

**EFECTOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH), INSULINA,  
CORTISOL Y ESTRADIOL SOBRE EXPRESIÓN DE LOS  
RECEPTORES DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GHRs) Y DE  
LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A INSULINA  
(IGFs) EN HEPATOCITOS DE PEJERREY (*Odontesthes Bonariensis*)  
EN CULTIVO**

**Trabajo de Grado**

Laura Angélica Cotrino Salcedo

Cod.0500697

Para optar al título de Biólogo

Luis Fabián Canosa, Ph.D.

**Director**

**Universidad Militar Nueva Granada  
Facultad de Ciencias y Aplicadas  
Biología Aplicada  
Bogotá, 2016**

**EFFECTOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH), INSULINA, CORTISOL Y ESTRADIOL SOBRE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GHRs) Y DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A INSULINA (IGFs) EN HEPATOCITOS DE PEJERREY (*Odontesthes bonariensis*) EN CULTIVO**

Cotrino, L<sup>1</sup>. y Canosa, L. F<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Estudiante Biología Aplicada, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada, Cajicá, Colombia. Dirección de correspondencia: lauracotrino@gmail.com

<sup>2</sup>Docente Investigador, Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada, Instituto de investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

**RESUMEN**

La hormona de crecimiento (GH) controla funciones fisiológicas esenciales en peces teleósteos, incluyendo crecimiento, metabolismo y osmoregulación. En los últimos años se han identificado los receptores de GH (GHR-I y GHR-II) en peces, los cuales se expresan altamente en el hígado. GH, a través de los GHRs, estimula la producción de factores de crecimiento similares a insulina (IGFs), los cuales median las acciones de GH en muchos de los procesos fisiológicos mencionados. En este trabajo se estudió el efecto de GH bovina, insulina, cortisol y estradiol sobre los niveles de ARNm de GHRI, GHRII, IGFI e IGFI en cultivos primarios de hepatocitos de Pejerrey, para lo que, como primera medida, fue necesario la estandarización de dicha metodología para la especie. Diferentes concentraciones de GHb estimulan los niveles de ARNm de GHRI e IGFI, pero no afectan los niveles de ARNm de GHRII e IGFI. Insulina estimula levemente la expresión de GHRI e IGFI, pero no afecta GHRII e IGFI. Cortisol y estradiol por si solos no presentaron acciones estimulantes o inhibitorias sobre la expresión de los genes de estudio. La acción combinada de tanto de GHb e insulina y GHb y cortisol, tiene un efecto negativo sobre la acción de GH, lo que resulta en la reducción de los niveles de ARNm de los genes de interés. GHb y estradiol promueven el aumento de los niveles de ARNm de todos los genes, es decir,

E2 tiene un efecto estimulante sobre la acción de GH. Este estudio muestra que la expresión de GHRs e IGFs en hepatocitos de Pejerrey en cultivo primario está diferencialmente regulada por diferentes concentraciones de GH e insulina administradas de manera individual, y por GH y hormonas esteroides administradas en conjunto.

**Palabras clave:** Hormona de crecimiento, Insulina, Cortisol, Estradiol, Receptores de GH, Factores de crecimiento similares a insulina.

### **ABSTRACT**

Growth hormone (GH) controls essential physiological functions in teleost fish, including growth, metabolism and osmoregulation. Recent studies have identified GH receptors (GHR-I and GHR-II) in fish, which are highly expressed in the liver. Similarly, GH stimulates production of insulin-like growth factors (IGFs), which mediate the actions of GH in such metabolic processes. In this work we investigated the effect of bovine GH, insulin, cortisol and estradiol on mRNA levels GHRI, GHRII, IGFI and IGFII in primary cultured Pejerrey hepatocytes and as a first step, it was necessary to standardize the methodology for the specie. Different concentrations of GHb stimulate mRNA levels of GHRI and IGFI, but did not affect mRNA levels GHRII and IGFII. Insulin stimulates expression level of GHRI and IGFII, but did not affect GHRII and IGFI. Cortisol and estradiol administered alone showed no stimulatory or inhibitory actions on the expression of the genes studied. Combination of both insulin and GHb, and GHb and cortisol, had a negative effect on the action of GH, resulting in reducing mRNA levels of the genes of interest. GHb and estradiol increased mRNA levels of all genes, *ie*, E2 has a stimulating effect on GH action. This study shows that GHRs and IGFs gene expression are differentially regulated by different concentrations of GH and insulin administered individually, and GH and steroids hormones administered in combination, in primary culture of Pejerrey hepatocytes.

**Key words:** Growth hormone, insulin, cortisol, estradiol, GH receptors, insulin-like growth factors.

## INTRODUCCIÓN

En gran medida, la regulación del metabolismo en los vertebrados está mediado por factores neuroendocrinos que intervienen en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de los individuos (Kopchick y Andry, 2000; Grandi *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2003). La hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en Inglés), que pertenece a la familia de las citoquinas junto a prolactina (PRL) y somatolactina (SL), es secretada por las células somatotropas de la *pars distalis proximal* (PDP) de la adenohipófisis (Robinson y Hindmarsh, 1999; Laiz-Carrión, 2003; Butler y Le Roith, 2001 revisado en Canosa *et al.*, 2007), regulando diversos procesos fisiológicos (Pierce *et al.*, 2007). Adicionalmente, GH puede expresarse en otros tejidos como gónadas y cerebro, incluso en células del sistema inmune (Wong *et al.*, 2006).

GH es una hormona pleiotrópica que cumple diversas funciones, generalmente indirectas, a través de la estimulación y liberación de somatomedinas o factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II) (Kopchick y Andry, 2000; Inoue *et al.*, 2003). Dichos factores son producidos por el hígado, el principal órgano blanco de GH en vertebrados (Chang y Wong, 2009). Estudios han demostrado que IGF-I es el mediador más importante de las funciones de GH (Mommsen, 2001; Inoue *et al.*, 2003), aunque de igual manera esta hormona también tiene efectos directos independientes de IGF-I (Pierce *et al.*, 2012). Como ya se mencionó, GH actúa como el mayor regulador del crecimiento (Chang y Wong, 2009), definiendo el crecimiento como cambios en longitud y/o peso en el tiempo (Beckman, 2011). Esta acción está mediada por sus receptores (GHR, por sus siglas en inglés), que se expresan principalmente en el hígado (Pierce *et al.*, 2012) y gónadas, contribuyendo también a la maduración sexual, gametogénesis y esteroidogénesis gonadal (Chang y Wong, 2009). Adicionalmente, desempeña funciones importantes en procesos de osmoregulación, en casos particulares como en la adaptación a agua de mar (Inoue *et al.*, 2003 y Sakamoto y McCormick, 2006) o a agua dulce (Sakamoto y McCormick, 2006). Además, tiene efectos sobre el apetito y el comportamiento durante el forrajeo, donde se ha demostrado que un tratamiento con inyección de GH puede incrementar el apetito y generar un comportamiento alimenticio dominante (Chang y Wong, 2009).

Los receptores de GH, forman parte de la superfamilia de receptores de citoquinas de la clase 1 (Zhu *et al.*, 2001). Estos receptores se componen de un dominio extracelular de unión, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que contiene los elementos de interacción con efectores intracelulares que desencadenan la activación de mensajeros secundarios de señalización. (Pierce *et al.*, 2007). La señal de traducción de estas hormonas comienza con la unión a un ligando simple a dos receptores, causando la dimerización de los receptores y continua principalmente por la vía de señalización JAK/STAT (Kopchick y Andry, 2000; Pierce *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2001). La activación de los receptores también desencadena la inhibición de la vía de señalización de JAK/STAT por una concomitante activación conocidos como SOCS (del inglés, suppressors of cytokine signaling) (Ram y Waxman, 2000), lo que genera un agotamiento de la respuesta ante estímulos continuos de la hormona. En peces teleósteos se ha reportado la presencia de dos tipos de GHR, denominados como GHRI y GHRII, cuya expresión es alta en hígado y que posiblemente podrían estar regulados de manera diferencial por GH y algunas hormonas como el cortisol y el estradiol (Leung *et al.*, 2008; Pierce *et al.*, 2012; Reindl y Sheridan, 2012).

En peces, y otros vertebrados, la expresión de GHRs es mayor en el hígado, sin embargo, niveles de ARNm y de proteína son expresados en tejidos extra-hepáticos (Calduch-Giner *et al.*, 2003). Por un lado, se ha reportado que GHRI se expresa en mayor medida en tejido adiposo, el hígado y el sistema muscular, lo que indica posibles acciones sobre el metabolismo, y a su vez la expresión de GHRII se encuentra en el sistema muscular, en el corazón, los testículos e hígado, lo que indica acciones tanto en el metabolismo como en el crecimiento (Reindl y Sheridan, 2012). Sin embargo, no es del todo claro por qué ambos receptores podrían estar vinculados a diferentes actividades metabólicas, incluso cuando su expresión es compartida en varios tejidos. Por otro lado, estos receptores también se encuentran regulados por factores de tipo ambiental, fisiológico e incluso la dieta de cada individuo (Gómez-Requeni *et al.*, 2012).

Los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) son los mediadores principales de los efectos del crecimiento promovidos por GH en peces y otros vertebrados, donde han sido demostradas sus acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas (Kopchick y Andry, 2000; Mommsen, 2001; Reinecke, 2010; Sciara *et al.*, 2008). Los IGFs regulan algunos procesos

como la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular. Se ha demostrado que los IGFs están relacionados fuertemente como estimuladores de procesos anabólicos que resultan en el crecimiento del músculo, como por ejemplo: incorporación de amino ácidos, proliferación celular, síntesis de proteínas, transporte de glucosa y diferenciación de fibras musculares (Mommsen, 2001; Mommsen y Moon, 2001). El hígado es el principal sitio de síntesis de IGFs, sin embargo, se ha documentado su expresión en tejidos extra-hepáticos. En peces en diferentes estadios del crecimiento se ha mostrado su presencia en distintos tejidos tales como músculo, intestino, corazón, gónadas, riñón, hipófisis y cerebro (Pierce et al., 2004). Dado que los IGFs se expresan en diferentes tejidos, no sorprende encontrar que tengan acciones promotoras de crecimiento independientes de GH (Reindl y Sheridan, 2012). Por otro lado, ha sido descrito que los niveles de expresión de IGF-I son modulados, no solo por factores fisiológicos de los individuos como el estado nutricional, sino también por factores ambientales como la temperatura, el fotoperiodo y las estaciones (Mommsen, 2001; Reinecke, 2010).

El estudio de GHRs e IGFs es importante puesto que cada uno de sus grupos se encuentran relacionados con un tipo de actividad del sistema neuroendocrino, especialmente dentro del eje GH-IGFI, las cuales son controladas bajo la acción de diferentes hormonas (Sciara *et al.*, 2008). Para IGFs, tratamientos *in-vivo* por inyección e *in-vitro* con cultivos de hepatocitos, han demostrado que GH estimula la síntesis de mRNA de IGFI e IGFII en peces (Reindl y Sheridan, 2012). Sin embargo, la síntesis en el caso particular de IGFI puede ser tanto dependiente como independiente de GH de acuerdo al estadio del individuo y el tipo de tejido tratado (Sciara *et al.*, 2008). Además de GH, hormonas como la insulina, somatostatina, cortisol y hormonas esteroides, influyen la expresión de mRNA de IGFI e IGFII en hígado y tejidos extra-hepáticos (Reindl y Sheridan, 2012). Sin embargo, estas características no han sido definidas para la mayoría de teleósteos como el pejerrey.

El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), es emblemático de la cuenca del río de La Plata, siendo una de las especies más apreciadas, no solo por su valor en la pesca deportiva sino también por su valor comercial en Argentina y otros países donde ha sido introducida (López *et al.*, 2001). En los últimos años, la gran demanda de carne de la especie por consumidores locales e internacionales ha ido en aumento, lo que podría mermar las poblaciones naturales

en diversas épocas del año, como en épocas de sequía (Somoza *et al.*, 2008), razón por la que se ha convertido en una especie de interés para la acuicultura. El pejerrey es uno de los peces de agua dulce de Argentina más aceptado para el consumo por la calidad de su carne, además los ejemplares de esta especie presentan el mayor tamaño registrado para Atheriniformes con 52 cm de longitud total (López *et al.*, 2001). Sin embargo, la tasa de crecimiento del Pejerrey es muy baja lo que contribuye a que su acuicultura no sea comercialmente viable. De esta manera, entender algunos de los aspectos relacionados con el crecimiento que aún no han sido descritos para la especie, resulta de gran importancia para el óptimo desarrollo de su cría en cautiverio.

