

Tesis Doctoral

Respuesta del eje hormona de crecimiento (GH)/factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) a alteraciones en la ingesta en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*

Delgadin, Tomás Horacio

2016-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Delgadin, Tomás Horacio. (2016-03-30). Respuesta del eje hormona de crecimiento (GH)/factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) a alteraciones en la ingesta en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Delgadin, Tomás Horacio. "Respuesta del eje hormona de crecimiento (GH)/factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) a alteraciones en la ingesta en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-30.



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Respuesta del eje hormona de crecimiento (GH)/factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) a alteraciones en la ingesta en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Tomás Horacio Delgadin

Director de Tesis: Dra. Paula Gabriela Vissio

Dra. Silvia Eda Arranz

Consejero de Estudios: Dr. Matías Pandolfi

Lugar de Trabajo: Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. , Argentina.

Buenos Aires, 30/03/2016

Respuesta del eje hormona de crecimiento (GH)/factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) a alteraciones en la ingesta en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*.

El eje hormona de crecimiento (GH)/ factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) es clave en la regulación del crecimiento somático en los vertebrados. Existen dos tipos de receptores para GH (GHR1 y GHR2), aunque actualmente no hay consenso sobre su especificidad. *Cichlasoma dimerus* es un pez cíclido social capaz de crecer a una tasa elevada en condiciones de laboratorio, pero la regulación de su crecimiento aún no ha sido estudiada. Esta Tesis se propone evaluar el crecimiento somático y su relación con el eje GH/IGF-1 bajo condiciones de ayuno y realimentación. Para ello en una primera etapa se caracterizó a GHR2, ya que en esta especie no estaba descrito. Se obtuvo una secuencia parcial que incluye parte de la región extracelular, el dominio transmembrana y parte de la región intracelular. Cuatro semanas de ayuno resultaron en un arresto del crecimiento somático, un incremento de la expresión de GHR2 en hígado y músculo y una disminución de IGF-1 muscular, sin variaciones en GHR1 ni en IGF-2 en ambos tejidos. Tres semanas de realimentación restituyeron completamente el estado nutricional y condujeron a un estado de “crecimiento acelerado” asociado a un incremento en la eficiencia de conversión alimentaria (FCE) sin observarse hiperfagia. Además, se restablecieron los niveles de expresión de GHR2 e IGF-1 a valores controles. Interesantemente la expresión de GH se incrementó a los 3 días de realimentación. Estos resultados muestran que no sólo hay una recuperación rápida del estado nutricional debido a la realimentación tras el ayuno prolongado, sino que se verifica una fase de crecimiento compensatorio asociado a cambios en el eje GH/IGF-1. Estos resultados nos permiten tener un conocimiento a nivel molecular de los cambios asociados al ayuno-realimentación que puede tener implicancias al momento de diseñar estrategias de crecimiento en acuicultura.

Palabras clave: Crecimiento, Hormona de Crecimiento, Factor de Crecimiento Tipo Insulina 1 y 2, Teleósteos, Crecimiento Compensatorio, GHR1, GHR2

Response of growth hormone (GH)/ insulin like growth factor I (IGF-I) axis to alterations in feed intake of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*

Growth hormone (GH)/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) axis is the key regulator of somatic growth in vertebrates. Two types of growth hormone receptors have been described in teleost fish (GHR1 and GHR2) although its specificity is under debate. *Cichlasoma dimerus* is a social cichlid fish capable of growing at high rates under laboratory conditions, but knowledge on somatic growth regulation is still unclear. The aim of this study was to evaluate the somatic growth and changes in the GH/IGF-I axis after 4 weeks of food deprivation and refeeding in *C. dimerus*. As a first step, we obtained a partial sequence of GHR2, consisting of a fragment of the extracellular domain, the transmembrane domain and a region of the intracellular domain. Fasting impaired body growth and increased liver and muscle GHR2 expression along with a reduction in muscle IGF-1 mRNA levels. Additionally, no changes were observed in liver IGF-1, muscle and liver GHR1 and IGF-2 expression. Three weeks of refeeding completely restored nutritional status of fish and led to a fast growing period during the first week associated with higher feed conversion efficiency values but surprisingly, with no hyperphagia. In addition, expression of GHR2 and IGF-1 was recovered to control levels after three days of refeeding. Interestingly, GH mRNA levels were increased at day 3 of refeeding. These results not only show a complete recovery of nutritional status of fish with refeeding but also demonstrate a compensatory growth period associated with alterations on the GH/IGF-1 axis. Taken together, these results allow us to get knowledge on molecular aspects related to fasting-refeeding in fish that may have implications on feeding manipulation in aquaculture.

Keywords: Growth, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor 1 and 2, Teleost, Compensatory Growth, GHR1, GHR2

Agradecimientos

Agradecer a todas las personas que de algún modo u otro hicieron esto posible.

A mi país, Argentina, por haberme brindado el acceso a las instituciones públicas que solventaron mi formación desde hace ya 12 años.

A mi Directora de Tesis, Paula Vissio. Por la oportunidad que me dio para unirme a su grupo de investigación y por la confianza que depositó en mí en todo momento. Por haberme enseñado los criterios del quehacer científico. Por estar siempre atenta a mi formación y dispuesta a los planteos y discusión de resultados, experimentos, proyectos, por ser una excelente guía, en fin... Por su valentía y coraje, por ser una excelente persona.

A mi Directora de Tesis, Silvia Arranz. Por haberme abierto las puertas de su laboratorio en donde pude desarrollar parte de mi formación como doctorando. Por las fructíferas discusiones de resultados y nuevos planteamientos. Por ser una muy buena persona, muy amable, por hacer muy amena mi estadía en Rosario.

A mis compañeros de laboratorio, por todos los momentos compartidos, refugio común de logros y de frustraciones, por ese lenguaje común difícil de definir pero que se encuentra entre gráficos y rumores, técnicas y cotidianidad, proyecciones y música, la más fría estadística y anécdotas, publicaciones y familia, entre congresos y logros personales, entre momentos difíciles y cursos.

En definitiva, a Tincho, Dani, Pauli, Leo, Vir y Agus, compañeros de fierro en todos estos años. A todos los chicos que se fueron sumando a los laboratorios: Pao, Lau, Florencia, Marilú, Nacho, Juli, Andrés, Luciano, Paula, por la buena onda.

A los integrantes de los laboratorios de Ecotoxicología Acuática, en especial a Fabi por la buena predisposición a solucionar temas que no siempre todos ven.

A los chicos del laboratorio de Rosario, en particular a Pablo Botta por haberme enseñado desinteresadamente técnicas de laboratorio durante los primeros años; y a Nacho, por la gran ayuda brindada tanto dentro como fuera del laboratorio cada vez que fui a Rosario, haciendo cada estadía muy confortable.

A mis viejos, que siempre me brindaron ese apoyo incondicional sobre el cual se erigió mi formación académica y humana.

A mi hermano, aunque estemos geográficamente lejos, siempre vamos a estar unidos.

Agradecimientos

A mis compañeros de ensayos, por el aguante y por hacer lo que más nos gusta, por hacer música.

A mi compañera de ruta, Brenda, por hacer de grises más colorido este viaje.

A mis abuelos

-Índice-

¿Qué es el crecimiento?.....	1
Hormona de crecimiento	3
Receptor para la hormona de crecimiento	4
GHR en peces	7
Dos tipos de GHR en peces: GHR1 y GHR2.....	9
GHRs en <i>C. dimerus</i>	12
Isoformas del receptor	13
Factor de crecimiento tipo insulina 1.....	15
Estructura	16
Efectos biológicos de IGF-1	17
Receptores de IGFs.....	18
IGFBPs: proteínas de unión a IGFs	18
IGFs en peces.....	19
Crecimiento compensatorio.....	21
El hígado en peces.....	23
Modelo biológico	26
-Hipótesis y Objetivos-	30
Objetivo general.....	30
1) Restricción alimentaria	30
2) Realimentación	30
3) Secuenciar GHR2 y determinar su distribución	31
-Materiales y Métodos-.....	32
Animales.....	32
Secuenciación del receptor de la hormona de crecimiento e IGF-2.....	32
Extracción de ARN, síntesis del ADN copia y amplificación mediante PCR.....	32
Análisis de distribución de los receptores de GH (GHR1 y GHR2) y de IGF-1	35
Diseño experimental	35
Diseño y construcción del sistema de peceras cerrado y de flujo continuo.....	36
Diseño experimental: restricción alimentaria y realimentación.....	40

Análisis de la expresión génica de GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2.....	43
Preparación de las muestras: extracción de ARN y síntesis de ADN copia	43
PCR en tiempo real.....	44
Histología hepática.....	46
Parámetros de crecimiento.....	47
Análisis estadístico	47
Análisis general.....	47
Análisis de los datos obtenidos por PCR en tiempo real.....	48
-Resultados-.....	49
Secuenciación de GHR2.....	49
Análisis de distribución de GHR1, GHR2 e IGF-1.....	51
Restricción alimentaria: 4 semanas	52
Histología hepática y parámetros de crecimiento	52
Expresión de GH, GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2	57
Realimentación.....	61
Histología hepática y parámetros de crecimiento	61
Expresión de GH, GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2 durante la realimentación a 3 días y 3 semanas	69
-Discusión-.....	74
Impacto del ayuno prolongado sobre el crecimiento somático	74
Impacto del ayuno sobre el sistema GH/IGF-1	75
Impacto de la realimentación sobre el crecimiento somático.....	79
Impacto de la realimentación sobre el sistema GH/IGF-1	85
Sobre GHR2	89
-Conclusiones-	91
Conclusión general	92
-Bibliografía-	93

-Introducción-

¿Qué es el crecimiento?

