, directamente a través de la expresión de dos atrogenes: *murf1* y *atrogen1*, los cuales a su vez son regulados por los factores de transcripción FOXOs (Lang *et al.* 2007; Sandri *et al.* 2004; Stitt *et al.* 2004). La interacción GC/GR puede promover la expresión y activación de FOXO1 y FOXO3 desencadenando la translocación al núcleo de estos factores y la posterior expresión de los atrogenes (Sanchez *et al.* 2014). Además, FOXO3 estimula la proteólisis lisosomal mediante la inducción de la autofagia, regulando de manera positiva la expresión de *lc3* y *bnip3*, moléculas fundamentales para que el proceso autofágico se lleve a cabo (Cheema *et al.* 2012; Mammucari *et al.* 2007) (**Fig.2**).

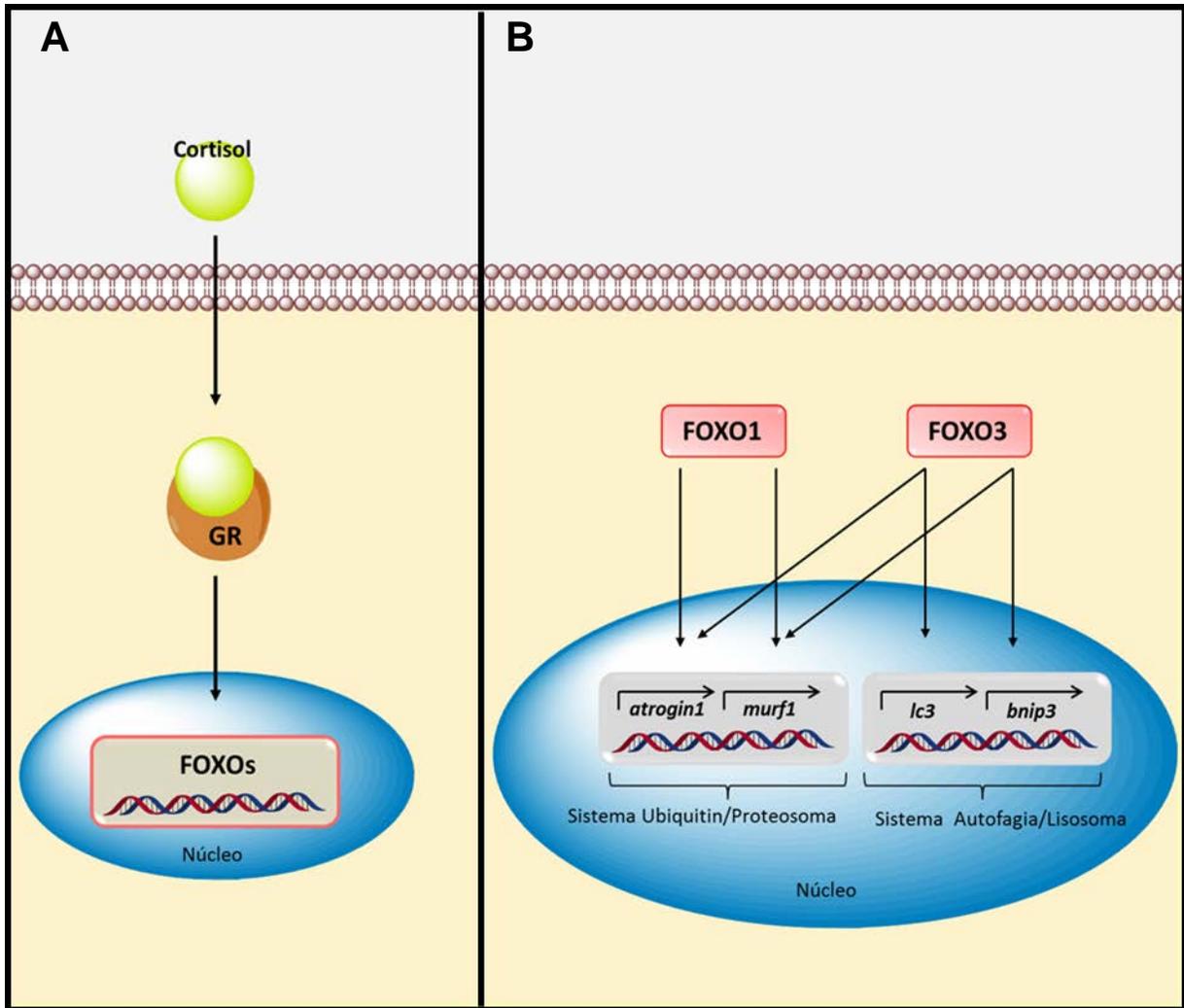


Figura 2: Sistema de atrofia muscular inducido por glucocorticoides.

A) El cortisol liberado se une al receptor de glucocorticoides, el complejo transloca al núcleo activando las transcripciones de los factores FOXOs. **B)** FOXO 1/3 que anteriormente fue activado por GC promoviendo la expresión de los atrogenes (*atrogen 1* y *murf1*) que a su vez desencadenan en la activación del sistema ubiquitin/proteosoma. FOXO3 a su vez activa la transcripción de *lc3* y *bnip3* los cuales desencadenan en el sistema autofagia/lisosoma. Ambos sistemas involucrados en la atrofia muscular. Modificado de Shimizu *et al.* 2011.

Junto con los mecanismos ya expuestos, existe una red secundaria de genes mediada por *klf15* (Signal transducer and activator of transcription 5) y *redd1* (regulated in development and DNA damage responses 1), los cuales son genes blancos de los GRs. Se sabe que REDD1 se induce por distintos tipos de estrés y directamente por glucocorticoides, inhibiendo la actividad mTOR (De Young *et al.* 2008; Xiao *et al.* 2013). A su vez, KLF15 participa en el catabolismo muscular a través de la regulación transcripcional de *atrogen1* y *murf1* (Schimizu *et al.* 2011).

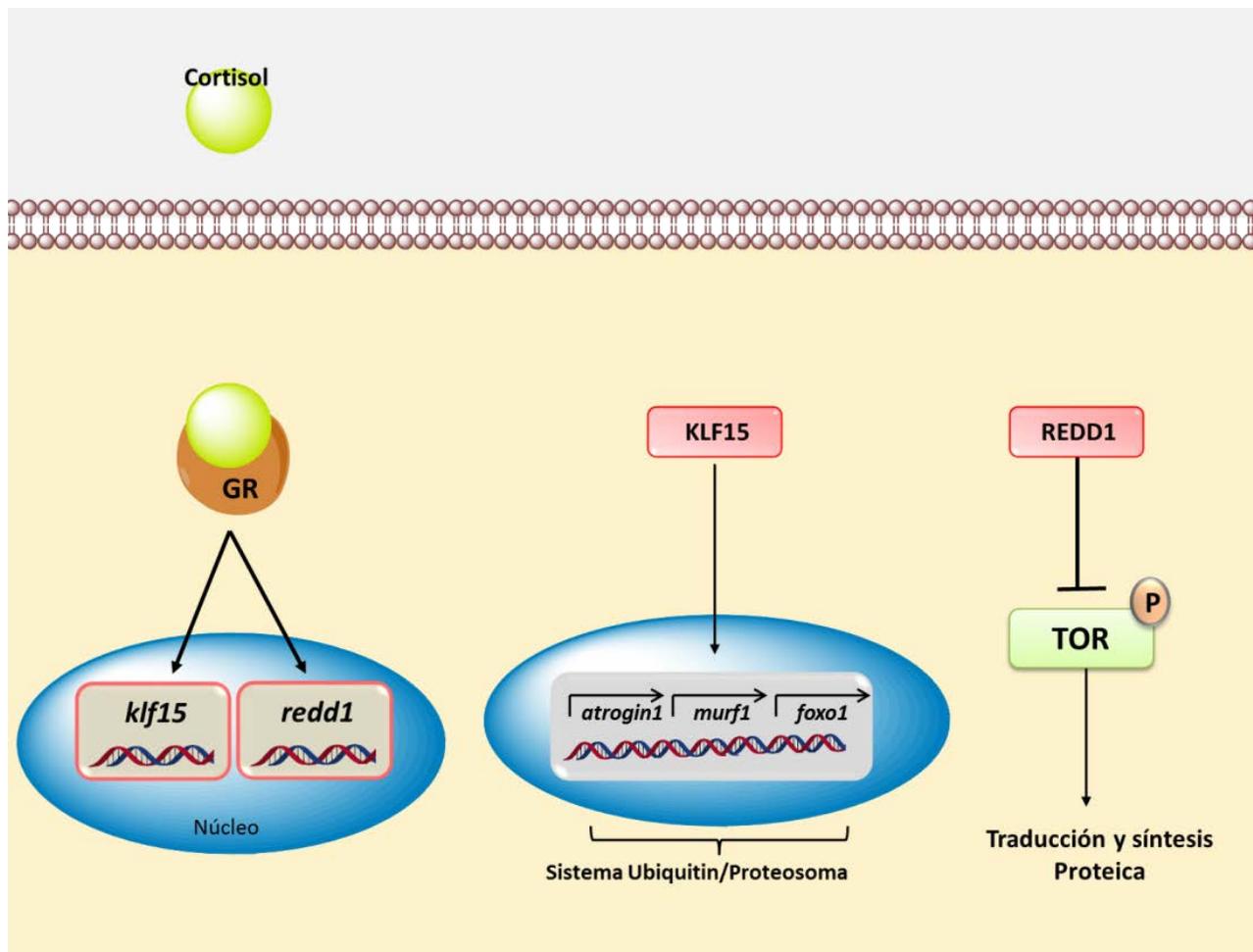


Figura 3: Mecanismo de activación de atrofia muscular por glucocorticoides.

GC activa la transcripción de *klf15* y *redd1*. KLF15 activa transcripcionalmente a los atrogenes, *atrogen1* y *murf1*, y *foxo1*. REDD1 inhibe la acción de TOR. Modificado de Shimizu *et al.* 2011.

2.6.- Estrés mediado por glucocorticoides sintéticos (Dexametasona)

En mamíferos se ha visto que el aumento de corticoesteroides (CS), afecta la integridad muscular, promoviendo diferentes componentes asociados al catabolismo muscular, promoviendo la atrofia muscular (Baehr *et al.* 2011). En diversos estudios se ha utilizado la aplicación de CS sintéticos, de manera de estudiar funcionalmente si son los CS los encargados de promover los diferentes mecanismos involucrados en la atrofia muscular. Dentro de los CS sintéticos se encuentra dexametasona, un análogo al cortisol, que presenta una mayor afinidad por los GR y una mayor vida media (Salas-Leiton *et al.* 2012).

Se ha observado en mamíferos que la administración de este fármaco promueve la expresión de *murf1* y *atrogen1*, promoviendo el sistema ubiquitin/proteosoma y el sistema autofagia/lisosoma promoviendo la atrofia muscular (Glass, 2005; Sandri *et al.* 2004; Stitt *et al.* 2004; Troncoso *et al.* 2012).

Adicionalmente se ha demostrado que la administración de este fármaco promueve la activación de REDD1, inhibiéndose de esta forma la síntesis de proteínas (Wang H *et al.*, 2006). Por lo cual, la administración de este fármaco en mamíferos inhibe la síntesis de proteínas, promoviendo la atrofia muscular y afectando de esta manera la integridad muscular (Baehr *et al.* 2011; Glass, 2005).

Respecto a los efectos del estrés en peces sobre el metabolismo y crecimiento del músculo esquelético, la información aún es limitada. Se ha observado que en períodos de estrés la liberación de cortisol aumenta la expresión de los GR, modulando de esta forma diferentes procesos celulares relacionados con el crecimiento y la atrofia muscular (Prunet, 2006). Sin embargo, aún no se dilucidan los efectos que tendría la administración de CS exógenos y sintéticos como Dex sobre la atrofia muscular y el crecimiento muscular.

Se observó que frente a un estrés por alta densidad poblacional en lenguados finos, se promovió el aumento de la expresión *klf15* y *redd1*, genes blanco de los GRs, adicionalmente se promovió la atrofia muscular mediante el sistema ubiquitin/proteosoma y el sistema autofagia/lisosoma (Valenzuela *et al.*, 2017).

