



**Universidad
Andrés Bello®**

Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias de la Vida
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Evaluación de los efectos no canónicos de cortisol sobre la activación de las vías PKA y
PKC y la expresión de genes pro miogénicos en miotubos de trucha arcoíris
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Memoria de Título presentado como parte de los requisitos para optar al Grado de Ingeniero
en Biotecnología.

Tutor: Dr. Juan Antonio Valdés

Lugar de realización: Laboratorio de Biotecnología Molecular y Bioquímica Celular
Facultad de Ciencias de la Vida
Universidad Nacional Andrés Bello

Consuelo Pilar Verena Figueroa Zimmermann

Santiago, Chile.
Enero, 2019.



Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

“Evaluación de los efectos no canónicos de cortisol sobre la activación de las vías PKA y PKC y la expresión de genes pro miogénicos en miotubos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)”

Consuelo Pilar Verena Figueroa Zimmermann

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Memoria de Título Dr. Juan Antonio Valdés., Laboratorio de Biotecnología Molecular y Bioquímica Celular Universidad Andrés Bello.

Prof. Dr. Juan Antonio Valdés
Director de Tesis/Patrocinante

Dr. Marco Álvarez
Comisión Evaluadora

Dr. Sebastián Escobar
Comisión Evaluadora

Dr. Juan Antonio Valdés
Director de Carrera Ingeniería en Biotecnología

Santiago, Chile. Enero 2019

Agradecimientos

Agradezco enormemente a mis papás, tíos y abuelos que me animaron a seguir el camino que yo escogiera con todo el apoyo y el cariño del mundo. También a mi mejor amiga, Mari, por soportar todo mi mal humor, estrés, pena y rabia durante todo este proceso, que me acompañaba a estudiar con una copita de vino y buena onda, que me escuchaba hablar de cosas que no entendía.

Agradezco demasiado a los chicos del lab, mis amigos y colegas Marcia, Caro, Jorge, Rodrigo, Joaquín, Vicky, Ramón y Paulette, que siempre apañan y estaban siempre dispuestos a ayudar. Los almuerzos con ustedes jamás fueron aburridos.

Agradezco a la gente que fui conociendo en el camino, y esos amigos que están en todas: Fani, Javi, Fran, Coni, Alvaro, Cristian y Carla, los más apañadores del mundo, los adoro.

A mis hermanos, no verlos regularmente solo hace más grato cuando nos sentamos a ver una serie, a comer algo, a compartir una cerveza. Aunque unos estén lejos siento su cariño y apañe en todas.

Muchas gracias, profe JAVA, por darme la oportunidad de trabajar en algo tan apasionante y entretenido en un ambiente tan grato con gente excelente.

Índice

1. ABREVIACIONES	5
2. RESUMEN	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 ESTRÉS Y ACUICULTURA	7
3.2 VÍA GENÓMICA DE CORTISOL.....	7
3.3 VÍA NO GENÓMICA DE CORTISOL.....	8
3.4 PKA Y PKC COMO POTENCIALES BLANCOS DE LA VÍA NO GENÓMICA DE CORTISOL.....	9
3.5 ARGUMENTOS DE LA HIPÓTESIS.....	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	12
5.1 OBJETIVO GENERAL	12
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6.1 REACTIVOS	12
6.2 CULTIVO CELULAR	13
6.3 TRATAMIENTO DE CÉLULAS IN VITRO.....	13
6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT.....	13
6.5 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE CDNA	14
6.6 RT-QPCR.....	14
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
7. RESULTADOS	16
7.1 OBTENCIÓN DE MIOTUBOS DE TRUCHA ARCOÍRIS	16
7.2 ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE PKA Y PKC MEDIADA POR LA VÍA ALTERNATIVA DE CORTISOL EN MIOTUBOS DE TRUCHA ARCOÍRIS.....	17
7.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE CREB MEDIADO POR LA VÍA ALTERNATIVA DE CORTISOL EN MIOTUBOS DE TRUCHA ARCOÍRIS	21
7.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MIOGÉNICOS MEDIADOS POR LA VÍA ALTERNATIVA DE CORTISOL EN MIOTUBOS DE TRUCHA ARCOÍRIS.....	23
8. DISCUSIÓN	24
9. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	28
10. REFERENCIAS	28

1. Abreviaciones

PKA	Proteína quinasa A
Akt	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
CREB	Elemento en respuesta a la unión de cAMP
pCREB	Fosfo CREB
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
Myf5	Factor miogénico 5
Pax3	Factor de transcripción de la caja emparejada 3
H89	Inhibidor de PKA
Cortisol-BSA	Cortisol conjugado con BSA
ATP	Adenosín trifosfato

2. Resumen

Los glucocorticoides son reguladores críticos de los procesos celulares que le permiten a los vertebrados lidiar con estresores. En el caso de los teleósteos, el cortisol es la principal hormona glucocorticoide circulante y está involucrado en una serie de procesos fisiológicos a nivel celular. Se ha descrito que cortisol ejerce sus efectos celulares a través de dos mecanismos: la vía de señalización genómica o clásica, y la vía no genómica o iniciada en la superficie. La señalización genómica, que involucra la interacción de cortisol con sus receptores intracelulares, ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la señalización no genómica recién se ha empezado a caracterizar. Dentro de las vías descritas que están involucradas en esta señalización no genómica de cortisol se encuentran las vías mediadas por PKA y PKC, que se describen en diferentes tejidos en vertebrados, y más recientemente en cultivo de hepatocitos de trucha arcoíris. A pesar de ello, en el caso de músculo esquelético en teleósteos, éstas no han sido estudiadas. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos la contribución de la vía no genómica de cortisol sobre la modulación de PKA y PKC en un cultivo primario de miotubos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Además, determinamos la participación de estas vías en la expresión de genes pro miogénicos claves para el crecimiento y diferenciación del músculo esquelético. Para este propósito, los miotubos fueron estimulados con dosis fisiológicas de cortisol y cortisol-BSA (inductor exclusivo de efectos de cortisol iniciados en la superficie celular). Luego se evaluó mediante Western blot la activación de PKA, PKC y CREB en este modelo *in vitro*, donde se observó una activación temprana de PKC y PKA a 15 y 60 minutos de estimulación con cortisol-BSA, respectivamente, además de una tendencia a la activación de CREB a 30 minutos de estimulación, denotando una posible modulación por la acción no genómica de cortisol. Adicionalmente, los miotubos se pre-trataron con el inhibidor H-89 para PKA, para comprobar el rol directo de esta vía en la señalización no genómica de cortisol, y su participación en la modulación de los genes pro miogénicos *myf5* y *pax3*. En miotubos estimulados con inhibidor, se observó un aumento en la expresión de *pax3* a 1 hora de tratamiento con cortisol-BSA, efecto que fue revertido a las 6 horas. Esto podría deberse a un posible rol inhibitor por parte de PKA. Por otro lado, la expresión de *myf5* tiende a disminuir en presencia de estímulo más inhibitor a 1 hora, y al aumento a 6 horas bajo los mismos estímulos, lo que indicaría una posible modulación de éste gen por PKA, pero ejerciendo un rol activador. Sin embargo, estas hipótesis requieren de más experimentos para ser aceptadas. Se puede concluir en esta

investigación que la vía alternativa de cortisol modula la activación de las proteínas PKA y PKC y la expresión de los genes blanco *pax3* y *myf5* en músculo esquelético, lo cual es de suma importancia para ampliar y profundizar los conocimientos que se tienen con respecto al rol de los glucocorticoides en éste tejido.

3. Introducción

3.1 Estrés y Acuicultura.

La acuicultura en Chile ha tenido un gran crecimiento de su producción en los últimos años, aportando actualmente el 1.6% de los peces de piscicultura destinado a la alimentación mundial (FAO 2016). Sin embargo, el estrés generado producto de las condiciones inherentes a la acuicultura constantemente genera mortalidades en los ejemplares y otros problemas asociados a su crecimiento y reproducción (Campbell, Pottinger, & Sumpter, 1994). Por lo anterior, el estudio del efecto del estrés sobre el tejido muscular es de suma importancia debido a su relevancia económica.

El estrés se define como un conjunto de alteraciones fisiológicas que se producen en el organismo como respuesta física ante determinados estímulos repetidos (Simpson & Weiner , 2005). En las prácticas acuícolas se dan principalmente dos tipos de respuesta a éste: la aguda, que se debe mayormente a la captura, el manejo y transporte y es de corta duración; y la crónica, de duración prolongada, como la provocada por alta densidad de cultivo, variaciones en la calidad del agua, entre otros (Munoz, Mardones, Chacoff, & Gesto, 2015).

