



Universidad  
Andrés Bello®

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**“Impacto de la vía no canónica de cortisol sobre la expresión de *fndc5* en músculo esquelético de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)”**

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de  
Ingeniero en Biotecnología.

Director: Dr. Juan Antonio Valdés.

Laboratorio de Bioquímica Celular.

Facultad de Ciencias de la Vida.

Universidad Andrés Bello.

Carlos Agustin Espinoza Gonzalez

Santiago, Chile

2019, 2019

COBE

## **Agradecimientos.**

En primer lugar, quiero agradecer al profesor Juan Antonio Valdés por aceptarme para realizar esta memoria de título bajo su tutela en el Laboratorio de Bioquímica Celular.

Asimismo, extender este agradecimiento a las personas que conforman este laboratorio, del cual me llevo muy buenos recuerdos de todos los momentos que pasamos, pero especialmente les agradezco a Jorge y Marcia, por todo el apoyo y amistad brindados.

Mi más profundo agradecimiento va a mi familia, mis padres Juan Carlos y Rosalba, quienes a pesar de todo siempre me apoyaron y a mis hermanos Joaquin y Susana, quienes fueron una gran motivación para llevar esto a cabo.

Finalmente, agradezco al proyecto FONDAP INCAR 15110027 y FONDECYT 1171318 por el financiamiento de este trabajo.

Índice.	
1.-Resumen.....	1
2.-Abstract.....	2
3.-Introducción.....	3
3.1.-Acuicultura en Chile.....	3
3.2.-Estrés y corticosteroides.....	4
3.3.-Vías de señalización de cortisol canónica y no canónica.....	5
3.4.-Efectos de estrés mediado por cortisol mediante su vía no canónica de acción.....	6
3.5.-Irisina, una nueva mioquina.....	7
3.6.-Regulación y función de irisina.....	8
4.-Hipótesis.....	10
5.-Objetivo general.....	10
6.-Objetivos específicos.....	10
7.-Materiales y métodos.....	11
7.1.-Animales.....	11
7.2.-Ensayo <i>in vivo</i> de inducción de estrés mediado por cortisol.....	11
7.3.-Extracción de ARN y síntesis de cADN.....	11
7.4.-Diseño de partidores.....	12
7.5.-PCR en tiempo real.....	13
7.6.-Extracción de proteínas.....	13
7.7.- <i>Western Blot</i> .....	13
7.8.-Análisis estadístico.....	14
8.-Resultados.....	15
8.1.-Validación de partidores.....	15
8.2.-Perfil de expresión de <i>fndc5</i> .....	17
8.3.-Detección de FNDC5 en tejidos de trucha arcoíris.....	18
8.4.-Efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de <i>fndc5</i> en músculo esquelético de trucha arcoíris.....	19
8.5.- Efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de <i>pgc-1α</i> en músculo esquelético de trucha arcoíris.....	21
9.-Discusión.....	23
10.-Conclusiones y proyecciones.....	27
11.-Bibliografía.....	28

## Listado de abreviaturas.

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>cADN</b>	ADN complementario
<b>FNDC5</b>	<i>Fibronectin type III domain-containing protein 5</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>mARN</b>	ARN mensajero
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> co-activator 1<math>\alpha</math></i>
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i>
<b>PKB</b>	<i>Protein kinase B</i>
<b>PKC</b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative PCR</i>
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>UCP1</b>	<i>uncoupling protein 1</i>

## 1.-Resumen.

Actualmente, Chile tiene un papel importante en la acuicultura mundial, el 70,1% de esta actividad corresponde a salmónidos donde trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se ubica como el tercer producto más exportado. El rápido crecimiento de esta actividad y los cultivos intensivo de peces han generado factores de riesgo capaces de producir estrés. Esta condición es una alteración a la homeostasis del organismo y cortisol surge como la hormona principal en respuesta a estrés. El cortisol regula diversos procesos fisiológicos en respuesta a estrés por sus vías de acción canónica y no canónica, y se ha visto que en modelos *in vitro* de músculo esquelético de trucha arcoíris regula la expresión de *pgc-1 $\alpha$*  por su vía no genómica o no canónica de acción. Asimismo, se describió en mamíferos una nueva mioquina denominada irisina, la cual es generada y liberada al torrente sanguíneo a través de una acción proteolítica sobre el extremo N-terminal de *fibronectin type III domain-containing protein 5* (FNDC5), y es regulada positivamente por *pgc-1 $\alpha$*  en músculo esquelético. A pesar de la extensa información relacionada a irisina en mamíferos, los antecedentes con respecto a su rol durante la respuesta a estrés en teleósteos son limitados. Teniendo esto en consideración, en este trabajo proponemos evaluar la contribución ambas vías de señalización de cortisol (canónica y no canónica) sobre la expresión *fndc5*, el cual codifica para FNDC5, precursor de irisina, y *pgc-1 $\alpha$*  en músculo esquelético de trucha arcoíris. Para ello, primero verificamos la presencia del transcrito (*fndc5*) y proteína FNDC5 en diferentes tejidos de trucha arcoíris. Posteriormente, evaluamos por RT-qPCR los niveles de transcrito de *fndc5* en el músculo esquelético de truchas arcoíris sometidas a un ensayo de administración exógena de cortisol y cortisol-BSA, modulando las vías de acción canónica y no canónica de cortisol. A pesar de que los resultados obtenidos no son los esperados, ya que no se logró obtener evidencia concluyente de que vía de acción de cortisol estaría regulando la expresión de irisina, se logró generar su perfil de expresión. Así abriendo la puerta al estudio de esta proteína en trucha arcoíris.

## 2.-Abstract.

Currently, Chile has an important role in world aquaculture, 70.1% of this activity corresponds to salmonids, where rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is the third most exported product. The rapid growth of this activity in Chile due to the intensive fish cultures have generated risk factors capable of producing stress. This condition is an alteration on the homeostasis of the organism, where cortisol is the key hormone in response to stress. Cortisol regulates various physiological processes in response to stress by its canonical and non-canonical pathways, and it has been reported that in an *in vitro* model in rainbow trout skeletal muscle, regulates the expression of *pgc-1 $\alpha$*  through its non-genomic or non-canonical action pathway. Likewise, a new myokine named irisin was described in mammals, which is the product of a proteolytic action over the N-terminal fraction of *fibronectin type III domain-containing protein 5* (FNDC5), and is positively regulated by *pgc-1 $\alpha$*  in skeletal muscle. Despite the extensive information related to irisin in mammals, the antecedents with respect to its role during the response to stress in teleosts are limited. With this in mind, in this work we propose to evaluate the contribution of both cortisol signaling pathways (canonical and non-canonical) on the expression *fndc5*, which codes for FNDC5, precursor of irisin, and *pgc-1 $\alpha$*  in skeletal muscle of rainbow trout. For this propose, we first verified the presence of the transcript (*fndc5*) and protein FNDC5 in different rainbow trout tissues. Subsequently, we evaluated by RT-qPCR the levels of *fndc5* mRNA in the skeletal muscle of rainbow trout submitted to an exogenous administration of cortisol and cortisol-BSA, modulating the canonical and non-canonical cortisol action pathways. Although the results obtained are not as expected, since conclusive evidence could not be obtained on which cortisol action pathway would be regulating the expression of irisin, it was possible to generate its expression profile. Thus opening the door to the study of this protein in rainbow trout.

### **3.-Introducción.**

#### **3.1.-Acuicultura en Chile.**

La acuicultura tiene un papel importante en la alimentación global, donde en conjunto con la pesca se generaron a nivel mundial 167,2 millones de toneladas de peces en el año 2014 (FAO, 2016). Asimismo, en el año 2015 los peces representaron el 20% del consumo de proteína animal (OECD, 2016). En el caso de Chile, se ha visto un crecimiento rápido de esta actividad en donde entre los periodos de los años 2000-2016 se experimentó un aumento del 265% de productos provenientes de la acuicultura (FAO, 2016). En el año 2016, la piscicultura nacional conformada por salmón del atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) produjo 855.351 toneladas. De estos, 76.960 toneladas corresponden a trucha arcoíris. El cultivo de peces representa un 70.1% del total producido por la acuicultura en Chile y la trucha arcoíris el 9% aproximadamente (SERNAPESCA, 2017). La trucha arcoíris es un pez carnívoro, que habita aguas frías y su cultivo se extiende entre las regiones VIII y XII (SERNAPESCA, 2017) y la exportación de esta generó US\$468 MM en exportaciones en el año 2017 (FOB Chile, 2017).

Así, siendo Chile uno de los principales exportadores de esta especie y el impacto que tiene este producto en la economía, resalta la importancia de su estudio para poder generar estrategias que permitan mejorar la producción de este recurso. Además, la rápida expansión de la acuicultura ha generado el aumento de diversos factores de riesgos como altas densidades de cultivo, baja calidad del agua, mala nutrición y vegetación acuática (Ikeogu *et al.* 2010) los cuales son factores que potencialmente generan estrés en los peces.