La regulación de GHRs e IGFs, a pesar de que ha sido estudiada en otras especies de teleosteos, ha sido poco estudiada en pejerrey, por lo que este estudio permitirá describir parcialmente el comportamiento del sistema GH-IGF del pejerrey a través de la medición de los niveles de expresión de mRNA de GHR-I, GHR-II, IGF-I e IGF-II bajo la influencia de GH, insulina y las hormonas esteroides, cortisol y estradiol, en cultivos de hepatocitos *in-vitro*. Los resultados obtenidos serán importantes para comprender el funcionamiento del sistema GH-IGFs en la regulación del crecimiento somático de la especie. Para esto fue necesario establecer un método estandarizado de cultivo de células hepáticas de Pejerrey, lo que representará una herramienta valiosa para estos estudios.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Biológico**

Ejemplares de Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) fueron mantenidos en tanques de 2000L en sistema de circulación abierto en la sede Chascomús del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Argentina. Los peces fueron alimentados con Shullet® al 0,5% de la biomasa total por tanque dos veces por día, sin embargo, un día antes del muestreo, los peces no fueron alimentados. La temperatura del agua fue mantenida entre 17-18 °C y salinidad del 1,5%. Todos los individuos utilizados fueron hembras entre 2 y 3 años de edad, peso promedio de 142,41±39,68 g, longitud estándar promedio de 22,42±2,09 cm y longitud total promedio de 25,59±2,20 cm. Los experimentos fueron realizados siguiendo las recomendaciones

internacionales de manejo de animales de laboratorio (*UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* y *The Canadian Council on Animal Care*).

### **Cultivo de hepatocitos primarios**

La metodología descrita a continuación corresponde al protocolo final establecido para el cultivo de células hepáticas de *Odontesthes bonariensis*.

#### ***Aislamiento de hepatocitos:***

El procedimiento a continuación descrito se basa en el descrito por Pierce y colaboradores (2012). Los peces fueron mantenidos en ayunas desde el día anterior a la preparación de los hepatocitos. Los individuos fueron anestesiados con benzocaína (50 mg/l) y posteriormente sacrificados por corte medular a nivel cervical. El hígado fue removido del pez, pesado y posteriormente colocado en Solución Balanceada de Sales de Hanks (HBSS) sin calcio y sin magnesio (HyClone®). Luego, bajo condiciones de esterilidad en flujo laminar, el hígado fue trozado en pequeños trozos con tijeras quirúrgicas y tratado con Tripsina (1,5 g/l) (Sigma-Aldrich®) por 1 hora en agitación para permitir disociación de las células. Posteriormente, se realizó una disociación mecánica con pipeta Pasteur para obtener una solución de células homogéneas. Dicha solución fue filtrada por una malla de 30 µm y las células fueron lavadas y colectadas posteriormente en HBSS por centrifugación a 500xg por 5 minutos. Las células fueron re-suspendidas en 3-6ml de medio M199 con Sales de Earls (Sigma-Aldrich®), pH 7,2 suplementado con bicarbonato de sodio (7,5% w/v) por litro. Se realizó un conteo celular tiñendo las células con azul de Tripano (Sigma®) en cámara de Neubauer. Esta tinción permite diferenciar las células viables de las no viables, lo que favorece la exactitud de la técnica. El número de células/ml de suspensión es calculado a partir del promedio de células viables contadas en dos o más secciones iguales de la cámara de Neubauer.

#### ***Cultivo de Hepatocitos***

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a diferentes densidades (en el rango de  $2.5 \times 10^5$  a  $2.0 \times 10^6$  células/ml) en experimentos previos (ver más adelante) y para los experimentos de tratamiento hormonal se utilizó una densidad de  $7,5 \times 10^5$  células/ml con 1ml de medio suplementado con 1% solución de Antibiótico (Penicilina, 5000 U/ml-



Estreptomicina, 5 mg/ml, Gibco) y 1% solución de Antimicótico (FUNGIZONE®, amphotericin B, 250 µg/ml, Gibco) y 10% suero fetal bovino. Bajo estas condiciones las células fueron incubadas a 22°C en atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por toda la noche (overnight-ON) para permitir la adherencia al sustrato. Luego se realizó el cambio de medio por el medio experimental con antibiótico y antimicótico, pero en ausencia de SFB. Los cultivos fueron detenidos removiendo el medio y adicionando 1ml de TriPure Insolation Reagent (Roche®) a cada pocillo.

### ***Tratamientos Hormonales***

Se realizaron tratamientos con GH bovina recombinante (Posilac®, Monsanto, St. Louis, MO, USA) gentilmente donada por el Dr. Adrian Mutto (IIB-INTECH), Insulina humana (Roche), cortisol (Sigma) y β-estradiol (Sigma), Cada uno de los tratamientos y el control aplicados a los cultivos fueron realizados por triplicado durante 4 horas, terminado el tiempo de incubación, se prepararon las células para el proceso de extracción del ARNm y qPCR. Para los tratamientos con cortisol y estradiol, estos se agregaron disueltos en etanol de modo tal que el vehículo no supere el 1% del volumen final. En los respectivos controles se adicionó al medio etanol a una concentración final igual a la de los tratamientos hormonales.

### **Extracción de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)**

La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo de TriPure Insolation Reagent. Posteriormente el ARN obtenido se trató con DNAsa (Roche) según indicaciones del productor para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico. Finalmente, se purificó con fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). La cantidad de ARN obtenido se determinó por absorbancia a 260nm (Synergy H1 Hibrid Reader, BioTek®: valores de la relación abs. 260:280 entre 1,8-2,1). Se usó una concentración de 1µg/µL de ARN para la síntesis de cDNA realizada con Super Script III (Invitrogen). Todas las qPCR fueron realizadas en placas de 96 pocillos en el equipo Stragene MX3005P usando las siguientes condiciones de reacción: 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C y finalmente un ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C. Este último ciclo se realizó para determinar la temperatura de fusión del producto de PCR obtenido, lo que permite comprobar que un solo producto fue amplificado, lo que fue

comprobado por medio de la curva de “Melting” o curva de disociación arrojada por el equipo. La mezcla de reacción fue preparada con FastStart SYBR Green Master Mix (Roche), set de primers y cADN en un volumen de reacción final de 10 $\mu$ l. La concentración final de los primers se fijó en 150nM luego de una serie de ensayos de validación (ver resultados). Los primers utilizados en este trabajo (Tabla 1) fueron previamente descritos por Gómez-Requeni y colaboradores (2012). La expresión de los genes en los experimentos fue normalizada por la expresión de  $\beta$ -actina, o alternativamente el factor de elongación I, según cual mostrara mejor comportamiento como gen de referencia, es decir que los Ct y los niveles relativos de expresión no varíen con los tratamientos.

**Tabla 1. Resumen de los primers forward (f) y reverse (r) utilizados para el análisis por real-time (qPCR).**

Nombre Primer		Secuencia Primer		
GHRI	f1	5'-	CTTTGGAGAGAGGTGAAACGGTTG	-3'
	r1	5'-	CTTGGGCGTAGAAGTCTGTGTTG	-3'
GHRII	f1	5'-	GACGGACCTGGACACGGACTG	-3'
	r1	5'-	ACGGGAGAATGGAGCGGTGAC	-3'
IGFI	f1	5'-	CTGCGCAATGGAACAAAG	-3'
	r1	5'-	GAATGAGCGCTAGACATCC	-3'
IGFII	f1	5'-	AGCAGAGAACAGCCGAAT	-3'
	r1	5'-	GTAGAGCGTGAGAGCCAG	-3'
$\beta$ ACT	f1	5'-	GCTGTCCCTGTACGCCTCTGG	-3'
	r1	5'-	GCTCGGCTGTGGTGGTGAAGC	-3'

### **Análisis de datos**

Los datos de expresión para cada gen fueron analizados por el método de expresión relativa con corrección por eficiencia (Pfaffl, 2001), donde se realizaron transformaciones por  $\log_2$  de los datos que no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizó ANOVA de una sola vía seguido del test *a posteriori* de Student-Neuman-Keuls utilizando el programa estadístico SigmaPlot 12.0. Los resultados fueron considerados estadísticamente significantes con el valor de  $p < 0.05$ . Los datos dados se expresan como la media  $\pm$  SEM (Error estándar medio) y los gráficos presentados fueron elaborados utilizando el programa GraphPad Prism 5.

Los porcentajes de identidad entre secuencias presentados fueron realizados con el programa Lasergene, con las aplicaciones EditSeq y MegAlign de DNASTAR versión 7.1.0 y las secuencias fueron obtenidas de la plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Cultivo de hepatocitos de Pejerrey y análisis por qPCR**

#### ***Prueba 1: Estandarización del cultivo y densidad celular.***

Fue necesaria la estandarización de los parámetros óptimos para el adecuado establecimiento de las células hepáticas de Pejerrey en cultivo, su mantenimiento durante las horas de tratamiento, asegurando el normal funcionamiento de la actividad fisiológica, además de proveer un ambiente libre de contaminantes y un proceso adecuado para la extracción del ARNm. De esta manera, varios factores tuvieron que ser evaluados durante el proceso:

- a. Agentes antibióticos y antimicóticos:** Inicialmente se pudo comprobar que el uso de únicamente una combinación de agente antibiótico como la mezcla de penicilina y estreptomycin no fueron suficientes, puesto que se encontró contaminación con levaduras, y estos agentes al ser solo bactericidas no tenían efectos sobre esta contaminación. De esta manera, se decidió suplementar el medio de cultivo con el antimicótico, FUNGIZONE de Gibco, capaz de evitar la colonización de hongos y levaduras. Esta combinación de antibiótico y antimicótico fue utilizada durante todas las etapas del cultivo.
- b. Tipo de cultivo:** Se evaluaron dos tipos de cultivos: pequeños explantos de aproximadamente medio centímetro del tejido hepático en cajas de Petri con medio de cultivo y cultivos primarios en monocapa de hepatocitos dispersos, en placas de 24 pocillos. De los explantos se esperaba que las células se segregaran a medida que pasara el tiempo, formando eventualmente una monocapa de células. Sin embargo, esto no sucedió con la celeridad necesaria y se pudo observar la degradación del tejido y la muerte celular luego de 24 horas. Por otro lado, en el cultivo en monocapa de células dispersas, se pudo observar como luego de 2 horas de la disposición de las

células en los pocillos, estas comenzaban a adherirse a la placa, estableciendo el cultivo primario.

- c. Dispersión de células hepáticas:* Para dispersar las células se probaron varios protocolos en ensayos preliminares, como ejemplo dispersión mecánica con bisturí seguido de dispersión mecánica con pipeta Pasteur, pero estos protocolos no permitieron la adecuada separación de las células del tejido conectivo. Finalmente se optó por digestión enzimática con Tripsina (1,5 g/l) durante 30 minutos, que permitió una adecuada separación de las células, seguido de dispersión mecánica de las células con pipeta Pasteur y posterior filtración de las mismas por una malla de 30  $\mu\text{m}$  (Segner, 1998), de manera que cualquier agregado de tejido tanto hepático como conectivo, no pase a la suspensión final de células.
- d. Densidad celular:* También fue necesario establecer una densidad adecuada de células en cada pozo, de manera que permitiera un adecuado establecimiento del cultivo durante las horas de tratamientos y que además asegurara una concentración óptima de ARNm luego de su extracción. Se probaron concentraciones entre  $2.5 \times 10^5$  hasta  $2 \times 10^6$  células/pocillo, que fueron dejadas en la cámara de cultivo por 24 horas. Pasado el tiempo, los cultivos fueron detenidos y se llevó a cabo la extracción de ARNm. Como era de esperarse, se observó que, a mayor concentración de células, mayor concentración de ARNm obtenido (Tabla 2).

**Tabla 2. Concentraciones de ARNm obtenidas a partir de diferentes densidades de células hepáticas de Pejerrey en cultivo.**

<b>Densidad</b>	<b>ARNm (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>
$2,5 \times 10^5$	353,321
$5 \times 10^5$	734,413
$7,5 \times 10^5$	1229,9
$1 \times 10^6$	1114,727
$1,5 \times 10^6$	2339,125
$2 \times 10^6$	2753,183

Estos resultados muestran que densidades entre  $7,5 \times 10^5$  y  $1,5 \times 10^6$  permitieron obtener concentraciones de ARN total suficientes, para medir la expresión de los genes de interés por PCR en tiempo real (qPCR). Se escogió trabajar con una densidad

de  $7,5 \times 10^5$  células/pocillo como la concentración de siembra para los experimentos desarrollados en este trabajo, dado que es el menor número de células que permiten obtener cantidad de ARN suficiente para la determinación de la expresión génica y adicionalmente permite que un mayor número de pozos puedan ser sembrados.

### ***Prueba 2: Diferentes concentraciones de primers***

No solo fue necesario establecer las condiciones adecuadas para el cultivo, sino también determinar y establecer las condiciones adecuadas para el óptimo funcionamiento durante la qPCR. Uno de los factores importantes corresponde a la concentración de los primers encargados de la amplificación de los genes de interés. Para esto se realizaron pruebas con cada uno de los primers a diferentes concentraciones (100, 200 y 400nM), con sus respectivas curvas de eficiencia, con diluciones seriadas en factor 1:4 del cDNA obtenido de los cultivos primarios. Posteriormente se analizaron las curvas estándar arrojadas por la qPCR. Se pudo determinar que, para cada uno de los genes, concentraciones entre 100nM y 200nM, arrojan resultados óptimos teniendo en cuenta la eficiencia del proceso de qPCR, valores que oscilan entre el 82 - 100% (datos no mostrados). De esta manera, se decidió trabajar con concentraciones de primers a 150nM, concentración utilizada para los mismos primers por Gómez-Requeni y colaboradores (2012).

### ***Prueba 3: Concentración óptima de primers y densidad celular***

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de las dos pruebas anteriores, se procedió a evaluar el desempeño de qPCR concentración de 150nM de cada primer. Como resultado se obtuvieron eficiencias de la curva estándar entre 69,2 y 100% para todos los primers evaluados (Tabla 3), además de curvas de amplificación y de disociación adecuadas.