No obstante esto no resuelve la interrogante sobre si el cortisol es el encargado de regular directamente los diferentes mecanismos involucrados en la respuesta al estrés. En *Selenegasea Solea*, una especie comercial del sur de Europa, se presenta el primer estudio donde se administró Dex en diferentes periodos de tiempo, sin embargo no se vieron cambios significativos en la expresión de genes involucrados en el estrés, tales como *gr1*, *gr2*, o en genes relacionados con el crecimiento muscular como *igf-I*, *igf-Ir* y *gh* a las 42 horas post tratamientos (Salas–Leiton *et al.* 2012). Quedando aún por demostrar si es el complejo GRs+Cortisol el encargado de modular los diferentes mecanismos involucrados en respuesta al estrés.

Nuestro grupo de investigación obtuvo los primeros antecedentes relacionados a que la administración de cortisol endógeno en un cultivo de miotubos de congrio colorado estaría promoviendo procesos catabólicos en el músculo esquelético por medio de la sobreexpresión de genes relacionados a la vía ubiquitina/proteosoma (Aedo *et al.*, 2015).

Sin embargo aún no se han reportado estudios *in vivo* en peces inyectados con Dex que determinen como el complejo GRs+Dex estaría promoviendo los diferentes mecanismos involucrados en la respuesta al estrés y atrofia muscular. Por lo que es de gran interés dilucidar si los GR unidos a Dex son los responsables de la respuesta al estrés y como estos estarían implicados en las vías de crecimiento y atrofia muscular. Acorde a estos antecedentes y los nulos estudios presentes en la actualidad sobre si los GR son los responsables de activar estos mecanismos nos llevan a preguntarnos ¿Son los GR unidos a Dex los responsables de regular negativamente la vía de crecimiento y promover la atrofia muscular? En base a estos antecedentes se plantea como objetivo general **“Estudiar *in vivo* el efecto de dexametasona unida a los receptores de glucocorticoides sobre la vía de crecimiento de IGF-I/AKT/TOR y los mecanismos de atrofia muscular en lenguado fino”**. Postulándose la siguiente hipótesis **“La respuesta a estrés mediada por dexametasona, induce la translocación de los receptores de glucocorticoides al núcleo modulando negativamente la vía IGF-I/AKT/TOR, promoviendo la atrofia muscular del lenguado fino (*Paralichthys adspersus*)”**.

En este trabajo se emuló una condición de estrés a un grupo de lenguados juveniles a través de la administración exógena del glucocorticoide sintético dexametasona (Dex). Paralelamente, se administró a un grupo el antagonista de GR, mifepristona (Mif) en presencia y ausencia de Dex. Esto se realizó con el fin de evaluar el efecto directo de GR durante la respuesta a estrés.

Posteriormente, se analizó la respuesta de los GR sobre la vía de crecimiento IGF-I/AKT/TOR y algunas moléculas fundamentales en la atrofia muscular (*atrogen1*, *murf1*, *foxo*, LC3 y *bnip3*) y se analizó mediante la medición de las fibras de manera de ver como este tratamiento afectó las fibras musculares y promovió la atrofia muscular.

3.-Hipótesis

“La respuesta a estrés mediada por dexametasona, induce la translocación de los receptores de glucocorticoides al núcleo modulando negativamente la vía IGF-I/AKT/TOR, promoviendo la atrofia muscular del lenguado fino (*Paralichthys adspersus*)”

4.-Objetivo General

“Estudiar *in vivo* el efecto de dexametasona unida a los receptores de glucocorticoides sobre la vía de crecimiento de IGF-I/AKT/TOR y los mecanismos de atrofia muscular en lenguado fino”

4.1.-Objetivos Específicos

- 1.- Evaluar el efecto de dexametasona en los niveles de transcrito de los receptores de corticosteroides y sus genes blanco.
- 2.- Determinar el efecto de dexametasona unida a los receptores de glucocorticoides en la activación de la vía IGF-I/AKT/TOR.
- 3.- Determinar el efecto de dexametasona sobre sistema ubiquitin/proteosoma y autofagia/lisosoma.

5.-Materiales y Métodos.

5.1.-Animales y mantención

Se utilizaron peces provenientes del Centro de investigaciones Marinas de Quintay (CIMARQ), el cual se encuentra ubicado al sur de la V región de Valparaíso (33° 13'S, 71° 38'O). Los peces fueron alimentados una vez al día con pellet comercial (45% de proteína, 22% de lípidos, 16% de carbohidratos, 1% fibra, 7% de cenizas y 10% de humedad, Skretting, Puerto Montt, Chile). Los experimentos se llevaron a cabo con ejemplares juveniles sexualmente inmaduros de Lengüado fino (*Paralichthys adspersus*), con un peso promedio de 10 gr y una talla promedio de 10 cm en total. Estos se mantuvieron en estanques circulares de 70 L (en 5 estanques con 4 peces cada uno), con una columna de agua de 30 cm y una renovación del agua a 13.4 L/min (un recambio de agua por hora). Las condiciones de temperatura fueron aproximadamente de 12°C y un fotoperiodo de 13 horas de luz y 11 horas de oscuridad.

5.2.- Estrategia experimental para inducción del estrés farmacológico

Con el fin de estudiar funcionalmente los mecanismos moleculares involucrados en las vías de crecimiento y atrofia muscular, los peces fueron expuestos a un estrés farmacológico mediante un análogo sintético de cortisol y un inhibidor de los receptores de glucocorticoides, estos fármacos se administraron mediante una inyección intraperitoneal única, divididos en los siguientes grupos:

- **Grupo Control:** Fueron inyectados con etanol y se realizó la misma rutina de muestreo que los ejemplares tratados farmacologicamente.

- **Grupo dexametasona:** Inyectados con 1 mg/Kg de peso corporal de dexametasona a 4 ejemplares de Lenguado fino juveniles. Dexametasona es un análogo al cortisol, con mayor afinidad a los receptores de glucocorticoides y mayor vida media. Este fármaco se administra para emular la respuesta al estrés (Salas-Leiton et al. 2012; Shimizu et al. 2011).
- **Grupo mifepristona:** Inyectados con 1,25 mg/Kg de peso corporal de Mifepristona a 4 ejemplares de Lenguado fino juveniles (peso aproximado de 10 gr). Mifepristona es un antagonista específico de los receptores de glucocorticoides, el cual será administrado para discriminar la participación de los receptores de glucocorticoides con los receptores de mineralocorticoides (Schjolden et al. 2009 y Marshall et al. 2005).
- **Grupo dexametasona/mifepristona:** Administrado de forma combinada 1mg/kg de peso corporal de dexametasona con 1,25 mg/kg de peso corporal de Mifepristona.

Posterior a la inyección fueron devueltos a sus tanques inmediatamente para su recuperación. Pasada las 72 horas se realizó el muestreo.

5.3.-Muestreo del tejido muscular y plasma

Los peces fueron anestesiados y eutanaziados con un exceso de tranquilizante-anestésico (Benzocaína, Veterquímica S.A.) a una concentración de 30 mg/ml, en los mismos estanques donde fueron mantenidos. Luego, se extrajo la sangre desde la vena caudal con jeringas de 1ml heparinizadas. Para la obtención de plasma, la sangre se centrifugó a 2.000 x g por 5 minutos y el sobrenadante obtenido fue almacenado a -80°C hasta su uso. Después, se obtuvo el tejido muscular esquelético del pez, principalmente en la sección troncal. Una parte se almacenó a -80°C hasta su posterior uso (extracción de RNA, cDNA y proteínas); mientras que la otra sección se cortó en cubos de 1 cm³, cubiertos en

un criopreservante y almacenados a -80°C para luego ser utilizados en análisis histológicos.

5.4.-Medición niveles de cortisol plasmático.

Se usó el plasma recolectado para medir los niveles de cortisol plasmático mediante el Cortisol EIA kit (Cayman Chemical Company), según las instrucciones del fabricante.

5.5.-Medición niveles de glucosa plasmática.

Se usó el plasma recolectado para medir los niveles de glucosa mediante el Glucose Colorimetric Assay kit (Cayman Chemical Company), según las instrucciones del fabricante.

5.6.-Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Con el propósito de evaluar las moléculas involucradas en estrés, crecimiento y atrofia muscular, se realizó un PCR en tiempo real (qPCR), primero se extrajo el RNA total del músculo y luego se sintetizó el DNA complementario (cDNA). Para ello, se utilizó el reactivo TRIzol® reagent, y se siguieron las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El tejido muscular (0,1 g) fue homogenizado con el reactivo TRIzol a 4°C , luego se adicionó 200 μL de cloroformo y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. El RNA se precipitó con 500 μL de isopropanol 100% y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. El precipitado se recuperó por centrifugación a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Posteriormente se lavó con 1 mL de etanol 75% para volver a centrifugar a 4°C durante 5 minutos a $7.500 \times g$ (repetidas 4 veces con el fin de evitar contaminación). Finalmente, el pellet se secó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se resuspendió en 30 μL de agua libre de nucleasas tratada con DEPC (0,1% dietilpolicarbonato) y se almacenó a -80°C .

El RNA se cuantificó mediante la tecnología NanoDrop mediante el espectrofotómetro Epoch multi-volumen (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.). Sólo los RNAs altamente puros con una relación A260/280 entre 1,9 y 2,1 se utilizaron para la síntesis de cDNA. Posteriormente se evaluó la integridad del RNA mediante geles de formaldehído/agarosa al 1,2%, migrando los RNA por 30 min a 70 V. Para la transcripción reversa, se utilizó el kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Austin, TX, EE.UU). Primeramente, el RNA se trató con el tampón DNA-wipeout para eliminar el DNA genómico y la síntesis de cDNA se realizó con 800 ng de RNA siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.7.-Diseño y evaluación de partidores

Para poder realizar el qPCR de los genes de interés, se diseñaron partidores específicos para cada uno de ellos. Se diseñaron partidores de alta calidad basándose en las secuencias previamente obtenidas en la línea de investigación del laboratorio, mediante el uso de los programas Amplifx (<http://ifrjr.nord.univmrs.fr/AmplifX-Home-page>) y Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Una vez generados, se validaron mediante el programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/com/netprimer/>) para descartar estructuras secundarias.

Con el propósito de evaluar la especificidad de los partidores, se realizó primero una curva de disociación. La curva consto de un pool de cDNA, el cual contenía 2 µL de cada una de las muestras extraídas que se amplificaron en una reacción única. Esto nos permitió identificar la Temperatura de alineamiento (T_m) del amplificado y descartar productos inespecíficos. La mezcla de la reacción correspondía a 7,5 µL de Brilliant® SYBR® Green qPCR Master Mix (Stratagene, USA), 1,5 µL de mix de partidores (5 µM), 0,2 µL de ROX y 6 µL de pool de cDNA (dilución 1/40). Esto se realizó en un equipo Mx3000p® qPCR System (Stratagene, USA) usando el siguiente programa de amplificación: denaturación inicial de 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de denaturación 30 seg a 95°C, alineamiento 30 seg a temperatura según el gen y 30 seg a 72°C de extensión. Al final del programa, se inició el programa de la curva predeterminado.

Luego, se desarrolló una curva estándar para determinar las eficiencias de cada gen mediante 8 diluciones seriadas del pool de cDNA. La reacción y el programa de qPCR se ejecutaron como se mencionó anteriormente. Por último, se determinaron los valores de Cq para cada gen, que fueron procesados en el programa Q-Gene (Muller *et al.* 2002). Como gen de referencia, se utilizó *ribosomal protein 40S (fau)*, el cual mostró tanto en trabajos anteriores como en este trabajo permanecer estable en condiciones de estrés en el músculo esquelético (Fuentes *et al.* 2012).

5.8.- PCR en tiempo real

Finalmente, la expresión génica se cuantificó por qPCR en una reacción que contenía 7,5 µL de Brilliant® SYBR® Green qPCR Master Mix (Stratagene, USA), 1,5 µL de mix de partidores (5 µM), 0,2 µL de ROX y 6 µL de cDNA (dilución 1/40) para cada muestra. Las reacciones se realizaron por triplicado técnico para cada una de las 16 muestras en trabajo. La amplificación se llevó a cabo en el mismo equipo, usando un programa de amplificación que consta de las siguientes etapas: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a temperatura variable según cada gen y 30 seg a 72°C. Adicionalmente, se incluyeron dos controles negativos: el primero un control sin templado (NTC), el cual permitió descartar la amplificación de cualquier contaminante en las muestras, y el segundo un control sin transcriptasa reversa (-RT), correspondiente a cDNA que fue sintetizado en ausencia de la enzima, lo que permitió descartar la amplificación de DNA genómico contaminante.