El crecimiento en los organismos vivos puede ser definido como el cambio en el tamaño corporal que ocurre en un cierto período de tiempo (Beckman, 2011), el cual resultará además en un cambio en la masa corporal del mismo. Así, tamaño y masa corporal están relacionados y en peces teleósteos esta relación suele ser descripta mediante la siguiente ecuación (Bagenal & Tesch, 1978):

$$\text{peso(g)} = \text{CF(g/cm}^3\text{)} * \text{largo(cm)}^3$$

donde CF (*condition factor*, por sus siglas en inglés) es también denominado índice de Fulton o simplemente factor de condición y se define como la relación entre el peso y el largo al cubo. Esta expresión puede estar dada en forma de porcentaje (%) o por mil (‰). De esta manera el CF hace referencia a la forma del organismo, donde valores altos del mismo se pueden interpretar, en un sentido coloquial, como un pez más “gordo” y valores bajos como un pez más “delgado”. Se puede advertir que un incremento en peso no necesariamente implica un incremento en el largo del animal. Este caso puede darse en eventos de engorde, aumento del tamaño de las vísceras como por ejemplo el hígado o las gónadas en época reproductiva, la masa muscular o el tejido adiposo. Por otra parte, el incremento en el largo del pez no siempre implica un aumento de peso porque es posible una disminución en el valor del CF en simultáneo. Así, en esencia, el crecimiento longitudinal y el crecimiento en peso pueden ser considerados dos procesos diferentes (Beckman, 2011) y ambos eventos deben ser tenidos en cuenta en los estudios de crecimiento (Ali y col., 2003; Beckman, 2011).

El patrón de crecimiento en los peces teleósteos puede ser considerado básicamente diferente al que presentan otros vertebrados tales como los mamíferos y las aves. Éstos

últimos muestran una tasa de crecimiento y tamaño en la adultez que son característicos en cada especie y que usualmente coincide con la madurez sexual (Asdell, 1946; Talbot, 1993). En tanto, el crecimiento somático en los peces es un fenómeno plástico, ya que es afectado por una multiplicidad de factores del medio ambiente como por ejemplo la temperatura y la disponibilidad de alimento (Talbot, 1993). La mayoría de los peces presenta lo que se denomina crecimiento indeterminado, por cuanto no es posible determinar un tamaño máximo característico para una especie en particular y donde el crecimiento continua durante lo que dura la vida del organismo. Sin embargo, la intensidad a la cual crecen disminuye con la edad. Se han propuesto varios modelos matemáticos para evaluar el crecimiento, uno de los cuales es la tasa específica de crecimiento (SGR de *specific growth rate*, por sus siglas en inglés), el cual supone crecimiento exponencial entre dos puntos que delimitan un intervalo temporal dado (en días) y es:

$$\text{SGR}(\text{peso}) = \text{Ln}(\text{peso final}/\text{peso inicial})/\text{tiempo}$$

$$\text{SGR}(\text{largo}) = \text{Ln}(\text{largo final}/\text{largo inicial})/\text{tiempo}$$

Este modelo es el más ampliamente utilizado en la literatura de acuicultura y fisiología de peces (Talbot, 1993), aunque también hay modelos más generales derivados de otros supuestos teóricos tales como el modelo de crecimiento de von Bertalanffy u otros que contemplan distintas funciones polinómicas (Chen y col., 1992). Jobling (1993) postuló un decrecimiento del SGR con el tamaño corporal en varias especies de peces según una relación alométrica dada por:

$$\text{SGR} = a * \text{peso}^b$$

Donde **b** para varias especies de salmónidos es -0.35 y **a** es la tasa de crecimiento para un pez de 1g de peso corporal (Jobling, 1993).

Hormona de crecimiento

En vertebrados, la hormona de crecimiento (GH) es la principal hormona involucrada en el crecimiento somático y la diferenciación (Chang y Wong, 2009; Fox y col., 2006; Reinecke y col., 2005). Se sintetiza principalmente en los somatotrópos que se encuentran bordeando la neurohipófisis a nivel de la *pars distalis* proximal (PDP) de la adenohipófisis (Kawauchi & Sower, 2006; Bernier y col, 2009; Pandolfi y col., 2009). Su expresión no sólo se restringe a los somatotropos, sino que también hay varios tejidos extra hipofisarios en los que se detectó su expresión, como por ejemplo en el cerebro, células del sistema inmune y gónadas, lo cual sugiere una acción autocrina/paracrina en dichos sitios (Biga y col., 2004; Li y col., 2005; Sciara y col., 2006; Canosa y col., 2007). En peces, GH no sólo está involucrada en el crecimiento somático, sino que además se relaciona con una multiplicidad de funciones biológicas como el metabolismo energético (Albalat y col., 2005; Leung & Woo, 2010; Mommsen, 2001), la reproducción (Gomez y col., 1998), la alimentación (Johansson y col., 2005), la osmoregulación (Mancera y col., 2002; Sakamoto & McCormick, 2006), el comportamiento (Jönsson y col., 2003) y funciones inmunológicas (Shved y col., 2011). Por este motivo GH es considerada una hormona pleiotrópica o pluripotente (Chang y Wong, 2009; Reinecke y col., 2005).

GH es una hormona polipeptídica simple cadena de entre 21-23 kDa en peces teleósteos y al igual que en tetrápodos, posee 2 puentes disulfuro intramoleculares altamente conservados, que son importantes para su actividad biológica, y un sitio de N-glicosilación (Cavari y col, 1994; Martínez-Barberá y col., 1994; Kopchick & Chen, 1999). La estructura génica de GH en peces es variable, presentado en algunos grupos 5 exones y 4 intrones, tal como en tetrápodos, o 6 exones y 5 intrones, donde se estima que los exones 5 y 6 son producto de la inserción de un intrón en el último exón (Chang y Wong, 2009). GH pertenece a una familia de péptidos estructural y evolutivamente relacionados, de la cual también forman parte otras hormonas hipofisarias como prolactina (PRL) y somatolactina (SL), esta última exclusiva de peces y ausente en tetrápodos, y otras extrahipofisarias como el lactógeno placentario (PL) y otras citoquinas (Forsyth & Wallis, 2002; Kawauchi &

Sower, 2006; Chang y Wong, 2009). GH en *C. dimerus*, de 25,5kDa ha sido caracterizada por Pérez Sirkin y col. (2012). El péptido consta de 204 aminoácidos con 4 residuos de cisteína y un probable sitio de glicosilación en posición N-terminal.

La secreción de GH por parte de los somatotropos se encuentra regulada por varios factores hipotalámicos. En mamíferos, esta regulación está dada principalmente, aunque no exclusivamente, por el factor inhibitorio somatostatina (SS-14), y por el estimulatorio GHRH (de *growth hormone releasing hormone*, por sus siglas en inglés), en lo que se denomina clásicamente como el ejemplo paradigmático de un sistema de “control dual” de la secreción de hormonas hipofisarias (Gahete y col, 2009). Este tipo de regulación resulta en un patrón de secreción pulsátil de GH, que al igual que en mamíferos, ha sido documentado en peces (Chang & Wong, 2009; Gahete y col, 2009). Por otra parte, la regulación de la secreción de GH en peces ha demostrado ser más compleja que en mamíferos, pues es multifactorial (Rousseau & Dufour, 2004). En este grupo, la secreción de GH está bajo inhibición tónica dada por SS-14, y el principal factor estimulante sería PACAP (de *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*, por sus siglas en inglés) y no GHRH. Además, toman relevancia otros factores estimulatorios tales como el factor liberador de gonadotrofinas (GnRH, por sus siglas en inglés), el factor liberador de tirotrófina (TRH, por sus siglas en inglés), el neuropéptido Y (NPY), la hormona liberadora de corticotrofina (CRH, por sus siglas en inglés), dopamina y colecistoquinina (CCK), entre otros (Canosa y col. 2007; Gahete y col, 2009; Chang & Wong, 2009).