**Tabla 3. Eficiencias para cada uno de los primers de los genes de interés luego del análisis por qPCR.**

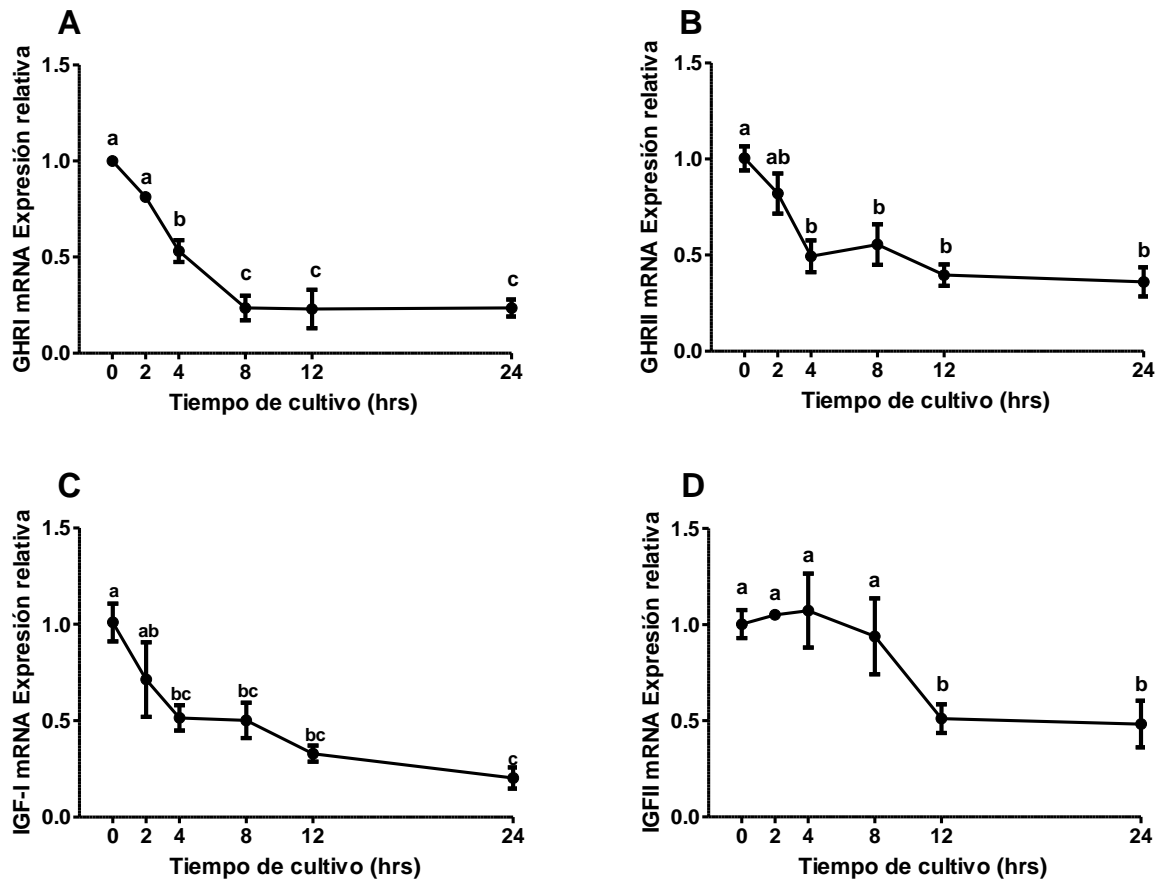
<b>Gen</b>	<b>Eficiencia</b>
GHRI	86,3 - 123%
GHRII	85 - 107%
IGFI	95,6 - 117,3%
IGFII	69,2 - 126%
$\beta$ ACT	88,2 - 100%

Sin embargo, durante los diferentes experimentos realizados, los valores de las eficiencias para cada gen variaron entre ensayos, casi siempre fueron diferentes del 100% y diferentes entre los distintos genes de interés y de referencia. Por esta razón, se decidió llevar a cabo el proceso de análisis de qPCR por medio del método de Pfaffl (2001) con corrección de eficiencia en lugar del método delta-delta Ct, como había sido decidido al iniciar este trabajo de investigación, por su simpleza.

***Prueba 4: Efecto de las condiciones de cultivo sobre la expresión de los genes de interés.***

Lo niveles de expresión de ARNm de los diferentes genes estudiados fueron evaluados por qPCR luego de cultivar los hepatocitos por diferentes periodos. Durante el desarrollo de este experimento, se logró evidenciar que las células se mantienen estables incluso durante 24 horas, además el gen de referencia ( $\beta$ -actina) mantuvo su expresión génica de manera estable durante los experimentos, lo que permitió demostrar que es un buen gen de referencia al no verse alterado con durante el tiempo de cultivo.

Al determinar la expresión relativa de los receptores de hormona de crecimiento I y II (Fig. 1A y B), se puede observar como a medida que pasa el tiempo, la expresión de cada uno de los genes va disminuyendo. Esto se debe a que las células, al encontrarse en cultivo, no están bajo el control hormonal y del metabolismo normal del organismo, por lo que la expresión génica no puede ser modulada de ninguna manera, resultando en la disminución de su expresión con el paso del tiempo. La misma respuesta fue observada para los genes de los factores de crecimiento similares a insulina I y II (Fig. 1B y C). Estos resultados indican que las células en el medio de cultivo se encuentran activas metabólicamente y fisiológicamente incluso 48 horas después de ser extraídas del individuo. Además, se observa que los niveles de expresión se reducen a medida que pasan las horas de muestreo, y en general, luego de 8 horas de cultivo, se estabilizan los niveles de expresión para la mayoría de los genes en estudio (GHRI, GHRII e IGFI), con la excepción de IGFI que requirió 12 horas de cultivo. A partir de estos datos se decidió que en los sucesivos cultivos se estabilizaran por la noche (16-18 horas) antes de aplicar los tratamientos hormonales y que estos se realizaran por 4 horas.



**Figura 1.** Análisis de la expresión de los receptores de hormona de crecimiento GHR-I (A), GHR-II (B) y de los factores de crecimiento similares a insulina IGF-I (C) e IGF-II (D) en función de la duración del cultivo *in vitro* sin tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempo de cultivo con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media +/- el error estándar medio (SEM).

Como es bien sabido, en los vertebrados el hígado está encargado de múltiples funciones dentro del metabolismo, como la síntesis y secreción de proteínas, mantener los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo, almacenamiento de energía, eliminación de componentes del nitrógeno luego de la formación de urea o amonio, entre otros (Segner, 1998). Estudios *in vitro* permiten un mejor entendimiento de las propiedades básicas del hígado y sus respuestas adaptativas, y más importante aún, diversos tipos de condiciones

experimentales pueden ser iniciadas con poblaciones celulares obtenidas de un mismo individuo. Además de ello, hepatocitos aislados ofrecen todos los beneficios de una célula intacta (organelos funcionales, interacciones enzimáticas, concentraciones de metabolitos, etc) sin la complejidad de un animal intacto (Segner, 1998). Por otro lado, la naturaleza dinámica del hígado y la regulación de procesos fisiológicos y metabólicos, hace de este órgano un modelo importante para el estudio del eje de crecimiento (Mommsen *et al.*, 1994). Es por esta razón que estandarizar el cultivo de células hepáticas de Pejerrey fue de gran importancia para el desarrollo de este estudio, de manera que permitiera entender de manera más precisa el funcionamiento del eje GH-GHRs-IGFs en esta especie.

### **Efecto de GH bovina (GHb) en cultivo de hepatocitos *in vitro* de Pejerrey**

#### ***Porcentajes de identidad entre GHb y GH de Pejerrey***

Se realizó el análisis de porcentaje de identidad entre la hormona de crecimiento bovina (Código de acceso NCBI M27325) y de Pejerrey (Código de acceso AY187284.2), donde se obtuvo un 52,9% de identidad del marco abierto de lectura entre ambas secuencias de amino ácidos. Esto muestra que la secuencia de GH se ha conservado en cierto porcentaje entre vertebrados durante los procesos evolutivos, y sugiere que GHb de manera heteróloga podría tener efectos metabólicos y fisiológicos sobre células de otra especie, como en este estudio.

#### ***Efecto de concentraciones crecientes de GHb sobre la expresión de GHRs e IGFs en cultivo de hepatocitos *in vitro*.***

Cuando hepatocitos en cultivo fueron tratados con concentraciones crecientes de GH bovina (GHb) por 4 horas, se pudo observar que a bajas concentraciones (5nM), no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de GHRI respecto al control (0nM). A partir de la concentración 50nM, el nivel de expresión del ARNm aumento con respecto al control y de igual manera ocurre a una concentración de 100nM (Fig. 2A). Por otro lado, y contrario a los resultados obtenidos para GHRI, la expresión de GHRII no se vio alterada por ninguna de las concentraciones de GHb utilizadas (Fig. 2B).



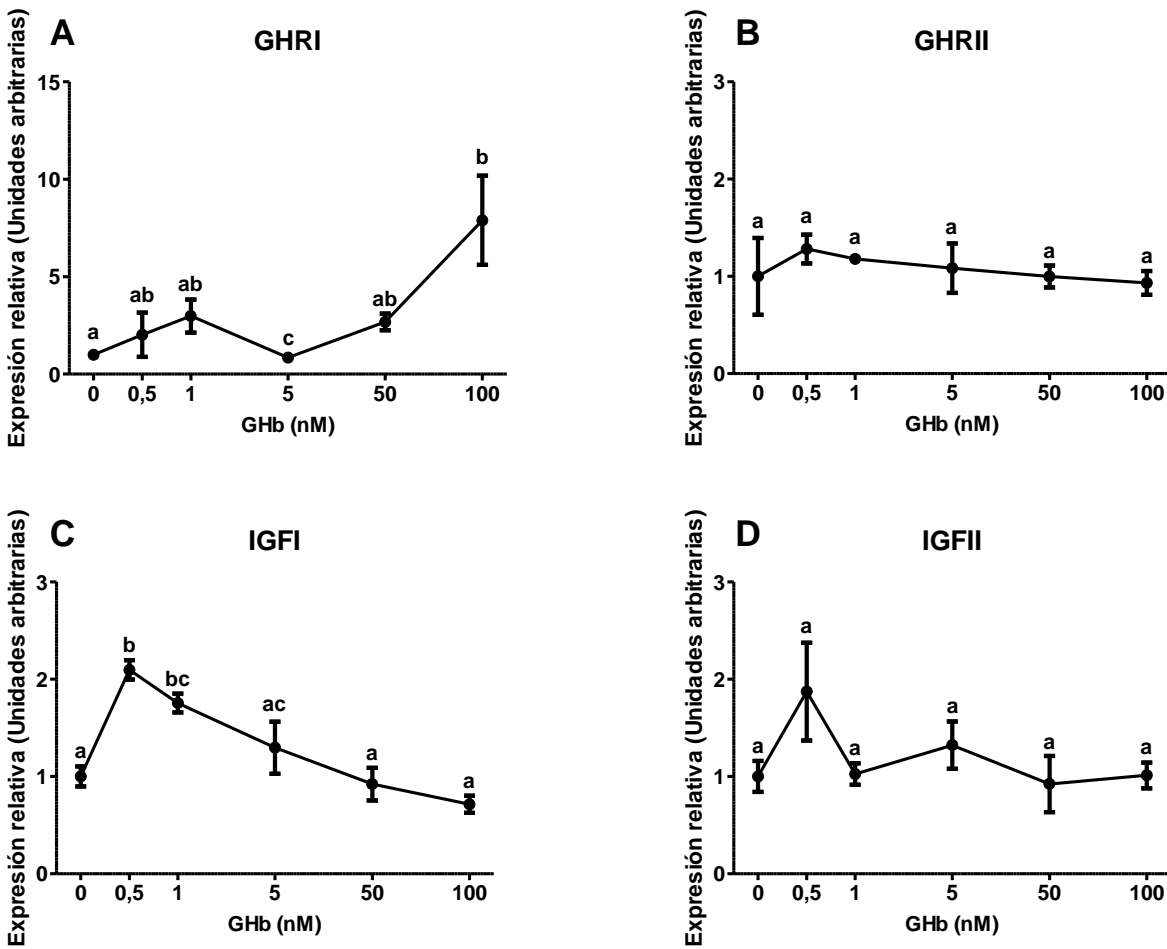
Estos resultados muestran que los niveles hepáticos de ARNm de GHRI y GHRII fueron regulados de manera diferencial por GH bovina. La estimulación de GHRI sugiere que los transcritos de ARNm de Pejerrey codifican para receptores de hormona de crecimiento funcionales. Además, la estimulación en la expresión de GHRs en hepatocitos con hormona de crecimiento heteróloga (GHb) confirma que, aunque el grado de homología y conservación estructural de GH entre diferentes grupos de vertebrados no sea muy elevado (52%), aun así, GHb es capaz de estimular la expresión de genes relacionados con el eje del crecimiento en Pejerrey.