La respuesta fisiológica al estrés ha sido ampliamente investigada y principalmente se caracteriza por el aumento de la liberación de hormonas glucocorticoide, siendo el cortisol el principal glucocorticoide secretado en peces. El cortisol es considerado hoy en día el regulador maestro de la respuesta al estrés en peces debido a que modula una gran cantidad de procesos biológicos, por ejemplo el metabolismo de la glucosa, proteínas, transcripción de genes, entre otros (Das, Thraya, & Vijayan, 2018).

3.2 Vía Genómica de cortisol.

El mecanismo clásico de acción de cortisol se relaciona a su interacción con su receptor intracelular de glucocorticoides (GR) y la posterior modulación de la expresión de genes (Faught & Vijayan, 2016). Comienza una vez que éste atraviesa la membrana plasmática y se une a GR, formando un complejo cortisol-GR que posteriormente transloca al núcleo y se une a una región correspondiente al elemento en respuesta a glucocorticoides (GRE) que se

encuentra en el promotor de los genes blanco, o modula la transcripción de genes mediante la interacción con diferentes factores de transcripción (Faught & Vijayan, 2016; Prunet, Sturm, & Milla, 2006). Sin embargo, en el último tiempo se ha empezado a caracterizar un segundo mecanismo de acción de cortisol que sería mediado por vías de señalización iniciadas en la superficie celular. Éste último mecanismo, a diferencia de la vía canónica de acción (que ha sido ampliamente caracterizada), es más rápida (segundos o minutos) y es independiente de la regulación de genes (R. J. Borski, 2000; Russell J. Borski, Hyde, & Fruchtman, 2002; Lösel & Wehling, 2003).

3.3 Vía no genómica de cortisol.

Respecto a cómo se inician los efectos rápidos de cortisol en teleósteos, mediados por su vía no genómica de acción, se postulan cuatro hipótesis (Fig. 1). La primera hipótesis plantea un cambio en la fluidez de la membrana mediado por cortisol que desencadena la activación de diferentes vías de señalización intracelular (Dindia *et al.*, 2012; Whiting, Restall, & Brain, 2000). La segunda hipótesis hace referencia a la activación de un receptor de membrana en la superficie celular distinto de GR, que inicia la señalización celular río abajo, y pertenecería a la familia GPCR, receptores acoplados a proteínas G, como ha sido visto en la vía de señalización no genómica de esteroides sexuales en peces (Lösel & Wehling, 2003) La tercera hipótesis baraja la posibilidad de la translocación o modulación de los receptores GR intracelulares hacia la membrana como mecanismo para activar la señalización. Por último, la cuarta hipótesis es que la vía rápida (no canónica) de cortisol altera los niveles intracelulares de Ca^{+2} por la modulación de sus canales en la membrana, independiente de receptores. Esto se sostiene al ser Ca^{+2} un segundo mensajero clave para la respuesta rápida de cortisol en modelos vertebrados, aunque no se tengan antecedentes claros en peces (Beato & Klug, 2000; Hyde, Seale, Grau, & Borski, 2004; Karst *et al.*, 2002) Finalmente, el uso de análogos de cortisol acoplados a moléculas impermeables a la membrana plasmática (ej. cortisol-BSA) ha sido clave para la caracterización de esta nueva vía de acción de cortisol (R. J. Borski, 2000; Espinoza *et al.*, 2017).

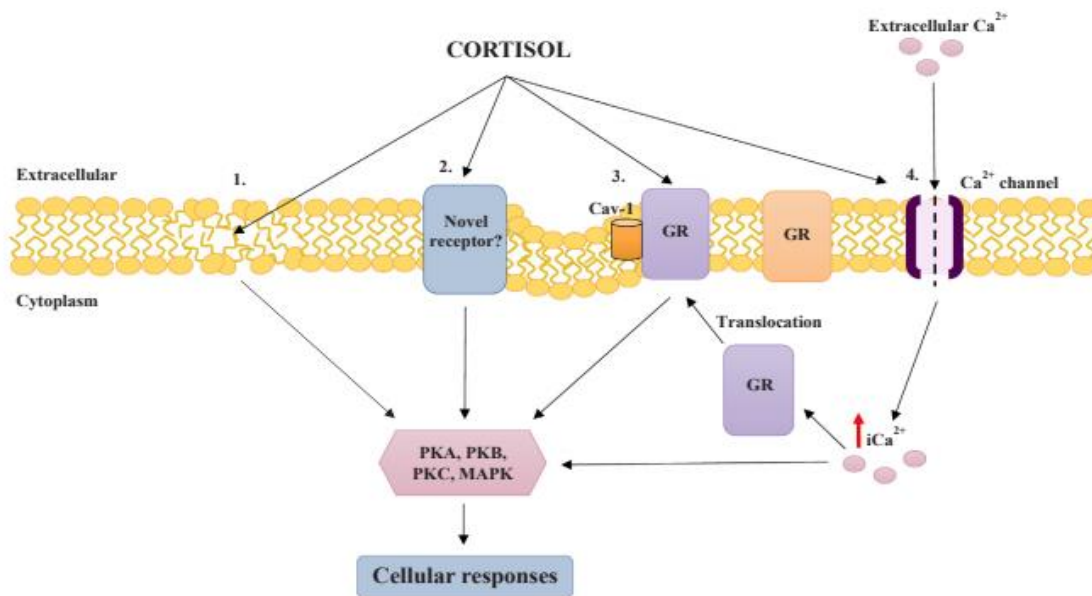


Figura 1: Modelo propuesto para la acción de cortisol iniciada en la superficie celular (Vía no canónica de cortisol). Se proponen cuatro hipótesis sobre cómo el cortisol ejerce su acción rápida a través de interacción con distintos componentes de la membrana plasmática. 1) Cambios en las propiedades biofísicas en la membrana plasmática; 2) Activación de un nuevo receptor de membrana; 3) Translocación de un receptor de glucocorticoides (GR) intracelular a la membrana plasmática; 4) Mediante la alteración de los niveles intracelulares de Ca^{+2} . Imagen representativa obtenida desde Das *et al* 2018.

3.4 PKA y PKC como potenciales blancos de la vía no genómica de cortisol.

Dentro de las vías de señalización descritas que son activadas por la acción no canónica de cortisol en mamíferos y peces destacan las vías PKA y PKC (Y. Z. Chen & Qiu, 1999). Particularmente en peces, se ha descrito que la rápida señalización por cortisol aumenta la actividad de PKA y PKC en hígado de trucha arcoíris con una implicancia biológica no establecida (Dindia, Faught, Leonenko, Thomas, & Vijayan, 2013; Dindia *et al.*, 2012), siendo observado a través de la fosforilación de sus respectivos sustratos. Esto sugiere un potencial rol de la vía no canónica de cortisol sobre la respuesta adaptativa temprana al estrés en peces.

La proteína quinasa PKA es una enzima ubicua dependiente de cAMP que transfiere fosfato γ proveniente de ATP a serinas y treoninas de una gran cantidad de proteínas. En su estado inactivo, PKA consiste en un complejo de dos subunidades catalíticas (C) y dos subunidades reguladoras (R), donde la actividad catalítica está dada por la inhibición del dominio inhibitorio de R. Las subunidades catalíticas son liberadas debido a la interacción de las subunidades R con dos moléculas de cAMP, disminuyendo la afinidad del tetrámero al punto de disociarse en dímeros de R y C activado (Taleisnik, 2006) Al estar inactiva, las

subunidades R la mantienen unida a la membrana plasmática y nuclear, desde donde posteriormente puede migrar para la fosforilación de distintos factores de transcripción. Por otro lado, la proteína quinasa PKC forma parte de una familia de 12 isoformas, activadas por Ca^{+2} o fosfolípidos. Forma parte de las enzimas que fosforilan serina y treonina y se dividen en 3 subfamilias, de acuerdo a similitud de secuencias y medios de activación: PKC convencionales (PKCc), noveles (PKCn) y atípicas (PKCa) (Taleisnik, 2006)

Dentro de los múltiples factores de transcripción que son activados tanto por PKA como PKC destaca el factor CREB (cAMP response element-binding protein) (Taleisnik, 2006). CREB es un factor de transcripción de 43 kDa perteneciente a la familia bZIP, que contiene una estructura de cremallera de leucina. Está formado por una región de unión al ADN, adyacente a un motivo cremallera de leucina en C-terminal, y una de activación de la transcripción con un dominio central que contiene el sitio de fosforilación por PKA. Se ha descrito que tanto PKA como PKC son capaces de fosforilar a CREB (Gonzalez *et al.*, 1989; Yamamoto, Gonzalez, Biggs, & Montminy, 1988), y que su posterior translocación al núcleo participa en la modulación de transcripción de un gran número de genes. Para que estos sean modulados por CREB, los genes blancos de esta proteína deben poseer en su región promotora el sitio de reconocimiento CRE. Esta secuencia se mantiene muy conservada entre vertebrados y suelen ser palindrómicas completas (TGACGTCA) o parciales (TGACG o CGTCA), aunque otras variantes han sido descritas (Altarejos & Montminy, 2011).