### **3.2.-Estrés y corticosteroides.**

El estrés se define como una condición donde la homeostasis del organismo es perturbada por un estímulo denominado estresor, desencadenando una respuesta fisiológica de carácter adaptativa o compensatoria lo que le permite al organismo sobrellevar este estado de homeostasis alterada y recuperar la normalidad de sus procesos fisiológicos. Sin embargo, si el estresor es sostenido en el tiempo, se produce una condición de estrés crónico en donde la respuesta fisiológica pierde su valor adaptativo y el organismo se vuelve disfuncional (Wendelaar Bonga, 1997). La respuesta fisiológica al estrés puede ser clasificada en tres niveles, primero está la respuesta primaria la cual consiste en la liberación de catecolaminas y la estimulación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal promoviendo la secreción de corticosteroides y la generación de cambios de comportamiento inmediatos como, por ejemplo, escapar. La respuesta secundaria consiste en cambios fisiológicos como variaciones en los niveles de metabolitos en tejidos o en el plasma, cambios a nivel hematológico (aumento de glóbulos rojos y glucosa en sangre) y alteraciones del comportamiento como ingesta de alimento reducida. Si el estresor es mantenido en el tiempo se puede provocar una respuesta terciaria, la que se caracteriza por causar efectos sobre todo el individuo, como cambios en el crecimiento, resistencia a enfermedades, reproducción y aumento en tasas de mortalidad. (Barton, 2002, Ellis T. *et al.* 2012).

El principal corticosteroide en peces es cortisol, el cual es considerado el regulador maestro de la respuesta a estrés, y cuya secreción está dada por la acción del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal. Cuando es percibido el agente estresor por el hipotálamo este modula la secreción de la hormona adrenocorticotropica (ACTH), ACTH interactúa con sus receptores en el riñón cefálico, dando como resultado la secreción de cortisol al torrente sanguíneo (Mommsen *et al.* 1999).



### 3.3.-Vías de señalización de cortisol canónica y no canónica.

El mecanismo de acción de cortisol es atribuido principalmente a la vía genómica o, también denominada, vía canónica de acción. Esta vía describe que el cortisol difunde desde el medio al citoplasma de las células, donde interactúa con sus receptores citoplasmáticos denominados receptores de glucocorticoides. Una vez formado este complejo, transloca al núcleo, donde, gracias a su dominio de unión a ADN se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides, los cuales se ubican en la región 5' de los promotores de genes sensibles a glucocorticoides promoviendo su transcripción o represión (Mommensen *et al*, 1999). Este mecanismo de acción puede tardar horas o días para generar un efecto a nivel celular, tejido u organismo. Sin embargo, se han detectado efectos asociados a glucocorticoides que ocurren en cortos periodos de tiempo, incluso en tiempos tan cortos como entre uno y dos minutos (Schmidt *et al*. 2000), los que son incompatibles con el tiempo que demora la activación de la vía canónica de cortisol (Löwenberg *et al*. 2007). Este tipo de efectos se le atribuyen a un segundo mecanismo de acción de cortisol, denominado vía no genómica o no canónica de acción (Faught & Vijayan, 2016).

Esta segunda vía de señalización inicia en la membrana plasmática y actualmente se describen cuatro posibles formas de la acción de cortisol en la membrana. Primero podría ser por una modulación de cambios biofísicos en la membrana provocando la activación de mecanismos de señalización intracelulares (Das *et al*, 2018). Otro método puede ser la activación de receptores de membrana, independientes de receptores de glucocorticoides, lo que iniciaría una rápida cascada de señalización (Das *et al*, 2018). Luego está la posibilidad de que cortisol module la translocación de receptores de glucocorticoides desde el espacio intracelular a la membrana (Das *et al*, 2018). Por último, el cortisol también podría estar iniciando esta rápida respuesta alterando los niveles de  $Ca^{+2}$ , modulando canales de  $Ca^{+2}$  transmembrana y provocando un aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular, lo que ha sido reportado como clave para su acción como segundo mensajero permitiendo una respuesta rápida a glucocorticoides en vertebrados (Das *et al*, 2018). Así, mediante alguna de estas vías de acción, el cortisol produce cambios detectables en poco tiempo. Esta vía puede ser selectivamente activada utilizando análogos impermeables a la membrana plasmática, como, cortisol-BSA (Ayrout *et al*, 2017).

### 3.4.-Efectos de estrés mediado por cortisol mediante su vía no canónica de acción.

Los efectos en respuesta a estrés mediado por cortisol por su vía de señalización canónica han sido ampliamente estudiados en peces, esta se ha vinculado con respuestas bioquímicas y fisiológicas adaptativas, como, regulación osmótica e iónica, crecimiento, metabolismo, respuesta inmune y reproducción (Aluru & Vijayan, 2009). Sin embargo, existe poca información de los efectos vinculados a la acción no canónica de cortisol en peces. Respecto a la limitada información relacionada a la vía no canónica de cortisol en teleósteos, se destacan los estudios de Agnisola *et al.*, 2004 que da cuenta de un aumento de vasoconstricción coronaria mediado por la acción rápida de glucocorticoides y los trabajos de Dindia *et al.*, 2012, 2013 que describen un aumento rápido de la fosforilación de los sustratos de PKA, PKB y PKC debido a cortisol. Finalmente, Espinoza *et al.*, 2017 determinaron un alza en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un cultivo *in vitro* de miotubos de trucha arcoíris, debido a la señalización rápida de cortisol iniciada en la superficie celular. Esta señalización implica la activación de la vía ERK1/2, CREB promoviendo el incremento de la expresión de *pgc-1 $\alpha$* , el cual es un participante clave del metabolismo energético de la célula. *pgc-1 $\alpha$*  codifica para *Peroxisome proliferator-activated receptor y co-activator 1 $\alpha$*  (PGC-1 $\alpha$ ) este corresponde al regulador maestro de la biogénesis mitocondrial y gasto de energía. Es inducido en el músculo esquelético por ejercicio y originalmente fue descrito como coactivador de PPAR- $\gamma$ , modulando la expresión de *uncoupling protein 1* (UCP1) y la termogénesis en el tejido adiposo marrón, proceso en el cual UCP1 oxida el tejido adiposo marrón produciendo calor (Puigserver *et al*, 1998).

### 3.5.-Irisina, una nueva mioquina.

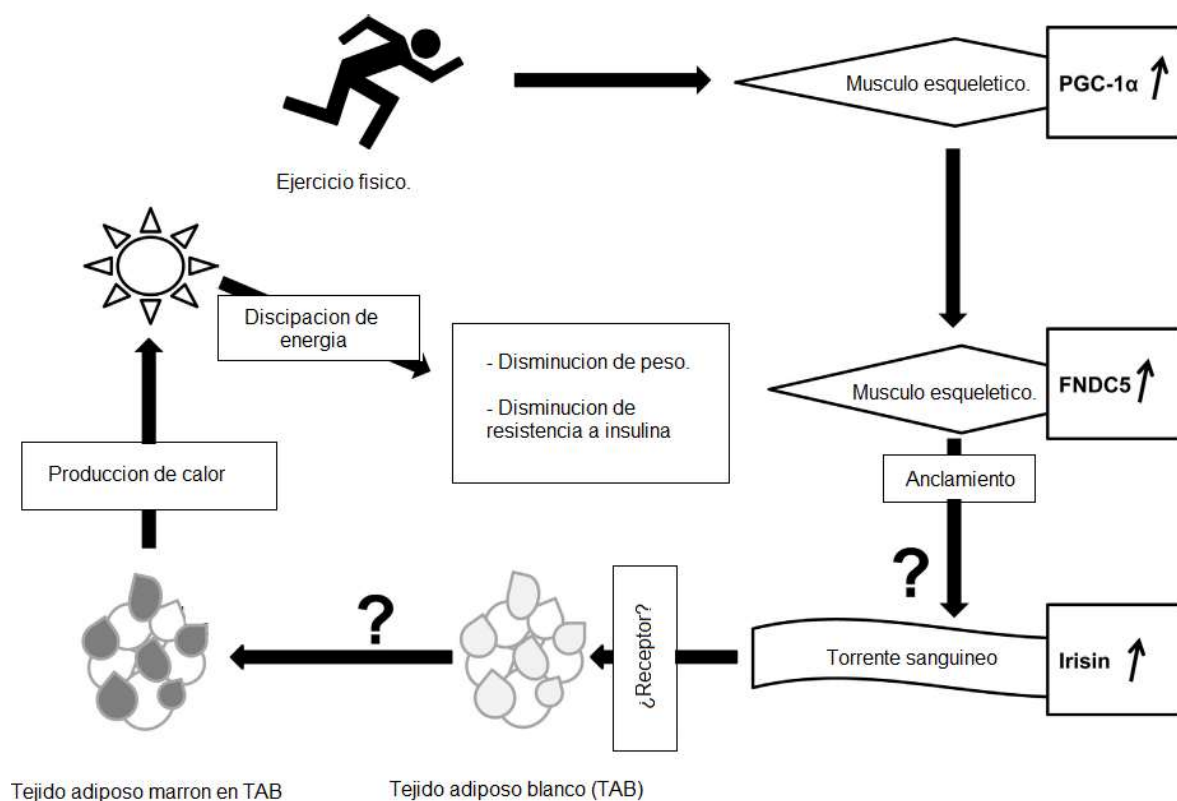
Un reciente estudio por Boström *et al*, 2012 en el que se buscaban genes relacionados a termogénesis y el desarrollo de tejido adiposo marrón, utilizando como modelo de estudio ratones transgénicos sobreexpresores de *pgc-1α* en músculo debido a que estos presentaban un fenotipo resistente a diabetes y obesidad asociada al envejecimiento. Uno de los hallazgos de este grupo fue identificar que *fibronectin type III domain-containing protein 5* (FNDC5), la cual es una proteína de membrana cuya expresión es dependiente de PGC-1α, constituida por un péptido señal, dos dominio de fibronectina y un dominio hidrofóbico (figura 1), secreta el dominio N-terminal por acción proteolítica a la circulación como irisina (Grygiel-Górniak & Puszczewicz, 2017).