Receptor para la hormona de crecimiento

Los receptores tipo citoquina clase 1 son receptores involucrados en una multiplicidad de procesos fisiológicos como son el crecimiento postnatal, la eritropoyesis, mielopoyesis, lactación y metabolismo (Brooks y col., 2014). El receptor de la hormona de crecimiento, GHR (*growth hormone receptor*, por sus siglas en inglés), pertenece a este grupo junto con otros receptores tales como los de PRL, eritropoyetina y leptina (Bazan, 1990). Son

receptores de un paso de membrana, con una región extracelular ECD (*extra cellular domain*, por sus siglas en inglés) de unión al ligando en el extremo N-terminal, una región transmembrana TMD (*trans membrane domain*, por sus siglas en inglés) y una región intracelular ICD (*intra cellular domain*, por sus siglas en inglés) de longitud variable hacia el extremo C-terminal (Bazan, 1990; Cunningham y col., 1991; de Vos y col., 1992; Moutoussamy y col., 1998). Esta clase de receptores además, se caracterizan por presentar en el ECD 2 dominios tipo fibronectina III de aproximadamente 100 aminoácidos, formados por 7 hebras β que conforman una lámina β en forma de barril, 4 cisteínas conservadas y un motivo WSXWS (triptófano-serina-cualquier aminoácido-triptofano-serina) cercano a la membrana plasmática (Bazan, 1990; de Vos y col., 1992; Moutoussamy y col., 1998). El TMD forma una estructura de α -hélice de entre 22 a 28 aminoácidos, seguido por el ICD que contiene dos regiones bien conservadas a través de los distintos tipos de receptores y especies: un motivo rico en prolina denominado Box 1, que se ubica cercano a la membrana plasmática y otro más hacia el extremo C-terminal llamado Box2 (Bazan, 1990; Moutoussamy y col., 1998). Estos motivos están involucrados en la transducción de señales luego de la activación del receptor tras la unión del ligando (Brooks y col., 2008, 2014; Deng y col., 2012). Además, el ICD presenta una serie de residuos tirosina luego de la Box 2, que son susceptibles a fosforilación por tirosin-kinasas (Carter-Su y col., 1996).

GHR está asociado a la vía de señalización intracelular JAK2 (*janus kinasa 2*)/STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*, por sus siglas en inglés) (Argetsinger y col. 1993; Carter-Su y col., 1989, 1996). La activación del GHR por la unión de GH al ECD conduce a la activación de la tirosin kinasa JAK2 que posteriormente fosforila y activa al factor de transcripción STAT5, el cual se transloca al núcleo y se une al ADN en sitios específicos alterando la expresión de genes *target*, como por ejemplo el gen de IGF-1. El mecanismo de acción de GHR ha sido estudiado ampliamente en mamíferos (Carter-Su y col., 1996; Deng y col., 2012; Brooks y col., 2008, 2014). GHR en ausencia de GH está presente en la membrana plasmática como homodímero. La unión de GH a uno de los receptores facilita la interacción de la hormona con el otro receptor del homodímero,

dando así una relación estequiométrica 1:2 GH/GHR (de Vos y col., 1992). Esta unión resulta en un cambio conformacional y en la rotación relativa de cada cadena del dímero que deriva en una separación de sus dominios intracelulares, alejando espacialmente a los Box1 de cada receptor del homodímero. Este desplazamiento conduce a la activación por fosforilación de JAK2 que a su vez fosforila los residuos tirosina del ICD. STAT5 mediante el dominio SH2 (*Src homology 2*, por sus siglas en inglés) reconoce e interacciona con estos sitios y resulta fosforilado entonces por JAK2. Es importante destacar que la tirosin kinasa JAK2 está constitutivamente asociada al Box1 pero inactiva. Su sitio catalítico está inhibido por el dominio pseudoquinasa del JAK2 asociado al Box1 del otro receptor del homodímero. La activación del receptor por GH conlleva la separación de los Box1, desplazando al dominio pseudoquinasa del sitio activo de JAK2, lo cual resulta en la fosforilación mutua de las tirosin kinasas JAK2 (Brooks y col., 2014).

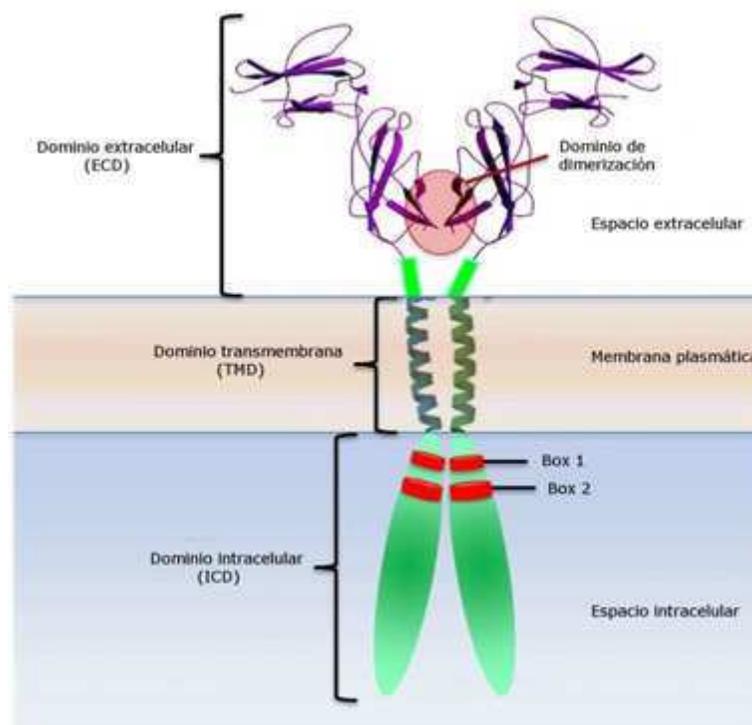


Figura 1: Esquema del receptor para GH. El receptor funcional es un homodímero compuesto dos por cadenas polipeptídicas idénticas de un paso de membrana. En la región extracelular se observa el dominio tipo fibronectina III (en violeta) y la región de dimerización. Obsérvese la configuración en α -hélice del TMD. En el ICD se ubican los motivos Box 1 y Box2, representados en rojo, cerca de la membrana plasmática. Adaptado de Brooks y col. (2014).

GHR en peces

El receptor para la hormona de crecimiento en peces fue identificado por primera vez en *Scophthalmus maximus* (Pleuronectiformes) (Calduch-Giner y col., 2001) y en *Carassius auratus* (Cypriniformes) (Lee y col., 2001) a partir de la secuenciación del ADN copia (cDNA) mediante la transcripción reversa del ARN mensajero (ARNm) y posterior reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Las secuencias aminoacídicas inferidas a partir del cDNA mostraron que el receptor obtenido tenía las características típicas de los receptores tipo citoquina de clase 1, es decir, un ECD de unión al ligando con dos dominios tipo fibronectina III y un número conservado de cisteínas, una región hidrofóbica transmembrana y un ICD con los motivos Box1 y Box 2 y hasta 9 residuos tirosina. Además, la comparación con los GHRs de mamíferos y aves dieron cuenta de una similitud de entre 32 al 40%. A pesar de la baja similitud en la secuencia, ciertas regiones se mostraron muy conservadas: el motivo FGEFS en el ECD (que en los receptores para GH reemplaza al motivo WSXWS encontrado en los otros receptores de la familia), que es idéntico al presente en aves y *Xenopus laevis*, pero distinto al de mamíferos que es YGEFS; un total de 7 residuos cisteína en el ECD, 6 de los cuales están involucrados en puentes disulfuro y son importantes en el reconocimiento del ligando y 9 residuos tirosina en el ICD. Una característica distintiva, por otra parte, es la ubicación de uno de los 7 residuos tirosina en el ECD: en aves y mamíferos este residuo se localiza hacia el extremo C-terminal del ECD, cercano a la membrana plasmática y posterior al motivo YGEFS y es importante en la dimerización del receptor; sin embargo, en las secuencias obtenidas en peces, esta cisteína se localiza antes de motivo FGEFS, a unos 30 aminoácidos de la membrana plasmática. La conservación de los motivos Box1 y Box2, junto a los residuos tirosina en el ICD, sugieren que los mecanismos de transducción de señales están muy conservados en los vertebrados (Calduch-Giner y col., 2001; Lee y col., 2001).