GHb estimula el nivel de ARNm de GHRI en hepatocitos de Pejerrey, empezando a una concentración de 50nM hasta 100nM (Fig. 2A), lo que coincide con la estimulación de hepatocitos de Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) con GH homóloga, en donde el nivel de expresión aumenta desde una concentración de 50nM, hasta un pico máximo de 500nM (Pierce *et al.*, 2012). Sin embargo, GHRI fue el único receptor de GH que se vio alterado en *O. bonariensis* a diferencia de lo que sucedió en *O. mossambicus* donde, ambos receptores se vieron influenciados por el tratamiento con hormona de crecimiento (Pierce *et al.*, 2012). Otros estudios, el tratamiento con GH resultó en un incremento de 2,5 a 3 veces en la tasa de transcripción de GHRI y GHRII, en hepatocitos de trucha arcoíris (Saera-Vila *et al.*, 2005), lo que coincide con los datos obtenidos para GHRI de Pejerrey, pero no para GHRII. Estos resultados podrían indicar que GHRI es estimulado de manera más activa por GH, por lo que podría suponerse que este receptor cumple un rol más directo en el crecimiento del Pejerrey que GHRII, que bajo la acción de GH no demostró un aumento significativo de su expresión.

Para los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) la respuesta a GHb fue diferente entre ambos genes. IGFI tuvo una respuesta bifásica y dependiente de la concentración, donde los niveles de ARNm fueron estadísticamente detectables a 0,5nM, que corresponde al punto de máxima expresión. Posteriormente la respuesta se vio reducida al nivel del control negativo desde la concentración de 5nM (Fig. 2C). Resultados similares fueron obtenidos en Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Pierce *et al.*, 2011) y en Salmón (*Oncorhynchus kisutch*) (Pierce *et al.*, 2004), donde la expresión de ARNm aumenta hasta un punto máximo a una concentración de GH entre 1 y 5nM, y luego desciende significativamente. Estudios realizados en Dorada plateada (*Sparus sarba*) también se

obtuvieron resultados similares luego de un tratamiento con GH por 24 horas (Leung *et al.*, 2008). Para individuos de *Oncorhynchus kisutch* no transgénicos (transgen de sobreexpresión de GH), la aplicación de GH bovina también incrementó la expresión de IGF1 (Raven *et al.*, 2012). Por otro lado, y contrario a lo reportado en estudios anteriores como los de Pierce y colaboradores (2010 y 2011), GHb no estimuló la expresión de IGF2 en Pejerrey (Fig. 2D).

Los niveles de ARNm de IGF1 fueron estimulados por GH en hepatocitos de Pejerrey en cultivo primario, como ha sido reportado en estudios anteriores en otros peces teleósteos (Leung *et al.*, 2008; Moriyama *et al.*, 2008; Pierce *et al.*, 2004, 2011). Sin embargo, el nivel de ARNm de IGF2 no se vio afectado en el Pejerrey. La curva de respuesta bifásica obtenida indica que altos niveles de GH regulan negativamente la señalización de GH en el hígado, donde dos mecanismos podrían estar involucrados: a) Inhibición de la activación del receptor por exceso de ligando, o b) Inhibición corriente abajo por inducción de inhibidores intracelulares (Pierce *et al.*, 2004), un fenómeno común para los receptores de citoquinas que involucra la activación de inhibidores de señalización inducibles por citoquinas conocidos como SOCS (del inglés, suppressors of cytokine signaling) (Ram y Waxman, 2000). Sin embargo, esto aún no ha sido demostrado en peces, aunque se cree que existen proteínas homólogas a SOCS que cumplirían esta función (Pierce *et al.*, 2004), lo que podría vincularse en la respuesta obtenida en este estudio. Por otro lado, en humanos ha sido demostrado que la interacción del ligando I de GH con su respectivo GHR puede resultar en una inhibición de la activación del receptor con niveles altos de GH (Frank, 2002). La expresión bifásica de IGF1 también fue descrita para *Sparus sarba* luego de que hepatocitos fueran incubados por 24 horas con GH (Leung *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Efecto de concentraciones crecientes de GHb sobre la expresión de GHR-I (A), GHR-II (B), IGF-I (C) e IGF-II (D) in vitro. Hepatocitos de pejerrey en cultivo fueron incubados por 4 horas con concentraciones entre 0 y 100nM de GHb. La expresión de los genes se determinó por qPCR. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar.

Este estudio muestra que los niveles de ARNm son regulados diferencialmente en hepatocitos de Pejerrey a través de los efectos directos y la modulación diferencial dependiente a la sensibilidad de GH por cada uno de los genes. Algunos estudios han demostrado que la inyección regular de GH bovina o humana promueve un incremento en la proporción de fibras musculares en Trucha arcoíris, además, GH también afecta el tamaño del pez como en salmónidos (Mommssen y Moon, 2001). En este sentido, gracias al rol que

desempeña GH en el crecimiento muscular de los peces, hace de esta hormona un candidato ideal para mejorar la producción en la acuicultura (Mommsen y Moon, 2001) a través de la expresión de sus genes mediadores como los son GHRs y principalmente la producción hepática de IGFI, lo que representa uno de los principales objetivos en el cultivo y producción de Pejerrey en cautiverio.

### **Efectos de Insulina, Cortisol y Estradiol en cultivo de hepatocitos *in vitro* de Pejerrey**

#### ***Porcentajes de identidad de Insulina entre diferentes grupos de vertebrados***

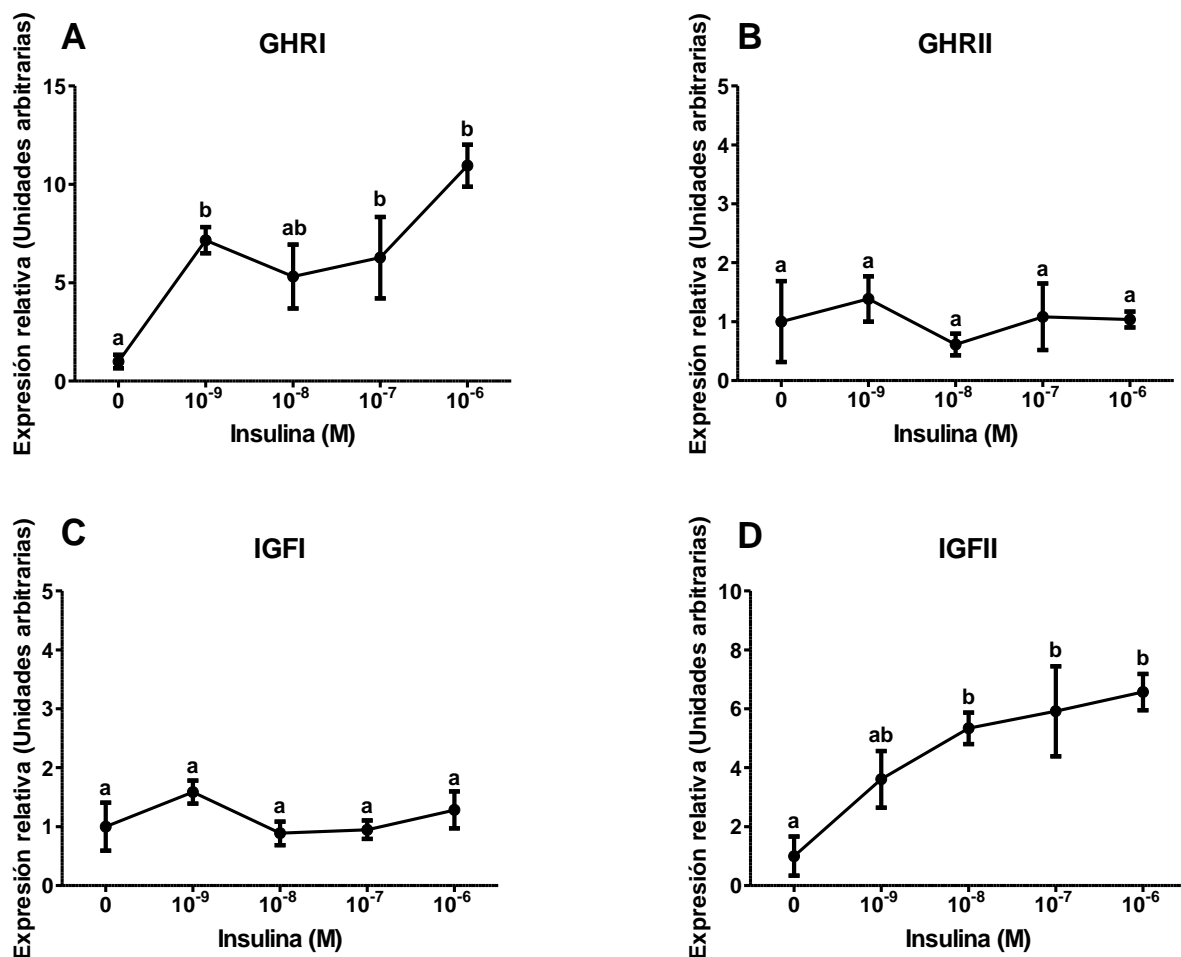
A través de análisis de secuencias, se ha demostrado que el gen de la insulina se ha conservado entre diferentes grupos de vertebrados durante la evolución, incluso entre humanos y peces. Se analizó el porcentaje de identidad entre la secuencia de amino ácidos de insulina de diferentes teleósteos en comparación con la insulina humana (Código de acceso NCBI BC005255) utilizada en este estudio, donde se encontró: *Danio rerio* (AJ237750) 53,8% de identidad, *Micropterus salmoides* (HQ418228) 53,5% de identidad y *Seriola dumerili* (AB262771) 53,6% de identidad. Entre el mismo grupo de teleósteos, el porcentaje de identidad de la secuencia varió entre 72,2% y 87,6%. También han sido reportados otros valores en la literatura, por ejemplo, mixino (*Myxine glutinosa*) comparte el 65% de identidad la secuencia de amino ácidos con la insulina humana (Duguay y Mommsen, 1994). Este resultado demuestra que dicha secuencia es conservada entre diferentes grupos de vertebrados y que la insulina humana tendría la capacidad de promover una respuesta fisiológica normal en Pejerrey.

### **Efecto de Insulina, Cortisol y Estradiol sobre la expresión de GHRs e IGFs en cultivo de hepatocitos *in vitro***

Con el objetivo de estudiar la interacción del eje de crecimiento con la regulación del metabolismo, el eje de respuesta al estrés y el eje reproductivo, se analizaron los efectos *in vitro* de concentraciones crecientes de Insulina (metabolismo), Cortisol (respuesta al estrés) y Estradiol (reproducción), sobre la expresión de los genes en estudio.

Luego del tratamiento por 4 horas, insulina estimuló el nivel de ARNm de GHRI, que presentó aumento de expresión entre  $10^{-9}\text{M}$  y  $10^{-6}\text{M}$  (Fig. 3A). Por el contrario, para GHRII, la expresión relativa de ARNm no se vio afectada por el tratamiento con insulina, por lo que no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 3B). Se han reportado resultados similares en otros teleósteos como para Tilapia, donde las mismas concentraciones de insulina promueven la expresión de GHRI de manera exponencial hasta un pico máximo a  $10^{-6}\text{M}$  (Pierce *et al.*, 2012).

El mismo tratamiento con insulina tuvo efectos contrarios para IGFs. IGFI no presentó aumento de la expresión con respecto al control, donde cada una de las concentraciones de insulina utilizadas no presentaron diferencias significativas (Fig. 3C). IGFIII presentó un leve aumento de la expresión relativa de ARNm entre las concentraciones de  $10^{-8}$  y  $10^{-6}\text{M}$  (Fig. 3D). Se han reportado los mismos resultados en Tilapia, donde el mismo tratamiento no alteraron la expresión de IGFI, mientras que a medida que aumentaron las concentraciones, el nivel de ARNm de IGFIII aumentó en concentraciones entre  $10^{-7}$  y  $10^{-6}\text{M}$  de insulina (Pierce *et al.*, 2011). Con las mismas concentraciones de insulina se obtuvo el mismo resultado sobre la expresión de IGFIII en hepatocitos de salmón (Pierce *et al.*, 2010).