**Figura 1. Estructura de FNDC5.** Esquema representativo de la estructura de FNDC5. SP, péptido señal; H, sitio hidrofóbico; C, dominio C-terminal (imagen modificada desde Boström *et al*, 2012)

Así, irisina fue descrita como una mioquina, las cuales corresponden a citoquinas secretadas por el músculo esquelético que pueden actuar de forma paracrina, autocrina o endocrina. Irisina induce el pardeamiento del tejido adiposo blanco permitiendo la oxidación de este por UCP1 y, en consecuencia, provocando pérdida de peso corporal y disminuyendo la resistencia a la insulina (Boström *et al*, 2012).

Como se muestra esquematizado en la figura 2, el modelo actual de la vía de señalización de irisina corresponde a: Aumento de PGC-1α por ejercicio, esto promueve la expresión de FNDC5, la cual, por una acción proteolítica (aún desconocida), irisina es liberada a la circulación, actuando sobre el tejido adiposo blanco promoviendo el pardeamiento de este y regula positivamente la expresión de UCP1 en la membrana externa de la mitocondria, lo que finaliza con un aumento en la termogénesis (producción de calor) debido a la oxidación de ácidos grasos (Panati *et al*, 2016).



**Figura 2. Vía de señalización de irisina.** A partir de un estímulo por ejercicio físico, se activa la vía de señalización en músculo esquelético, desencadenando en disminución de peso y disminución de resistencia a insulina (Imagen modificada desde Hofmann *et al*, 2014).

### 3.6.-Regulación y función de irisina.

Irisina ha sido ampliamente estudiada en mamíferos, destacando en humanos debido a los posibles usos que esta podría tener en terapias contra la obesidad y la diabetes tipo 2 (Martinez *et al*, 2018). En humanos se han evaluado los efectos en la expresión de *fnDC5* en conjunto con *pgc-1α* en distintos regímenes de ejercicio correspondientes a actividad física aguda y crónica en músculo. Con respecto a los resultados obtenidos en pacientes sometidos a actividad física aguda, se ha logrado vincular solo en algunos casos una relación positiva entre estos dos genes, esta misma tendencia se mantiene para los estudios realizados bajo un régimen de ejercicio físico crónico (Dinas *et al*, 2017). También se evaluó irisina bajo estas condiciones

entregando resultados similares a los anteriores, donde predomina la discordancia e incluso contradicciones entre los estudios (Dinas *et al*, 2017).

Si bien el estudio de irisina ha sido enfocado a su regulación en músculo y, principalmente a su función en la termogénesis, se ha reportado que irisina también está involucrada cumpliendo funciones regulatorias de otros procesos, como diferenciación de células neuronales (Forouzanfar. *et al*, 2015), regulación del apetito (Ferrante *et al*, 2016), como factor pro miogénico (Reza *et al*, 2017), incluso llegando a ser relacionada con *Alzheimer Disease* (Kim & Song, 2018).

Por otra parte, los estudios relacionados con el rol de irisina en modelos teleósteos son reducidos. En pez dorado (*Carassius auratus*) se obtuvo el perfil de expresión de FNDC5 y se sugiere que irisina cumple funciones reguladoras sobre el sistema nervioso central (Butt *et al*, 2016). En pez cebra (*Danio rerio*) se reporta que irisina tiene un rol regulatorio a nivel cardiaco y que podría estar regulando, en músculo esquelético, a miostatina y troponina pudiendo tener un papel en la atrofia muscular (Sundarrajan *et al*, 2017). Así, también que irisina es relevante en regular la ingesta de alimento en este modelo (Sundarrajan & Unniappan, 2017). Otra información reportada revela que irisina participa en la angiogénesis en embriones de pez cebra (Wu *et al*, 2015) y, en tilapia (*Oreochromis niloticus*), se ha mostrado que estaría contribuyendo a la regulación de gonadotropinas (Jiang *et al*, 2017) y que podría estar inhibiendo la síntesis de la hormona del crecimiento (Lian *et al*, 2017).

Así, con los reportes mencionados anteriormente, se da cuenta que irisina podría ser más relevante de lo que se pensaba desde un comienzo, ya que estaría actuando no solo como una mioquina regulando la termogénesis. Conociendo que *pgc-1 $\alpha$*  es regulado por la vía no canónica de cortisol en miotubos de trucha arcoíris y que este, a su vez, regula a irisina, la que en teleósteos podría incluso estar involucrada en la atrofia muscular, resulta relevante generar mayor conocimiento de esta proteína, además de empezar a elucidar como esta es regulada bajo estrés, la cual es una condición presente en la piscicultura, lo que podría ayudar a generar estrategias para obtener mayores rendimientos en los cultivos.

#### **4.-Hipótesis.**

“*fndc5* es expresado en el músculo esquelético de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la regulación transcripcional de *fndc5* y *pgc-1 $\alpha$*  es mediada por la señalización no canónica de cortisol”

#### **5.-Objetivo general.**

Determinar el perfil de expresión de *fndc5* y evaluar los efectos de las vías de señalización canónica y no canónica de cortisol en la expresión de *fndc5* y *pgc-1 $\alpha$*  en músculo esquelético de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

#### **6.-Objetivos específicos.**

- 1- Determinar la expresión de *fndc5* en tejidos de trucha arcoíris.
- 2- Determinar la presencia de FNDC5 en distintos tejidos de trucha arcoíris.
- 3- Evaluar el efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de *fndc5* en músculo esquelético de trucha arcoíris.
- 4- Evaluar el efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de *pgc-1 $\alpha$*  en músculo esquelético de trucha arcoíris.

## **7.-Materiales y métodos.**

### **7.1.-Animales.**

Las truchas arcoíris utilizadas son provenientes de la piscicultura Rio Blanco, ubicada en Av. Altamirano 1424, 1480. Valparaíso, V Región, Chile.

### **7.2.-Ensayo *in vivo* de inducción de estrés mediado por cortisol.**

Para evaluar la expresión de los genes candidatos y como estos son regulados por las vías de acción de cortisol se utilizaron muestras provenientes de un ensayo *in vivo* realizado anteriormente por nuestro grupo de trabajo.

Este ensayo consistió en tratar truchas arcoíris juveniles con metirapona (1 mg/kg) por 1 hora y posteriormente dividir las en cuatro tanques. Los tanques uno y dos fueron tratados con cortisol y cortisol-BSA (10 mg/kg de pez) respectivamente. Como grupos control, los tanques tres y cuatro fueron tratados con solución vehículo (PBS1x, DMSO y NP-40 0,05%) y BSA (0,3 mg/kg de pez). A los tiempos de 1, 3 y 9 horas de tratamiento se procedió a practicar eutanasia a los peces (n=6) por sobredosis de benzocaína y extraer músculo esquelético, para ser inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C para ser utilizado posteriormente.

### **7.3.-Extracción de ARN y síntesis de cADN.**

Se extrajo ARN utilizando TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a partir de diferentes tejidos de trucha arcoíris juvenil sin tratamientos farmacológicos (n=3). Los tejidos fueron: hígado, bazo, intestino, corazón, cerebro, branquias, músculo esquelético, riñón cefálico y riñón posterior. Adicionalmente se extrajo ARN desde músculo esquelético proveniente de los peces sometidos al ensayo *in vivo* anteriormente descrito. Para la extracción de ARN por TRIzol se siguieron las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, el tejido (máximo 0,1 gr) fue homogenizado en tubos de 2.0 mL conteniendo 1 mL de TRIzol a 4 °C, se añadieron 200 uL de cloroformo frío (-20 °C), se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Luego se centrifugó a 12.000 xg por 15 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL y se precipitó el ARN adicionando 500 uL isopropanol 100% frío (-20 °C), incubando a temperatura ambiente por 10 minutos.

Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12.000 xg a 4 °C y se descartó el sobrenadante y el precipitado (ARN) se lavó con 1 mL de etanol 75% (-20 °C), centrifugando por 5 minutos a 4.000 xg a 4 °C (este lavado se repitió 3 veces). Finalmente se descartó el etanol y se dejó secando el precipitado a temperatura ambiente para luego ser resuspendido en 30 ul de agua libre de nucleasas. El ARN fue cuantificado utilizando Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System (BioTek, VT, USA) y su pureza fue estimada determinando la razón de ABS 260/280. Finalmente, se evaluó la integridad del ARN visualizándolo en un gel de agarosa denaturante 1,2%, el cual fue pre corrido por 30 minutos a 70 V y luego corrido por 30 minutos a 90 V con las muestras.

Se sintetizó cADN mediante el uso del kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, TX, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron 800 ng de ARN con una relación de ABS 260/280 entre 1,8 y 2,1 y con integridad óptima.

#### 7.4.-Diseño de partidores.

Trucha arcoíris posee 6 isoformas de *fndc5*, por lo cual para diseñar un juego de partidores que pueda amplificar todas las isoformas. Se realizó un alineamiento múltiple de estas con la herramienta Clustal W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las secuencias candidatas para partidores fueron analizadas por las herramientas Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) y OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Los partidores utilizados se pueden observar en la tabla 1.

**Tabla 1. Partidores utilizados.** Secuencias sentido y anti sentido de los partidores utilizados, se indica su temperatura de fusión (Tm) y su eficiencia.

Gen	Sentido	Secuencia	Tm (°C)	Eficiencia (%)
<i>fndc5</i>	5'-3'	TTCGCCATCACACAGCAGAA	61	99,8
	3'-5'	GCACAATGTAGTCGGTCTCC		
<i>s30</i>	5'-3'	CATTTAGGAGTTGGCGTTGG	57	101,2
	3'-5'	CCAAGGTTGAAAAGCAGGAG		
<i>gapdh</i>	5'-3'	GGAAGGACAGCGAAGTGAAG	60	102,9
	3'-5'	GGAGATGATGACCCTCTTGG		
<i>pgc-1α</i>	5'-3'	GCTGGAGCTGGATGACAGTGA	63	103,90
	3'-5'	GCGGTCTCCACAGCAGAT		



### **7.5.-PCR en tiempo real.**

El análisis por PCR en tiempo real de *fndc5* y *pgc-1 $\alpha$*  fue llevado a cabo en un termociclador Stratagene MX3000P qPCR System (Stratagene, CA, USA). Cada reacción contuvo 7,5  $\mu$ l de Brilliant II SYBR Master Mix 2X (Agilent Technologies), 6  $\mu$ l de cDNA (diluido 10 veces desde el stock), 0,75  $\mu$ l de cada partidor a una concentración de 5  $\mu$ M y 0.2  $\mu$ l de ROX 1 mM, además se incluyeron controles negativos sin templado y un control de síntesis de cDNA (sin transcriptasa reversa), Se evaluó la curva de disociación para confirmar que los partidores amplificaran un producto único y el programa de PCR utilizado para los análisis fue: inicial de 10 minutos a 95°C, intermedia de 40 ciclos, 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la T<sub>m</sub> correspondiente para el partido (temperatura de fusión), 30 segundos a 95°C y una etapa final de extensión de 30 segundos a 72°C.

### **7.6.-Extracción de proteínas.**

Se extrajeron proteínas totales de truchas arcoíris juveniles sin ningún tratamiento farmacológico (n=3) desde hígado, bazo, intestino, corazón, cerebro, branquias, músculo esquelético, riñón cefálico y riñón posterior. Estos fueron homogenizados utilizando un homogeneizador de tejidos (Tissue Master 125, OMNI International, GA, USA) en buffer de lisis 2X (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; NaCl 300 mM, EDTA 2 mM, Nonidet-P40 2%) conteniendo inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail set III EDTA-free, Calbiochem No. 539131), posteriormente se centrifugaron por 30 minutos a 12.000 x g a 4 °C, el sobrenadante se recuperó y se cuantificaron con el kit BCA Pierce siguiendo el protocolo del fabricante (Thermofisher, USA), los extractos fueron almacenados a -20 °C para su posterior uso.

### **7.7.-Western Blot.**

Las muestras fueron preparadas tomando 12  $\mu$ g de proteínas y añadiéndoles buffer de carga 5X (Tris-HCl pH 6,8 1 M, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%. B-mercaptoetanol 200 mM) y se sometieron a 95 °C por 10 minutos. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE en geles 12% a 100 V por 90 minutos y transferidas a una membrana de PDVF utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (BioRad, CA, USA) con su protocolo pre determinado para proteínas de peso molecular mixto. El gel fue teñido con azul de coomasie (Coomassie Brilliant Blue R250 0,01%, metanol 50% y ácido acético 10%) como control de transferencia. La membrana se bloqueó por 1 hora a temperatura ambiente con ECL 2% (GE Healthcare, UK) y fue posteriormente incubada con anticuerpo primario contra FNDC5 durante la

noche a 4 °C (Abcam, ab131390). Luego se incubó con anti-rabbit conjugado con HRP por 1 hora a temperatura ambiente y por último se reveló con el kit ECL Advance™ Western Blotting Detection (GE Healthcare, UK).