Si bien la caracterización de GHR en peces por comparación de la secuencia con la mamíferos y aves mostraron un alto grado de conservación de motivos clave para el reconocimiento del ligando, dimerización y transducción de señales, Lee y col. (2001)

realizaron ensayos para determinar si el receptor caracterizado en *C. auratus* respondía a GH humana (hGH). En una primera instancia los ensayos en células transfectadas CHO-K1 expresando el receptor dieron cuenta de una curva dosis-respuesta en forma de campana asimétrica, concordante con el modelo de dimerización del receptor y un solo ligando, mientras que PRL no pudo evocar esta respuesta. Luego, mediante ensayos de genes reporteros en células CHO-K1 se demostró que hGH producía un aumento en la expresión del gen reportero bajo el promotor Spi2.1 (*serin protein inhibitor* 2.1, por sus siglas en inglés), que se sabe contiene elementos en *cis* que unen STAT5. A partir de estos resultados, Lee y col. (2001) concluyeron que el receptor clonado y secuenciado de *C. auratus* era el receptor para la hormona de crecimiento. Tse y col. (2003) obtuvieron resultados similares en *Acanthopagrus schlegeli* (Perciformes) pero esta vez con GH específico.

Estudios posteriores caracterizaron GHR en varias especies de peces teleósteos (Ozaki y col., 2002; Calduch-Giner y col. 2003; Tse y col., 2003; Fukada y col., 2004; Kajimura y col., 2004; Nakao y col., 2004), obteniendo resultados muy similares en cuanto a la estructura y secuencia, en los que se destacan siete residuos cisteína en el ECD, tres involucrados en uniones disulfuro intracatenario y uno en la dimerización del receptor rio arriba del motivo FGEFS; y 9 residuos tirosina en el ICD. La estructura génica de GHR fue caracterizada por primera en peces teleósteos en base a la secuencia de un Pleunectiforme *S. maximus* y un Perciforme *Sparus aurata*, mostrando una estructura muy similar entre ellos (Pérez-Sánchez y col., 2002) y dieron cuenta de un intrón único de peces entre los exones 10/10A, el cual en algunas especies se conserva en el transcripto maduro sin cambiar el marco de lectura y da lugar a un GHR de mayor longitud (Tse y col., 2003). Por otra parte, Nakao y col. (2004), a partir de la secuencia del cDNA y génica de GHR de otro Pleunectiforme *Paralichthys olivaceus*, mostraron que el gen de GHR está conformado por 10 exones. De acuerdo a su nomenclatura, el exón 1 contiene a la región 5'-UTR; los exones 2, 3, 4, 5 y 6 el ECD; el exón 7 el TMD y los exones 8 a 10 el ICD más el 3'-UTR. Es importante notar que en el GHR humano el TMD es codificado por el exón 8 y el Box 1 por el exón 9, mientras que en *P. olivaceus* el TMD está codificado por el exón 7 y el

Box 1 por el exón 8. De todos modos, en *P. olivaceus* también se encuentra el intrón 10/10A, aunque los autores denominan 9 y 10 a los exones flanqueantes a dicho intrón.

Dos tipos de GHR en peces: GHR1 y GHR2

Discrepancia entre las secuencias de GHR de peces

Al haberse obtenido la secuencia de GHR en un número cada vez mayor de especies de peces teleósteos, se hizo evidente la aparición de diferencias características entre las mismas. Por un lado, el grupo de GHR de peces no salmónidos con las características previamente descritas: 7 residuos cisteínas en el ECD y 9 residuos tirosina conservados en el ICD; por otro, las secuencias obtenidas en el grupo de los salmónidos, que si bien no habían sido publicas hasta el momento, sí habían sido cargadas en base de datos públicas (GENBANK). Éste último grupo mostraba en el ECD sólo cinco residuos cisteína y 6 residuos tirosina en el ICD en posiciones conservadas. De allí que algunos autores hayan explicado esta diferencia postulando la presencia de dos linajes diferenciados de GHR, uno característico de salmónidos y otro característico de no salmónidos, cada grupo expresando sólo uno de los dos tipos de receptores (Tse y col., 2003; Jiao y col., 2006). Además, y mediante ensayos de *binding* por afinidad y competencia, Fukada y col. (2004) demostraron por primera en un salmónido, *Oncorhynchus masou* (Salmoniformes), que GHR unía específicamente GH pero no PRL ni SL. De modo que se postuló a GHR de salmónidos también como un auténtico receptor para GH. De manera interesante, los mismos autores al momento de clonar y secuenciar GHR obtuvieron otra secuencia relacionada (Fukada y col., 2005). Sorprendentemente, la misma conservaba las características de los GHR de los no salmónidos. Al realizar los ensayos de *binding* de afinidad y competencia estos autores llegaron a la conclusión de que este GHR era en realidad el receptor para la hormona SL, denominándolo SLR (Fukada y col., 2005).

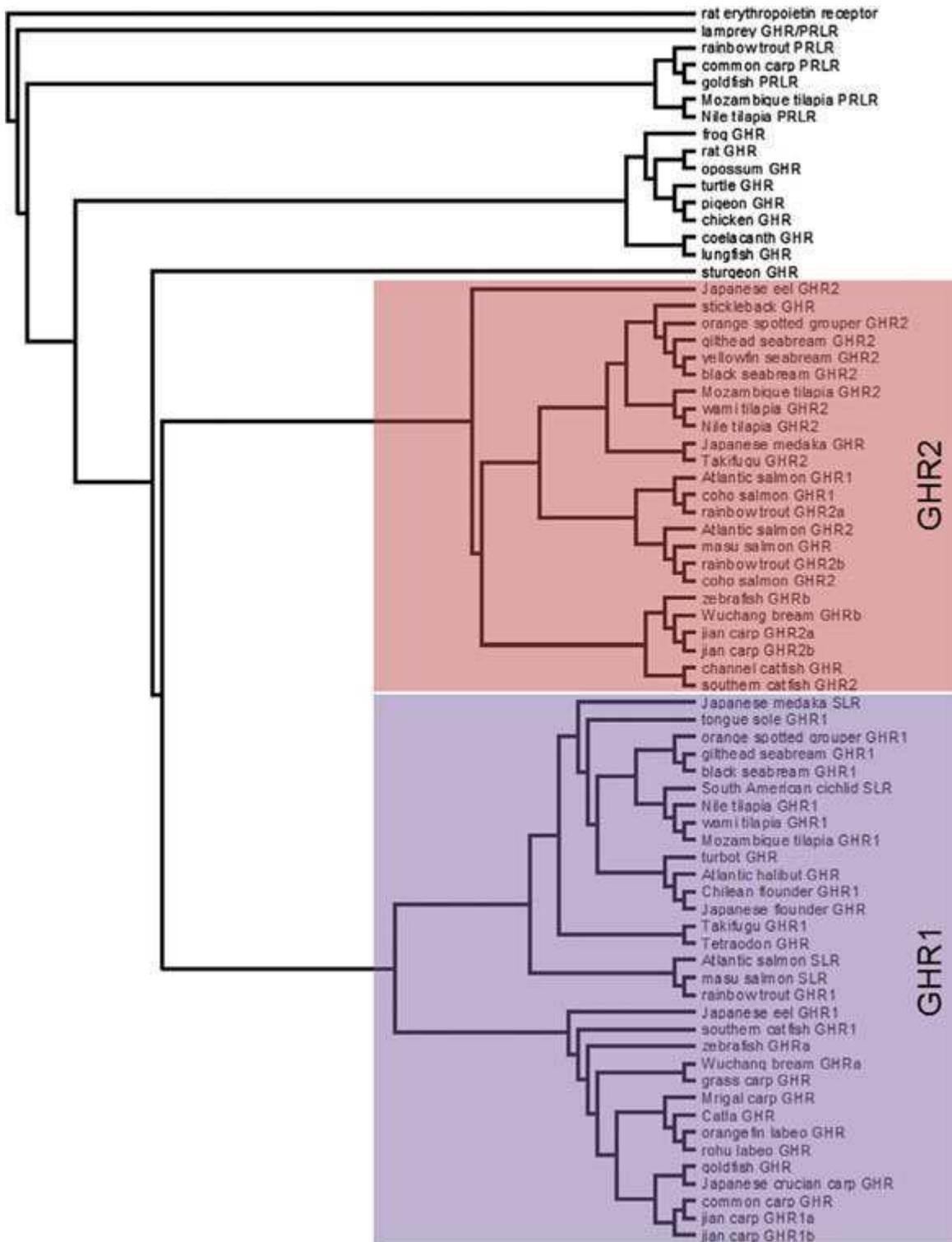


Figura 2: Árbol filogenético de las secuencias de los receptores para la hormona de crecimiento de peces teleósteos y otros vertebrados. En púrpura se muestran agrupadas las secuencias de GHR2 y en violeta las de GHR1. Extraído de Ellens y col. (2013)