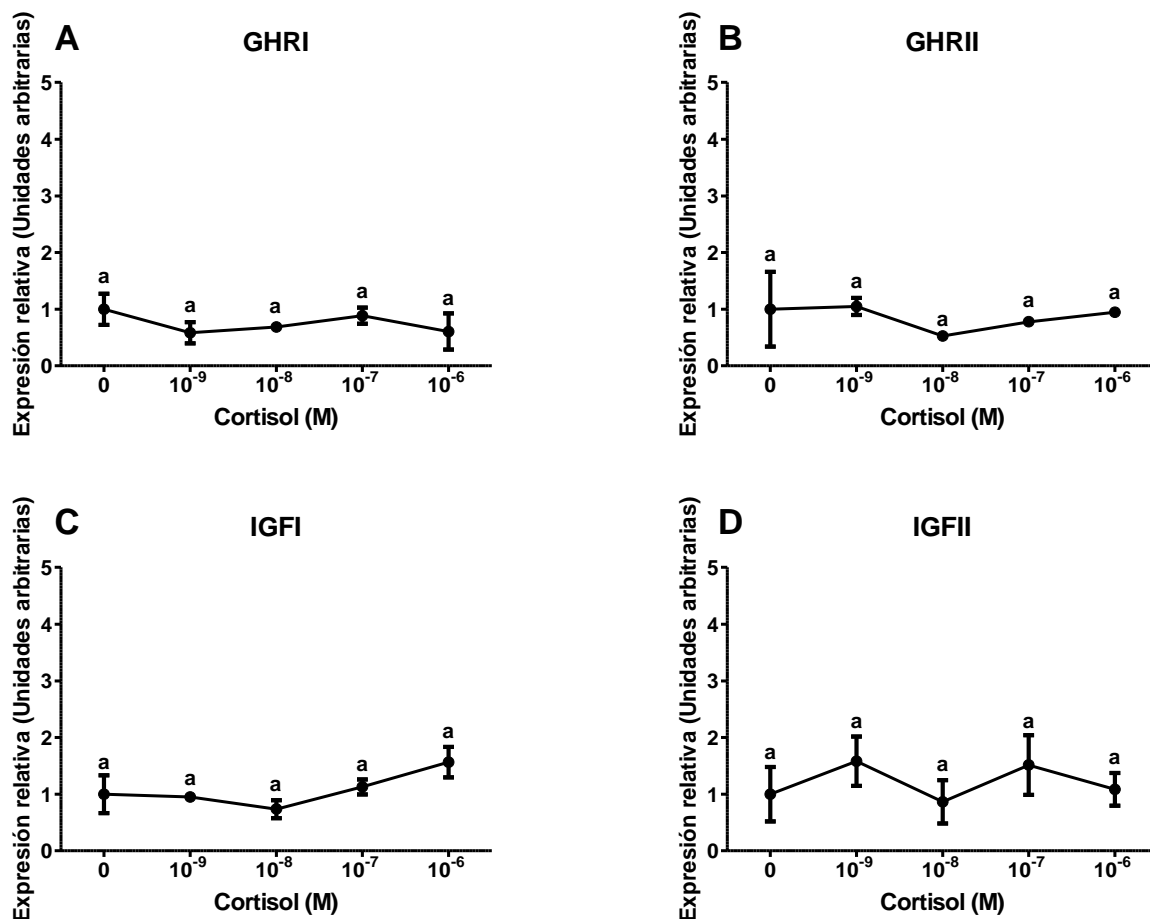


**Figura 3.** Efecto de la Insulina a diferentes concentraciones sobre la expresión de GHR-I (A), GHR-II (B), IGF-I (C) e IGF-II (D) *in vitro*. Hepatocitos de pejerrey en cultivo fueron incubados por 4 horas tratados con concentraciones crecientes de Insulina. La expresión de los genes se determinó por qPCR. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media +/- el error estándar.

Es bien sabido que el mayor rol de la insulina en teleósteos es la regulación del metabolismo de proteínas reduciendo los niveles plasmáticos de amino ácidos individuales, además incrementa la incorporación de carbono derivado de la glucosa y de amino ácidos al hígado y/o al músculo esquelético tanto *in vivo* como *in vitro*. De igual manera promueve la proteogénesis y lipogénesis en teleósteos, mientras suprime la gluconeogénesis (Ince, 1983; Duguay y Mommsen, 1994). El ARNm de GHRs e IGFs son regulados de manera diferencial

por insulina humana en Pejerrey. Es importante resaltar que insulina no tiene efecto sobre la expresión de GHRII en Pejerrey, incluso cuando la inhibición de niveles hepáticos de ARNm de GHRII por insulina es una característica conservada en peces teleósteos (Pierce *et al.*, 2012), así, se ha evidenciado una acción directa de la insulina sobre GHRI y IGFII de Pejerrey, genes vinculados directamente sobre metabolismo del crecimiento en teleósteos. Adicionalmente, incluso cuando los niveles de glucosa no fueron medidos durante este estudio, se esperaría que la insulina estimule la absorción de glucosa. Es posible, que los niveles hepáticos de ARNm de GHRI respondan a niveles intracelulares de combustibles metabólicos como la glucosa (Pierce *et al.*, 2012). Consistente con esta hipótesis, Riley y colaboradores (2009), inyectaron glucosa a ejemplares de tilapia y como resultado obtuvieron un aumento del nivel de expresión de ARNm de GHRI. Por esta razón, nuevos estudios son requeridos para esclarecer la posibilidad de que la expresión de GHRI responda a niveles intracelulares de glucosa en forma directa o vía la liberación pancreática de insulina.

Luego de realizar el análisis estadístico, se determinó que cortisol, en ninguna de las concentraciones empleadas, tuvo efecto sobre la expresión de los receptores de GH y tampoco sobre los factores de crecimiento similares a insulina (Fig. 4A-D). Este resultado fue inesperado y difiere del obtenido en hepatocitos de Tilapia, donde la expresión de GHRI aumenta exponencialmente desde concentraciones de  $10^{-9}$ M hasta  $10^{-6}$ M (Pierce *et al.*, 2012). Por otro lado, para GHRII, Pierce y colaboradores (2012), obtuvieron una curva de expresión bifásica, donde a partir de la concentración  $10^{-7}$ M, la expresión relativa de GHRII aumenta hasta un pico máximo de expresión a  $10^{-6}$ M. En el caso de IGFs, el mismo tratamiento empleado para hepatocitos de Pejerrey, tampoco modificó la expresión en hepatocitos en cultivo *in vitro* de Tilapia con ninguna de las concentraciones utilizadas (Pierce *et al.*, 2011). Sin embargo, la expresión de IGFI de *Sparus sarba*, disminuye con concentraciones ascendentes de cortisol durante la incubación de los hepatocitos por 24 horas (Leung *et al.*, 2008).



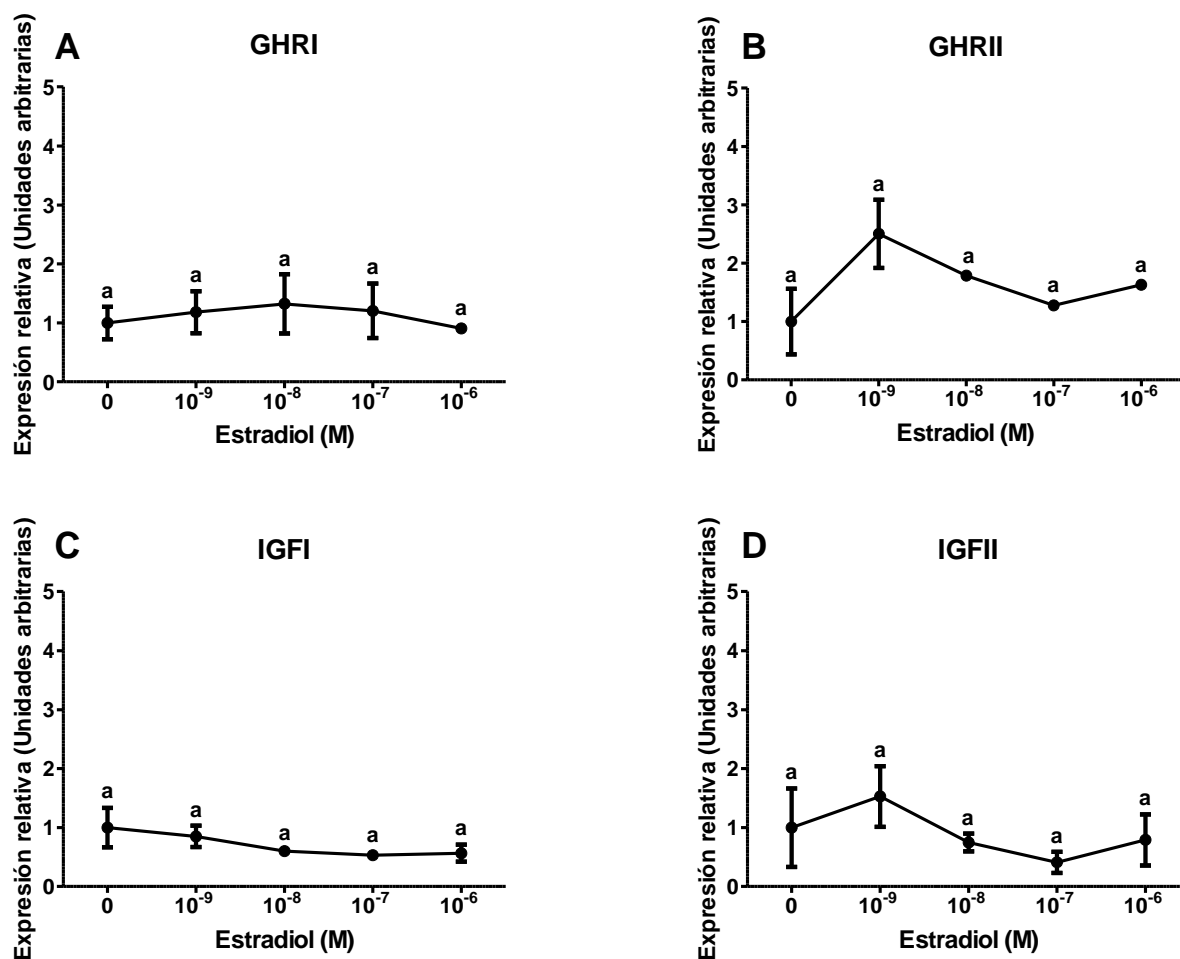
**Figura 4.** Efecto del Cortisol a diferentes concentraciones sobre la expresión de GHR-I (A), GHR-II (B), IGF-I (C) e IGF-II (D) in vitro. Hepatocitos de pejerrey en cultivo fueron incubados por 4 horas, tratados con concentraciones crecientes de Cortisol. La expresión de los genes se determinó por qPCR. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar.

El cortisol es el principal glucocorticoide en peces, desempeña diversas funciones, pero principalmente genera respuestas al estrés (Mommsen y Moon, 2001) y como un importante regulador negativo del crecimiento (Mommsen, 2001). Además, es bien sabido que el cortisol está involucrado en la regulación energética del metabolismo, el transporte de iones en branquias, osmoregulación, además de tener acciones dentro del sistema inmune. Es también conocido que el cortisol tiene efectos sobre la secreción de GH (Chang y Wong, 2009), y además puede afectar la liberación de GH indirectamente limitando el “feedback”



negativo de IGFI (Chang y Wong, 2009). Por otro lado, se ha demostrado que cortisol suprime la producción hepática y los niveles plasmáticos de IGFI en Bagre (*Ictalurus punctatus*) (Peterson y Small, 2005), y adicionalmente puede inhibir la expresión de los receptores de GH (Small *et al.*, 2006). La inhibición de IGFI y GHRs por glucocorticoides parece estar conservada en peces teleósteos (Pierce *et al.*, 2011). De esta manera, puede suponerse que la acción de cortisol podría estar directamente relacionada con el eje GH/GHR/IGF, y como resultado de la baja regulación de GHRs, se produce una regulación negativa directa sobre de la producción de IGFs, aunque en Pejerrey dicho tratamiento no tuvo efecto. Sin embargo, el hecho que cortisol presente efectos estimulantes en algunas especies de teleósteos y en otras no, puede sugerir diferencias entre los mecanismos celulares encargados de la regulación de glucocorticoides en hepatocitos y su efecto sobre el eje GH/IGF, por lo que nuevos estudios deben ser realizados.

El tratamiento con concentraciones crecientes de 17 $\beta$ -estradiol (E2) no tuvo efectos sobre la expresión de GHRs (Fig. 5A y B). Estos resultados difieren a los obtenidos en explantos de hígado de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) incubados con estradiol, donde la expresión de GHRI y GHRII disminuye en la misma proporción a medida que las concentraciones aumentan en un tiempo de incubación de 6 horas (Norbeck y Sheridan, 2011). Resultados similares fueron descritos para la misma especie al medir la expresión de ARNm de GHRs en hígado luego de un tratamiento *in vivo* con E2 por 15 días, donde GHRI se expresó más que GHRII durante dicho tratamiento (Hanson *et al.*, 2014). El mismo tratamiento de E2 a hepatocitos de Pejerrey no presentó efecto sobre la expresión de IGFs (Fig. 5C y D). Los resultados obtenidos difieren a los reportados con anterioridad para diferentes especies. En *O. mykiss*, la expresión de ARNm de IGFs disminuye a medida que las concentraciones de E2 aumentan (Norbeck y Sheridan, 2011). Hanson y colaboradores (2014) describieron que, durante el tratamiento aplicado a la misma especie, ambos factores disminuyen a medida que las concentraciones de E2 aumentan.



**Figura 5.** Efecto del Estradiol a diferentes concentraciones sobre la expresión de GHR-I (A), GHR-II (B), IGF-I (C) e IGF-II (D) in vitro. Hepatocitos de pejerrey en cultivo fueron incubados por 4 horas, tratados con concentraciones crecientes de Estradiol. La expresión de los genes se determinó por qPCR. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media +/- el error estándar.

No se pudo evidenciar un efecto directo de E2 sobre el eje GH-IGF. E2 inhibe los niveles de ARNm de los receptores de GH en hepatocitos y además también inhibe la expresión de IGFs como ha sido reportado en estudios anteriores en otras especies (Norbeck y Sheridan, 2011). Con estos resultados podría suponerse que E2 reduce la respuesta del tejido hepático a GH, inhibiendo la expresión del ARNm de GHRs y de IGFs, por lo que un efecto directo sería la reducción del crecimiento en peso y tamaño como fue demostrado por

Hanson y colaboradores (2014), al aplicar E2 a juveniles de Trucha arcoíris. De igual manera, dichos resultados podrían estar modulados por el sexo de los individuos. Algunos estudios han demostrado que los estrógenos, como E2, disminuyen la expresión hepática de IGFI en hembras maduras de peces como la Tilapia, lo que provee evidencia de un mecanismo que puede redirigir la energía del individuo hacia la producción de oocitos en hembras y no hacia el crecimiento somático (Riley *et al.*, 2004). Dicha teoría podría aplicarse para este estudio, puesto que los individuos de Pejerrey utilizados eran hembras maduras.