Respecto a la importancia que tiene la vía PKA/PKC/CREB sobre el crecimiento del músculo esquelético, se ha descrito en mamíferos que PKA regula la biogénesis mitocondrial mediante la fosforilación de CREB y la posterior sobreexpresión de *pgc1a*, regulador maestro de la biogénesis mitocondrial (Ray Hamidie, Yamada, Ishizawa, Saito, & Masuda, 2015). Además, PKA también se ha visto involucrado en la supresión de la proteólisis dependiente de ubiquitina-proteasoma en el músculo esquelético, mediante la acción de CREB y un aumento de cAMP (Silveira *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha descrito que la proteína $\text{PKC}\alpha$ sería activada por Ca^{+2} y en cultivo de miotubos de rata estaría involucrada en la fosforilación de CREB mediada por Ca^{+2} (Cárdenas *et al.*, 2004). Asimismo, modelos murinos *in vivo* e *in vitro* han revelado que $\text{PKC}\epsilon$ regula la diferenciación y regeneración del músculo esquelético (Di Marcantonio *et al.*, 2015). Estos antecedentes indican que la activación de CREB mediada tanto por las vías PKA y PKC es crítica en la modulación de diferentes procesos biológicos fundamentales para el desarrollo del músculo esquelético.

Dentro de los genes blancos postulados para la vía PKA/PKC/CREB en el músculo esquelético, se encuentran los factores pro miogénicos *myf5* y *pax3* que tienen un rol

fundamental en la regulación de desarrollo y proliferación de este tejido (Fig. 2) (Lagha *et al.*, 2008). El gen *myf5* codifica para una proteína que está involucrada en la creación de nuevas fibras musculares en peces, mientras que en mamíferos, es requerido, junto a otros, para la especificación de células madre a progenitores miogénicos («Biology of Stress in Fish, Volume 35 - 1st Edition», s. f.). Por otro lado, *pax3* pareciera estar involucrado en la activación del mencionado anteriormente, controlando miogénesis a nivel embrionario y la posterior mantención del músculo. Además, para estos genes se ha identificado una zona CRE en su promotor, lo que indicaría que son blanco directo de CREB y su expresión ha sido regulada negativamente en la presencia de cortisol (Pandurangan *et al.*, 2014).

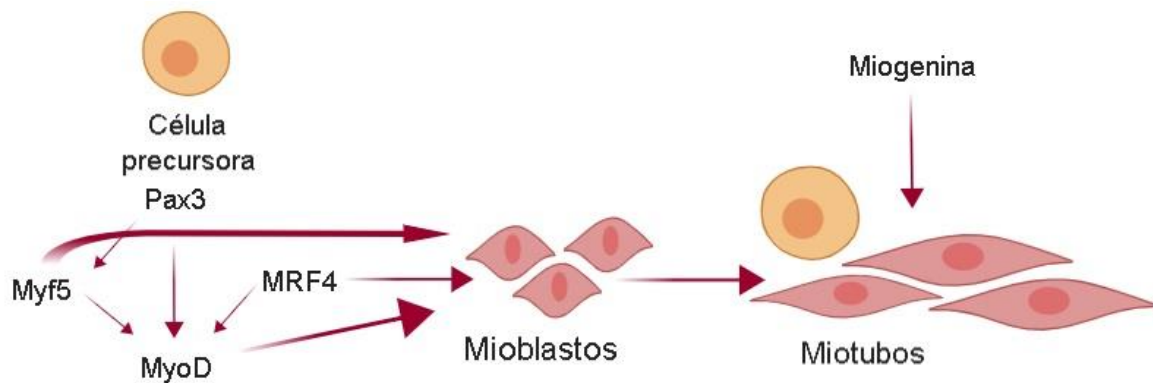


Figura 2: Esquema de modulación de genes pro miogénicos. Se muestra en el esquema el paso desde célula satélite (o precursora) hasta la formación de miotubos diferenciados, indicando su rol principal en la miogénesis adulta.

3.5 Argumentos de la hipótesis.

A pesar de que se ha descrito que los glucocorticoides modulan la rápida activación de PKA, PKC y CREB en distintas líneas celulares, los efectos no genómicos de cortisol sobre estas vías en el músculo esquelético no han sido estudiados. Además, el impacto de la activación de PKA y PKC mediada por cortisol sobre la expresión de genes blanco en el músculo esquelético es desconocido. Finalmente, debido a que el factor de transcripción CREB es sustrato de ambas vías de señalización y se han descrito regiones CRE en el promotor de los genes pro miogénicos: *pax3* y *myf5* (sitios de reconocimiento de CREB), postulamos a estos genes como potenciales blanco de esta nueva vía de señalización activada por cortisol PKA y/o PKC en el músculo esquelético de trucha arcoíris.

4. Hipótesis

Los efectos no canónicos de cortisol activan la vías de señalización PKA/PKC/CREB modulando la expresión de *pax3* y *myf5* en miotubos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar la participación de los efectos no canónicos de cortisol sobre la activación de las vías de señalización PKA y PKC/CREB y la expresión de *pax3* y *myf5* en miotubos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar si la vía no canónica de cortisol activa las vías de señalización PKA/PKC/CREB en miotubos de trucha arcoíris.
- 2) Determinar si la vía PKA y/o PKC estimulada por la vía no canónica de cortisol regula los niveles de transcrito de los genes pro miogénicos *pax3* y *myf5* en miotubos de trucha arcoíris.

6. Materiales y métodos

6.1 Reactivos

El inhibidor para la proteína kinasa A, H89, fue comprado en Merck (Darmstadt, Germany). Los anticuerpos anti-CREB, anti-pCREB, anti-sustratos fosforilados de PKA, anti-sustratos fosforilados de PKC, anti-rabbit y anti-mouse fueron comprados en Cell Signaling Technology (Beverly, Massachusetts). El anticuerpo anti-H2B fue comprado en abcam (Cambridge, UK). El anticuerpo contra sustratos fosforilados de PKA reconoce residuos de serina o treonina con una Arginina en posición -3, mientras que el anticuerpo contra sustratos fosforilados de PKC reconoce residuos de serina o treonina con una Arginina o Lisina en posición -3, -2 y +2.

6.2 Cultivo celular

Los miotubos fueron preparados a partir de 9 g de músculo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Los peces fueron criados y utilizados según los protocolos previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Andrés Bello. El Músculo dorsal fue obtenido bajo condiciones estériles y depositado en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), que contiene 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 10% suero de caballo, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina a pH 7.4.

Luego de la disociación mecánica del músculo, el tejido fue digerido con 0.2% de colagenasa tipo II diluida en medio DMEM por 1 hora a 18°C. La suspensión fue posteriormente centrifugada a 500 g por 10 minutos a 15°C, y el pellet resultante fue sometido a una segunda digestión con 0.1% solución de tripsina en DMEM por 30 minutos a 18°C. A la suspensión obtenida se le añadió medio DMEM con 10% suero fetal bovino (SFB) y luego filtrada con filtros de nylon *cell strainer* de 100 y 40 µm. Los mioblastos obtenidos fueron sembradas con una densidad de 5×10^5 - 1×10^6 por pocillo en placas previamente tratadas con poly-L-lisina y laminina. El cultivo de mioblastos resultante fue incubado a 18°C por 12 días en medio de proliferación que contiene 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 10% suero fetal bovino, 100 U/mL penicilina y 250 µg/mL anfotericina B para obtener miotubos diferenciados. Los cultivos primarios de miotubos fueron realizados en placas de 12 pocillos y éstos fueron divididos para cada grupo experimental: vehículo, cortisol y cortisol-BSA con n=4 de réplicas biológicas para cada experimento independiente.

6.3 Tratamiento de células in vitro

Cortisol y cortisol-BSA (Sigma) fueron disueltos en DMSO y NP40 con PBS 1X, respectivamente, para luego diluir en medio DMEM fresco antes del tratamiento. Los cultivos fueron posteriormente tratados con dosis fisiológicas para ambas moléculas (276 nM o 100 ng/mL) por 15, 30 y 60 minutos a 18°C.

Los cultivos fueron pre incubados con el inhibidor H89 para PKA 30 minutos antes del estímulo correspondiente (cortisol o cortisol-BSA), a una concentración de 10 µM. Éste inhibidor es un inhibidor por competencia que se une al sitio de reconocimiento de ATP, evitando que la proteína quinasa sea capaz de fosforilar a sus sustratos correspondientes.

6.4 Extracción de proteínas y Western blot

Los miotubos se recolectaron en 40 µl de buffer de lisis (50mM Tris-HCl a pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 5mM Na₃PO₄, 20mM NaF y 10mM pirofosfato de

sodio) con un conjunto de inhibidores de proteasas (Calbiochem-Novabiochem). Las células fueron recolectadas, incubadas en hielo por 20 minutos y centrifugadas a 14000 RPM por 15 minutos a 4°C. Las proteínas extraídas se cuantificaron usando el “Pierce BCA Protein Assay Kit” (Pierce).