Coexistencia de GHR1 y GHR2

La hipótesis de los receptores tipo salmónido y no salmónido fue puesta en duda al descubrirse que la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) presentaba el receptor del tipo de los no salmónidos (Gómez-Requeni y col., 2005). Esta observación sugirió que posiblemente coexistieran en una misma especie ambos tipos de receptores y que los mismos fueron conservados evolutivamente en todas las especies de peces teleósteos (Saera-Vila y col., 2005). Los estudios llevados a cabo por Saera-Vila y col., (2005) y Jiao y col., (2006) demostraron que efectivamente ambos tipos de receptores coexisten en una variedad de especies de teleósteos. El alineamiento y análisis filogenético de estas secuencias dio como resultado la formación de dos clados bien diferenciados, uno que se correspondían con los receptores denominados previamente como no salmónido, y otro clado con los receptores tipo salmónido (Figura 2). Los autores designaron a estos clados como GHR tipo 1 y GHR tipo 2, o GHR1 y GHR2, respectivamente. Estos dos tipos de receptores se diferencian principalmente en la cantidad de residuos cisteína en el ECD y los residuos tirosina en el ICD. Mientras que GHR1 tiene entre 6 y 7 cisteínas, GHR2 presenta 4 a 5 (Jiao y col., 2006). El ICD de GHR1 conserva 9 residuos tirosina, pero GHR2 sólo presenta 6. Además, GHR1 tiene un intrón extra entre los exones 10 y 10A, que es una característica sólo observada en peces teleósteos; sin embargo, GHR2 no tiene este intrón extra. Luego, ambos tipo de receptores conservan las características típicas de los receptores para GH.

¿Cuál es el receptor para GH?

Las primeras caracterizaciones funcionales del receptor fueron realizadas para GHR1. Mediante ensayos de *binding*, proliferación y de genes reporteros con GH heterólogo y específico se determinó que GH efectivamente podía activar a GHR1 y conducir a una

respuesta biológica (Lee y col., 2001; Tse y col., 2003). Otros ensayos de *binding* competitivo realizados en *Oreochromis mossambicus* (Perciformes) demostraron que GH se une específicamente a GHR1 ($ED_{50}=0.85ng$), pero no PRL ($ED_{50}=333.3ng$). En cuanto a GHR2, se demostró en el salmónido *O. masou* que este receptor también responde específicamente a GH específico, pero no a SL ni PRL (Fukada y col., 2004). En paralelo, los ensayos realizados para GHR1 en la misma especie mostraron que este receptor respondía a GH sólo a concentraciones muy elevadas ($ED_{50}=124ng/ml$), no respondía a PRL, pero sí a SL ($ED_{50}=15.6ng/ml$) (Fukada y col., 2005). En base a estos últimos resultados en salmónidos y al análisis genómico de *Oryzias latipes* (Beloniformes), se propuso que GHR1 es en realidad el receptor para SL y GHR2 el de GH (Fukada y col., 2004, 2005; Fukamachi y col., 2005; Fukamachi & Mayer, 2007). Además, se propuso que GHR1 y GHR2 son el producto de una duplicación genómica específica de teleósteos (Saera-Vila y col., 2005; Jiao y col., 2006; Fukamachi & Meyer, 2007). Según esta propuesta, los receptores del tipo 1 para GH en realidad serían los receptores para SL, y los del tipo 2 los receptores para GH. Ésta hipótesis es netamente filogenética y se basa en que dado que GHR1 de *O. masou* une específicamente a SL y GHR2 a GH, todos los otros GHR del clado de GHR1 deberían ser los receptores para SL, o SLR; mientras que los GHR que se agrupan en el clado de GHR2 deberían ser los receptores para GH. Sin embargo, esta clasificación ha sido ampliamente cuestionada (Chen y col., 2011; Ellens y col., 2013; Reindl & Sheridan, 2012). Un exhaustivo estudio realizado en *Danio rerio* (Cypriniformes) demostró categóricamente que GHR1 no es el receptor para SL, al menos en esa especie, pero que tanto GHR1 y GHR2 sí responden a GH (Chen y col., 2011). Estos autores demostraron además que GHR1 puede activar la expresión de los genes Spi2.0, c-fos y β -caseína, mientras que GHR2 es incapaz de activar c-fos (Chen y col., 2011; Jiao y col., 2006).

GHRs en *C. dimerus*

Una de las características que se le atribuyen a la hormona SL es la regulación de la pigmentación (Fukamachi y col., 2004). En el pez medaka *O. latipes*, una mutación en el

gen de SL conduce a una línea de peces denominados *ci* (*color interfere*, por sus siglas en inglés) que son fenotípicamente más pálidos que la línea salvaje (Fukamachi y col., 2004). En este sentido, el receptor de tipo 1 para GH, GHR1/SLR, ya ha sido secuenciado en *C. dimerus* (Cánepa y col., 2012). Estos autores han demostrado que los niveles del transcripto de GHR1 están asociados a los cambios de pigmentación en relación a la adaptación a la coloración del entorno. En ambientes oscuros, tanto la hormona SL como el GHR1 aumentan su expresión comparados a la expresión de los mismos en entornos claros. En base a estos resultados los autores propusieron que en *C. dimerus* GHR1 sería el receptor para SL, denominándolo SLR (Cánepa y col., 2012), en concordancia con lo propuesto por Fukada y col. (2005), Fukamachi y col. (2005) y Fukamachi & Mayer (2007). Sin embargo, queda el interrogante de si este receptor conserva las características funcionales de receptor para la hormona de crecimiento, como es la regulación del crecimiento. Por otra parte, GHR2 aún no ha sido secuenciado en esta especie. En estas circunstancias, sería de suma relevancia evaluar la expresión de ambos tipos de receptores bajo condiciones que arresten el crecimiento somático, como por ejemplo los protocolos de restricción alimentaria.

Isoformas del receptor

Los receptores pertenecientes de la superfamilia de receptores clase 1 de citoquinas presentan muchas características similares en cuanto a su estructura, principalmente en el dominio extracelular y regiones específicas del dominio intracelular (Bazan, 1990). Muchos de estos receptores, además de su forma funcional completa anclada a la membrana plasmática, presentan isoformas más cortas producto de procesamientos postranscripcionales y/o postraduccionales (Rose-John & Heinrich, 1994; Edens & Talamantes, 1998). Estas isoformas comprenden a las proteínas de unión al ligando o *binding proteins* (BPs, por sus siglas en inglés), a las formas truncadas del receptor pero ancladas a membrana, y otras formas que difieren en el extremo 5' UTR. Las BPs son las

formas solubles del receptor y se corresponden esencialmente con la región extracelular del mismo, aunque esto depende de la forma en la cual se genere la BP. Uno de los mecanismos consiste en la proteólisis limitada de la región extracelular del receptor, proceso denominado *shedding*, por medio del cual una metaloproteasa cliva la región extracelular del receptor cerca del dominio transmembrana, dejando un producto soluble que conserva los dominios de unión al ligando y es exactamente igual a la secuencia aminoacídica de la región extracelular del receptor (Sotiropoulos y col., 1993; Saito y col., 1995; Alele y col., 1998; Zhang y col., 2000). La enzima que cataliza esta reacción ha sido caracterizada para GHR en mamíferos y corresponde a la metaloproteasa TACE/ADAM-17 (Zhang y col., 2000), que además está involucrada en el clivaje de otras moléculas de membrana (Black y col., 1997; Moss y col., 1997; Peschon y col., 1998). Por otra parte, la BP puede ser generada como producto del procesamiento diferencial de ARNm del receptor, por medio del cual se pierden las regiones transmembrana e intracelular del mismo. La BP así formada difiere de la región extracelular hacia su extremo C-terminal, donde presenta una serie de aminoácidos distintos a la misma región del receptor completo y conforma una región C-terminal hidrofílica (Edens & Talamantes, 1998; Caldusch-Giner y col., 2001). Se han atribuido efectos agonísticos y antagónicos para las BP en mamíferos, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Rose-John & Heinrich, 1994; Baumann, 2002), donde por un lado las BP actúan como un reservorio de ligando aumentando la vida media de la misma en circulación y su biodisponibilidad, y por otro, compitiendo por la unión al ligando con el receptor anclado a membrana, formando dímeros no funcionales con el receptor completo, o por disminución en la abundancia de receptores funcionales por clivaje de los mismos o “decapitación” del receptor (Baumann, 2002). El procesamiento del transcrito primario del receptor también puede dar lugar a otras isoformas más allá de la BP, y se producen por el truncamiento de gran parte de la región intracelular del receptor (Edens & Talamantes, 1998). Estas isoformas ancladas a membrana conservan la región extracelular de unión al ligando, la región transmembrana y un fragmento de la región intracelular. Característicamente carecen de los motivos Box 1 y Box 2, perdiendo así la capacidad de transducción de señales propias del receptor

funcional (Edens & Talamantes, 1998). Se ha demostrado para GHR en mamíferos que estas isoformas pueden actuar como dominantes negativos al formar heterodímeros con el receptor completo, y a la vez son más susceptibles que el receptor completo para la formación de GHBP por proteólisis (Ross y col., 1997; Dastot y col., 1996, 1998; Edens & Talamantes, 1998; Iida y col., 1999, 2003).