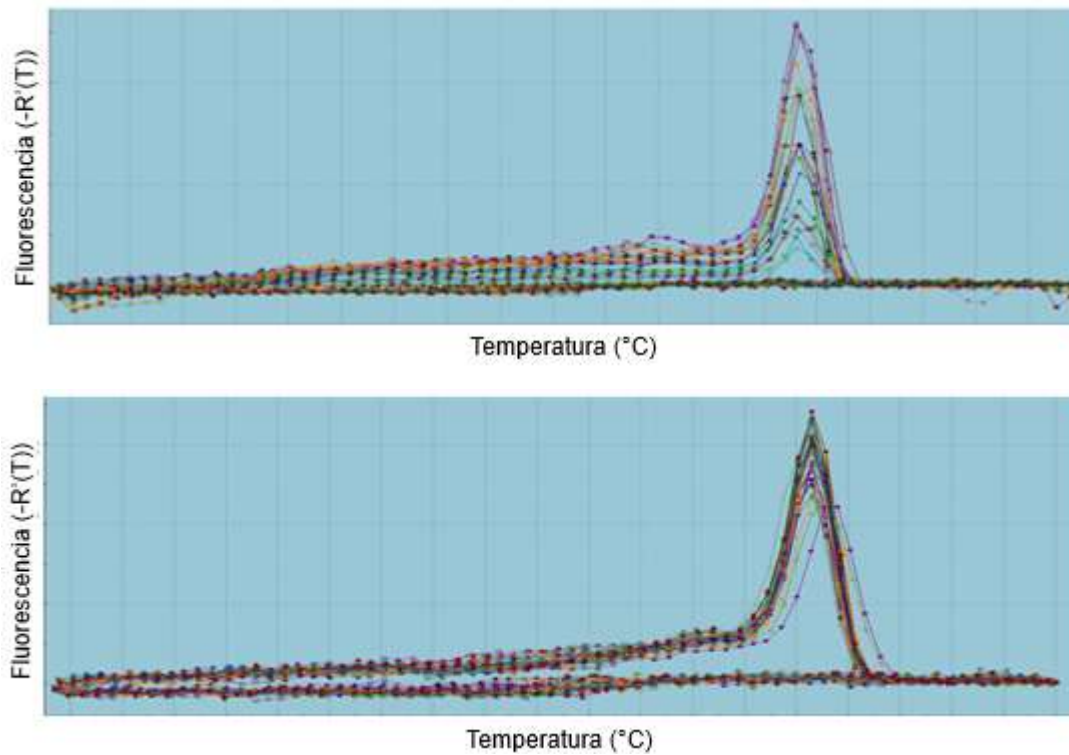
### **7.8.-Análisis estadístico.**

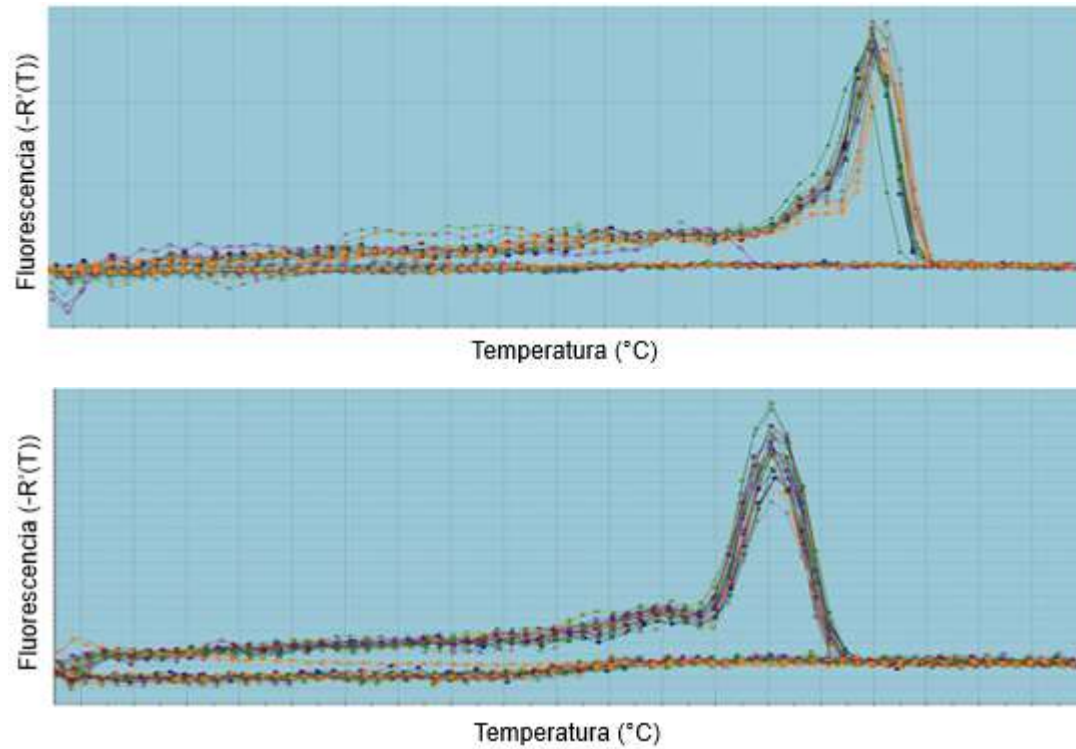
Los resultados obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía (one way-ANOVA) y luego por el análisis estadístico de Tukey. La probabilidad considerada fue de un valor de probabilidad significativa de  $P < 0,05$  con un  $n=3$  para los ensayos de perfil de expresión de *fnDC5* y detección de FNDC5, y, con un  $n=6$  para los análisis a partir del ensayo *in vivo*. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados en el software GraphPad Prism 6.

## 8.-Resultados.

### 8.1.-Validación de partidores.

Se realizó una curva de disociación para validar los juegos de partidores usados. Se observa una única curva en los partidores evaluados, lo cual indica que se amplificó un solo producto de PCR y son aptos para continuar con los análisis (figura 3).

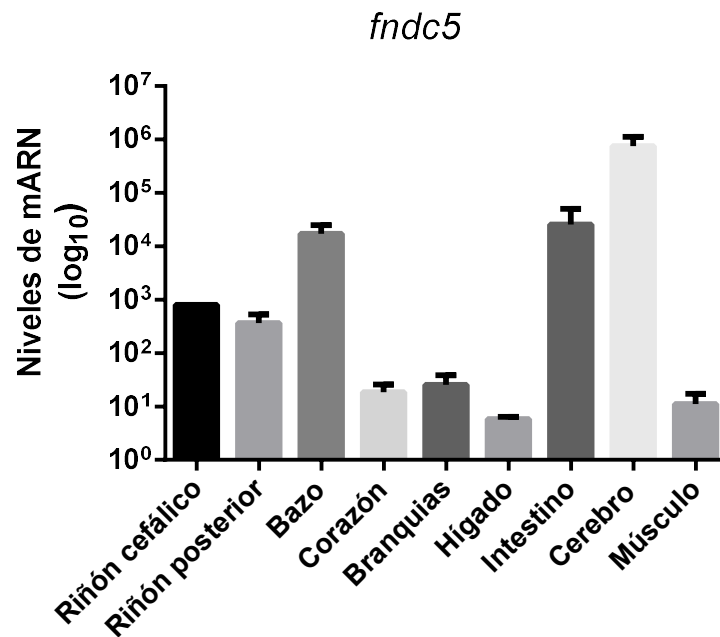




**Figura 3. Curvas de disociación de partidores.** Las curvas de disociación corresponden a *fndc5*, *S30*, *gapdh* y *pgc-1a* respectivamente. Los ejes muestran la fluorescencia (Y) y la temperatura (X). se aprecia una única curva para los partidores evaluados, implicando que amplifican un producto único de PCR.

## 8.2.-Perfil de expresión de *fndc5*.

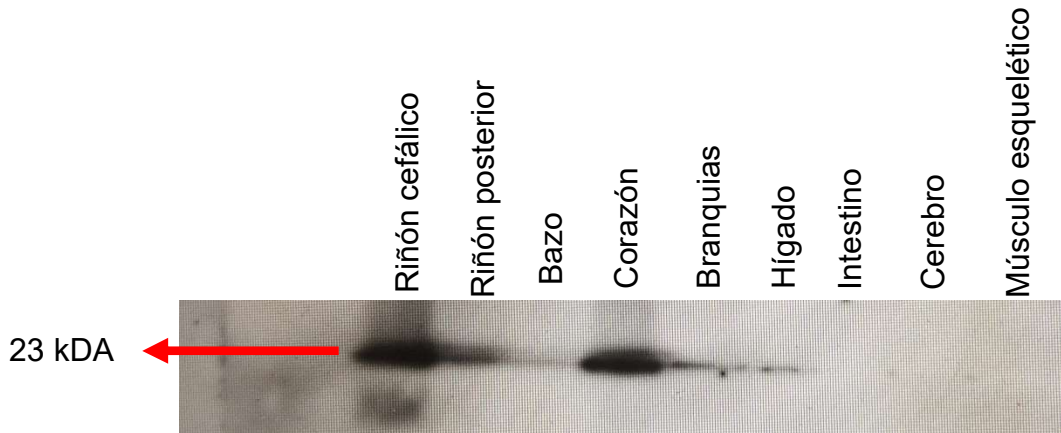
Para identificar en que tejidos se está expresando *fndc5*, se evaluaron peces mantenidos sin ningún tipo de tratamiento. Los valores graficados corresponden al promedio de cada muestra analizada (n=3). y se muestran como el  $\log_{10}$  del nivel de mARN (figura 4). En todos los tejidos evaluados se detectó expresión de *fndc5*.



**Figura 4. Perfil de expresión de *fndc5* en tejidos de trucha arcoíris.** los resultados se muestran como el  $\log_{10}$  del nivel de mARN normalizada contra *gapdh*. Los gráficos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM (n=3)

### 8.3.-Detección de FNDC5 en tejidos de trucha arcoíris.

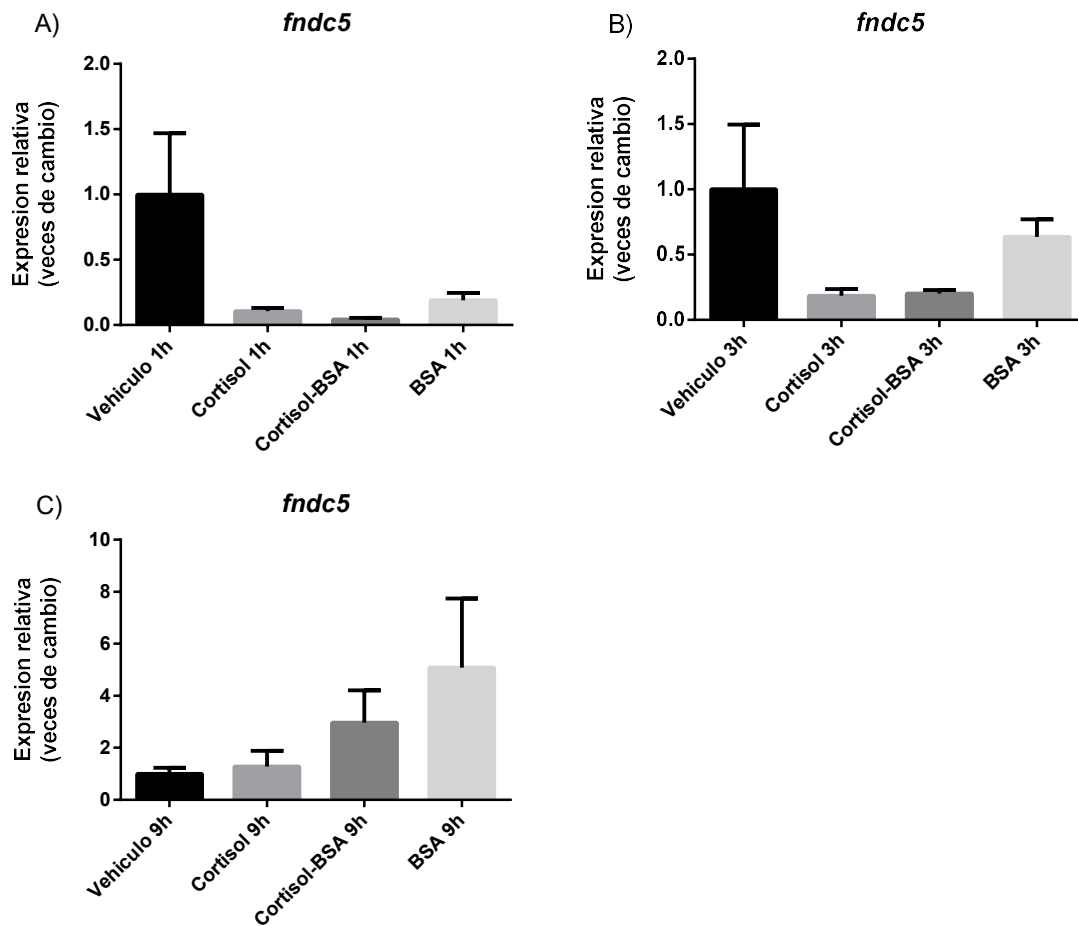
A partir de las proteínas extraídas de truchas arcoíris (n=3) se llevaron a cabo ensayos de *western blot* para analizar en qué tejidos está presente FNDC5. A continuación, en la figura 5 se muestra una imagen representativa de la presencia de FNDC5 en distintos tejidos de trucha arcoíris. FNDC5 fue detectada en riñón cefálico, riñón posterior, bazo, corazón, branquias e hígado.