Posteriormente, los extractos de proteínas totales fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) al 12%, electro-transferidos a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA) y se bloquearon las membranas en 2% “Amersham ECL prime blocking agent” (GE healthcare, Chicago, IL, USA) disuelto en Tris buffer salino (TBS) 1X por 1 hora a temperatura ambiente (Valdés *et al.*, 2008). Las incubaciones con anticuerpo primario fueron realizadas a 4°C toda la noche. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado a HRP anti-conejo o anti-ratón por 1 hora a temperatura ambiente y finalmente expuestas usando el kit “ECL Amersham” (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) (Valdés *et al.*, 2008). Una vez revelados, los films fueron escaneados para analizar las bandas obtenidas por densitometría con el programa ImageJ (NIH, USA). Como control de carga, las membranas fueron sometidas a un Stripping para un nuevo blot contra H2B (Abcam, Cambridge, UK)(Valdés *et al.*, 2008).

La incubación con anticuerpo primario se realizó en las siguientes proporciones: 1:500 para el caso de anti-pCREB (Cell Signaling) y anti-CREB (Cell Signaling) y 1:1000 para anti-PKA sustratos fosforilados y anti-PKC sustratos fosforilados. Para el control de carga se utilizó anti-H2B en relación 1:1000.

6.5 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de RNA a partir del cultivo primario de miotubos se realizó mediante el kit RNeasy Mini kit 50 (Qiagen, TX, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, obteniendo una pureza de 1.9 en promedio, en base a la relación 260/280 nm. Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, TX, USA) siguiendo el protocolo del fabricante.

6.6 RT-qPCR

Se utilizó cDNA proveniente de miotubos obtenidos desde cultivo primario para cuantificar la expresión de los genes objetivos (*myf5* y *pax3*). Se utilizaron primers diseñados a partir del genoma de referencia de trucha arcoíris, utilizando el programa Primer3 (www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0). Se evaluó la formación de estructuras secundarias

(dímeros) y temperatura de alineamiento (T_m) mediante la herramienta Oligo Analyzer (www.idtdna.com/calc/analizer). Los primers utilizados se muestran en la Tabla 1. Con el propósito de evaluar la especificidad de los partidores, se realizó una curva de disociación, dando como resultado un producto único para todos los partidores utilizados. Para la realización de ésta curva se utilizó un pool que contenía 2 µL de cDNA proveniente de miotubos, lo que nos permitió identificar la temperatura de alineamiento (T_m) del amplificado. La mezcla para cada reacción correspondía a 7,5 µL de Brilliant II® SYBR® Green qPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA), 1,5 µL de mix de los partidores correspondientes (5 µM), 0,2 de ROX y 6 µL de pool de cDNA en una dilución de 1:40. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo al siguiente programa: Denaturación inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de denaturación 30 segundos a 95°C, 30 segundos a una T_m según el gen y 30 segundos a 72°C de extensión.

Luego se desarrolló una curva estándar para determinar la eficiencia de los genes mediante 8 diluciones seriadas de pool de cDNA. La reacción y el programa de qPCR se realizaron como se mencionó anteriormente. Como gen de referencia se utilizó *la proteína ribosomal 40S* (fau), el cual se ha visto en trabajos anteriores, se mantiene estable en condiciones de estrés en músculo esquelético (Fuentes, Safian, Valdés, & Molina, 2013).

Por último, la expresión génica se cuantificó por qPCR utilizando la reacción previamente descrita, utilizando un duplicado para cada muestra, incluyendo controles negativos: NTC, que corresponde a reacción sin templado, permitiendo descartar la amplificación de un contaminante, y -RT, que corresponde a una muestra sin la utilización de transcriptasa reversa, que permite descartar la amplificación de DNA genómico.

Tabla 1: Partidores utilizados.

Lista de genes con sus respectivos partidores, producto de amplificación en pb, temperatura de alineamiento (T_m) y eficiencia.

Gen	Partidores	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	T _m (°C)	Eficiencia
<i>pax3</i>	Sentido	GGGGCAATACCAAGGATGA	163	59,3	102,7%
	Anti sentido	CGATCTTATGGCGGATATGG	163	57,6	
<i>myf5</i>	Sentido	TGGATGTCTTCTCCAGTCC	253	60,7	98,0%
	Anti sentido	CCGTGGTTCACCTTTTTCAG	253	59,1	
<i>Fau</i>	Sentido	CATTTAGGAGTTGGCGTTGG	134	59	100%
	Anti sentido	CCAAGGTTGAAAAGCAGGAG	134	59	

6.7 Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm SEM ($n = 3$) con análisis estadístico ANOVA de una vía, seguido por un análisis de Tukey para ver la diferencia entre los diferentes grupos. La probabilidad considerada fue de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos y gráficos fueron llevados a cabo utilizando el software Prism 6.0 (Graphpad Software, CA, USA.)

7. Resultados

7.1 Obtención de miotubos de trucha arcoíris

La estandarización de cultivo primario de miotubos de trucha arcoíris resulta un paso fundamental para la realización de los experimentos propuestos en este trabajo, por lo que el alcanzar una confluencia suficiente de miotubos diferenciados fue primordial para la evaluación de la vía no genómica de cortisol en un modelo *in vitro* de músculo esquelético de peces.

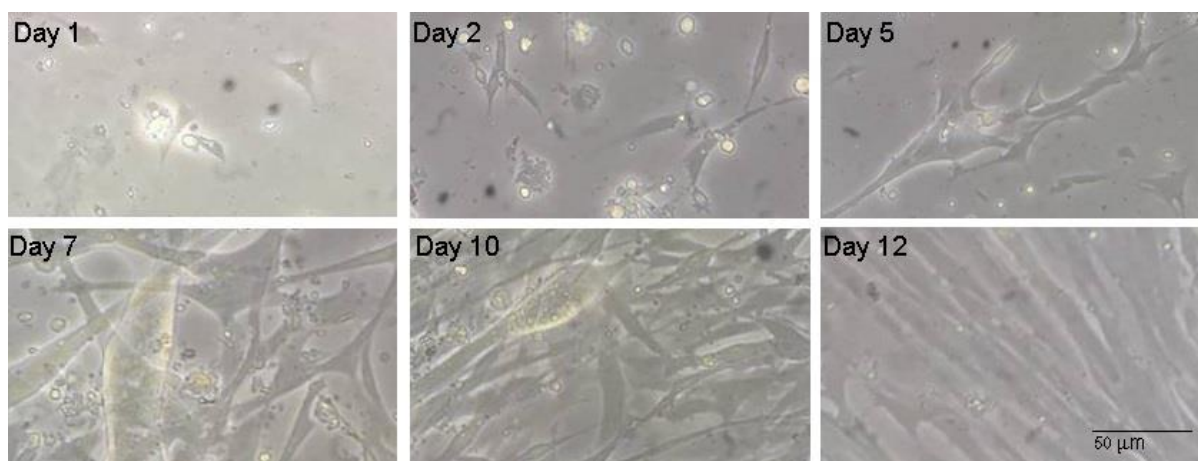


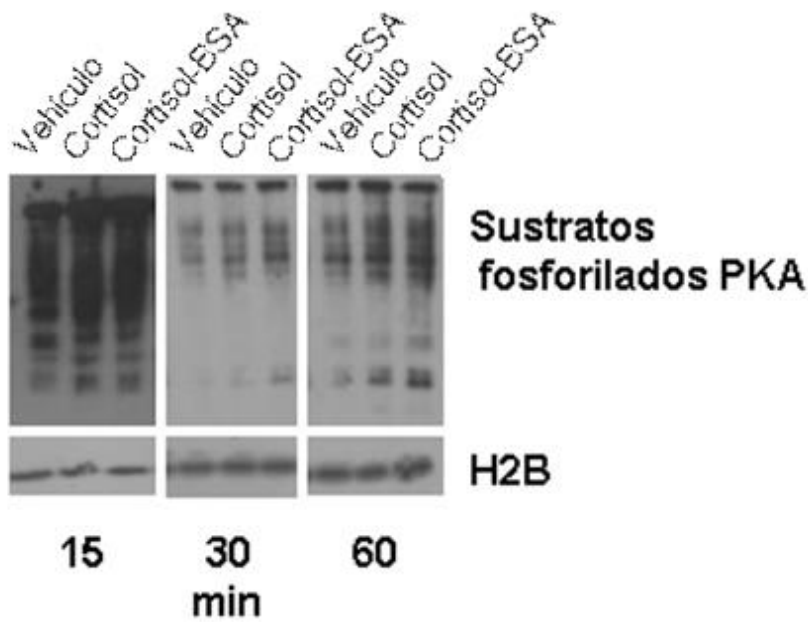
Figura 1: Cultivo primario de miotubos de trucha arcoíris. Los miotubos fueron mantenidos hasta alcanzar confluencia (monocapa de miotubos a lo largo de la placa) en medio (DMEM), 9 mM NaHCO_3 , 20 mM HEPES, 100 U/mL penicilina y 250 $\mu\text{g/mL}$ anfotericina B. Los miotubos fueron observados a un aumento de 40X.