En peces se ha determinado la presencia de GHBP en varias especies, como en la trucha arcoíris *O. mykiss* (Sohm y col., 1998), *S. aurata* (Zhang & Marchant, 1999) y *Acipenser sinensis* (Liao & Zhu, 2004; Liao y col., 2009), aunque todavía no se conoce si GHBP es generada por proteólisis o es una variante del ARNm de GHR. Al respecto, Calduch-Giner y col. (2001) han hipotetizado que el mecanismo sería por proteólisis, pues han observado en *S. maximus* la presencia de una forma truncada del receptor anclado a membrana, argumentando que en estudios realizados en mamíferos estas formas son más susceptibles a producir GHBP que el receptor completo.

Factor de crecimiento tipo insulina 1

El factor de crecimiento tipo insulina 1 o IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*, por sus siglas en inglés) es una hormona polipeptídica de entre 68 a 70 aminoácidos sintetizada y liberada a circulación principalmente por el hígado y cuyas funciones biológicas abarcan procesos metabólicos y anabólicos (Wood y col., 2005). Originalmente esta hormona fue descrita como “factor de sulfatación”, pues estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo en mamíferos a mediados del siglo XX mostraron que la incorporación de sulfato al cartílago en crecimiento estimulado por la hormona de crecimiento era mediado por un factor presente en suero (Denko & Bergenstal, 1955; Salmon & Daughaday, 1957). El análisis y caracterización de dicho suero condujo a la identificación de tres factores en el mismo, denominados somatomedina A, B y C (Hall & Uthne, 1971; Van Wyk y col., 1974), tal nombre debido a su rol mediador de los efectos biológicos de GH (Daughaday y col., 1972). En otra serie de estudios independientes sobre adipocitos encontraron un factor en

suero con efectos biológicos característicos de insulina, pero que sin embargo no podían ser suprimidos cuando el suero era tratado con un anticuerpo contra insulina. A esta actividad remanente se la denominó “actividad tipo insulina no suprimible, o NSILA (*non suppressible insuline-like activity*, por sus siglas en inglés), cuyo efecto es el aumento en la entrada de glucosa a la célula (Froesch y col., 1963). A su vez, se describió en suero un factor cuyo efecto biológico era la estimulación de la proliferación celular y síntesis de ADN, denominado MSA (*multiplication-stimulating activity*, por sus siglas en inglés) y que tampoco podía ser suprimido con anticuerpos contra insulina (Pierson & Temin, 1972). La secuenciación de NSILA dio como resultado la identificación y descripción de NSILA-1 y NSILA-2 (Rinderknecht & Humbel, 1978a,b), los cuales fueron renombrados como IGF-1 e IGF-2 respectivamente por su similitud estructural con proinsulina. Así mismo, se pudo saber que la somatomedina C es IGF-1, mientras que MSA es IGF-2 (Klapper y col., 1983; Marquardt y col., 1981). Por su parte, somatomedina A es la somatomedina C deaminada mientras somatomedina B dejó de ser considerada una somatomedina y fue caracterizada como EGF (*epidermal growth factor*, por sus siglas en inglés).

Estructura

Tanto IGF-1 como IGF-2 son hormonas polipeptídicas muy conservadas evolutivamente en los vertebrados y están relacionadas estructural y funcionalmente a insulina. IGF-1 es sintetizada como prohormona, y luego de la escisión del péptido señal, la prohormona queda constituida por 5 dominios bien diferenciados, denominados B-C-A-D-E desde el extremo N- al C- terminal respectivamente. La maduración postraduccion final implica la eliminación del dominio E y a diferencia de insulina, la cual no posee este dominio, IGF-1 conserva el dominio D (Duan, 1997; Wood y col., 2005; Duan y col., 2010).

IGF-1 es sintetizado principalmente por el hígado, hecho que se desprende de estudios realizados en ratones transgénicos con el sistema de *knock out* (KO) condicional Cre-loxP, donde la delección de IGF-1 dirigida a hígado redujo en un 75% la concentración de IGF-1

circulante en comparación con la línea de ratones salvaje (Yakar y col., 1999; Sjögren y col., 1999). No obstante, la expresión de IGF-1 no se restringe al hígado, pues se expresa en una amplia variedad de tejidos extra hepáticos (Daughaday & Rotweir, 1989; Jones & Clemmons, 1995).

Efectos biológicos de IGF-1

Los efectos biológicos descritos en mamíferos para IGF-1 incluyen la estimulación de la entrada glucosa a la célula, lipogénesis, síntesis de glucógeno y la incorporación de aminoácidos, presumiblemente actuando a través de los receptores de insulina (Binoux, 1995). Además estimula la proliferación celular, la síntesis de proteínas, de ADN y ARN, disminuye la degradación de proteínas, está involucrada el crecimiento celular y migración celular, en la inhibición de la apoptosis y modulación de la síntesis de hormonas esteroideas y citoquinas (Le Roith y col., 2001; Wood y col., 2005).

Los ensayos biológicos midiendo la incorporación de sulfato al cartílago permitieron mostrar un rol fundamental de IGF-1 en el crecimiento y fueron fundamentales para el establecimiento de la hipótesis inicial de las somatomedinas por cuanto IGF-1 actuaba como mediador de los efectos biológicos de GH en el crecimiento (Le Roith y col., 2001). El desarrollo de ratones KO para IGF-1, IGF-2 y para ambas IGFs mostraron asimismo un rol fundamental de los IGFs en el crecimiento pre y posnatal. En ratones KO para IGF-1 o para IGF-2 el peso al nacer es sólo el 60% de la línea salvaje, mientras que en ratones KO para ambas IGFs el peso al nacer es del 30% de los valores normales, muriendo al poco tiempo (Baker y col., 1993; De Chiara y col., 1990; Liu y col., 1993). Esto constituye una fuerte evidencia de los efectos de los IGFs en el crecimiento pre y posnatal. Además, se ha documentado en humanos que una delección en IGF-1 está asociada al enanismo severo (Woods y col., 1996).

Receptores de IGFs

El sistema de IGFs está constituido por los ligando, IGF-1 e IGF-2, sus receptores y las proteínas de unión a IGFs denominadas IGFBPs (*IGF binding proteins*, por sus siglas en inglés) (Duan, 1997; Le Roith y col., 2001; Wood y col., 2005). Los receptores de IGFs son dos receptores de membranas diferentes, denominados IGF-1R e IGF-2R. IGF-1R es un receptor de un paso de membrana con actividad tirosin kinasa que muestra una alta similitud de secuencia y estructural con el receptor de insulina. IGF-1R presenta una alta afinidad por IGF-1, pero también interacciona con IGF-2 y con mucha menor afinidad con insulina. Es un receptor tetramérico conformado por una subunidad α ubicada en la región extracelular y que interacciona con el ligando, unida a una subunidad β mediante puentes disulfuro, de ubicación intracelular, con actividad tirosin kinasa y que además posee el dominio transmembrana. Cada hemireceptor $\alpha\beta$ une otro igual mediante uniones disulfuro constituyendo el receptor tetramérico funcional de tipo $\alpha_2\beta_2$ (Le Roith y col., 1995). La importancia de IGF-1R en el desarrollo queda reflejada por el hecho de que en ratones KO para IGF-1R el peso al nacer es un 45% del peso de la línea salvaje y luego mueren a poco de nacer (Baker y col., 1993; Liu y col., 1993), y que el desarrollo de los huesos se ve afectado en ratones KO condicional específico de osteoblastos (Zhang y col., 2002). Por otra parte, el receptor tipo 2, o IGF-2R, es estructuralmente diferente a IGF-1R, y en mamíferos muestra una afinidad 100 veces mayor por IGF-2 que por IGF-1. Es un receptor monomérico caracterizado como el receptor de manosa-6 fosfato y está involucrado en la degradación lisosomal de IGF-2 (Kornfeld, 1992).