Tabla 1: Partidores utilizados en esta Tesis.

Lista de genes con sus respectivos partidores diseñados, tamaño del producto amplificado en pb, la temperatura de alineamiento y su eficiencia.

Gen	Partidores	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Eficiencia
<i>murf1</i>	Sentido	TCTGGTGTCTTCCGAT	172	55	99,3
	Antisentido	TTGGCTAACGCAATAGA			
<i>atrogen1</i>	Sentido	TGACTCTGACCGAACTGCC	226	57	100,3
	Antisentido	AAGTGGTGCTGGCAGAGTTT			
<i>gr1</i>	Sentido	ACCTGCCTTTGCCAACCTT	130	64	97,4
	Antisentido	CGACCGCTGTTCCCATCCA			
<i>gr2</i>	Sentido	CCAGAGTTACTGCCAAATGA	162	59	99,5
	Antisentido	GCACTGACTTCGGTTCCTT			
<i>Mr</i>	Sentido	TACAGAACGACACCAACAGCC	96	60	100,4
	Antisentido	CCCCGTCAACCATCTCTACTT			
<i>foxo1</i>	Sentido	GCAGACCTCATAACCAAAGC	203	59	102,2
	Antisentido	TTGCCCGTTCCCTCATTC			
<i>foxo3</i>	Sentido	ACACTGTCCCAAATCTACGA	160	59	100,6
	Antisentido	AACTCTCCCTGTTCTTCA			
<i>klf15</i>	Sentido	GGCGAAAGGTTCAAGGACA	246	60	100,2
	Antisentido	ACACTGGAGGCACTGGTATC			
<i>redd1</i>	Sentido	GACTCAGGCTCCGACATCTCC	126	63	99,8
	Antisentido	TTTGGCTTCTCGCAGGCTT			
<i>bnip3</i>	Sentido	ACCTGATGAAGAAAAATGCTGAT	130	57	101
	Antisentido	ATGACGCTGGTGTTCCTGA			
<i>igf-1</i>	Sentido	GGGCATTGGTGTGATGTCTTT	228	57	98,5
	Antisentido	CGATTGTGCGACCGTCTTG			
<i>Bax</i>	Sentido	CTACCAGCGGGTTGAGA	299	52	103,6
	Antisentido	TCACAAGAGCTTTGATGACA			
<i>bcl2</i>	Sentido	AAAACAGAGAACTGGTGGTT	161	52	101,2
	Antisentido	AAAAGTCCCGTTGGCGT			
<i>ghr1</i>	Sentido	AGCAGGTCTGGGGTTATGTA	132	58	97
	Antisentido	GCAGGAGGTGGACACTCA			
<i>ghr2</i>	Sentido	GGACTCCCCTAAAGATTGG	184	58	95
	Antisentido	TGGATCTGGTTGAACGATG			
<i>Fau</i>	Sentido	CATTTAGGAGTTGGCGTTGG	134	60	100
	Antisentido	CCAAGGTTGAAAAGCAGGAG			

5.9 Extracción y cuantificación de proteínas

Para evaluar las moléculas ligadas al crecimiento (AKT y TOR), Receptor de Glucocorticoides (GR) y moléculas ligadas a la atrofia muscular (sistema autofagia: LC3; sistema ubiquitin/proteosoma: FOXO1/3), se utilizó un protocolo de western blot para proteínas del músculo esquelético. Brevemente el tejido muscular (0,1 g) se homogeneizó a 4°C en 1 ml de tampón de lisis (100 mM Tris HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2% Nonidet P-40, 50 mM Na₃VO₄, 200 mM NaF, 100 mM pirofosfato de sodio y 20 µL del cóctel de inhibidor de proteasas (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA)). El sobrenadante se recolectó y sometió a centrifugación por 30 minutos a 12000 x g (4°C). Las proteínas totales extraídas fueron cuantificadas usando el Pierce® Protein Assay Kit bajo las condiciones sugeridas por el fabricante (Pierce, Rockford, IL).

5.10.-Western blot

Se separaron 50 µg de proteínas totales mediante geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes al 12% (SDS/PAGE), luego estas fueron electro-transferidas durante 1 hora a 100 volt a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Bedford, MA), previamente activadas en metanol por 5 minutos. El gel transferido fue teñido con azul de Coomasie (Coomassie Brilliant Blue R250 0,01%, metanol 50% y ácido acético 10%) como control de transferencia. Posteriormente, la membrana fue bloqueada utilizando una solución 2% de agente bloqueante ECL Blocking agent (GE Healthcare, Amersham, UK) disuelto en TBS 1X (200 Mm Tris-HCl, pH 7,6 y 1,5 M NaCl) por una hora a temperatura ambiente en agitación y a continuación, se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con agitación. Al día siguiente, se lavaron tres veces con TBS 1X por 10 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Después de otros tres lavados, las membranas fueron reveladas en películas Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences, Amersham,

UK), utilizando el kit de quimioluminiscencia de alta sensibilidad ECL Prime Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis de los resultados, las películas fueron “escaneadas” y sometidas a un análisis densitométrico mediante el programa ImageJ (NIH, USA). Como control de carga, posteriormente las membranas fueron estripeadas e incubadas con un anticuerpo contra la histona H2B.

Tabla 2: Lista de anticuerpos utilizados para Western blot en esta tesis.

Anticuerpo	Dilución	Peso Molecular (kDa)	Marca	Código
AKT	1:5000	60	Cell Signaling	9271
pAKT	1:5000	60	Cell Signaling	9272
LC3	1:2000	14-16	Cell Signaling	12741
H2B	1:3000	14	Abcam	1790
TOR	1:1000	289	Cell Signaling	9205
pTOR	1:1000	289	Cell Signaling	9202
GR2	1:500	88	Producción local	-----
pFOXO1/3	1:1000	85-80	Cell Signaling	9464
FOXO1/3	1:2000	85-80	Cell Signaling	2880
Antirabbit	1:2000	-	Cell Signaling	7074

5.11.-Cortes Histológicos

Se realizaron cortes histológicos del músculo esquelético obtenido anteriormente de 1 cm³ los cuales fueron cubiertos con O.C.T comercial (Temperatura de corte Optimo, Tissue-Tek, Prolab limitada) y sumergidos en isopentano. Luego, se congelaron con nitrógeno líquido y guardaron a -80°C. El tejido se cortó en un Criostato con un espesor de 35 micras, los cuales fueron montados en portaobjetos gelatinizados (0,05%) y almacenados a -20°C.

5.12.-Tinción hematoxilina eosina

Los cortes anteriormente obtenidos fueron lavados con PBS 1X para retirar el exceso de O.C.T, posteriormente se incubaron por 5 minutos con hematoxilina Merck S.A, se lavaron en corriente de agua durante 10 minutos. Posteriormente fueron incubados con Eosina durante 1 minuto y nuevamente lavados en una corriente de agua durante 10 minutos. Se les agrego Xilol 100% durante 3 minutos y nuevamente se lavaron en una corriente de agua durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se secaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se montaron con líquido de montaje hidrófobo.

5.13.-Medición del área de la fibra muscular

Las áreas de las fibras se determinaron usando el software Image J en cinco imágenes capturadas aleatoriamente de la tinción hematoxilina/eosina. Las fibras se seleccionaron manualmente y el software computó el diámetro mínimo de Feret de cada fibra (Morales *et al*, 2013).

5.14.- Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm SEM. El análisis estadístico de los datos se realizó aplicando un ANOVA de una vía, seguido por un análisis a posteriori de Tukey, para ver la diferencia entre los grupos. La probabilidad considerada fue de un valor de probabilidad significativa de $P < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron realizados en el software Prism 3.0 (GraphPad Software, CA, USA) y los datos fueron graficados en el software SigmaPlot 2.0 (Systac Software Inc.).

6.- Resultados

6.1.-Efecto de la administración de dexametasona y mifepristona sobre los niveles de cortisol y glucosa en el plasma del lenguado fino.

La manipulación en peces puede inducir un aumento de los niveles de cortisol y glucosa plasmático. Por lo tanto, para verificar que la respuesta fisiológica de los lenguados utilizados en el ensayo *in vivo* no corresponda a una respuesta a la manipulación se midieron los niveles de cortisol plasmático en peces control y experimentales.

Los peces tratados con Dex no muestran cambios en sus niveles de cortisol plasmático con respecto al control, mientras que los individuos tratados con Mif muestran un aumento de casi 5 veces en relación al grupo control **(Fig.4A)**.

Adicionalmente se midieron los niveles de glucosa, un parámetro que aumenta frente a la respuesta primaria al estrés. **(Fig. 4B)**. No se observaron cambios significativos en los niveles de glucosa entre los peces controles y peces tratados con Dex y Mif.

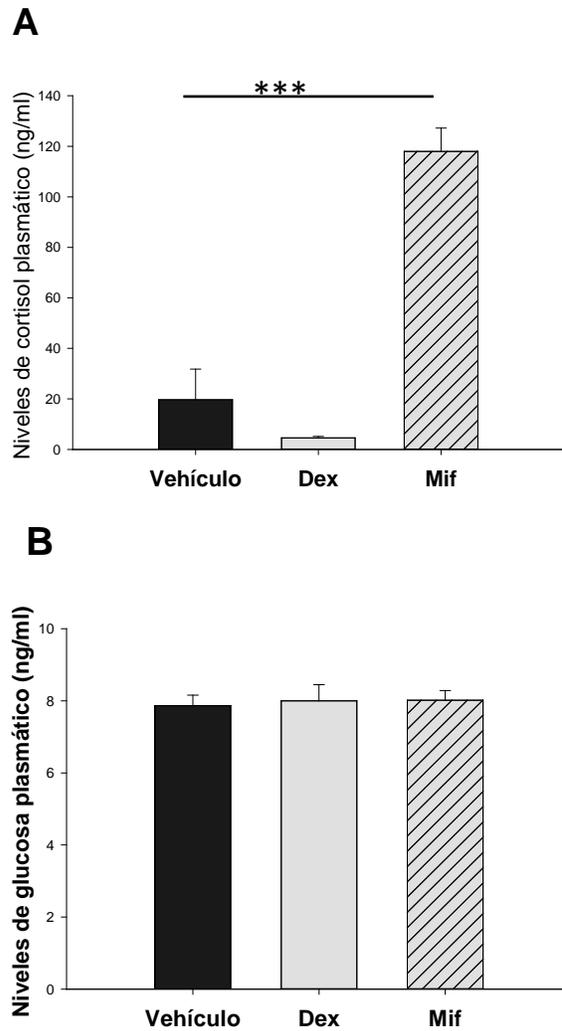


Figura 4. Niveles de cortisol y glucosa en el plasma de peces tratados con glucocorticoides sintéticos.

A) Niveles plasmáticos de Cortisol en peces tratados con Dex y Mif respectivamente. **B)** Niveles plasmáticos de Glucosa en peces tratados con Dex y Mif. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM ($n=3$), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad ($***P < 0.001$)

6.3.-Análisis de los receptores de corticosteroides y sus genes blanco *redd1* y *klf15*.

Con el objetivo de analizar la respuesta secundaria al estrés farmacológico inducido en este estudio, se evaluaron los niveles de transcrito de los receptores de corticosteroides: *gr1*, *gr2* y *mr*, además de los genes blancos directos de los GRs: *redd1* y *klf15*.