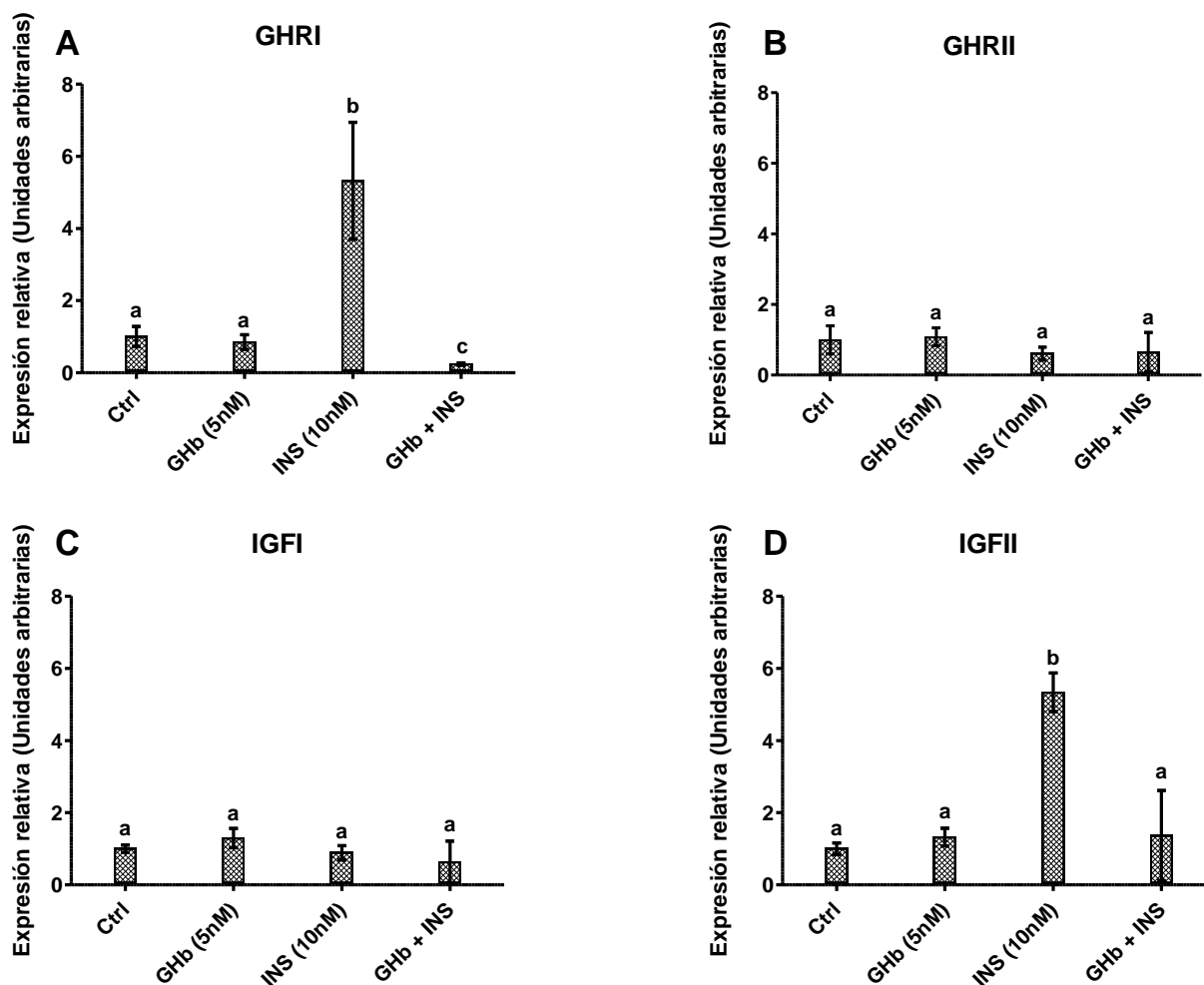
La razón para estos diferentes tipos de respuestas entre teleósteos no es clara (Norberck y Sheridan, 2011), sin embargo, podría deberse a diferencias en la metodología empleada (modo de administración, concentración, duración del tratamiento), etapa del desarrollo o la especie. En este sentido, resultados contrarios a los ya descritos han sido demostrados, donde por ejemplo para perca amarilla (*Perca flavescens*), E2 aumenta los niveles hepáticos de ARNm de IGFI (Goetz *et al.*, 2009). Tratamientos con estradiol en hepatocitos han sido utilizados desde hace varias décadas para elucidar funcionamiento de esta hormona sobre la fisiología y el metabolismo del crecimiento en peces (Mommsen y Lazier, 1986), aun así, el rol y funcionamiento de E2 en el eje del crecimiento no ha sido del todo elucidado, por lo que nuevos estudios deben ser adelantados en teleósteos como el Pejerrey.

### **Efectos de Insulina, Cortisol y Estradiol en combinación con GHb sobre la expresión de GHRs e IGFs en cultivo de hepatocitos *in vitro***

Con el objetivo de estudiar el efecto combinado de GHb [5nM] con Insulina  $10^{-6}$ M, Cortisol  $10^{-6}$ M y E2  $10^{-6}$ M sobre el eje de crecimiento, se procedió a medir el efecto *in vitro* de dichas combinaciones hormonales y posteriormente, por qPCR, se midió la expresión de los genes en estudio. El tratamiento en conjunto de GHb e Insulina reduce significativamente la expresión de GHRI en comparación al nivel de expresión relativa presentando por ambas hormonas de manera individual (Fig. 6A), donde GHb no presentó diferencias significativas con el control e Insulina se presenta un nivel de expresión mayor respecto al control. Por el contrario, para GHRII, el tratamiento combinado de GHb e Insulina no afecta el nivel de expresión respecto al control (Fig. 6B). Sin embargo, estos resultados difieren a los obtenidos en estudios anteriores en Tilapia, donde el efecto combinado de dichas hormonas promueve

la expresión de GHRI por encima de los niveles de expresión presentados por GH e Insulina de manera individual (Pierce *et al.*, 2012). De igual manera, Pierce y colaboradores (2012), reportaron que el mismo tratamiento combinado de GHb e Insulina redujo la expresión de GHRII con respecto al tratamiento únicamente con GH y aumenta la expresión con respecto al tratamiento con Insulina.

El mismo tratamiento con GHb e Insulina, tanto de manera individual como en conjunto, no inhibió ni promovió la expresión de IGFI (Fig. 6C). Para el caso de IGFII, la acción en conjunto de dichas hormonas, mantienen la expresión del gen al mismo nivel del control y de GHb, e Insulina presenta un pico de expresión por encima de los demás tratamientos (Fig. 6D). Sin embargo, de acuerdo a estudios realizados con anterioridad en Tilapia, el mismo tratamiento con GH 5nM promueve una mayor expresión de IGFI respecto al tratamiento control e Insulina ( $10^{-6}$ M), que se expresa por debajo del control, pero en conjunto, GH+Ins mantienen el mismo nivel de expresión que GH de manera individual, por lo que Insulina no presentó efecto sobre la expresión de este gen (Pierce *et al.*, 2011). Sin embargo, en hepatocitos de salmón, la combinación de GH e insulina homologas reduce la expresión relativa de IGFI en comparación al efecto sobre la expresión de dicho gen con GH de manera individual (Pierce *et al.*, 2005), por lo que insulina tiene un efecto negativo sobre la expresión de dicho receptor. Por otro lado, el tratamiento combinado de GH e insulina favoreció el aumento del nivel de expresión de IGFII por encima de los tratamientos individuales y el control, por lo que insulina promueve la traducción y expresión de IGFII en Tilapia (Pierce *et al.*, 2011). El mismo resultado fue obtenido en otro estudio en salmón (Pierce *et al.*, 2010).



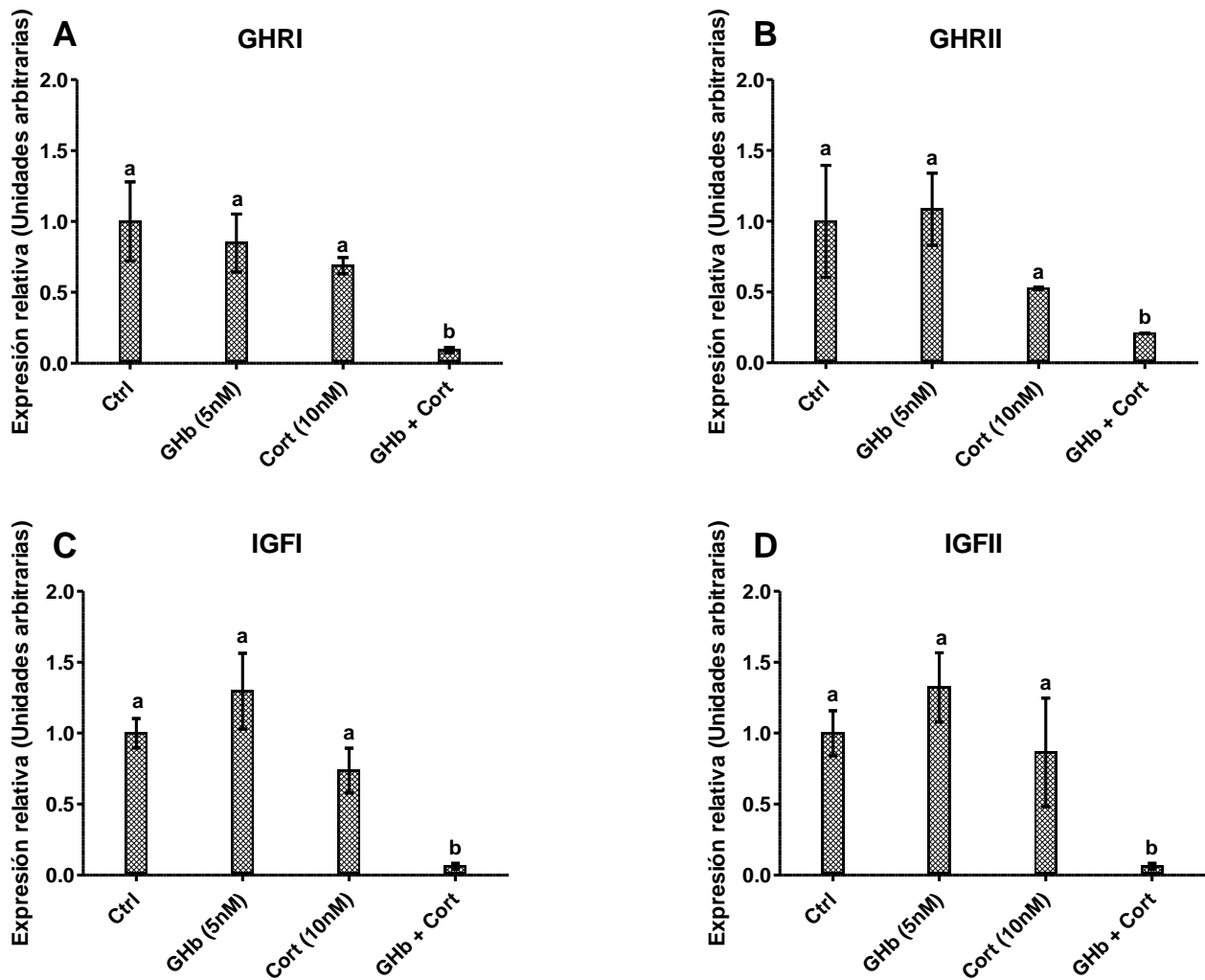
**Figura 6.** Efecto del tratamiento con Insulina ( $10^{-6}M$ ) y GHb (5nM) sobre la expresión de GHR-I (A), GHR-II (B), IGF-I (C) e IGF-II (D) en cultivo in vitro de hepatocitos de Pejerrey. La expresión de los genes se determinó por qPCR. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar.

En hepatocitos de Pejerrey, tanto en el experimento con insulina en concentraciones ascendentes como en el experimento de GHb en combinación con insulina, los niveles de mRNA de GHR II se mantienen siempre al nivel del control. En contraste con estos resultados, en hepatocitos de Salmon, insulina redujo el nivel de ARNm de GHR II (Pierce *et al.*, 2005; Pierce *et al.*, 2006). Además, insulina causa resistencia a GH en hepatocitos de salmón en términos de expresión de IGFI (Pierce *et al.*, 2005). En mamíferos, insulina

incrementa el nivel de ARNm de GHRs y también la respuesta de los hepatocitos a GH (Reindl y Sheridan, 2012). La supresión de ARNm de GHRII en tilapia y salmónidos sugiere que el rol de la insulina en la regulación de la sensibilidad a GH por el hígado difiere entre mamíferos y peces teleósteos.