IGFBPs: proteínas de unión a IGFs

Las IGFBPs son proteínas de secreción que se encuentran en el medio extracelular, particularmente en circulación y poseen una alta afinidad por IGF-1 e IGF-2 que es igual o incluso mayor que la de sus respectivos receptores. Estas proteínas funcionan como

proteínas transportadoras en circulación, regulan el recambio de IGF-1 e IGF-2 y sus vidas medias (Jones & Clemmons, 1995). Hay descritas seis IGFBPs en mamíferos numeradas de 1 a la 6. De éstas, IGFBP3 es la más abundante en circulación, y se encuentra formando un complejo ternario con el ligando, IGF-1 o IGF-2, y con otra proteína denominada ALS (*acid labile subunit*, por sus siglas en inglés). Este complejo compromete al 80% de IGF-1 en circulación en rata y prolonga la vida media de la misma de 10 minutos a 12-15 horas (Hodgkinson y col., 1987; Guler y col., 1989). Estructuralmente las IGFBPs mantienen una organización común, con un dominio N-terminal y C-terminal ricos en cisteínas, entre los cuales se establecen uniones disulfuro, y que intervienen en el reconocimiento a las IGFs (Brinkman y col., 1991; Forbes y col., 1998; Hobba y col., 1998; Neumann & Bach, 1999; Chelius y col., 2001; Clemmons, 2001). Además, se ha postulado un rol modulador para las IGFBPs en la interacción entre los IGFs y sus receptores como así también un rol protector por cuanto evitaría la degradación proteolítica de los IGFs en circulación (Clemmons, 2001; Duan, 2002; Firth & Baxter, 2002). Por otra parte, también se han descrito efectos biológicos de IGFBPs independientes de IGFs (Andress & Birnbaum, 1992; Jones y col., 1993; Oh y col., 1993; Clemmons, 2001; Firth & Baxter, 2002).

IGFs en peces

La mayoría de los estudios de IGF-1 en peces se ha centrado en la identificación de IGF, en el desarrollo de ensayos para medir los niveles plasmáticos y de ARNm de diversos tejidos en respuesta a una variedad de condiciones nutricionales y de estaciones climáticas, y evaluando el control de la síntesis y liberación de IGF-1 por parte de GH y otros factores como la hormona tiroidea (TH) o estrógenos. IGF-1 presenta una alta similitud entre peces y mamíferos en cuanto a su estructura, regulación y función (Reinecke & Collet, 1998). En muchas especies de peces, los niveles plasmáticos de IGF-1 o la expresión de su mensajero, correlacionan con la cantidad de alimento ingerido, su contenido proteico y con la tasa de crecimiento (Duan, 1998; Beckman y col., 2004). Se ha descrito un incremento de IGF-1 con la temperatura (Beckman y col., 1998) y la duración del día

(McCormick y col., 2000). Además, McCormick y col. (1992) demostraron mediante el uso de implantes que IGF-1 estimula el crecimiento en *Oncorhynchus kisutch* (Salmoniformes).

En peces teleósteos no sólo se ha detectado el transcripto de IGF-1, sino también el de IGF-2, en hígado y en numerosos órganos tales como el cerebro, ojos, branquias, tracto gastrointestinal, páncreas, riñón, músculo esquelético, bazo y gónadas (Reinecke y col., 2005). Por otra parte, se ha demostrado que IGF-2 regula el metabolismo en células musculares de la trucha (Codina y col., 2004), indicando que IGF-2, al igual que IGF-1, podría actuar no sólo como factor de crecimiento sino también como una hormona metabólica. Además existe cierta evidencia que indica que IGF-2 e IGF-1 activan potencialmente la proliferación celular y la síntesis de ADN en el pez zebra *D. rerio* (Pozios y col., 2001). Tanto IGF-1 como IGF-2 estarían regulados por GH en todos los órganos, lo cual convierte a los peces teleósteos únicos en relación a otros vertebrados, en cuanto a que GH regularía principalmente a IGF-1 (Reinecke y Collet, 1998).

IGF-1 fue identificada por primera vez en teleósteos en el salmón *O. kisutch* (Cao y col., 1989) y subsecuentemente en varias especies más (Duan, 1997; Wood y col., 2005). La estructura y secuencia de IGF-1 se encuentra altamente conservada en teleósteos como así también en relación a otros vertebrados (Duan, 1997), donde por ejemplo la similitud global respecto de IGF-1 en humanos es de entre el 72 y 80% (Duan, 1997; Wood y col., 2005). Los cDNA obtenidos a partir de los ARNm de estas especies de peces teleósteos muestran que el mismo da lugar a una preprohormona de entre 159 a 193 aminoácidos dependiendo la especie, y que luego de la escisión del péptido señal, la prohormona queda conformada por los dominios D-B-A-D-E, tal como ocurre en mamíferos. A su vez, el dominio E es clivado para dar lugar a la hormona madura conformada por 68 a 70 aminoácidos de longitud, nuevamente dependiendo de la especie (Wood et al, 2005).

Crecimiento compensatorio

Se observa frecuentemente que luego de un período de retardo en el crecimiento debido a condiciones de entorno desfavorables hay un crecimiento acelerado (Ali y col., 2003). Este fenómeno se denomina crecimiento compensatorio y fue descrito inicialmente en mamíferos y en otros animales domésticos endotermos (Wilson & Osbourn, 1960), aunque también ha sido estudiado en varios grupos de peces teleósteos (Ali y col., 2003). Entre las condiciones desfavorables que provocan este retraso en el crecimiento y posterior crecimiento compensatorio al ser aquellas revertidas, se encuentran la disminución en la temperatura del agua (Mortensen & Damsgård, 1993; Nicieza & Metcalfe, 1997; Purchase & Brown, 2001), las interacciones sociales (Jobling & Koskela., 1996) y la restricción alimentaria (Miglavš & Jobling., 1989; Wang y col., 2000; Picha y col., 2008). Sin embargo, pocos trabajos se han focalizado en el estudio de la expresión de los componentes del eje GH/IGF-I en esos casos (Gabillard y col., 2006; Picha y col., 2008; Fox y col., 2010; Fuentes y col., 2011).

Uno de los efectos que produce el crecimiento compensatorio a nivel poblacional es la disminución en la variabilidad de los tamaños corporales de los individuos que la conforman, pues las curvas de crecimiento de los peces que han sufrido un periodo de restricción alimentaria, tras restablecerse el alimento, tienden a converger con la de los que no han pasado por el mismo estado de escasez de alimento. Por otra parte, es importante notar que el crecimiento compensatorio ha sido observado en una variedad de especies, condiciones de laboratorio y manipulación experimental. Por ejemplo, dicho fenómeno fue documentado en peces que han sido mantenidos durante el transcurso de los experimentos en peceras comunitarias, es decir, donde la cantidad de peces por peceras era mayor a uno (Ali y col., 2003). Así mismo, también se ha observado crecimiento compensatorio en diseños experimentales donde los peces son mantenidos aislados en peceras individuales bajo condiciones de ayuno y realimentación (Miglavš & Jobling, 1989; Rusell & Wootton, 1992; Xie y col., 2001; Zhu y col., 2001).

El crecimiento compensatorio puede ser parcial, completo e incluso puede haber sobrecompensación (Figura 3), aunque este último caso sólo se ha observado bajo un régimen de alimentación-ayuno cíclico (Hayward y col. 1997). En experimentos con peces mantenidos individualmente se ha visto que el crecimiento compensatorio se debe en parte a un periodo de hiperfagia registrado inmediatamente después del ayuno (Won & Borski, 2013). Además se ha observado que la magnitud del ayuno incrementa este periodo de hiperfagia (Won & Borski, 2013). Muchos estudios además han demostrado que la eficiencia de conversión alimentaria, que es la relación entre el peso corporal ganado y la cantidad de alimento ingerido en un tiempo dado, es mayor durante el crecimiento compensatorio (Picha y col. 2008; Won & Borski, 2013). A pesar de que varios neuropéptidos, como por ejemplo el NPY, están involucrados en la ingesta, todavía no es clara la relevancia de otras hormonas como IGF-1 y GH durante el crecimiento compensatorio.