No se observaron cambios significativos en los niveles de transcrito de *gr1* en ninguno de los tratamientos farmacológicos empleados: Dex, Mif, Dex+Mif. **(Fig. 5A).**

Por otra parte, *gr2* no mostró cambios en los niveles de transcrito en los diferentes tratamientos con respecto al control **(Fig. 5B).**

En el caso de *mr*, no se observaron cambios en los niveles de mRNA en los individuos tratados con Dex **(Fig. 5C)**. Sin embargo, en los individuos tratados con Mif, los niveles de mRNA incrementaron significativamente, siendo estos casi 4 veces más con respecto al control. Por el contrario, en los individuos tratados con Dex+Mif se observó una disminución significativa de los niveles de mRNA en 0,6 veces con respecto al control **(Fig. 5C).**

Adicionalmente, se evaluó el contenido proteico de GR2, el cual no varió en los peces tratados con Dex, sin embargo, bajo los estímulos de Mif y Dex+Mif el contenido proteico disminuyó significativamente **(Fig. 5D).**

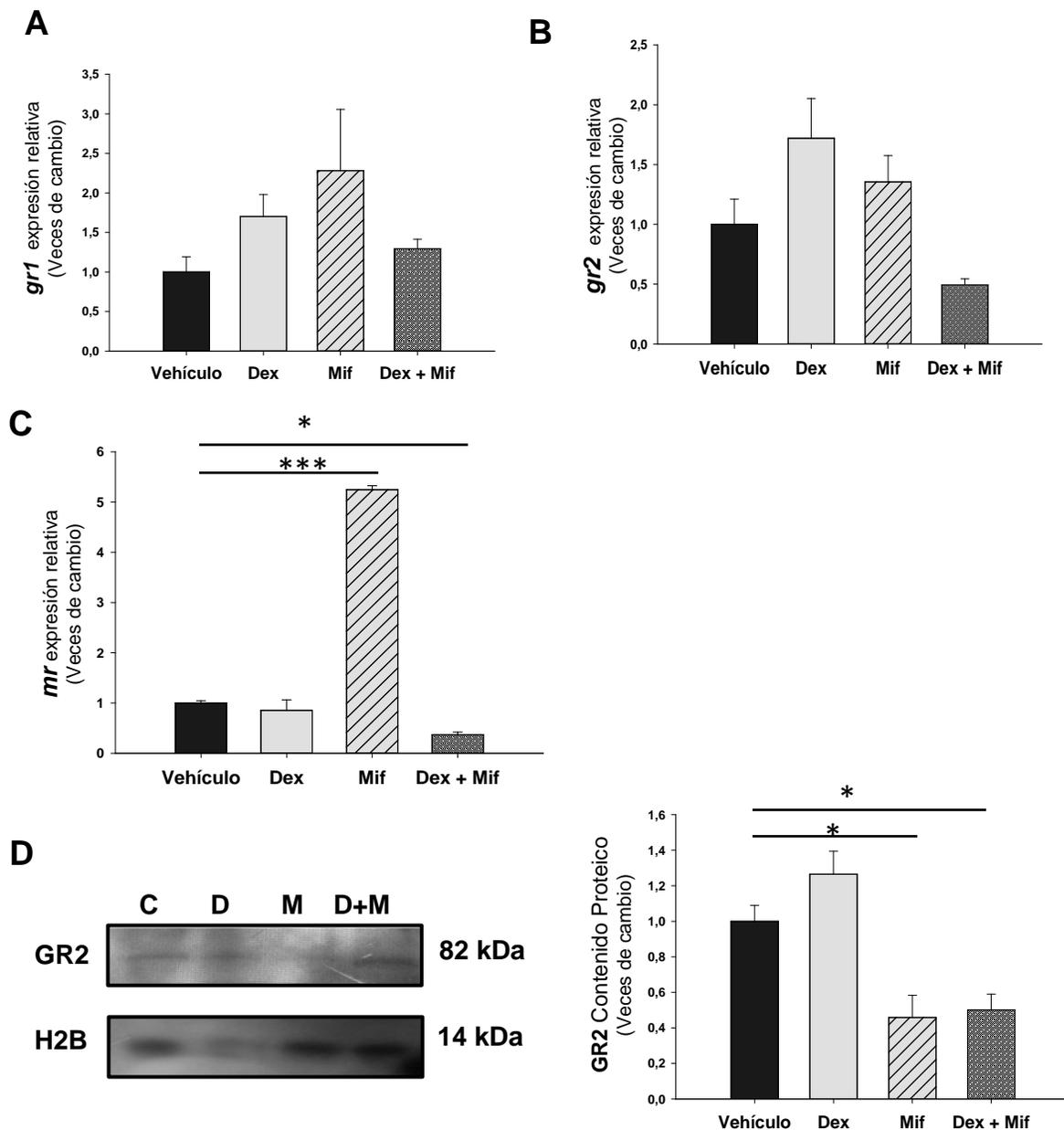


Figura 5. Perfil de expresión de los receptores de corticosteroides y contenido proteico de GR2 en el músculo esquelético en Lengados Finos tratados farmacológicamente.

A, B y C) Niveles de transcritos de *gr1*, *gr2* y *mr* respectivamente, en músculo esquelético de peces tratados farmacológicamente (Dex, Mif, Dex+Mif). **D)** Niveles proteicos de GR2 en el músculo esquelético de peces tratados farmacológicamente (Dex, Mif, Dex+Mif). Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA, con un nivel de probabilidad (*P < 0.05, ***P < 0.001).

C: Vehículo; **D:** Dexametasona; **M:** Mifepristona; **D+M:** Dexametasona+Mifepristona.

Posteriormente, se evaluaron los niveles de transcritos de *klf15* y *redd1*, genes blancos directos de GRs.

No se observaron cambios significativos en los peces tratados con Dex y Dex+Mif por el contrario, en los peces tratados con Mif hubo un aumento significativo de los niveles de transcrito de *klf15* en 1,5 veces con respecto al control (**Fig. 6A**).

Por otra parte, no se observaron cambios significativos en los niveles de *redd1* en ninguno de los tratamientos Dex, Mif y Dex+Mif (**Fig.6 B**).

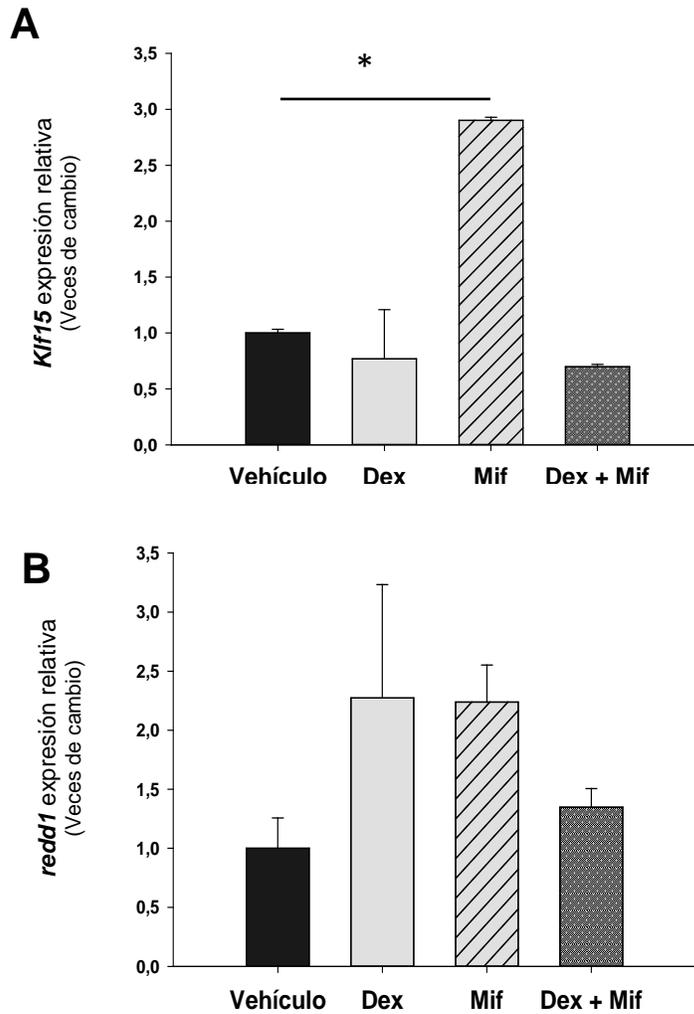


Figura 6. Perfil de expresión de genes blancos de Grs: *klf15* y *redd1*

A) Niveles de transcritos de *klf15* en músculo esquelético de peces tratados farmacológicamente con Dex, Mif, Dex+Mif. **B)** Niveles de transcritos de *redd1* en músculo esquelético de peces tratados farmacológicamente con Dex, Mif y Dex+Mif. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad (*P < 0.05).

6.4.-Efecto del tratamiento farmacológico sobre la activación de la vía IGF-I/Akt/TOR.

Con el objetivo de evaluar el efecto del estrés farmacológico sobre la vía de crecimiento IGF-I/Akt/TOR, se evaluaron los niveles de mRNA de *igf-I*, *ghr1*, *ghr2* y la activación de la vía Akt/TOR.

Los niveles de transcrito de *igf-I* no mostraron cambios significativos con respecto al control en ninguno de los tratamientos aplicados, sin embargo, se pudo observar una tendencia a aumentar los niveles de mRNA en los grupos tratados con Dex y Dex+Mif, y una disminución en Mif con respecto al control (**Fig.7A**). De manera complementaria, se midieron los niveles de transcrito de *ghr1* y *ghr2* los cuales no mostraron cambios significativos (Anexo 1).

Paralelamente, se pudo observar que tanto en los tratamientos con Mif y Dex+Mif, Akt se encuentra activada, debido a un aumento en los niveles proteicos (forma fosforilada/forma total) en 0,5 y 0,3 respectivamente, con respecto al control (**Fig.7B**). El contenido proteico de TOR no cambio en ninguno de los peces tratados con los diferentes fármacos (**Fig.7C**).

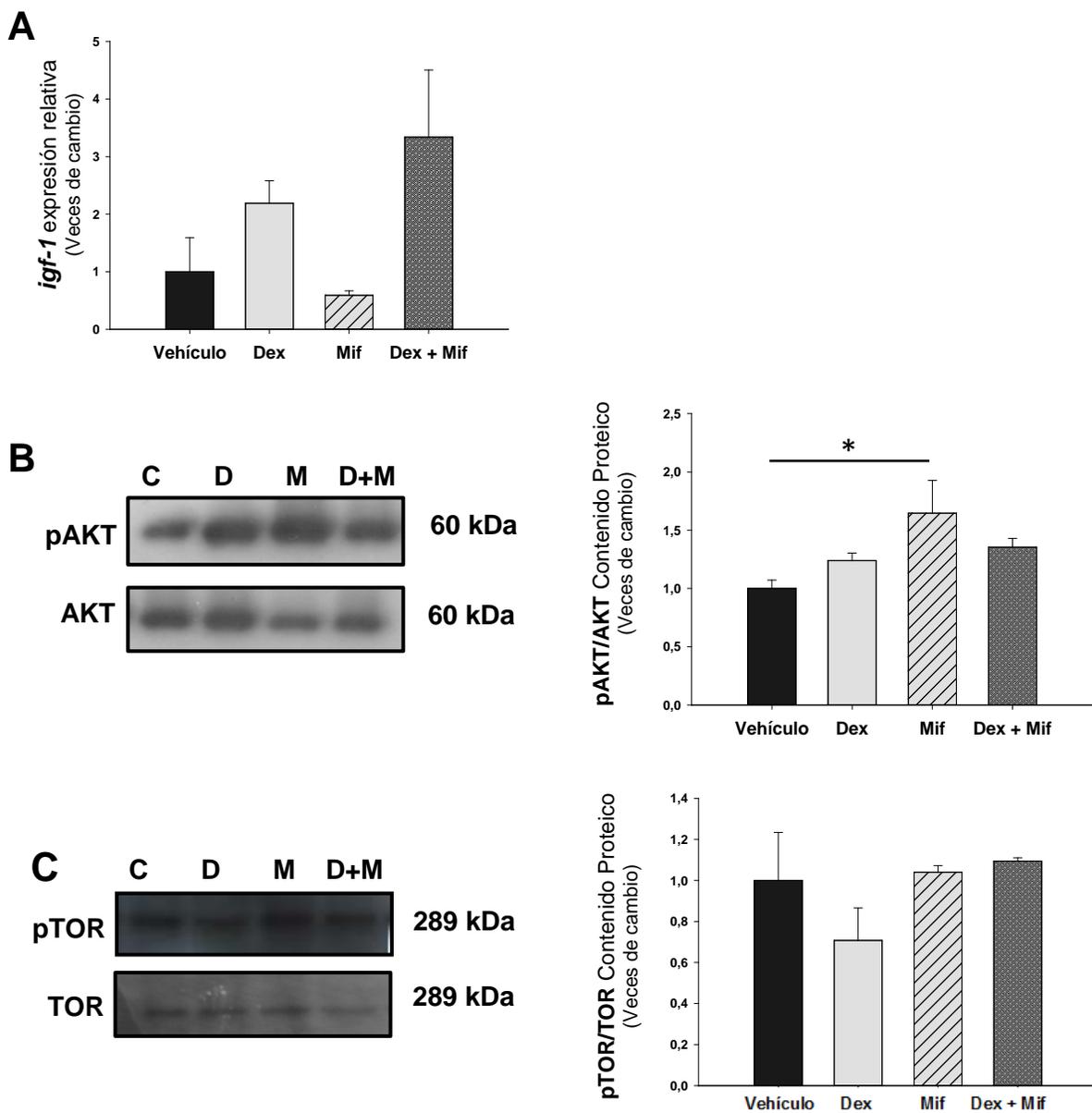


Figura 7. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre la vía de crecimiento IGF-1/AKT/TOR.