**Figura 5. Detección de FNDC5 en tejidos de trucha arcoíris por *western blot*.** Imagen representativa de la localización de FNDC5 en diferentes tejidos de trucha arcoíris a partir de extracciones de proteínas totales. FNDC5 fue detectado a 23 kDa.

#### **8.4.-Efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de *fndc5* en músculo esquelético de trucha arcoíris.**

Se evaluó la expresión de *fndc5* en músculo esquelético de truchas arcoíris tratadas farmacológicamente por 1, 3 y 9 horas con cortisol y cortisol-BSA (cortisol impermeable a membrana), utilizando como controles el grupo vehículo y BSA (figura 6). El objetivo de este experimento fue determinar si la expresión de *fndc5* es regulada, en primera parte, por estrés y también evidenciar que vía de señalización de cortisol estaría llevando a cabo esta regulación. A pesar de no haber diferencia significativa en la expresión de *fndc5* entre los tratamientos a las diferentes horas, se aprecia una tendencia a las 1 y 3 horas post tratamiento de una disminución en la expresión de este gen con respecto al vehículo.

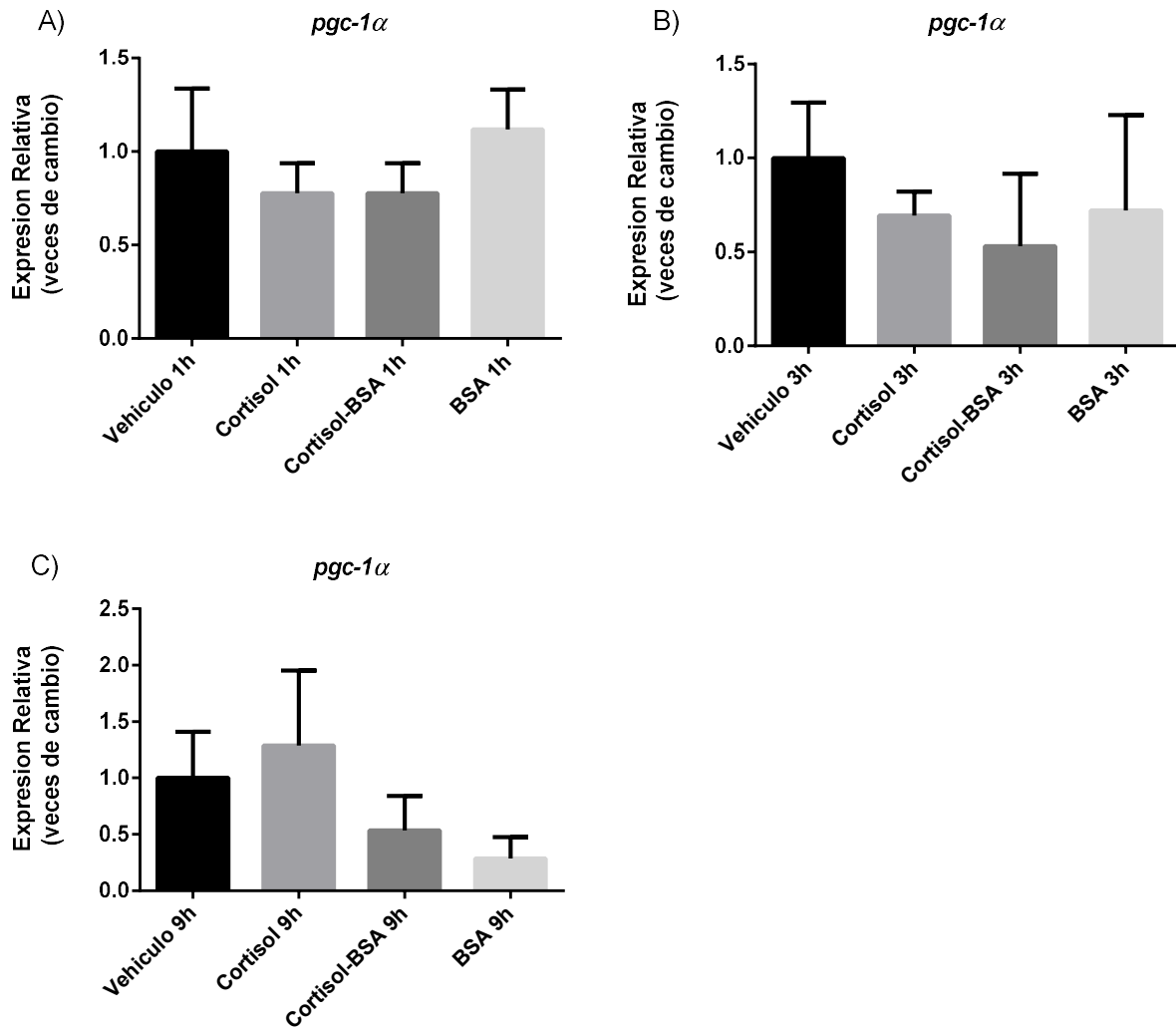


**Figura 6. Impacto de las vías de señalización canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de *fndc5* en músculo esquelético de trucha arcoíris.** Los gráficos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM ( $n=6$ ) de las veces de cambio de la expresión relativa de *fndc5* en relación al vehículo. A, B y C corresponden a los tratamientos a 1, 3 y 9 horas respectivamente. La expresión relativa fue normalizada usando proteína ribosomal *s30*. Se realizó un análisis de una vía de ANOVA y una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas.



### **8.5.- Efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de *pgc-1 $\alpha$* en músculo esquelético de trucha arcoíris**

Se procedió a analizar la expresión de *pgc-1 $\alpha$*  a partir de las mismas muestras utilizadas anteriormente, esto debido a que *pgc-1 $\alpha$*  regula la expresión de *fndc5* y, así, poder tener una mejor aproximación de lo que está ocurriendo con la expresión de *fndc5*. No se obtuvieron diferencias significativas ni tendencias en la expresión de *pgc-1 $\alpha$*  en 1, 3 y 9 horas (figura 7).



**Figura 7. Impacto de las vías de señalización canónica y no canónica de cortisol en la expresión de *pgc-1α* en músculo esquelético de trucha arcoíris.** Los gráficos se muestran como el promedio  $\pm$  SEM (n=6) de las veces de cambio de la expresión relativa de *pgc-1a* en relación al vehículo. A, B y C corresponden a los tratamientos a 1, 3 y 9 horas respectivamente. La expresión relativa fue normalizada usando proteína ribosomal S30. Se realizó un análisis de una vía de ANOVA y una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas.

## 9.-Discusión.

Irisina es una mioquina que ha sido vinculada a diversos procesos fisiológicos, específicamente, en teleósteos se ha vinculado a atrofia muscular y crecimiento, procesos que son de gran relevancia en la acuicultura. Por lo tanto, el entendimiento de la regulación de irisina podría ayudar a optimizar los cultivos aumentando la producción de estos. En este trabajo se evaluó el perfil de expresión de *fndc5* (precursor de irisina) y como se ve afectada su expresión bajo una condición de estrés mediado por cortisol por sus vías de acción canónica y no canónica en músculo esquelético de trucha arcoíris.

### Perfil de expresión de *fndc5*.

El perfil de expresión de *fndc5* ha sido reportado en varias especies de mamíferos. En humanos se identificó que *fndc5* está siendo expresado en glándulas suprarrenales, cerebro, duodeno, endometrio, esófago, tejido adiposo, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, ovarios, próstata, glándulas salivales, intestino delgado, estómago, testículos, tiroides y vejiga, destacando que el músculo es donde se aprecia mayor expresión, el corazón tiene una expresión media y los otros tejidos identificados, poseen una expresión baja en relación al músculo (Huh *et al*, 2012).

En pollos se reportó que está siendo expresado altamente en músculo, cerebro, corazón, ovarios y en la pituitaria. Luego con una expresión media en la grasa subcutánea, intestino, riñón y pulmón. Por último, se encuentra bajamente expresado en hígado, bazo y páncreas (Li *et al*, 2015).