Como se observa en la Figura 1, la progresión del cultivo primario hasta la formación de miotubos diferenciados demoró aproximadamente 12 días, donde éstos se comienzan a apreciar a partir del día 5.

7.2 Análisis de la activación de PKA y PKC mediada por la vía alternativa de cortisol en miotubos de trucha arcoíris

Una vez alcanzada la confluencia, los miotubos fueron utilizados para los respectivos tratamientos con vehículo, cortisol o cortisol-BSA a dosis fisiológicas a (276 nM) a 15, 30 y 60 minutos para la evaluación de la activación de las vías de señalización y posterior extracción de RNA para expresión génica de pax3 y myf5. A partir de los miotubos obtenidos desde el cultivo primario, se extrajeron proteínas para la evaluación de la activación de PKA y PKC (Figura 2 y Figura 3) medida por el nivel proteico de sus sustratos fosforilados. Esto, ya que según lo demostrado por Dindia *et al.*, 2013, ambas proteínas se activarían bajo la acción no genómica de cortisol en tejido hepático de trucha, razón por la cual se evaluó la activación a distintos tiempos tempranos (15, 30 y 60 minutos).

A)



B)

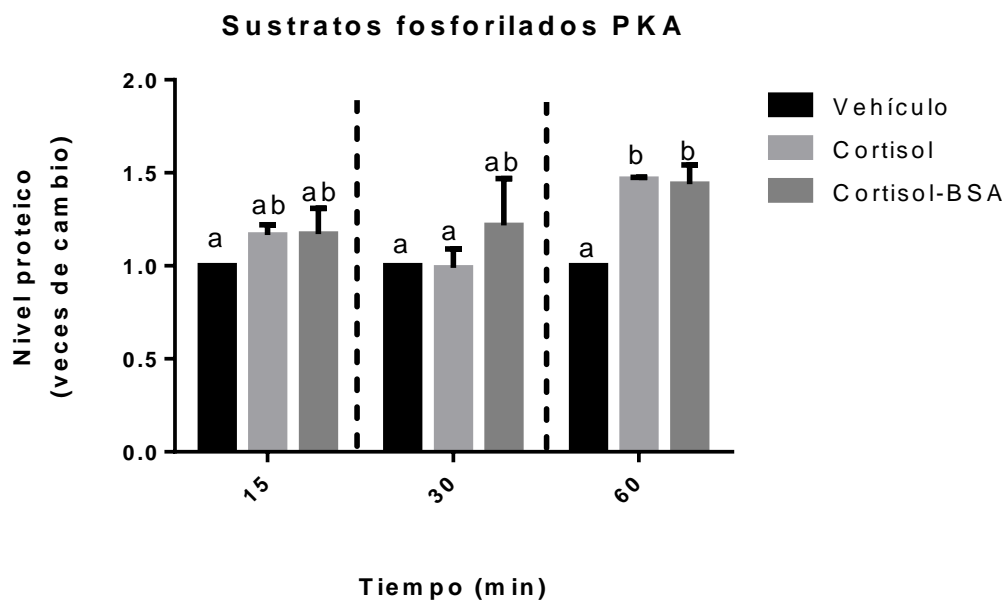


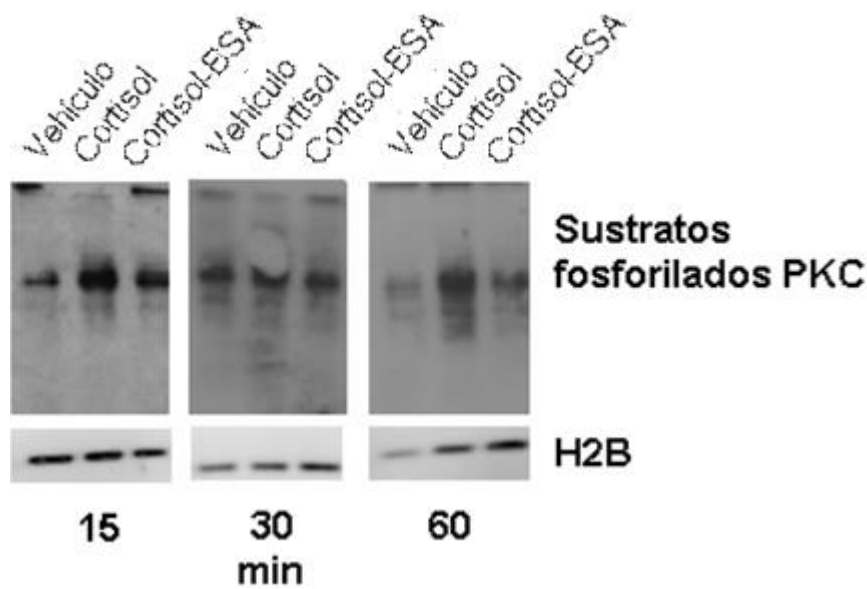
Figura 2: Activación de la proteína quinasa A (PKA). (A) Western Blot representativo de los respectivos tratamientos. (B) Los niveles proteicos de los sustratos fosforilados de PKA fueron normalizados contra la proteína H2B. Todas las muestras fueron tratadas con vehículo, cortisol o cortisol-BSA por 15,30 y 60 minutos. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 3$) con análisis estadístico ANOVA y se expresan como un cambio en relación con los

valores en las células control (vehículo). Las diferencias estadísticas se muestran como diferentes letras con $P < 0.05$.

En la Figura 2A se observa un aumento en la fosforilación de los sustratos de la proteína PKA a tiempos tempranos (15, 30 y 60 minutos) tanto en miotubos estimulados con cortisol como cortisol-BSA, lo que, posteriormente, se traduce a un análisis densitométrico (Figura 2B) donde se observa un aumento significativo en la fosforilación de los sustratos a 60 minutos de estimulación.

Del mismo modo, se evaluó la activación de PKC con el fin de comprobar lo descrito por Dindia *et al.*, 2013, y proseguir a la implicación de una o ambas proteínas en la modulación de genes pro miogénicos mediante la acción no genómica de cortisol.

A)



B)