A) Niveles de transcrito de *igf-1* en músculo esquelético de peces tratados con Dex, Mif y Dex+Mif. **B)** Activación de AKT, contenido proteico en muestras del músculo esquelético de lenguados finos tratados farmacológicamente con Dex, Mif y Dex+Mif. **C)** Activación de TOR, contenido proteico en muestras del músculo esquelético de lenguados finos tratados farmacológicamente con Dex, Mif y Dex+Mif. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad (*P < 0.05).

Resultados de los western blot están expresados como formas fosforiladas/formas totales.

C: Vehículo; **D:** Dexametasona; **M:** Mifepristona; **D+M:** Dexametasona+Mifepristona.

6.5.-Efecto del estrés farmacológico sobre el sistema ubiquitin/proteosoma.

Para determinar el efecto del estrés farmacológico sobre la vía ubiquitin/proteosoma, se analizaron los niveles de transcrito y de proteínas de participantes claves descritos para este proceso. Nuestros resultados muestran que los niveles de transcrito de *foxo1* aumentaron significativamente respecto al control en 0,6 veces en los peces tratados con Mif, sin mostrar cambios significativos en los tratamientos con Dex y Dex+Mif (**Fig. 8A**). Por otra parte los niveles de transcritos de *foxo3* aumentaron solo en los peces tratados con Dex en 1,1 veces con respecto al control (**Fig. 8B**).

Adicionalmente, se analizó el contenido proteico de los factores FOXOs en su relación pFOXO1/3/FOXO1/3 en donde no se observaron cambios significativos entre los grupos experimentales con respecto al control (**Fig.8C**).

En cuanto a los niveles de transcrito de *atrogen1* no mostraron cambios significativos en ninguno de los tratamientos con Dex, Mif y Dex+Mif (**Fig.8D**). En cuanto a los niveles de transcrito de *murf1*, se observó un aumento significativo en los ejemplares tratados con Mif en 1,4 veces con respecto al control, sin observarse cambios significativos en los tratamientos con Dex y Dex+Mif (**Fig.8E**).

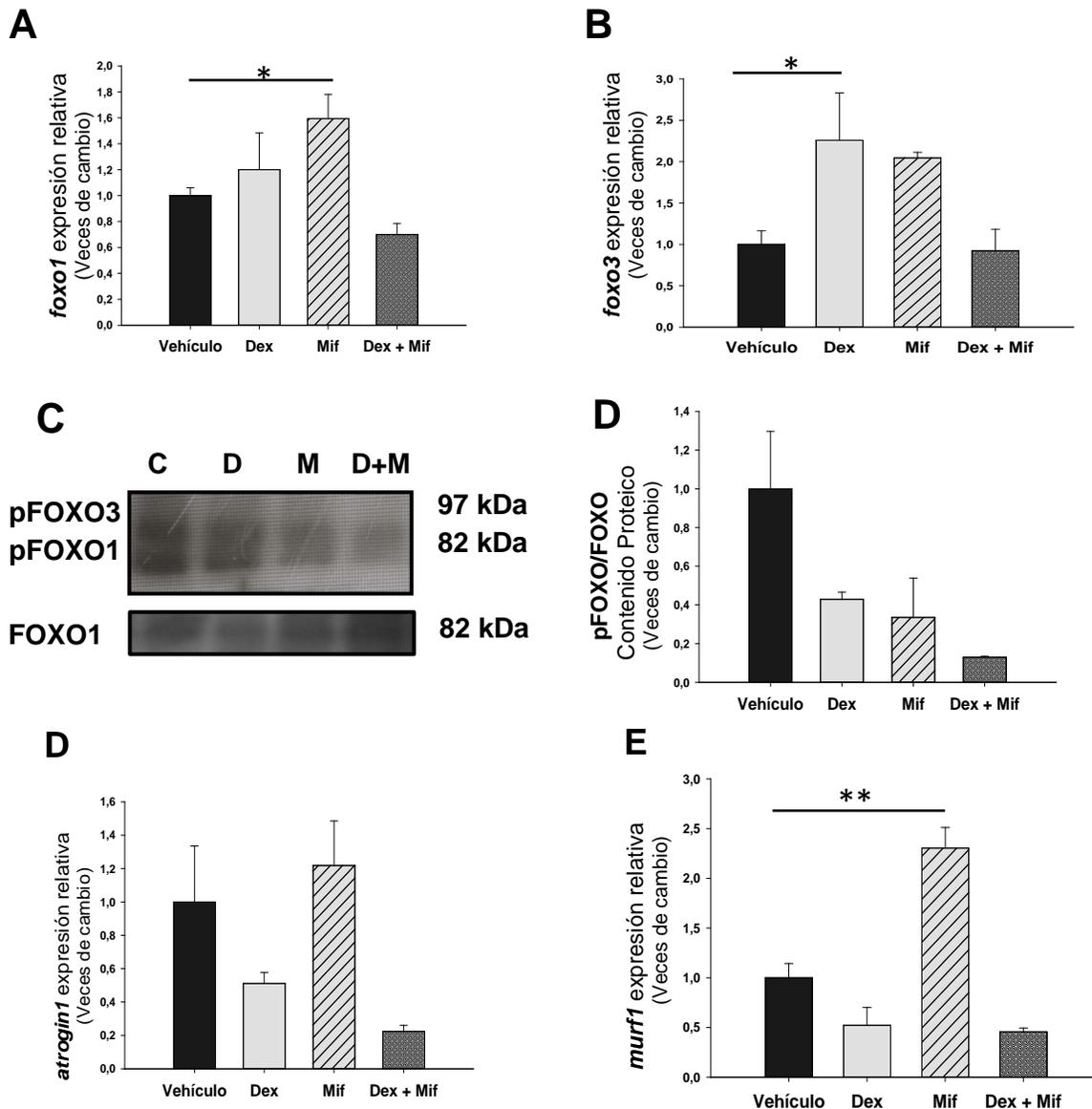


Figura 8. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre el sistema ubiquitin/proteosoma.

Niveles de transcrito de *foxo1* en los diferentes tratamientos farmacológicos (Dex; Mif; Dex+Mif) grupo. **B)** Niveles de transcrito de *foxo3* en los diferentes grupos. **C)** Niveles de contenido proteico de Factores FOXOs, imagen representativa del western blot. El grafico representa la densitometría de banda. **D)** Niveles de transcrito de *atrogen1* en los diferentes tratamientos con glucocorticoides sintéticos. **E)** Niveles de transcrito de *murf1* en los diferentes tratamientos realizados a los ejemplares. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad (*P < 0.05, **P < 0.01). Resultados de los western blot están expresados como formas fosforiladas/formas totales.

C: Vehículo; **D:** Dexametasona; **M:** Mifepristona; **D+M:** Dexametasona+Mifepristona.

6.6.-Efecto del estrés farmacológico sobre el sistema autofagia/lisosoma.

Con el objetivo de analizar el efecto del estrés farmacológico sobre el sistema autofagia lisosoma. La vía de autofagia se analizó mediante el procesamiento de LC3 a su forma activa, LC3-II, así como la expresión del gen *bnip3*. No se observaron cambios significativos en los niveles de transcrito de *bnip3* en los diferentes tratamientos con Dex, Mif y Dex+Mif (**Fig.9A**).

En cuanto al procesamieto de LC3-I a LC3-II no fue posible visualizar este resultado debido a que no se pudo obtener el marcaje de la proteína LC3-II (**Fig.9B**).

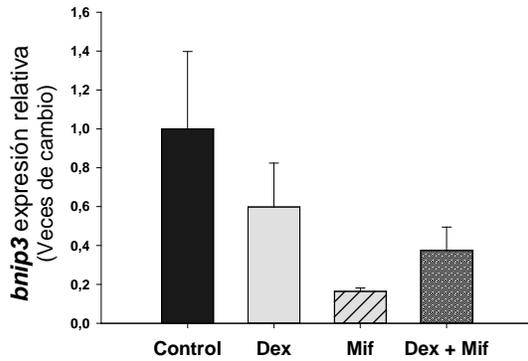
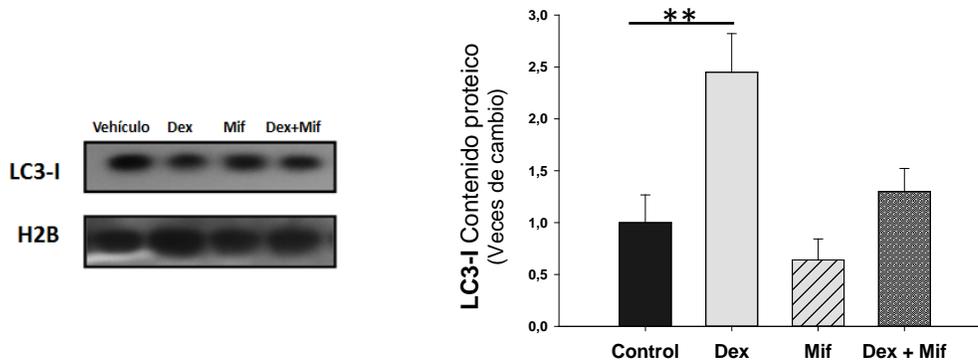
A**B**

Figura 9. Efecto del estrés farmacológico sobre el sistema autofagia/lisosoma.

A) Niveles de transcrito de *bnip3* en los diferentes grupos tratados farmacológicamente con (Dex; Mif; Dex+Mif). **B)** Contenido proteico de LC3-I en los diferentes tratamientos farmacológicos. Los gráficos se muestran como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad (**P < 0.01). Resultados de los western blot están expresados como LC3-I/H2B.

C: Vehículo; **D:** Dexametasona; **M:** Mifepristona; **D+M:** Dexametasona+Mifepristona

6.7.-Efecto del estrés farmacológico sobre el tamaño de las fibras musculares

Para determinar el efecto del estrés farmacológico sobre el músculo esquelético, se midió el área de distintas fibras musculares con el objetivo de determinar si existía disminución en su tamaño debido a los diferentes tratamientos administrados a los ejemplares.

Para esto, se midió el área de 40 fibras musculares elegidas al azar de cortes histológicos de cada tratamiento farmacológico, mostrando que el área de las fibras no tuvo cambios en los ejemplares tratados con Dex y con Dex+Mif respecto al control (**Fig.10AB**). Sin embargo en los ejemplares tratados con Mif el área de las fibras disminuyó en un 35% su diámetro en relación al control (**Fig.10AB**).

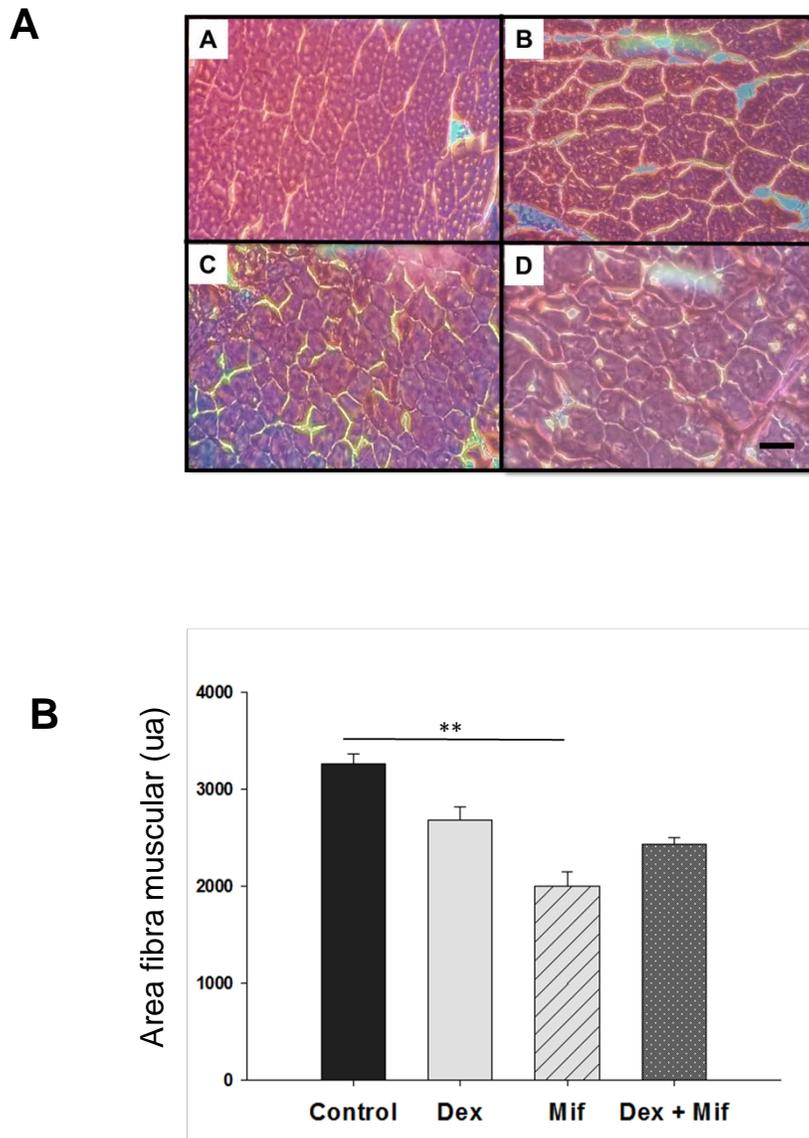


Figura 10. Área fibra muscular de Lenguados finos tratados con glucocorticoides sintético.