El tratamiento combinado de GHb y cortisol redujo el nivel de expresión del ARNm para todos los genes de interés analizados en este estudio. En todos los casos, el control, GHb y cortisol de manera individual, se mantienen al mismo nivel de expresión sin diferencias significativas entre sí, por el contrario, el tratamiento de GHb + Cortisol redujo ese nivel de expresión, incluso por debajo del control (Fig. 7). Sin embargo, el mismo tratamiento en Tilapia presentó efectos contrarios a los obtenidos para Pejerrey. Por un lado, para GHRI, el tratamiento con GH se mantiene al nivel del control, mientras que el tratamiento con cortisol aumenta significativamente la expresión de dicho gen, y el tratamiento combinado entre ambas hormonas mantiene el nivel de expresión de ARNm igual que al de cortisol, por lo que se puede decir que cortisol no tiene efecto aditivo a GH sobre la expresión hepática de GHRI (Pierce *et al.*, 2012). Con el mismo tratamiento, Pierce y colaboradores (2012), midieron la expresión de GHRII, e incluso cuando todos los tratamientos estimulan la expresión de GHRII respecto al control, no lograron obtener diferencias significativas entre tratamientos con hormonas individuales y en combinación, por lo que no se pudo evidenciar un efecto aditivo del cortisol sobre GH.

En otro estudio realizado en Tilapia por Pierce y colaboradores (2011), donde emplearon los mismos tratamientos sobre la expresión de IGFs, también obtuvieron resultados diferentes a los obtenidos para Pejerrey. La respuesta de IGFI con cortisol no tuvo diferencias respecto al control mientras que GH generó una mayor expresión relativa de IGFI, sin embargo, el tratamiento en combinación disminuyó la expresión de IGFI con respecto al resultado presentado por GH, pero fue mayor al de cortisol de manera individual. Esto indicaría que cortisol tiene un efecto negativo sobre la expresión de IGFI estimulada por GH, pero no afecta la expresión basal. Por otro lado, para IGFII el resultado fue contrario para el tratamiento en combinación de las dos hormonas, donde cortisol tiene un efecto positivo sobre la expresión del gen cuando es combinado con GH. En este caso, aunque cortisol tampoco tuvo efecto sobre la expresión basal, potenció el efecto de GH.



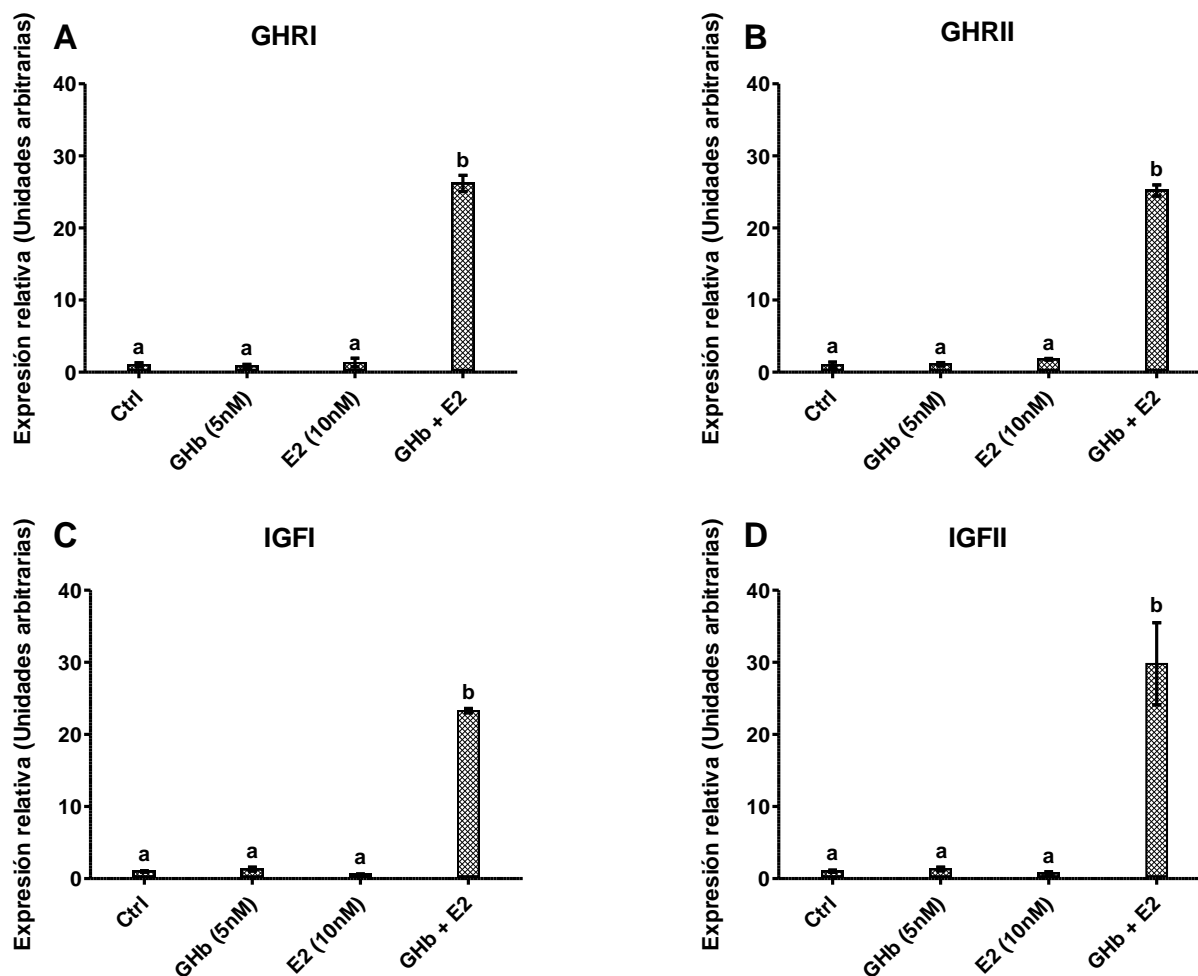
**Figura 7.** Efecto del tratamiento con Cortisol ( $10^{-6}M$ ) y GHb (5nM) sobre la expresión de GHR-I (A), GHR-II (B), IGF-I (C) e IGF-II (D) en cultivo in vitro de hepatocitos de Pejerrey. La expresión de los genes se determinó por qPCR. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con el estudio del cortisol en peces han sido enfocadas a la fisiología del estrés. Durante las últimas décadas, estos estudios se han enfocado en la acuicultura debido al interés de manejar el estrés mientras se maximiza

la producción en ambientes artificiales (Barton, 2002). El estrés es el resultado de varios tipos de factores de carácter químico, físico y/o percibidos por el individuo en el ambiente. Estos factores desencadenan una serie de respuestas, que van desde la *Respuesta primaria*, donde se incrementan los niveles de corticosteroides y catecolaminas, pasando por la *Respuesta secundaria*, en la que se producen cambios metabólicos, celulares, cambios de las funciones inmunológicas y hematológicas, entre otros, y finalmente, con la *Respuesta terciaria*, se generan cambios en el rendimiento de las características de todo el individuo, como en la tasa de crecimiento (Barton, 2002). Esto podría sugerir una razón por la cual, para los resultados de este experimento, la expresión de cada uno de los genes se redujo. Cortisol tiene un efecto negativo sobre los genes del eje GH/IGF en Pejerrey, reduciendo sus niveles de expresión en combinación con GH, de manera que podría inhibir o alterar la actividad de GH. Sin embargo, las diferencias sobre el control que ejerce el cortisol en el eje del crecimiento entre teleósteos pueden indicar una regulación diferencial de los receptores de GH por glucocorticoides. Sin embargo, es probable que, debido a la cantidad de réplicas empleadas en el estudio, sea necesario repetir el experimento de manera que se pueda corroborar si existen o no dichas diferencias tan marcadas entre otros teleósteo y Pejerrey.

Por otro lado, el tratamiento combinando de E2 con GHb arrojó los mismos resultados para cada uno de los genes de interés estudiados. Para cada uno de los genes, los dos tratamientos individuales, GHb y E2, no presentaron diferencias significativas respecto del control o entre sí. Por otro lado, el tratamiento combinado con ambas hormonas resultó en un aumento significativo de la expresión de todos los genes (Fig. 8A-D).





**Figura 8.** Efecto del tratamiento con Estradiol ( $10^{-6}$ M) y GHb (5nM) sobre la expresión de GHR-I (A), GHR-II (B), IGF-I (C) e IGF-II (D) en cultivo in vitro de hepatocitos de Pejerrey. La expresión de los genes se determinó por qPCR. Las letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$  (Test: Student-Newman-Kleus). Los puntos representan la media  $\pm$  el error estándar.

Las alteraciones en la sensibilidad del eje GH-IGF inducidas por esteroides sexuales demostradas en diferentes estudios, pueden jugar importantes roles fisiológicos en la asignación de la energía y la coordinación del crecimiento con procesos metabólicos y reproductivos (Norbeck y Sheridan, 2011; Riley *et al.*, 2004). Antes de la maduración sexual, los individuos experimentan un rápido crecimiento somático, posteriormente, al inicio de la maduración sexual, el crecimiento somático disminuye y un aumento de energía es destinado

al desarrollo gonadal (Mommssen, 2001). Algunos estudios han demostrado que los estrógenos, como es el caso de  $17\beta$ -estradiol puede inhibir la expresión hepática de GHRI y GHRII (Davis *et al.*, 2009) y también la producción hepática de IGFI (Riley *et al.*, 2004) en machos de Tilapia.

Un control negativo ha sido propuesto entre E2 y elementos periféricos del sistema GH/IGF, donde E2 disminuye la sensibilidad a GH, de manera que la producción de IGFs también disminuye (Norbeck y Sheridan, 2011). Este control negativo explicaría porque el crecimiento somático, particularmente en hembras, disminuye durante la maduración sexual (Holloway *et al.*, 1999). Al disminuir la sensibilidad periférica a GH y reduciendo la producción de IGFs, E2 podría atenuar las acciones promotoras del crecimiento de GH y priorizar las acciones metabólicas y reproductivas de GH. Esto podría explicar el aumento de la expresión de los genes del eje GH-IGF durante este estudio, debido a que el individuo utilizado para este estudio fue una hembra madura, donde E2 podría promover la efectividad de GH sobre su eje de acción, pero dirigido hacia la maduración gonadal. Sin embargo, estudios en los que se midan los efectos en conjunto de GH y E2 no han sido realizados en otros teleósteos, por lo que nuevos estudios se deben llevar a cabo para tener un mayor conocimiento sobre la acción de E2 en el crecimiento. De igual manera, es posible que debido el bajo número de réplicas de este estudio haya intervenido en el resultado estadístico de este experimento, por lo que nuevas réplicas del mismo deberían ser realizadas.

De igual manera, se ha observado la influencia de esteroides sexuales sobre la sensibilidad a GH en el organismo, restringiendo la producción de IGFs, lo que tiene implicaciones sobre la disrupción endocrina del crecimiento (Norbeck y Sheridan, 2011). Por ejemplo, la exposición de individuos a estrógenos naturales o sintéticos podría reducir la sensibilidad hacia GH del organismo e inhibir la producción de IGFs, lo que potencialmente podría conducir de un retraso del crecimiento y/o alteraciones en el desarrollo (Holloway *et al.*, 1999; Norbeck y Sheridan, 2011). Un estudio realizado por Hanson y colaboradores (2012) demostró que E2, entre otros esteroides sexuales, retardan el crecimiento de trucha arcoíris. Esto también se ha visto con estrógenos ambientales y xenoestrogenos (Marlatt *et al.*, 2015). Por otro lado, estudios en hepatocitos de ratón mostraron que el tratamiento combinado de GH y estradiol, pero no cada hormona por separado, aumentó la expresión de

GHR (Contreras y Talamantes 1999). En vacas lecheras, los niveles circulantes de GH e IGFI fueron mayores previos a la ovulación (altos niveles de estradiol) que en la fase lútea (bajos niveles de estradiol) (Mense *et al.*, 2015). Sin embargo, no se encontró aumento de expresión de IGFs en el hígado de vacas lecheras en ninguna etapa del ciclo reproductivo (Mense *et al.* 2015). Mientras que, en peces teleósteos, el estradiol reduce la sensibilidad a GH por parte del hígado (resistencia a GH), con lo que se reduce la producción de IGFs hepáticas, en mamíferos, si bien GHR aumenta, no ocurre un aumento simultáneo de IGFs hepáticas, mostrando también que la respuesta hepática a GH está reducida. En ambos casos, el efecto final es el de reducir el componente endocrino del eje de crecimiento en los cuales, tanto GHRs como IGFs, son inhibidos por estradiol. El aumento de la liberación de GH que se observa en peces tratados con estradiol (Canosa *et al.*, 2002; 2007; 2012) simultáneamente a la resistencia hepática a GH, sugieren que GH tendría efectos directos sobre los tejidos periféricos más relacionados con el control de metabolismos que con el crecimiento. En apoyo a esta hipótesis, recientes estudios de Cleveland y Weber (2015) mostraron que 24 horas después de la administración de estradiol a truchas arco iris, disminuye la expresión hepática de GHRII, pero no se modifica la expresión de GHRI, IGFI e IGFI en hígado. Por otro lado, en músculo aumenta la expresión de GHRII, IGFI e IGFI, pero no GHRI. De este modo, es necesario realizar más estudios para determinar si los resultados obtenidos en Pejerrey son compatibles con esta hipótesis o si el Pejerrey presenta una regulación particular del eje de crecimiento por las hormonas sexuales.