Con respecto a teleósteos, en pez dorado se aprecia que en los tejidos donde existe una mayor expresión de *fndc5* son cerebro e intestino, luego con una expresión media branquias, bazo, y músculo esquelético, en corazón se obtiene una expresión baja y en hígado no se pudo identificar (Butt *et al*, 2017). En nuestro estudio, se identificó que los tejidos que presentan una mayor expresión de *fndc5* son el cerebro, intestino y bazo.

Al contrastar estos datos con mamíferos destaca principalmente la diferencia en la expresión en el músculo esquelético, donde en trucha arcoíris es baja y en mamíferos predomina como el principal tejido donde es expresado. Se desconoce cómo es regulada irisina a nivel de músculo esquelético en teleósteos, pero esta diferencia podría estar dada por las condiciones en las que se mantienen los peces, en mamíferos se conoce que, en el músculo esquelético, irisina está involucrada en la biogénesis mitocondrial y miogénesis, estos procesos, en mamíferos, son

estimulados por irisina si los individuos están frente a regímenes de ejercicio y una dieta rica en proteínas y baja en lípidos, por lo tanto, como los individuos no presentan un régimen de ejercicio ni una dieta como la descrita, no necesitarían una alta expresión de *fndc5* en el músculo esquelético (Mahgoub *et al*, 2018).

### **Detección de FNDC5 en tejidos de trucha arcoíris.**

La localización de FNDC5 ha sido reportada en distintos modelos de mamíferos. Por inmunohistoquímica se ha reportado su presencia en corazón, músculo, estómago, páncreas, hígado, bazo, cerebro, intestino delgado en ratas, humanos, rata topo (*Heterocephalus glaber*) y hámster enano (Aydin *et al*, 2014a; Aydin *et al*, 2014b; Aydin, *et al*, 2014c; Gür *et al*, 2017; Gür *et al*, 2018) y por *western blot* se identificó en hígado, bazo, pulmón, riñón, músculo y tejido adiposo en cerdos Meishan (Cai *et al*, 2017). En teleosteos esta información es muy limitada, donde mediante *western blot* en pez cebra se reportó su presencia en corazón y músculo (Sundarrajan *et al*, 2017) y por inmunohistoquímica en cerebro de tilapia (Lian *et al*, 2017).

En nuestro estudio se identificó por primera vez la presencia de FNDC5 en riñón cefálico, riñón posterior, bazo, corazón, branquias e hígado. Por el contrario, no pudo ser apreciada en cerebro, intestino y músculo esquelético.

También se esperaba observar la presencia de FNDC5 en cerebro, intestino y músculo, no solo por lo reportado en estudios previos, si no que por el perfil de expresión generado. Esta ausencia se podría explicar por, primero, las isoformas de *fndc5* que posee trucha arcoíris, las cuales son 6 y se ha visto que no todas las isoformas de *fndc5* son transcripcionalmente activas (Kim *et al*, 2017), por lo que, aunque se haya identificado en el perfil de expresión, no necesariamente va a estar presente como proteína. Otra posible explicación puede ser que las isoformas que son funcionales en estos órganos lleguen a generar una proteína de FNDC5, la cual, no puede ser reconocido por el anticuerpo utilizado, ya que este no está modelado y tampoco está predicho para trucha arcoíris. Aun así, este anticuerpo fue utilizado ya que lo han empleado en pez cebra (Sundarrajan *et al*, 2017) y que, a diferencia de otros disponibles, este se une a la parte extracelular de FNDC5 correspondiente a irisina, y no como otros disponibles que se unen a la región C-terminal de FNDC5, la cual es intracelular, lo que entrega datos erróneos si lo que se busca evaluar es irisina.

### **Efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de *fndc5* en músculo esquelético de trucha arcoíris.**

Los efectos de glucocorticoides sobre la expresión de *fndc5* en músculo esquelético no han sido estudiados, tanto en mamíferos como en teleósteos. En nuestro ensayo, realizado con tratamientos de cortisol y cortisol-BSA a 1, 3 y 9 horas no se logró apreciar diferencias significativas con respecto al vehículo, pero se puede observar una tendencia a las 1 y 3 horas. Si bien a 1 hora la expresión de *fndc5* en los tratamientos con cortisol-BSA y BSA son similares, impidiendo discriminar si este resultado se debe a la acción de cortisol o BSA, se aprecia que en el tratamiento con cortisol también hay una disminución, por lo que se podría sugerir una represión de la expresión de *fndc5* por la vía no genómica de cortisol, esto debido al tiempo que se está evaluando y que cortisol ejerce un efecto completo a nivel de señalización iniciada en membrana y sus receptores intracelulares, lo cual se ha observado con anterioridad (Dindia *et al*, 2012). En el tiempo de 9 horas, la expresión de *fndc5* se ve reducida con los tratamientos de cortisol y cortisol-BSA, así, suponiendo una posible regulación de este gen por las vías de señalización genómica y no genómica de acción. En un ensayo *in vitro* con la línea celular de hígado Huh7 en la cual se aplicaron estímulos a diferentes concentraciones de cortisol (1-20 uM), y evaluando 3 variantes de *fndc5* por qPCR, se constató que cortisol regula positivamente 2 de las 3 variantes en esta línea celular (Kim *et al*, 2017), siendo nuestro resultado obtenido contradictorio con lo observado. Además, por lo reportado por Espinoza *et al*, 2017, se esperaba un aumento en la expresión de *fndc5* por la vía no genómica de cortisol, debido a que este estudio reportó que en miotubos de truchas arcoíris tratados con cortisol-BSA a 2 y 4 horas, regula positivamente la expresión de *pgc-1 $\alpha$*  *in vitro*.

### **Efecto de las vías de acción canónica y no canónica de cortisol sobre la expresión de *pgc-1 $\alpha$* en músculo esquelético de trucha arcoíris.**

Para comprender de mejor forma que está ocurriendo con la regulación de la expresión de *fndc5*, se evaluó *pgc-1 $\alpha$* , el cual, en músculo esquelético regula positivamente la expresión de *fndc5* (Boström *et al*, 2012). En el ensayo realizado no se obtuvieron datos estadísticamente significativos para ningún tiempo evaluado, aunque se esperaba una tendencia a disminuir su expresión por los tratamientos con cortisol y cortisol-BSA generando una correlación con lo observado anteriormente para *fndc5* a las 3 horas.

También se podía esperar lo reportado por Espinoza *et al*, 2017, quienes al tratar miotubos de trucha arcoíris con cortisol-BSA observan un aumento en la expresión de *pgc-1 $\alpha$*  luego de 2 y 4 horas de la inducción, pero no se puede apreciar una tendencia similar.

## 10.-Conclusiones y proyecciones.

Se obtuvo el perfil de expresión de *fndc5*, el cual no estaba descrito para trucha arcoíris y que es relevante para poner los cimientos de futuras investigaciones del papel que tiene irisina en diferentes procesos fisiológicos.

Se logró identificar que FNDC5 está presente en riñón cefálico, riñón posterior, bazo, corazón, branquias e hígado de trucha arcoíris, pero hace falta un mayor análisis antes de descartar los tejidos en los cuales no se pudo observar su presencia. El principal impedimento para esto es el anticuerpo, por lo cual podría ser de ayuda generar uno específico para trucha arcoíris.

No se pudo determinar de forma concluyente porque vía de acción de cortisol es regulado *fndc5* en músculo esquelético de trucha arcoíris, si bien se obtuvo una tendencia que podría indicar que es por ambas. Es necesario realizar más estudios para poder elucidar esto, se podría aumentar el número de individuos en el ensayo, debido a la dispersión de datos obtenidos.

Así, a pesar de que no se lograron obtener datos concluyentes, se deja una base para estudiar irisina en un modelo comercial como lo es la trucha arcoíris, teniendo como proyección poder vincular esta proteína a procesos biológicos que pueden impactar la industria como, por ejemplo, atrofia muscular o crecimiento, lo cual podría llevar a generar estrategias para obtener una mayor y/o más eficiente producción, como lo puede ser una dieta o la optimización de las condiciones de cultivo.

## 11.-Bibliografia.

- Agnisola, C., Masullo, P., Mustafa, T., (2004). Short-term responses of coronary circulation to cortisol and estrogen in trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genomic Comparative Endocrinology*, 135, 210–216.
- Aluru, N & Vijayan, MM. (2009). Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. *Genomic Comparative Endocrinology*, 164.142-50.
- Aydin, S., Aydin, S., Kobat, M. A., Kalayci, M., Eren, M. N., Yilmaz, M., Baydas, A. (2014a). Decreased saliva/serum irisin concentrations in the acute myocardial infarction is promising for being a new candidate biomarker for diagnosis of this pathology. *Peptides*, 56, 141–145.
- Aydin, S., Kuloglu, T., Aydin, S., Eren, M. N., Celik, A., Yilmaz, M., Dabak, O. (2014b). Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses with or without water exercise in young and old male rats: Cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. *Peptides*, 52, 68–73.
- Aydin, S., Kuloglu, T., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Cakmak, T., Ozercan, I. H. (2014c). A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. *Peptides*, 61, 130–136.
- Ayroul, M., Simon, V., Bernard, V., Binart, N., Cohen-Tannoudji, J., Lombés, M., Chauvin, S., (2017). A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells. *Scientific Reports*. 7.1537.
- Barton, BA. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42.517-525.



- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, MP., Korde, A., Ye, L., Lo, JC., Rasbach, KA., Boström, EA., Choi, JH., Long, JZ., Kajimura, S., Zingaretti, MC., Vind, BF., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, SP., Spiegelman, BM., (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481.463–468.
- Butt, Z., Hackett, J., Volkoff, H., (2017). Irisin in goldfish (*Carassius auratus*): Effects of irisin injections on feeding behavior and expression of appetite regulators, uncoupling proteins and lipoprotein lipase, and fasting-induced changes in FNDC5 expression. *Peptides*, 90. 27-36.
- Cai, C., Xiao, G., Qian, L., Jiang, S., Li, B., Xie, S., Gao, T., An, X., Cui, W., Li, K., (2017) Gene Location, Expression, and Function of FNDC5 in Meishan Pigs. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-08406-y
- Castro, R., Zou, J., Secomber, CJ., Martin, SA., (2011). Cortisol modulates the induction of inflammatory gene expression in a rainbow trout macrophage cell line. *Fish & Shellfish Immunology*, 30. 215-223.
- Cortés, R., Teles, M., Tridico, R., Acerete, L., Tort, L., (2013). Effects of Cortisol Administered through Slow-Release Implants on Innate Immune Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Genomics*. doi: 10.1155/2013/619714.
- Das, C., Thraya, M., Vijayan, MM., (2018). Nongenomic cortisol signaling in fish. *General and Comparative Endocrinology*. ISSN 0016-6480. 30049.
- Dinas P., Lahart, I., Timmons, J., Svensson, P., Koutedakis, Y., Flouris, D., Metsios, G., (2017). Effects of physical activity on the link between PGC-1 $\alpha$  and FNDC5 in muscle, circulating Irisin and UCP1 of white adipocytes in humans: A systematic review, *F1000Res*, 6. 286.

- Dindia, L., Murray, J., Faught, E., Davis, T. L., Leonenko, Z., Vijayan M. M., (2012). Novel Nongenomic Signaling by Glucocorticoid May Involve Changes to Liver Membrane Order in Rainbow Trout. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046859>
- Dindia, L., Faught, E., Leonenko, Z., Thomas, R., Vijayan, M.M., (2013). Rapid cortisol signaling in response to acute stress involves changes in plasma membrane order in rainbow trout liver. *The journal of physiology*, 304.1157-1166.
- Ellis, T., Yildiz, HY., López-Olmeda, J., Spedicato, MT., Tort, L., Overli, O., Martins, Cl., (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology Biochemistry*, 38.163–88.
- Espinoza, M.B., Aedo, J.E., Zuloaga, R., Valenzuela, C., Molina, A., Valdés, J.A., (2017). Cortisol induces reactive oxygen species through a membrane glucocorticoid receptor in rainbow trout myotubes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118.718–725.
- FAO 2016, el estado mundial de la acuicultura.
- Faught, E., Vijayan, MM., (2016). Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 199.136-145.
- Ferrante, C., Orlando, G., Recinella, L., Leone, L., Chiavaroli, A., Di Nisio, C., Shohreh R., Manippa, F., Ricciuti, A., Vacca M., Brunetti L., (2016). Central inhibitory effects on feeding induced by the adipo-myokine irisin. *European Journal of Pharmacology*. 791.389-394.
- FOB Chile 2017, reporte anual de comercio exterior de Chile.
- Forouzanfar, M., Rabiee, F., Ghaedi, K., Beheshti, S., Tanhaei, S., Shoaraye Nejati, A., Jodeiri Farshbaf, M., Baharvand, H., Nasr-Esfahani, MH., (2015). Fndc5 overexpression facilitated neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Biology International*, 39. 629-637.

- Grygiel-Górniak, B., Puszczewicz, M., (2017). A review on irisin, a new protagonist that mediates muscle adipose bone neuron connectivity. *European Review for Medical and pharmacological Sciences*, 21.4687-4693.
- Gür, F. M., Timurkaan, S., Yalçın, M., Girgin, A., & Gençer, B. (2017). Immunohistochemical localization of irisin in mole rats (*Spalaxleucodon*). *Biotechnic & Histochemistry*, 92, 245–251.
- Gür, F. M., Timurkaan, S., Gençer Tarakçı, B., Yalçın, M.H., Özkan, Z. E., Baygeldi, S. B., Yılmaz, S., Eröksüz, H., (2018). Identification of immunohistochemical localization of irisin in the dwarf hamster (*Phodopus roborovskii*) tissues. *Anatomia Histologia Embryologia*, 47. 174-179.
- Huh, JY., Panagiotou, G., Mougios, V., Brinkoetter, M., Vamvini, MT., Scheinder, BE., Mantzoros, CS., (2012). FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism*, 61. 1725-1738.
- Ikeogu, Fc., Nsofor, Cl., Ikpeze, Oo., (2010). A review of risk factors for fish diseases in aquatic environments. *Proceedings of the Society for Occupational Safety and Environmental Health (SOSEH)*, 6.199-204.
- Jiang, Q., Zhang, Q., Lian, A., Xu, Y., (2017). Irisin stimulates gonadotropins gene expression in tilapia (*Oreochromis niloticus*) pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, 185. 140-147.
- Kelly, C & Salinas, I., (2017). Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System. *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2017.00559.
- Kim, HK., Jeong, YJ., Song, IS., Noh, YH., Seo, KW., Kim, M., Han, j., (2017). Glucocorticoid receptor positively regulates transcription of FNDC5 in the liver. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep43296.

- Kim, OY & Song, J., (2018). The Role of Irisin in Alzheimer's Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 7. 407.
- Lian, A., Li, X., Jiang, Q., (2017). Irisin inhibition of growth hormone secretion in cultured tilapia pituitary cells. *Molecular and Cell Endocrinology*, 439. 395-406.
- Li, X., Fang, W., Hu, Y., Wang, Y., Li J., (2015). Characterization of fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) gene in chickens: Cloning, tissue expression, and regulation of its expression in the muscle by fasting and cold exposure. *Gene*, 570. 221-229.
- Löwenberg, M., Verhaar, AP., Van Den Brink, GR., Hommes, DW., (2007). Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends in Molecular Medicine*. 13.158-183.
- Mahgoub, MO., D'Souza, C., Al Darmaki, RSMH., Baniyas, MMYH., Adeghate, E., (2018). An update on the role of irisin in the regulation of endocrine and metabolic functions. *Peptides*, 104. 15-23.
- Martinez Muñoz, IY., Camarillo Romero, EDS., Garduno Garcia, JJ., (2018). Irisin a Novel Metabolic Biomarker: Present Knowledge and Future Directions. *International Journal of endocrinology*, Volume 2018, Article ID: 7816806.
- Mommsen, TP., Vijayan, MM., Moon, TW., (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9. 211-268.
- OECD 2016, review of fisheries: country statistics 2015.
- Panati, K., Suneetha, Y., Narala V.R., (2016). Irisin/FNDC5 an updated review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20. 689-697.

- Puigserver, P., Wu, P., Won Park, C., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B., (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *CellPress*, 92. 829-839.
- Reza, MM., Subramaniyam, N., Sim, CM., Ge, X., Sathiakumar, D., McFarlane, C., Sharma, M., Kambadur, R., (2017). Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy. *Nature communications*, 8. Article: 1104.
- Schmidt, BM., Gerdes, D., Feuring, M., Falkenstein, E., Christ, M., Wehling, M., (2000). Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Frontiers in Neuroendocrinology*. 21.57-94.
- SERNAPESCA 2017, cosecha de centros de acuicultura año 2016.
- Sundarajan, L & Unniappan, S., (2017). Small interfering RNA mediated knockdown of irisin suppresses food intake and modulates appetite regulatory peptides in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 252. 200-208.
- Sundarajan, L., Yeung, C., Hahn, L., Weber, LP., Unniappan, S., (2017). Irisin regulates cardiac physiology in zebrafish. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0181461.
- Wu, F., Song, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Mu, Q., Jiang, M., Wang, E., Zhang, W., Li, L., Li, H., Wang, Y., Zhang, M., Li, S., Yang, L., Meng, Y., Tang, D., (2015). Irisin Induces Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells *In Vitro* and in Zebrafish Embryos *In Vivo* via Activation of the ERK Signaling Pathway. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0134662.
- Wendelaar Bonga, SE., (1997). The stress response in fish. *American Physiological society*, 7. 591-625.