A) Cortes en criostato de 35 micras de músculo esquelético. Imagen representativa de tinción eosina /hematoxilina se puede observar en **A:** Control (etanol) **B:** Dexametasona **C:** Mifepristona **D:** Dexametasona + Mifepristona. Aumento 40X microscopia de contraste de fases.

B) Grafico de área de fibra muscular en los diferentes tratamientos realizados. El gráfico se muestra como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad (**P < 0.01). Barra corresponde a 200 μ m.

7.-Discusión

El estrés es un importante factor que impacta negativamente el cultivo de peces, por lo cual su estudio y entendimiento es de gran importancia para optimizar las condiciones de cultivo, y de esta forma mejorar y consolidar la industria acuícola a nivel mundial. En este trabajo se emuló una condición de estrés a un grupo de lenguados juveniles a través de la administración exógena del glucocorticoide sintético dexametasona (Dex). Paralelamente, un segundo grupo de lenguados fueron estimulados con el antagonista de GR, Mifepristona (Mif) en presencia y ausencia de Dex. Esto se realizó con el fin de evaluar el efecto directo de GR durante la respuesta a estrés.

7.1.-Efecto del estrés farmacológico sobre los niveles plasmáticos de cortisol y glucosa.

El principal indicador relacionado al desarrollo de una respuesta al estrés en peces corresponde al incremento en los niveles de cortisol plasmático (Porchas *et al.* 2009). Por lo tanto, para determinar si la manipulación y administración de cada fármaco indujo un aumento en el cortisol plasmático en los peces, se midieron los niveles de este metabolito en el total de ejemplares sometidos al ensayo.

Se pudo observar un aumento significativo de los niveles de cortisol endógeno en los peces tratados con Mif. Este resultado es novedoso y se puede atribuir al bloqueo prolongado de GRs por Mif. En condiciones de estrés, el cortisol liberado es capaz de unirse a los GR (complejo cortisol+GR), translocando al núcleo (Ratman *et al.* 2013). Este complejo se une a las regiones GRE, promoviendo la expresión de sus genes blanco involucrados en la respuesta secundaria al estrés (Bury *et al.* 2007). Sin embargo, cuando las cantidades de cortisol son excesivas, el complejo cortisol+GR, se une a las regiones nGRE (negative glucocorticoid receptor response elements), inhibiendo la liberación de

ACTH por la pituitaria, resultando en la inactivación de la producción de cortisol endógeno (Pickering *et al.* 1986; Zhang *et al.* 2015). Se ha descrito que este mecanismo “llamado retroalimentación negativa” podría estar mediado por una proteína llamada CRF-BP (Proteína de unión a la hormona liberadora de la hormona corticotropina), la cual estaría regulando la liberación directa de ACTH (Alderman *et al.* 2011). Por otra parte sabemos que Mif actúa bloqueando específicamente los GRs e impide su acción, lo que conlleva a que los peces tratados con este fármaco no pudieran activar el mecanismo de retroalimentación negativa favoreciéndose la producción de cortisol endógeno.

Otro indicador clásico de respuesta a estrés ampliamente utilizado corresponde al aumento de glucosa plasmática (Wiseman *et al.* 2007).

Se ha descrito que los niveles de glucosa plasmática aumentan bajo una condición de estrés agudo, lo que se relaciona con la necesidad de obtención de energía inmediata por parte del individuo (Bonga , 1997). Diversos estudios en peces han mostrado que el aumento de glucosa plasmática ocurre dentro de las seis primeras horas posteriores al estímulo, comenzando a estabilizarse a partir de las 24 horas, debido a la adaptación frente al estrés que sufren los individuos (Andelrman *et al.* 2011; Hemre *et al.* 2002; Jentonft *et al.* 2005). En nuestro ensayo, la administración de Dex y Mif no generó cambios en los niveles de glucosa plasmático en los ejemplares respecto a su control, esto responde a los comportamientos que se han descrito en los estudios anteriores, ya que a las 72 horas después de la inyección, nuestros ejemplares ya habrían estabilizado sus niveles de glucosa.

7.2.-Evaluar el efecto del estrés farmacológico sobre los niveles de transcrito de los receptores de corticosteroides y sus genes blanco.

La acción biológica del cortisol es iniciada por su unión a los receptores de Corticosteroides (GR1, GR2 y MR), los cuales al translocar al núcleo, se unen a unidades regulatorias (GRE Y MRE), promoviendo la expresión de diferentes genes blanco (Sturm *et al.*, 2011).

En cuanto a los niveles de transcrito de los GRs, estos no variaron significativamente frente a ninguno de los tratamientos experimentales con respecto al control.

Interesantemente, los niveles de transcritos de MR aumentaron en peces administrados con Mif. Esto se ha observado ampliamente en mamíferos donde la administración de este fármaco promueve la expresión de los niveles de transcrito de MR tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* (Gomez- Sanchez E y Gomez- Sanchez C, 2014; Peeters *et al.*, 2004; Peeters *et al.* 2008).

En cuanto a los niveles proteicos de GR2, se observó una disminución significativa del contenido proteico de GR2 en los individuos tratados con Mif y Dex+Mif, por el contrario, el tratamiento con Dex no mostró cambios respecto al vehículo.

Aún no existen reportes donde se relacione Mif con la disminución de los niveles proteicos de GRs. Por lo que estos resultados abren una nueva interrogante respecto a cómo estos receptores estarían actuando tanto en mamíferos como en peces.

Una vez unidos los GRs a Dex se esperaba el aumento en los niveles de transcrito de los genes blancos *klf15* y *redd1*, los cuales se a decrito que presentan un fuerte aumento en respuesta al estrés en mamíferos (Shimizu *et al.* 2011). Adicionalmente, en el trabajo de Tsuchida *et al.*, 2017, se observó que en miotubos de rata tratados con Dex se produce un aumento en los niveles de transcrito de *redd1* y *klf15* a las 6 horas post estresor. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios en los niveles de expresión de ambos genes frente al tratamiento de Dex.

Interesantemente, se pudo observar un aumento de los niveles de transcrito de *klf15* en los individuos tratados con Mif, este aumento se podría atribuir a lo descrito anteriormente en mamíferos, donde en miotubos de rata se observó que al administrar Mif se estaría promoviendo la expresión de *klf15*, atribuyéndose la expresión de este gen no solo a los GR, si no que también a los MR (Mihailidou y Ashton, 2016). En este contexto, nuestro estudio sería uno de los primeros en observar una relación de los MR con la expresión del gen *klf15* en peces.

7.3.-Efecto del estrés farmacológico sobre la vía de crecimiento en músculo de lenguado fino.

Se ha evidenciado que la respuesta al estrés disminuye la activación de la vía IGF-1/AKT/TOR. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios significativos de los niveles de transcrito de *igf-1* en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, se observó la activación de AKT (aumento de la razón forma fosforilada/forma total) en los peces tratados con Mif y Dex+Mif. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en mamíferos y peces, donde se ha observado que el complejo MR-aldosterona estaría activando AKT como mecanismo compensatorio frente a la respuesta a estrés, sin embargo, los mecanismos que estarían involucrados aún no se han descrito (Bottino *et al.* 2011; Nolly *et al.* 2013).

Finalmente, el último componente del eje es TOR, el cual se ha observado que frente a una condición de estrés la activación de TOR en el músculo esquelético se ve fuertemente disminuida (Shimizu *et al.*, 2011; Fuentes *et al.* 2012). Sin embargo los niveles de activación de TOR no variaron en nuestro modelo experimental, lo que se podría atribuir al tiempo de exposición al fármaco.

7.4.-Efecto del estrés farmacológico sobre los mecanismos de atrofia muscular.

El sistema ubiquitin/proteosoma puede activarse bajo condiciones de estrés, promoviendo la degradación de proteínas (Sandri *et al.* 2004). Nuestros resultados no mostraron diferencias en los niveles de transcritos de *foxo1* y en los principales atrogenes (*atrogen1* y *murf1*), en los peces tratados con Dex, sin embargo se observó un aumento de los niveles de transcrito de *foxo3*, el cual se ha descrito como un regulador clave de los procesos catabólicos en el músculo esquelético y un intermediario del sistema ubiquitin/ proteosoma (Shimizu *et al.* 2011). En mioblastos de rata se ha observado que Dex promueve la expresión de ambos atrogenes en estudios realizados a las 24 horas (Troncoso *et al.* 2015), sin embargo en nuestro ensayo realizado a las 72 horas no se pudo observar este mismo comportamiento.

Interesantemente, en los individuos tratados con Mif, se observó un aumento de los niveles de transcrito de *foxo1* y *murf1*. El aumento de los niveles de transcritos de estos genes se podría correlacionar al aumento de *klf15* observado anteriormente. Ya que se ha descrito que *klf15* es capaz de promover la expresión de *murf1* y *atrogen1* (Shimizu *et al.* 2011) y la expresión de *foxo1*, que a su vez también promueve la expresión de *murf1* (Bonaldo y Sandri, 2013). Sin embargo no existen reportes donde se correlacione la administración de Mif con el aumento de los niveles de transcrito de *foxo1* y *murf*.

Todos los mecanismos antes mencionados promueven la atrofia muscular, caracterizada por la disminución del área de las fibras musculares y la masa muscular (Higashino *et al.* 2013).

Si bien en los individuos tratados con Dex y Dex+Mif no se observaron cambios en el tamaño de la fibra muscular, este resultado es concordante con lo visto anteriormente, ya que no se vio activación de ninguno de los mecanismos involucrados. Sin embargo, los individuos tratados con Mif mostraron una disminución del tamaño de las fibras musculares, la cual podría atribuirse a la activación del sistema ubiquitin/proteosoma.

Todos estos antecedentes nos indican que el bloqueo de los GRs mediante Mif estaría promoviendo la actividad de los MR. Los MR en peces se han relacionado directamente con la atrofia muscular, tanto por mecanismos convencionales (sistema ubiquitin/proteosoma), como por mecanismos no genómicos (Sukhanov *et al.* 2011). Otro de los procesos involucrados en promover la atrofia muscular es la apoptosis: un mecanismo encargado de la destrucción o muerte celular programada con el fin de controlar el desarrollo y crecimiento del tejido (Lozano *et al.* 2009).

Estudios han descrito que la inhibición de los MR estaría involucrada en la expresión génica de *bcl2*, gen el cual se encuentra directamente involucrado en la supresión de la apoptosis (McCullers y Hermsan, 1998). También se ha descrito que la activación del sistema MR+aldosterona activaría los mecanismos de apoptosis en mamíferos (Lee *et al.* 2009), por otra parte el grupo de Burniston *et al.*, 2005 demostró a nivel histológico en miocitos de rata, que el aumento de células apoptóticas estaba correlacionado con el aumento de los MR, todos estos estudios nos indican la fuerte relación que tienen los MR con la activación de la vía apoptótica.

En nuestro ensayo los individuos tratados con Mif presentaron un fuerte aumento en la expresión de los MR, además se vio un incremento en los niveles de transcritos de la relación *bax/bcl2*, esta relación se ha utilizado frecuentemente como indicador de apoptosis (Hasnan *et al.* 2010), sugiriéndose de esta forma que el aumento de los MR estaría directamente relacionado con la apoptosis celular en el músculo de peces.