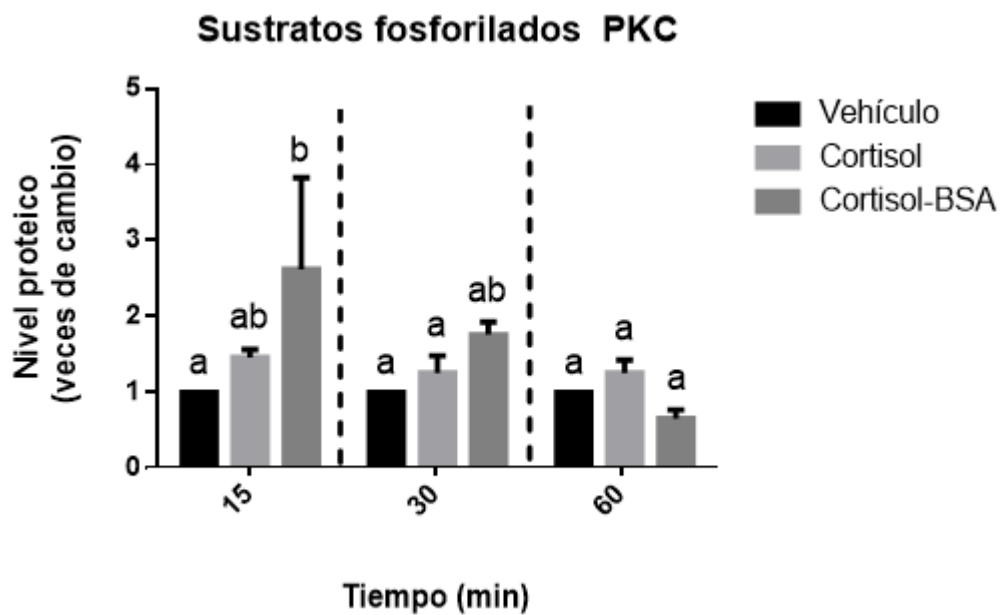


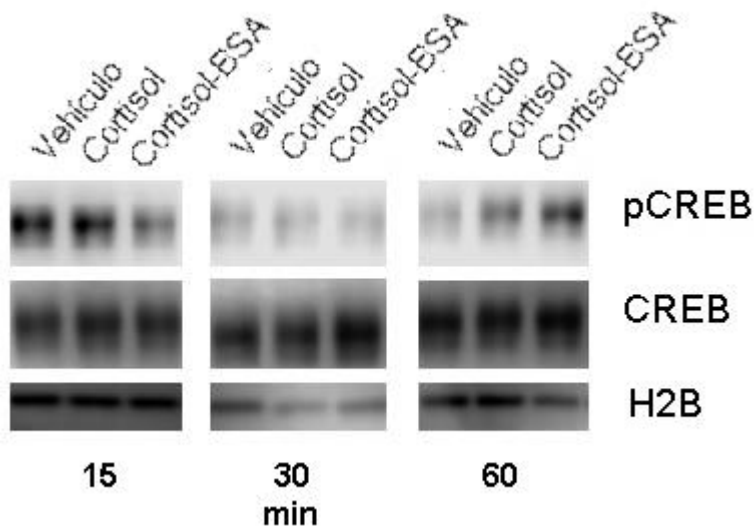
Figura 3: Activación de la proteína quinasa C (PKC). (A) Western Blot representativo de los respectivos tratamientos. (B) Los niveles proteicos de los sustratos fosforilados de PKC fueron normalizados contra la proteína H2B. Todas las muestras fueron tratadas con vehículo, cortisol o cortisol-BSA a 15, 30 y 60 minutos. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 3$) con análisis estadístico ANOVA y se expresan como un cambio en relación con los valores en las células control (vehículo). Las diferencias estadísticas se muestran como diferentes letras con $P < 0.05$.

En la Figura 3, se ve una activación significativa de PKC a tiempos tempranos, tras 15 minutos de estímulo, en miotubos tratados tanto con cortisol como cortisol-BSA, y una tendencia a la activación a 30 minutos, como se puede observar tanto en la Figura 3A y B, en comparación a miotubos sin tratamiento (vehículo).

7.3 Análisis de la activación de CREB mediado por la vía alternativa de cortisol en miotubos de trucha arcoíris

Por otro lado, de acuerdo a Espinoza *et al.*, 2017, habría una activación del factor de transcripción CREB mediado por la acción no genómica de cortisol a través de ERK 1/2. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que éste factor de transcripción es modulado por un gran número de proteínas, tales como PKA y PKC, por lo que de igual manera se evaluó su activación.

A)



B)

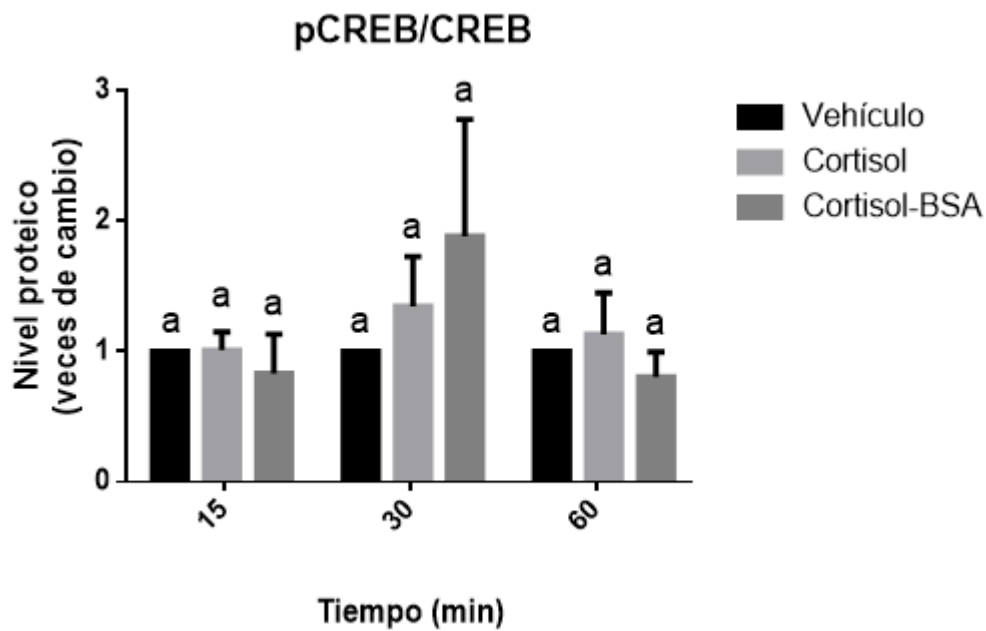


Figura 4: Activación del factor de transcripción CREB. (A) Western Blot representativo de los respectivos tratamientos. (B) Los niveles proteicos de CREB y pCREB fueron normalizados contra la proteína H2B. Todas las muestras fueron tratadas con vehículo, cortisol o cortisol-BSA por 15, 30 y 60 minutos. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 3$) con análisis estadístico ANOVA y se expresan como un cambio en relación con los valores en las células control (vehículo).

Se observa una tendencia a la activación de CREB a 30 minutos de estímulo, lo que sería concordante con lo visto en bibliografía. Sin embargo, hacen falta más experimentos para

alcanzar significancia estadística que permita determinar si está siendo activado por la acción no genómica de cortisol y si ésta activación es mediante una o ambas proteínas quinasas.

7.4 Análisis de la expresión de genes miogénicos mediados por la vía alternativa de cortisol en miotubos de trucha arcoíris.

En base a los resultados obtenidos, y siendo éstos significativos para la activación de PKA, observado mediante la fosforilación de sus sustratos a 1 hora de estimulación, se procedió a utilizar el inhibidor H89 para determinar si PKA, mediada por la acción no genómica del cortisol, está involucrada en la expresión de los genes pro miogénicos *myf5* y *pax3*. Se procedió a inhibir la PKA a pesar de la activación de PKC a tiempos tempranos, ya que se ha encontrado evidencia de que ésta estaría modulando genes pro miogénicos mediante la activación de CREB (A. E. Chen, Ginty, & Fan, 2005).

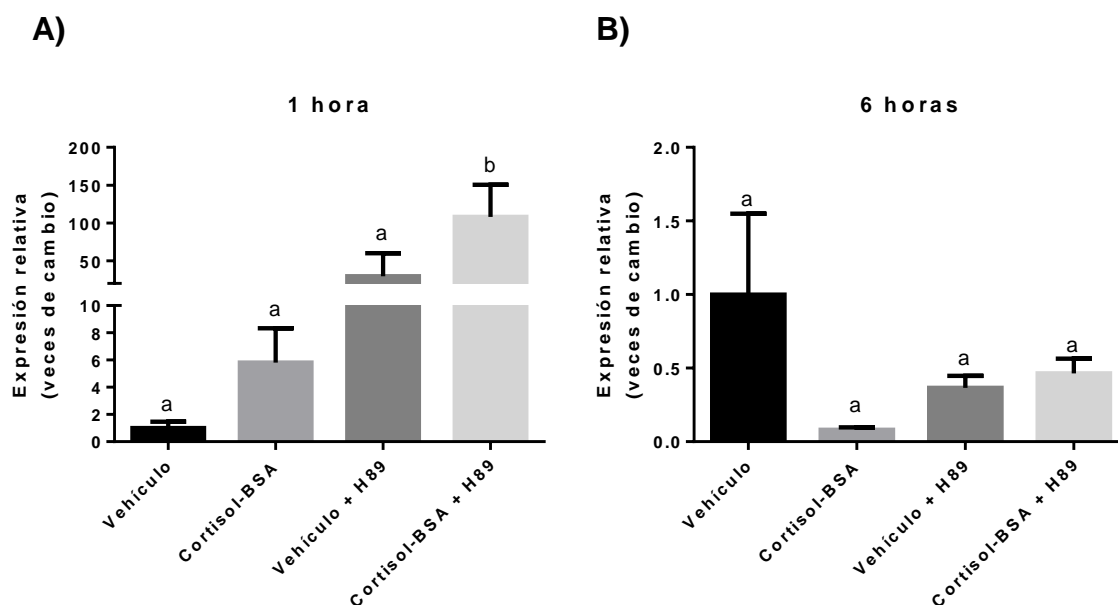


Figura 5: Expresión del gen *pax3* 1 y 6 horas post estímulo. Los miotubos fueron pre incubados con 10 μ M del inhibidor de la proteína PKA, H89, para posteriormente incubarse (A) 1 y (B) 6 horas con cortisol-BSA y vehículo. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 3) con análisis estadístico ANOVA y se expresan como un cambio en relación con los valores en las células control (vehículo). Las diferencias estadísticas se muestran como diferentes letras con $P < 0.05$.

En la Figura 5 se observa la expresión del gen pro miogénico *pax3* 1 y 6 horas post estímulos con cortisol-BSA y vehículo, previa una incubación con el inhibidor H89 de la PKA, donde a

1 hora se observa una tendencia al aumento de la expresión de este gen producto de la acción de cortisol-BSA, efecto que se ve significativamente potenciado en miotubos previamente incubados con el inhibidor H89. Por otra parte, a las 6 horas no se observarían cambios significativos en la expresión de éste gen.