Evidencia obtenida durante años, sugiere que no solo GH influye en el crecimiento de los peces modulando los componentes del eje GH-IGF, sino que también los esteroides sexuales juegan un rol importante durante los diferentes procesos fisiológicos como el crecimiento. Si bien se han encontrado diferencias entre los resultados obtenidos en experimentos similares en teleósteos, es importante resaltar que este es un eje dinámico, donde a pesar que sus componentes genéticos, metabólicos y fisiológicos sean conservados entre especies, pueden existir diversos factores que modulen de diferentes maneras su funcionamiento. Por esta razón, es necesario realizar un mayor número de experimentos encaminados a un mejor entendimiento del funcionamiento del eje GH-IGF, en los cuales se tenga en cuenta diversos factores como el sexo de los individuos, el estadio de maduración sexual, tipo de dieta, factores ambientales, entre otros. Como conclusión de este trabajo, cabe

resaltar que la metodología de cultivo de hepatocitos implementada para Pejerrey fue exitosa y respondió a las necesidades del estudio, y finalmente se puede concluir que los niveles de expresión hepáticos de GHRs e IGFs están diferencialmente regulados por GH, insulina y hormonas esteroides en Pejerrey.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42: 517-525p.
2. Beckman, B.R. 2011. Perspectives on concordant and discordant relation between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *General and comparative endocrinology*, 170: 233-252p.
3. Caldach-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D. y Pérez-Sánchez, J. 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comparative biochemistry and physiology Part B*, 136: 1-13p.
4. Canosa, L., Chang, J y Peter, R. 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 151: 1–26p.
5. Canosa, L., Gomez-Requeni, P. y Cerdá-Reverter, J.M. 2013. Integrative cross-talk between food intake and growth function. Chapter 10, 179-239 p. En: Polakof, S. y Moon, T (Eds.) 2013. *Trout: From physiology to conservation*, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 452p.
6. Canosa, L.F., Lin, X., y Peter, R.E. 2002. Regulation of somatostatin gene expression in goldfish brain by sex steroids hormones. *Neuroendocrinology*. 76: 8-17p
7. Chang, JP y Wong, AOL. 2009. Growth Hormone Regulation in Fish: A Multifactorial Model with Hypothalamic, Peripheral and Local Autocrine/Paracrine Signals. p. 151-195. En: Bernier NJ, GVD Kraak, AP Farrel and CJ Brauner (Eds.). *Fish Neuroendocrinology*. Academic Press, London, 529p.
8. Cleveland, B.M. y Weber, G.M. 2015. Effects of sex steroids on expression of genes regulating growth-related mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology.*, 216: 103–115p.
9. Contreras, B., y Talamantes, F. 1999. Growth hormone (GH) and 17beta-estradiol regulation of the expression of mouse GH receptor and GH-binding protein in cultured mouse hepatocytes. *Endocrinology*, 140:4725–4731p.
10. Davis, L.K., Visitacion, N., Riley, L.G., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hirano, T.H. y Grau, E.G. 2009. Effects of o,p'-DDE, heptachlor, and 17β-estradiol on vitellogenin gene expression and the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative biochemistry and physiology, Part C*, 149: 507-514p.
11. Duguay, S.J. y Mommsen, T.P. 1994. Molecular aspects of pancreatic peptides. p. 225-270. En: Sherwood, N.M. y Hew, C.L. (Farrell, A.P. y Randall, D.J (Eds.)). *Fish physiology. Molecular endocrinology of fish, Volume XIII*. Academic Press, London,
12. Frank, S.J. 2002. Receptor dimerization in GH and erythropoietin action-it takes two to tango, but how? *Endocrinology*, 136: 446-452p.

13. Goetz, F.W., Rise, M.L., Rise, M., Goetz, G.W., Binkowski, F. y Shepherd, B.S. 2009. Stimulation of growth and changes in the hepatic transcriptome by 17 $\beta$ -estradiol in the yellow perch (*Perca flavescens*), *Physiological genomics*, 38: 261–280p.
14. Goméz-Requeni, P., Kraemer, M. y Canosa, L. 2012. Regulation of somatic growth and gene expression of the GH-IGF system and PRP-PACAP by dietary lipid level in early juveniles of a teleost fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Journal of comparative physiology*, 175 (1): 517-530p.
15. Grandi, G., Colombo, G y Chicca, M. 2003. Immunocytochemical studies on the pituitary gland of *Anguilla anguilla* L., in relation to early growth stages and diet-induced sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology* 131 (2003) 66–7612.
16. Hanson, A.M., Kittilson, J.D., Martin, L.E. y Sheridan, M.A. 2014. Environmental estrogens inhibit growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by modulating the growth hormone-insuline-like growth factor system. *General and comparative endocrinology*, 196: 130-138p.
17. Hanson, A.M., Kittilson, J.D., McCormick, S.C. y Shwridan, M.A. 2012. Effects of 17 $\beta$ -estradiol, 4-nonylphenol, and  $\beta$ -sitosterol on the growth hormone-insulin-like growth factor system and seawater adaptation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 362-363; 241-247p.
18. Holloway, A.C., Sheridan, M.A., Van Der Kraak, G. y Leatherland, J.F. 1999. Correlations of plasma growth hormone with somatostatin, gonadal steroid hormones and thyroid hormones in rainbow trout during sexual recrudescence, *Comparative biochemistry and physiology Part B*, 123: 251-260p.
19. Ince, B.W. 1983. Pancreatic control of metabolism, p 89-102. En: Rankin, J.C., Pitcher, T.J. y Duggan, R.T (Eds). *Control processes in fish physiology*. Croom Helm Ltd, Australia, 307p.
20. Inoue, K., Iwatani, H. y Takei, Y. 2003. Growth hormone and insulin-like growth factor I of a Euryhaline fish *Cottus kazika*: cDNA cloning and expression after seawater acclimation. *General and Comparative Endocrinology*, 13: 77–84p.
21. Kopchick, J.J. y Andry, J.M. 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Molecular genetics and metabolism*, 71: 293-314p.
22. Leung, L.Y., Kwong, A., Man, A., Woo, N. 2008. Direct actions of cortisol, thyroxine and growth hormone on IGF-I mRNA expression in sea bream hepatocytes. *Comparative biochemistry and physiology*, 151: 705-710p.
23. López, H., Baigún, C., Iwaszkiw, J., Delfino, R. y Padin, O. 2001. La cuenca del salado: Uso y posibilidades de sus recursos pesqueros. Ed. Universidad de La Plata, Argentina, 90p.
24. Marlatt VL, Sun J, Curran CA, Bailey HC, Kennedy CK, Elphick JR, Martyniuk, C. J. (2014). Molecular responses to 17 $\beta$ -estradiol in early life stage salmonids. *General and Comparative Endocrinology*, 203:203-214.
25. Mense K, Meyerholz M, Gil Araujo M, Lietzau M, Knaack H, Wrenzycki C, Hoedemaker, M. and Piechotta M. (2015). The somatotropic axis during the physiological estrus cycle in dairy heifers—Effect on hepatic expression of *GHR* and *SOCS2*. *Journal of Dairy Science* 98: 2409-2418.
26. Mommsen, T.P. y Lazier, C.B. 1986. Stimulation of estrogen receptor accumulation by estradiol in primary cultures of salmon hepatocytes. *Federation of European biochemical societies*, 195: 296-271p.

27. Mommsen, T.P., Moon, T.W. y Walsh, P.J. 1994. Hepatocytes: insulation, maintenance and utilization. En: Hochachka, y Mommsen, T.P (Eds.). Biochemistry and molecular biology of fishes, vol 3.
28. Mommsen, T.P. 2001. Paradigms of growth in fish. Comparative biochemistry and physiology, Part B, 129: 207-219p.
29. Mommsen, T.P. y Moon, T.W. 2001. Hormonal regulation of muscle growth. p. 250-288. En: Johnston, I.A. Muscle development and growth. Academic Press, United States, 325p.
30. Moriyama, S., Yamaguchi, K., Takasawa, T., Chiba, H. y Kawauchi, H. 2008. Identification of two insuline-like growth factor IIs in the Japanese eel, *Anguilla japonica*: Cloning, tissue distribution, and expression after growth hormone treatment and seawater acclimation. Comparative biochemistry and physiology, part B, 149: 47-57p.
31. Norbeck, L.A. y Sheridan, M.A. 2011. An *in vitro* model for evaluating peripheral regulation of growth in fish: Effects of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone on the expression of growth hormone receptors, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor type 1 receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and comparative endocrinology, 173: 270-280p.
32. Peterson, B.C. y Small, B.C. 2005. Effects of exogenous cortisol on the GH/IGF-I/IGFBP network in channel catfish. Domestic animal endocrinology, 28: 391-404p.
33. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research, 29: 2002-2007p.
34. Pierce, A.L., Breves, J.P., Moriyama, S., Hirano, T. y Grau, E.G. 2011. Differential regulation of Igf1 and Igf2 mRNA levels in tilapia hepatocytes: effects of insulin and cortisol on GH sensitivity. Journal of endocrinology, 211: 201-210p.
35. Pierce, A.L., Breves, J.P., Moriyama, S., Uchida, K. y Grau, E.G. 2012. Regulation of growth hormone (GH) receptor (GHR1 and GHR2) mRNA level by GH and metabolic hormones in primary cultured tilapia hepatocytes. General and comparative endocrinology, 179: 22-29p.
36. Pierce, A.L., Dickey, J.T., Felli, L., Swanson, P. y Dickhoff, W.W. 2010. Metabolic hormones regulate basal and growth hormone-dependent *igf2* mRNA level in primary cultured coho salmon hepatocytes: effects of insulin, glucagon, dexamethasone, and triiodothyronine. Journal of endocrinology, 204: 331-339p.
37. Pierce, A.L., Dickey, J.T., Larsen, D.A., Fukada, H., Swanson, P. y Dickhoff, W.W. 2004. A quantitative real-time RT-PCR assay for salmon IGF-1 mRNA, and its application in the study of GH regulation of IGF-1 gene expression in primary culture of salmon hepatocytes. General and comparative endocrinology, 135: 401-411p
38. Pierce, A.L., Fox, B.K., Davis, L.K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T. y Grau, E.G. 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. General and comparative endocrinology, 154: 31-40p.
39. Pierce, A.L., Fukada, H. y Dickhoff, W.W. 2005. Metabolic hormones modulate the effect of growth hormone (GH) on insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA level in primary culture of salmon hepatocytes. Journal of endocrinology, 184: 341-349p.
40. Pierce, A.L., Shimizu, M., Felli, L., Swanson, P. y Dickhoff, W.W. 2006. Metabolic hormones regulate insulin-like growth factor binding protein-1 mRNA levels in primary cultured salmon hepatocytes; lack of inhibition by insulin. Journal of endocrinology, 191: 379-386p.

41. Ram, P.A. y Waxman, D.J. 2000. Role of the cytokine-inducible SH2 protein CIS in desensitization of STAT5b signaling by continuous growth hormone. *Journal of biological chemistry*, 275: 39487–39496p.
42. Raven, P.A., Sakhrani, D., Beckman, B., Neregard, L., Sundström, L.F., Björnsson, B.Th. y Devlin, R.H. 2012. Growth and endocrine effects of recombinant bovine growth hormone treatment in non-transgenic and growth hormone transgenic coho salmon. *General and comparative endocrinology*, 177: 143-152p.
43. Reindl, K. y Sheridan, M. 2012. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology*, 163: 231-245p.
44. Reinecke, M. 2010. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. *Journal of fish biology*, 76: 1233-1254p.
45. Riley, L.G., Hirano, T. y Grau, E.G. 2004. Estradiol-17 $\beta$  and dihydrotestosterone differentially regulate vitellogenin and insulin-like growth factor-I production in primary hepatocytes of *Tilapia Oreochromis mossambicus*. *Comparative biochemistry and physiology, Part C*, 138: 177-186p.
46. Riley, L.G., Walker, A.P., Dorough, C.P., Schwandt, S.E. y Grau, E.G. 2009. Glucose regulates ghrelin, neuropeptide Y, and the GH/IGF-I axis in the *Tilapia, Oreochromis mossambicus*. *Comparative biochemistry and physiology, Part A*, 154: 541-546p.
47. Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. y Pérez-Sánchez, J. 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and comparative endocrinology*, 142: 193-203p.
48. Sakamoto, T y McCormick, S. 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147: 24–30p.
49. Sambrook y Russell. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
50. Sciara, A., Somoza, G.M. y Arranz, S. 2008. Insulin-like growth factor-I of Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*: cDNA characterization, tissue distribution and expression profiles after growth hormone administration. *Journal of experimental zoology*, 309A: 407-418p.
51. Segner, H. 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative biochemistry and physiology Part A*, 120: 71-81p.
52. Small, B.C., Murdock, C.A., Waldbieser, G.C. y Peterson, B.C. 2006. Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. *Domestic animal endocrinology*, 31: 340-356p.
53. Somoza, G., Miranda, L., Berasain, G., Colautti, D., Lenicov, M. y Strüssmann, C. 2008. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America, *Aquaculture Research*, 39: 784-793p.
54. Wong, A., Zhou, H., Jiang, y Ko, W. 2006. Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 144 (2006) 284 – 305.
55. Zhu, T., Goh, E.L.K., Graichen, R., Ling, L. y Lobie, P.E. 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cellular signalling*, 13: 599-616p.