Adicionalmente, se ha reportado que la autofagia es un mecanismo que promueve la atrofia muscular, por el cual la célula es capaz de degradar agregados proteicos y organelos defectuosos (Levine y Kroemer, 2008) es activada bajo diferentes condiciones de estrés y además mediada por los GRs (Seilliez *et al.* 2014). Respecto al efecto de los glucocorticoides sobre la autofagia en el músculo esquelético de mamíferos, se ha visto que este proceso estaría ocurriendo a tiempos tempranos de estimulación con Dex (menor a 24 horas) en miotubos de rata (Troncoso *et al.* 2012). Concordante con estos antecedentes, en

nuestro ensayo no se observó la activación de autofagia (determinado por la conversión de LC3-I a LC3-II) en el músculo de los individuos luego de 72 horas de estímulo con los diferentes tratamientos.

En base a estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis se propone que, el bloqueo de los GRs mediante su antagonista Mif impide la unión a las zonas nGRE, lo que resulta en la inactivación de la retroalimentación negativa promoviéndose la liberación de cortisol endógeno, el cual se estaría uniendo a los MR. Este complejo MR+cortisol translocaría al núcleo promoviendo componentes del sistema ubiquitina/proteosoma y apoptosis celular en el músculo esquelético de peces, mediante mecanismos no descritos (**Fig.11**).

8.-Conclusiones.

- La administración de dexametasona no promovió el aumento en los niveles de transcrito de los genes blancos directos de los glucocorticoides.
- No se pudo observar el efecto de dexametasona sobre los mecanismos que promueven la atrofia muscular: sistema ubiquitin/proteosoma y sistema autofagia/lisosoma
- La administración de mifepristona promovió el aumento en los niveles de expresión de los receptores de mineralocorticoides y *klf15*.
- La administración de mifepristona promovió el aumento en los niveles de expresión de componentes del sistema ubiquitin/proteosoma y apoptosis celular.
- Los resultados de esta tesis revelan que los MR, mediante mecanismos aún no conocidos en peces, estarían regulando procesos involucrados en la atrofia muscular, tales como el sistema ubiquitin/proteosoma y la apoptosis. Esto representa la primera evidencia del rol de los MR en procesos relacionados a atrofia muscular en peces.

9.-Proyecciones.

- Esta tesis representa la primera evidencia del rol de los MR en procesos relacionados a estrés y atrofia muscular en teleósteos.
- Los MR, mediante mecanismos desconocidos, estarían regulando procesos involucrados en la atrofia muscular, tales como el sistema ubiquitin/proteosoma y la apoptosis, por lo cual es de gran importancia estudiar los mecanismos involucrados.
- Este trabajo sienta las bases para futuros estudios relacionados al rol de los MR en :
 - Su función sobre los mecanismos de atrofia muscular.
 - La implicancia de estos receptores en la respuesta adaptativa al estrés.

10.- Modelo representativo propuesto en este estudio.

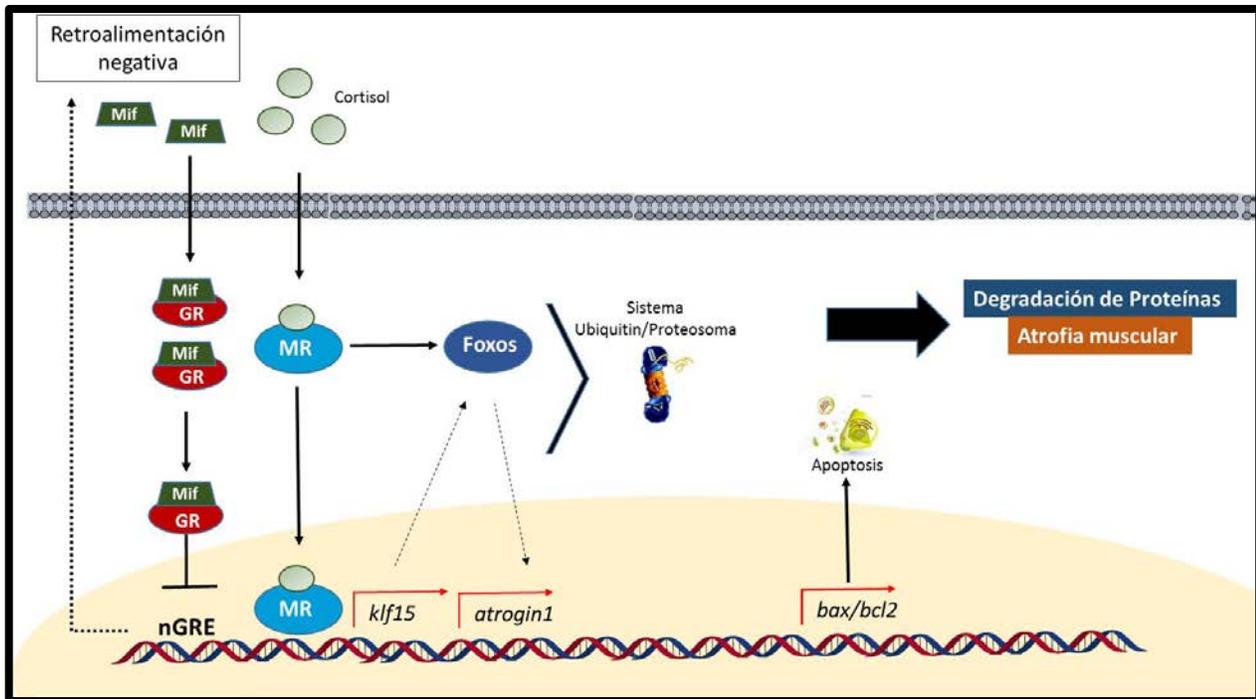


Figura 11: Mecanismo de acción de respuesta al estrés en peces tratados con mifepristona.

11.-Bibliografía

- Aedo JE, Maldonado J, Aballai V, Estrada J, Bastias-Molina M, Meneses C, Valdés J. (2015). "mRNA-seq reveals skeletal muscle atrophy in response to handling stress in a marine teleost, the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*)." *BMC genomics*.16:1024.
- Alers S, Löffler A.S, Wesselborg S, Stork B. (2012). "Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks." *Molecular and cellular biology*. 32:2-11.
- Alderman S, McGuire A, Bernier N, Vijayan M. (2012). "Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout." *General and comparative endocrinology*. 176: 79-85.
- Alsop D, Vijayan M. (2009). "The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost- specific genome duplication event." *General and comparative endocrinology* 161: 62-66.
- Alvial M y Manríquez J. (1999). "Diversification of flatfish culture in Chile." *Aquaculture* 176: 65-73.
- Baehr LM, Furlow JD, Bodine SC. (2011). "Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids." *Journal Physiology*. 589: 4759-4776.

- Barton B. (2002). "Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids." *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525.
- Bonaldo P, Sandri M. (2013). "Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy." *Disease models & mechanisms*. 6: 25-39.
- Bottino M.C, Cerliani J.P, Rojas P, Giulianelli S, Soldati R, Mondillo C, Amornphimoltham P. (2011). "Classical membrane progesterone receptors in murine mammary carcinomas: agonistic effects of progestins and RU-486 mediating rapid non-genomic effects." *Breast cancer research and treatment*. 126: 621-636.
- Bonga W. (1997). "The stress response in fish." *Physiological reviews*. 77: 591-625.
- Bury N, Sturm A. (2007). "Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish." *General and comparative endocrinology* 153: 47-56.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond M, Lin M, Juo P, Hu L, Anderson M, Arden K, Blenis J, Greenberg M. (1997). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* 96:857–868.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. (2005). "Endocrinology of the stress response." *Annual Review of Physiology* Vol. 67: 259-284

- Cheema Y, Zhao W, Zhao T, Khan M, Green K, Ahokas R, Gerling C, Bhattacharya S, Weber K. (2012). "Reverse remodeling and recovery from cachexia in rats with aldosteronism." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 303: H486-H495
- Davey HW, Xie T, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Waxman DJ, Grattan DR. (2001). "STAT5b Is Required for GH-Induced Liver *Igf-I* Gene Expression." *Endocrinology* 142: 3836–3841.
- De Young M, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen W. (2008). "Hypoxia regulates TSC1/2– mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling." *Genes & development* 22: 239-251.
- Duan C, Ren H. (2010). "Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF- binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation." *General and comparative endocrinology* 167: 344-351.
- Egerman MA, David J, Glass. (2014). "Signaling pathways controlling skeletal muscle mass." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 49: 59 – 68.
- Escobar S, Fuentes E, Poblete E, Valdés J, Safian D, Reyes A, Álvarez M, Molina A. (2011). "Molecular cloning of IGF-1 and IGF-1 receptor and their expression pattern in the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*)." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 159: 140–147
- FAO 2011. El estado mundial de la pesca y acuicultura.
- FAO 2014. El estado mundial de la pesca y acuicultura.

- FAO 2016. El estado mundial de la pesca y acuicultura.
- Fuentes E, Einarsdottir I, Valdes J, Alvarez M, Molina A, Björnsson B. (2012). "Inherent growth hormone resistance in the skeletal muscle of the fine flounder is modulated by nutritional status and is characterized by high contents of truncated GHR, impairment in the JAK2/STAT5 signaling pathway, and low IGF-I expression." *Endocrinology* 153: 283-294.(a)
- Fuentes, E. N., Ruiz, P., Valdes, J. A., & Molina, A. (2012). "Catabolic signaling pathways, atrogenes, and ubiquitinated proteins are regulated by the nutritional status in the muscle of the fine flounder". *Plos One* 153: 283-294.(b)
- Furuno K, Goodman M, Goldberg A. (1990). "Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy." *The Journal of Biological Chemistry* 265: 8550-8557.
- Glass DJ. (2003). "Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy" *Nature Cell Biology* 5: 87-90.
- Glass DJ. (2010). "Signaling pathways perturbing muscle mass." *Current opinion in clinical Nutrition and metabolic care* 13:225-229.
- Greenwood A, Butler P, White R, Demarco U, Pearce D, Fernald D. (2003). "Multiple Corticosteroid Receptors in a Teleost Fish: Distinct Sequences, Expression Patterns, and Transcriptional Activities Program in Neuroscience." *Endocrinology* 144: 4226-4236.

- Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez C. (2014). "The multifaceted mineralocorticoid receptor". *Comprehensive Physiology*. 4:965-994
- Gordon BS, Kelleher AR, Kimball SR. (2013). "Regulation of muscle protein synthesis and effects of catabolic states" *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 45: 2147-2157.
- Higashino K, Matsuura T, Suganuma K, Yukata K, Nishisho T, Higashino N. (2013). "Early changes in muscle atrophy and muscle fiber type conversion after spinal cord transection and peripheral nerve transection in rats." *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*.
- Hasnan J, Yusoff M.I, Damitri T.D, Faridah A.R, Adenan A.S, Norbaini T.H. (2010). "Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus". *Singapore medical journal*. 51:50.
- Higgins P, Thorpe P. (1990). "Hyperplasi and Hypertrophy in the growth of skeletal muscle in juvenile Atlantic Salmon". *Journal of Fish Biology*. Vol. 37, p 505-519.
- Jiang J, Young G, Kobayashi T, Nagahama Y. (1998). "Eel (*Anguilla japonica*) testis 11 β -hydroxylase gene is expressed in interrenal tissue and its product lacks aldosterone synthesizing activity." *Molecular and cellular endocrinology* 146: 207-211.

- Jentoft S, Aastveit A, Torjesen P, Andersen O. (2005). "Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 141: 353-358.
- Johnston I. (1982). "Physiology of muscle in hatchery raised fish." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 73: 105-124.
- Kim M, Kim D, Sohn Y. (2011). "Characterization of two functional glucocorticoid receptors in the marine medaka *Oryzias dancena*." *General and comparative endocrinology*. 171: 341-349.
- Kumar R, Calhoun W. (2008). "Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation." *Journal and Biologics: Targets and Therapy* 4: 845-854.
- Lang C, Frost R, Nystrom G, Jefferson L. (2007). "Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin1 and murf1 in skeletal muscle." *Endocrinology and metabolism*. 292: E501-512.
- Lee Y, Gustafsson Å.B. (2009). "Role of apoptosis in cardiovascular disease". *Journal of Reproduction and Development*. 14:536-548.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. (2011). "Autophagy in immunity and inflammation." *Nature* 469: 323-335.
- Levine B, Kroemer G. (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease". *Cell*. 132: 27-42.