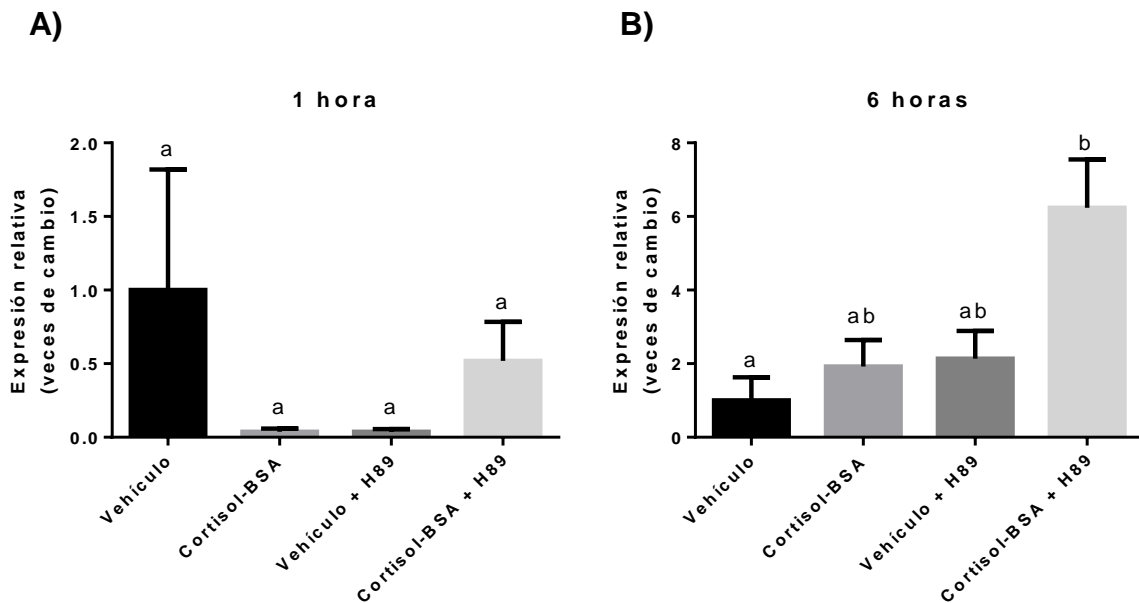


Figura 6: Expresión del gen *myf5* 1 y 6 horas post estímulo. Los miotubos fueron pre incubados con 10 μ M del inhibidor de la proteína PKA, H89, para posteriormente incubar 1 hora con cortisol-BSA y vehículo. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 3) con análisis estadístico ANOVA y se expresan como un cambio en relación con los valores en las células control (vehículo). Las diferencias estadísticas se muestran como diferentes letras con $P < 0.05$.

Por otro lado, en la Figura 6 se observa, de forma opuesta, que no parecieran haber cambios significativos a 1 hora de tratamiento con cortisol-BSA y en presencia de H89 en la expresión de *myf5*. Por el contrario, luego de 6 horas de estimulación con el glucocorticoide, se vería un aumento significativo en la expresión de dicho gen en presencia del inhibidor H89.

8. Discusión

El mecanismo de acción de cortisol se atribuye a su vía clásica, sin embargo recientemente se han caracterizado vías rápidas moduladas por cortisol que darían cuenta de un nuevo mecanismo de acción iniciado en la membrana.

En esta tesis determinamos que cortisol modula tanto PKA como PKC en miotubos de trucha arcoíris mediante acción genómica y no genómica, así como un posible rol de PKA en la modulación de genes pro miogénicos.

De acuerdo a lo observado en la Figura 1, se utilizaron los miotubos diferenciados a 12 días en medio DMEM para posteriores tratamientos. Debido a que éstos no son producto de una línea comercial, la estandarización de cultivo para la utilización de miotubos de trucha arcoíris era de suma importancia, por lo que nos basamos en el protocolo establecido por Aedo, Reyes, Avendaño-Herrera, Molina, & Valdés, 2015 para este fin.

A partir de estos miotubos, se procedió a la extracción de proteínas para evaluar la activación de las vías de señalización PKA y PKC mediante la detección del nivel proteico de sus sustratos fosforilados (Figura 2 y Figura 3).

Como se observa tanto en la Figura 2A a través del blot representativo y a través del análisis densitométrico del perfil de corrida en la Figura 2B, se da indicios de una tendencia a la activación de la vía PKA hasta alcanzar significancia a los 60 minutos de estimulación. Esto sugiere una potencial modulación de esta vía de señalización por la acción no genómica de cortisol, ya que se vio un mayor nivel proteico en miotubos tratados tanto con cortisol como cortisol-BSA, en comparación con miotubos con tratamiento control (vehículo) (Figura 2A). Esto concuerda con lo observado por Roy & Rai, 2009, que asocia la activación de PKA con la acción no genómica de cortisol en cultivo de fagocitos, donde tanto los inhibidores para adenilato ciclasa y PKA bloquearon el efecto inhibitor rápido de cortisol-BSA. Además de lo anterior, se observó un marcado aumento de cAMP en respuesta a cortisol-BSA, reafirmando la relación entre cAMP-PKA en la transducción de la acción no genómica de cortisol en la regulación de la fagocitosis.

Por otra parte, en la Figura 3A se observa un aumento en la fosforilación de los sustratos de la proteína PKC a 15 minutos, que a su vez se traduce en el análisis densitométrico mostrado en la Figura 3B, viéndose una potencial activación de esta vía en miotubos estimulados con cortisol-BSA, que, al ser impermeable a la membrana, promovería únicamente la acción no genómica de cortisol. Estos resultados podrían indicar una modulación de esta proteína por la acción no genómica de cortisol, concordando con bibliografía, donde se plantea la acción de cortisol iniciada en la membrana activa vías de señalización rápidas en otros tejidos en mamíferos y teleósteos (Das *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos tanto para PKA como PKC serían concordantes con lo descrito por Dindia *et al.*, 2013, en donde se observa un aumento en la fosforilación de los sustratos de ambas proteínas, sugiriendo una activación rápida de ambas vías mediada por la acción no genómica de cortisol en tejido hepático de trucha arcoíris. Por lo anterior, tanto PKA como PKC serían blanco de la acción no genómica de cortisol tanto en hepatocitos como en miotubos de trucha arcoíris. Por otro lado, se ha visto en otros tejidos, como cultivo neuronal de rata, que PKC estaría modulando la activación de CREB, posiblemente involucrando más proteínas quinasas, como PKA (Mao, Tang, & Wang, 2007), relacionándola así con la acción de cortisol iniciada en la membrana y posible co activación de CREB.

En base a estos resultados, se procedió a evaluar la activación del factor de transcripción CREB bajo los mismos estímulos, ya que, según lo descrito, esta proteína es uno de los sustratos principales de ambas proteínas quinasas, y, eventualmente, estaría involucrado en la modulación de genes pro miogénicos. Como se observa en la Figura 4, habría una tendencia a la activación de CREB a tiempos tempranos, de 30 minutos de estimulación tanto por cortisol como cortisol-BSA, sugiriendo una modulación por parte de la vía no genómica de cortisol. Estos resultados concuerdan con lo descrito por (Espinoza *et al.*, 2017), donde CREB se ve activado a 30 minutos de estimulación con cortisol y es principalmente fosforilado por PKA (Xie, Perry, Espinoza, Zhang, & Price, 2018).

Debido a estos resultados, y en base a lo descrito en bibliografía (A. E. Chen *et al.*, 2005) tanto para PKA como para CREB, factor de transcripción clave en el proceso de miogénesis y sustrato de ambas proteínas quinasas, se decidió determinar si esta vía modula la expresión de los genes pro miogénicos *myf5* y *pax3* mediante la acción no genómica de cortisol. Si bien la activación de la proteína PKC se vio a tiempos más tempranos en comparación a PKA, se decidió observar la potencial modulación de la expresión de los genes pro miogénicos por ésta última debido a que en modelos *in vitro* se describió que no habría una variación significativa en la expresión de genes pro miogénicos, como *myf5*, producto de la modulación por PKC (Di Marcantonio *et al.*, 2015). Además, recientemente se ha descrito a PKA como la principal proteína quinasa encargada de la fosforilación de CREB, evaluado en células C2C12 en presencia del análogo sintético de cortisol, dexametasona (Xie *et al.*, 2018).