- Lozano G, Bejarano I, Espino J, Gonzalez D, Ortiz A, Garcia J, Pariente J. (2009). "Density gradient capacitation is the most suitable method to improve fertilization and to reduce DNA fragmentation positive spermatozoa of infertile men". *Anatolian Journal of Obstetrics & Gynecology*.
- Lozano G, Bejarano I, Espino J, Gonzalez D, Ortiz, A, Garcia J, Pariente J.A. (2009). "Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone". *Journal of Reproduction and Development*. 55:615-621.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. (2005). "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis." *Cellpress* 120: 237-248.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden S, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg A, Schiaffino S, Sandri M. (2007). "FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo." *Cell metabolism* 6: 458-471.
- McCullers D, Herman J. (1998). "Mineralocorticoid receptors regulate bcl-2 and p53 mRNA expression in hippocampus". *Neuroreport*. 9: 3085-3089.
- Mihailidou Anastasia ¹ y Anthony Ashton ². Department of Cardiology, Northern Sydney Local Health District & Kolling Institute, Sydney, Australia¹. Department of Perinatal Research Laboratory, Division of Perinatal Health, RNSH & Kolling Institute, Sydney, Australia².
- Mommsen T, Vijayan M, Moon T. (1999). "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 211-268.

- Morales, M. G., Gutierrez, J., Cabello-Verrugio, C., Cabrera, D., Lipson, K. E., Goldschmeding, R., & Brandan, E. (2013). Reducing CTGF/CCN2 slows down mdx muscle dystrophy and improves cell therapy. *Human molecular genetics*, 22(24), 4938-4951.
- McCarthy JJ and Esser KA. (2010). "Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass." *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 3: 230-235.
- Nolly M.B, Pérez N.G, Morgan P.E, Villa-Abrille M.C, Caldiz C.I, Cingolani H.E. (2013). "Myocardial mineralocorticoid receptor activation by stretching and its functional consequences." *Hypertension*. 63:112-118
- Pariante C, Pearce B, Pisell T, Su C, Miller A. (2001). "The steroid receptor antagonists RU40555 and RU486 activate glucocorticoid receptor translocation and are not excreted by the steroid hormones transporter in L929 cells." *Journal of Endocrinology*.169:309-320.
- Pearce D, Náray-Fejes-Tóth A, Fejes-Tóth G. (2002). "Determinants of subnuclear organization of mineralocorticoid receptor characterized through analysis of wild type and mutant receptors." *Journal of Biological Chemistry*, 277: 1451-1456.
- Peeters B.W.M.M, Ruigt G.S.F, Craighead M, Kitchener P. (2008). "Differential effects of the new glucocorticoid receptor antagonist ORG 34517 and RU486 (mifepristone) on glucocorticoid receptor nuclear translocation in the AtT20 cell line." *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1148: 536-541.

- Pickering A, Pottinger T, Sumpter J. (1987). "On the use of Dexamethasone to Block the Pituitary-Interrenal Axis in the Brown Trout, *Salmo Trutta L.*" *General and comparative endocrinology* 65: 346-353.
- Porchas M, Martinez L, Enriquez R. (2009). "Cortisol and glucose: Realible indicators of fish stress." *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4: 158-178.
- Prunet P, Sturm A, Milla S. (2006). "Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts." *General and comparative endocrinology* 147: 17-23.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers R. (2002). "A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR." *Cancer Cell* 2:81–91.
- Ratman D, Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck I, De Bosscher K. (2013). "How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering." *Molecular and cellular endocrinology*. 380: 41-54.
- Rhen T, Cidlowski J. (2005). "Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs." *New England Journal of Medicine* 353: 1711-1723.
- Rowlerson A and Veggetti A. (2001). "Celular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species." *Muscle development and growth* p.103-140 (Vol 18 of Fish Physiology series).

- Salas-Leiton E, Coste O, Asensio E, Infante C, Cañavate J, Manchado M. (2012). "Dexamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese Sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1958)." *Fish shellfish immunology*. 32:769-778.
- Sanchez A, Candau R, Bernardi H. (2014). "FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 71: 1657-1671.
- Sandri M, Barberi L, Bijlsma AY, Blaauw B, Dyar KA, Milan G, Mammucari C, Meskers CG, Pallafacchina G, Paoli A, Pion D, Roceri M, Romanello V, Serrano AL, Toniolo L, Larsson L, Maier AB, Muñoz-Cánoves P, Musarò A, Pende M, Reggiani C, Rizzuto R, Schiaffino S. (2013). "Signaling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway". *Biogerontology*, 14: 303-323.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker S, Goldberg A. (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." *Cell* 117: 399-412.
- Seilliez I, Gutierrez J, Salmerón C, Skiba-Cassy S, Chauvin C, Dias K, Kaushik S, Tesseraud S, Panserat S. (2010). "An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 157: 258-266.

- Seilliez I, Dias K, Cleveland B.M. (2014). "Contribution of the autophagy-lysosomal and ubiquitin-proteasomal proteolytic systems to total proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 307: R1330-R1337.
- Schiaffino S, Dyar K, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. (2013). "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy." *FEBS Journal* 280: 4294-4314.
- Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. (2011). "Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle." *Cell metabolism* 13: 170-182.
- Silva A and Oliva M. (2010). "Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo de lenguado chileno (*Paralichthys adpersus*).". *Latin American Journal of aquatic Reserch* 38(3):377-386.
- Stitt T, Drujan D, Clarke B, Panaro F, Timofeyva Y, Kline W, Gonzalez M, Yancopoulos G, Glass D. (2004). "The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy- induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors." *Molecular cell* 14: 395- 403.
- Spoorenberg S, Deneer V.H, Grutters J.C, Pulles A.E, Voorn G.P, Rijkers G.T, Garde E. (2014). "Pharmacokinetics of oral vs. intravenous dexamethasone in patients hospitalized with community-acquired pneumonia." *British journal of clinical pharmacology*. 78: 78-83.

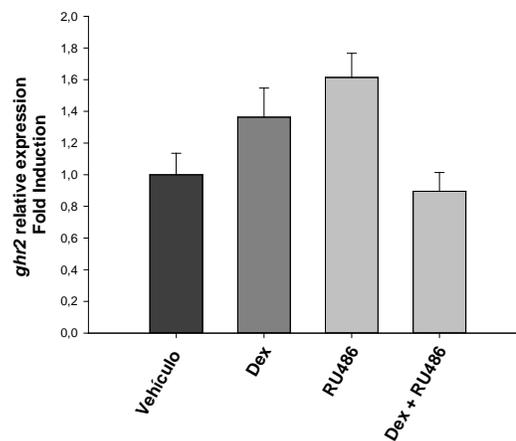
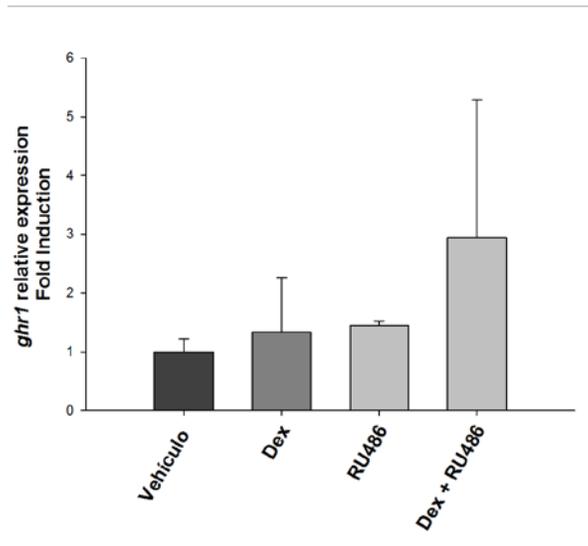
- Sturm A, Colliar L, Leaver M, Bury N. (2011). "Molecular determinants of hormone sensitivity in rainbow trout glucocorticoid receptors 1 and 2." *Molecular and cellular endocrinology*. 333:181-189.
- Sukhanov S, Yoshida T, Tabony A.M, Higashi Y, Galvez S, Delafontaine P, Semprun-Prieto L. (2011). "Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting". *The American journal of the medical sciences*. 342: 143-147.
- Teles M, Tridico R, Callol A, Fierro-Castro C, Tort L. (2013). "Differential expression of the corticosteroid receptors GR1, GR2 and MR in rainbow trout organs with slow release cortisol implants." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 164:506-511.
- Tort L. (2011). "Stress and immune modulation in fish." *Developmental & Comparative Immunology* 35: 1366-1375.
- Tissing W, Meijerink J, Den Boer M, Brinkhof B, Pieters R. (2005). "mRNA expression levels of (co) chaperone molecules of the glucocorticoid receptor are not involved in glucocorticoid resistance in pediatric ALL." *Leukemia* 19: 727-733.
- Troncoso R, Paredes F, Parra V, Gatica D, Vasquez-Trincado C, Quiroga C, Bravo-Sagua R, Lopez-Crisosto C, Rodriguez A, Oyarzun A, Kroemer G, Lavandero S.(2012). "Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance". *Cell Cycle*. 14:2281-2295.

- Valenzuela CA, Escobar D, Perez L, Zuloaga R, Estrada JM, Mercado L, Valdés JA, Molina A. (2015). "Transcriptional dynamics of immune, growth and stress related genes in skeletal muscle of the fine flounder (*Paralichthys adpersus*) during different nutritional statuses." *Developmental and comparative immunology*. 53:145-157.
- Weatherley A, Gill H. (1985). "Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth." *Experientia* 41: 353-354.
- Wiseman S, Osachoff H, Baseett E, Malhotra J, Bruno J, VanAnggelen G, Mommsen T, Vijayan M. (2007). "Gene expression pattern in the live during recovery from an acute stressor in rainbow trout." *Comparative biochemistry and physiology* 2: 234-244.
- Wang H, Kubica N, Ellisen L, Jefferson L, Kimball S. (2006). "Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1." *Journal of Biological Chemistry*.281: 39128-39134.
- Wood AW, Duan C, Bern HA. (2005). "Insulin-like growth factor signaling in fish." *International Review of Cytology*. 243: 215-285.
- Xiao T, Zhang Y, Wang Y, Xu Y, Yu Z, Shen X. (2013). "Activation of an apoptotic signal transduction pathway involved in the upregulation of calpain and apoptosis-inducing factor in aldosterone-induced primary cultured cardiomyocytes." *Food and chemical toxicology* 53: 364-370.
- Yakar S, Liu J, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B. (1999). "Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 7324-7329.

- Zhang C, Jiang Y, Wang W, Su T, Zhou W, Jiang L, Ning G. (2015). "Diagnostic value of ACTH stimulation test in determining the subtypes of primary aldosteronism." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 100: 1837-1844.

12. – Anexo

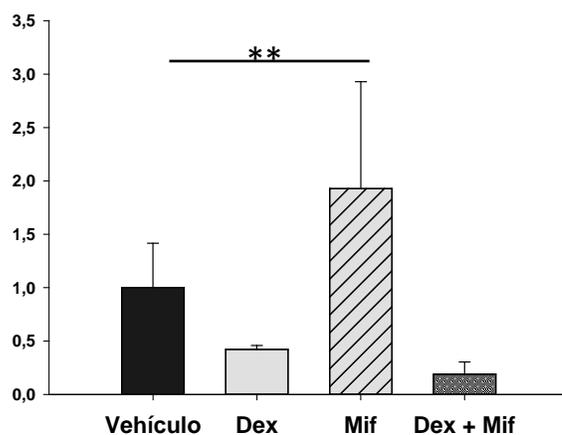
Anexo 1: Medición complementaria de los niveles de transcrito de *ghr1* y *gh2*



Niveles de transcrito de *ghr1* y *ghr2* en los diferentes tratamientos farmacológicos aplicados a los ejemplares de lenguado fino. El gráfico se muestra como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

Anexo 2: Medición complementaria de los niveles de transcrito de *bax/bcl2*

Los niveles de transcrito de esta relación muestran un aumento en los ejemplares tratados con Mif de aproximadamente 1,0 veces



Niveles de transcrito relación *bax/bcl2* en los diferentes tratamientos farmacológicos aplicados a los ejemplares de lenguado fino. El gráfico se muestra como el promedio \pm SEM (n=4), con un análisis estadístico ANOVA de una vía, con un nivel de probabilidad (**P < 0.01).