En la Figura 5A se puede observar un aumento en la expresión de *pax3* a 1 hora de estimulación de los miotubos con cortisol-BSA, previa incubación con el inhibidor de PKA, H89, lo que

potencialmente indicaría una modulación mediante ésta proteína a través de los efectos no genómicos de cortisol. Por el contrario, a las 6 horas de estimulación con cortisol-BSA se observa un resultado que podría ser concordante con lo esperado, donde los glucocorticoides disminuirían la expresión de genes pro miogénicos (Figura 5B) (Pandurangan *et al.*, 2014), como lo observado en miotubos estimulados con cortisol-BSA. Una posible hipótesis sobre estos resultados es que PKA tenga una acción inhibitora sobre *pax3* a tiempos tempranos (1 hora) mientras que a 6 horas de estimulación no parecen haber cambios significativos modulados específicamente por ésta proteína. Esta hipótesis se sostendría en base a lo descrito por Xie *et al.*, 2018, donde se plantea una modulación de PKA mediante la Akt. Esta modulación se estaría llevando a cabo a través de las proteínas PDE3 y PDE4, ambas expresadas en músculo esquelético y encargadas de la hidrólisis de cAMP, inhibiendo, por lo tanto, la activación de PKA en presencia del análogo de cortisol, dexametasona. Por lo anterior, si PKA tuviera un rol inhibitor a tiempos tempranos, y Akt actúa como un inhibidor de ésta, los resultados obtenidos en la Figura 5A concordarían con lo descrito, al haber un leve aumento en el nivel de expresión de *pax3* en miotubos a 1 hora de tratamiento solo con cortisol-BSA y un mayor aumento en la expresión en presencia de cortisol-BSA y H89.

Por otra parte, en la Figura 6 se observan resultados inversos para la expresión de *myf5* a 1 hora de estimulación con cortisol-BSA (Figura 6A), donde la expresión de éste gen no parecería tener un cambio significativo en su expresión. En contraste, a las 6 horas se observa un aumento significativo en la expresión del gen en presencia del estímulo e inhibidor. Esto podría deberse a una posible modulación por parte de PKA como un inhibidor del mismo a 6 horas de estimulación. Esto va en concordancia con lo descrito por Xie *et al.*, 2018, donde se produciría una modulación (inhibición) progresiva de PKA por parte de Akt a partir de 3 y hasta 24 horas de medición, en presencia del análogo de cortisol, dexametasona. Al comenzar a haber una inhibición de PKA a partir de las 3 horas mediada por Akt, y PKA está actuando como un inhibidor de la transcripción de éste gen a 6 horas, tendría concordancia la observación de un leve aumento en la expresión de *myf5* en miotubos tratados con cortisol-BSA, efecto revertido al inhibir PKA mediante H89.

9. Conclusiones y Proyecciones

- Se puede concluir, en base a los resultados obtenidos, que la acción no genómica de cortisol estaría activando las vías de señalización de las proteínas PKA y PKC en miotubos de trucha.
- La vía de PKA, bajo la modulación de la acción no genómica de cortisol, estaría regulando la expresión de los genes pro miogénicos *pax3* y *myf5* a 1 y 6 horas, respectivamente. Sin embargo, esta regulación pareciera requerir de otras proteínas accesorias.
- Para la caracterización completa de ésta vía de señalización de cortisol iniciada en la membrana se sugieren más experimentos, como la implicancia del factor de transcripción CREB en la transcripción de los genes pro miogénicos bajo la activación de PKA. Para lo cual se propone utilizar el inhibidor H89 para evaluar la activación de CREB dependiente de PKA.

10. Referencias

- Aedo, J. E., Reyes, A. E., Avendaño-Herrera, R., Molina, A., & Valdés, J. A. (2015). Bacterial lipopolysaccharide induces rainbow trout myotube atrophy via Akt/FoxO1/Atrogin-1 signaling pathway. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 47(11), 932-937.
- Altarejos, J. Y., & Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(3), 141-151.
- Beato, M., & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, 6(3), 225-236.
- Biology of Stress in Fish, Volume 35 - 1st Edition. (s. f.). Recuperado 28 de noviembre de 2018, de <https://www.elsevier.com/books/biology-of-stress-in-fish/schreck/978-0-12-802728-8>

- Borski, R. J. (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 11(10), 427-436.
- Borski, Russell J., Hyde, G. N., & Fruchtmann, S. (2002). Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release. *Steroids*, 67(6), 539-548.
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G., & Sumpter, J. P. (1994). Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120(1), 151-169.
- Cárdenas, C., Müller, M., Jaimovich, E., Pérez, F., Buchuk, D., Quest, A. F. G., & Carrasco, M. A. (2004). Depolarization of skeletal muscle cells induces phosphorylation of cAMP response element binding protein via calcium and protein kinase Calpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 39122-39131.
- Chen, A. E., Ginty, D. D., & Fan, C.-M. (2005). Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*, 433(7023), 317-322.
- Chen, Y. Z., & Qiu, J. (1999). Pleiotropic signaling pathways in rapid, nongenomic action of glucocorticoid. *Molecular Cell Biology Research Communications: MCBRC*, 2(3), 145-149.
- Das, C., Thraya, M., & Vijayan, M. M. (2018). Nongenomic cortisol signaling in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 265, 121-127.
- Di Marcantonio, D., Galli, D., Carubbi, C., Gobbi, G., Queirolo, V., Martini, S., ... Mirandola, P. (2015). PKC ϵ as a novel promoter of skeletal muscle differentiation and regeneration. *Experimental Cell Research*, 339(1), 10-19.
- 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. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 304(11), E1157-1166.

- 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*, 7(10), e46859.
- 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(4), 718-725.
- Faught, E., & Vijayan, M. M. (2016). Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 199, 136-145.
- Fuentes, E. N., Safian, D., Valdés, J. A., & Molina, A. (2013). Isolation and selection of suitable reference genes for real-time PCR analyses in the skeletal muscle of the fine flounder in response to nutritional status: assessment and normalization of gene expression of growth-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(4), 765-777.
- Gonzalez, G. A., Yamamoto, K. K., Fischer, W. H., Karr, D., Menzel, P., Biggs, W., ... Montminy, M. R. (1989). A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature*, 337(6209), 749-752.
- Hyde, G. N., Seale, A. P., Grau, E. G., & Borski, R. J. (2004). Cortisol rapidly suppresses intracellular calcium and voltage-gated calcium channel activity in prolactin cells of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 286(4), E626-633.
- Karst, H., Nair, S., Velzing, E., Rumpff-van Essen, L., Slagter, E., Shinnick-Gallagher, P., & Joëls, M. (2002). Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel

- subunit expression in basolateral amygdala neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 16(6), 1083-1089.
- Lagha, M., Sato, T., Bajard, L., Daubas, P., Esner, M., Montarras, D., ... Buckingham, M. (2008). Regulation of skeletal muscle stem cell behavior by Pax3 and Pax7. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73, 307-315.
- Lösel, R., & Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(1), 46-56.
- Mao, L.-M., Tang, Q., & Wang, J. Q. (2007). Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons. *Brain Research Bulletin*, 72(4-6), 302-308.
- Munoz, J. L. P., Mardones, O., Chacoff, L., & Gesto, M. (2015). Estrés en peces: respuesta fisiológica y sus implicaciones en el cultivo de salmónidos. *Salmonexpert*, (5), 55-57.
- Pandurangan, M., Moorthy, H., Sambandam, R., Jeyaraman, V., Irisappan, G., & Kothandam, R. (2014). Effects of stress hormone cortisol on the mRNA expression of myogenin, MyoD, Myf5, PAX3 and PAX7. *Cytotechnology*, 66(5), 839-844.
- Prunet, P., Sturm, A., & Milla, S. (2006). Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts. *General and Comparative Endocrinology*, 147(1), 17-23.
- Ray Hamidie, R. D., Yamada, T., Ishizawa, R., Saito, Y., & Masuda, K. (2015). Curcumin treatment enhances the effect of exercise on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by increasing cAMP levels. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 64(10), 1334-1347.
- Roy, B., & Rai, U. (2009). Genomic and non-genomic effect of cortisol on phagocytosis in freshwater teleost *Channa punctatus*: an in vitro study. *Steroids*, 74(4-5), 449-455.
- Silveira, W. A., Gonçalves, D. A., Graça, F. A., Andrade-Lopes, A. L., Bergantin, L. B., Zanon, N. M., ... Navegantes, L. C. C. (2014). Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis:

implications for sympathetic regulation. *Journal of Applied Physiology*, 117(1), 11-19.

Taleisnik, S. (2006). *Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de Biología Celular*. Editorial Brujas.

Valdés, J. A., Gaggero, E., Hidalgo, J., Leal, N., Jaimovich, E., & Carrasco, M. A. (2008). NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 294(3), C715-725.

Whiting, K. P., Restall, C. J., & Brain, P. F. (2000). Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sciences*, 67(7), 743-757.

Xie, Y., Perry, B. D., Espinoza, D., Zhang, P., & Price, S. R. (2018). Glucocorticoid-induced CREB activation and myostatin expression in C2C12 myotubes involves phosphodiesterase-3/4 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(3), 1409-1414.

Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H., & Montminy, M. R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, 334(6182), 494-498.