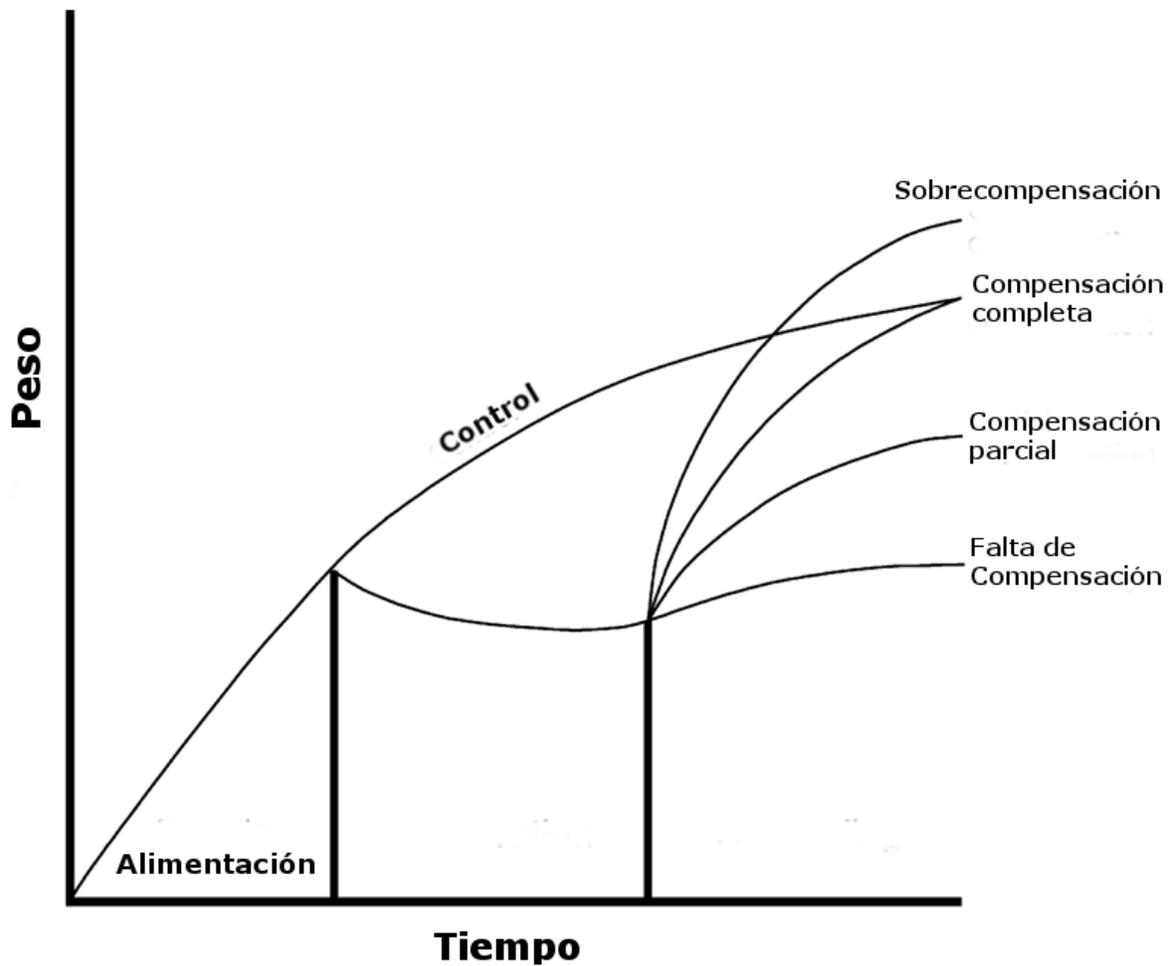


Figura 3: Perfiles teóricos de crecimiento compensatorio (extraído de Ali y col., 2003)

El hígado en peces

En los vertebrados el hígado es una glándula digestiva muy irrigada que surge en el desarrollo como una evaginación del intestino anterior que crece hacia el mesénquima que lo rodea. El mesénquima induce al endodermo a proliferar, ramificarse y a formar el epitelio glandular del hígado. Una porción del divertículo hepático, la región próxima al tubo digestivo, continúa funcionando como un conducto de drenaje y una rama desde este conducto se diferencia en vesícula biliar (Gilbert, 2005). En muchas especies de peces teleósteos, el análisis morfológico del hígado revela tres lóbulos rodeados por una capa

delgada de tejido conectivo (Souza y col., 2001). Sin embargo, en algunas especies de teleósteos no se reconoce ninguna lobulación (Bruslé & Anadón., 1996). El parénquima contiene los hepatocitos, y el estroma contiene los vasos sanguíneos, los macrófagos y las fibras de tejido conectivo que mantienen la estructura y función del órgano. La vena portal llega al hígado con la sangre que viene desde los órganos gastrointestinales y el bazo, ramificándose en capilares sinusoides. Asociados a éstos se encuentran los hepatocitos, formando cordones hepáticos poco definidos, que no forman lobulillos y que están íntimamente asociados a la secreción biliar. Los hepatocitos tienen forma poliédrica y un núcleo central esférico con un nucléolo bien definido. La membrana plasmática es levemente basófila mientras que el citoplasma es levemente acidófilo y puede contener estructuras vacuolares (Hibiya, 1982; Souza y col., 2001) que se deben a la acumulación de glucógeno y lípidos. En algunos teleósteos, el hígado es invadido por tejido pancreático exocrino íntimamente asociado a las ramificaciones de la vena portal, cuya función es secretar enzimas digestivas (Hibiya, 1982). Muchos autores denominan a esta estructura hepatopáncreas. Es común ver en este órgano la presencia de centros melanomacrofágicos estrechamente relacionados a los vasos de mayor calibre.

El contenido de reservas energéticas en forma de lípidos y glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos está relacionado con la función metabólica normal del hígado de los vertebrados. El agotamiento del glucógeno de los hepatocitos generalmente ocurre en peces frente a una situación de estrés o de mal nutrición (Hinton & Lauren, 1990; Wilhelm Filho y col., 2001), actuando el glucógeno como reserva de glucosa frente a una mayor demanda energética en esas situaciones (Panepucci y col., 2001). Según Camargo & Martínez (2007) el hígado es el órgano más afectado por los factores estresantes a los que los peces son sometidos.

Muchas especies de peces teleósteos enfrentan largos períodos de restricción alimentaria que se dan naturalmente durante una etapa del año (Larsson & Lewander, 1973; Loughna & Goldspink, 1984; Machado y col., 1988). Durante estos periodos, la tasa de crecimiento se reduce y la energía es redirigida al mantenimiento del metabolismo (MacKenzie y col., 1998). La dinámica de utilización de la energía endógena se puede estudiar,

indirectamente, mediante el índice hepatosomático (IHS) (Jensen, 1979), el cual refleja cambios morfológicos que se producen como resultado de la movilización y la utilización de lípidos, proteínas y glucógeno endógeno. En *Pollachius virens* (Gadiformes), el patrón de deposición y movilización de lípidos, proteínas y glucógeno en el hígado refleja los cambios observados en el IHS en respuesta a los cambios en la disponibilidad de alimentos (Jensen, 1979).

Collins & Anderson (1995) observaron que la inanición en *Macquaria ambigua* (Perciformes) induce una reducción significativa e inmediata en el IHS, lo que indica que las reservas de energía dentro del hígado se movilizan rápidamente en respuesta a la privación de alimentos. En varios trabajos se ha demostrado una disminución significativa en el IHS en respuesta a la restricción alimentaria. Los lípidos y proteínas que se mantienen en el hígado luego del hambreado son presumiblemente la cantidad mínima esencial necesaria para mantener la función y la integridad celular (Collins & Anderson, 1995).

El tejido hepático parece proporcionar los sustratos de energía sólo durante las etapas iniciales de privación de alimentos. Si bien el propio tejido permanece activo metabólicamente, los sustratos energéticos subsecuentes son suministrados por otros tejidos durante periodos de ayuno prolongados. La rápida regeneración de las reservas hepáticas frente a una realimentación, indica su importancia durante cortos períodos de privación de alimentos. Por lo tanto, el hígado es el tejido metabólicamente más activo y sus reservas de energía parecen ser de fácil acceso (Collins & Anderson, 1995).

En peces como el pacú *Piaractus mesopotamicus* (Charasiformes) o el lenguado *Paralichthys dentatus* (Pleuronectiformes) la restricción alimentaria al cabo de 60 días conduce a una disminución del área y el volumen de los hepatocitos, la acumulación de partículas de hierro, cambios en la forma y la posición del núcleo, la reducción de los espacios intercelulares y desorganización celular. El núcleo se torna picnótico y las reservas de glucógeno y lípidos disminuyen (Bisbal & Bengtson, 1995; Souza y col., 1995). Interesantemente, se ha observado una respuesta hepática diferencial en el peso del

hígado entre machos y hembras del bacalao *Gadus morhua* (Gadiformes) frente a un ayuno (Karlsen y col., 1995) en periodo reproductivo. La mayor reducción en hembras sugiere que las mismas estarían agotando los lípidos del hígado a una mayor tasa de lo que lo hacen los machos. Esto es posiblemente, porque las hembras continúan la vitelogénesis durante el desove (Kjesbu & col, 1991).

Modelo biológico

Cichlasoma dimerus (Ovalentariae: Cichlidae, nombre común “chanchita”) es un pez cíclido sudamericano que se encuentra principalmente asociado a cuerpos de aguas quietas y poco profundas. Habita en lagos y lagunas de las cuencas de los ríos Paraná y Paraguay, desde Brasil hasta el norte de la provincia de Buenos Aires, como por ejemplo en los esteros y bañados de la provincia de Corrientes (Kullander, 1983). En un principio esta especie estaba incluida dentro del orden Perciformes, pero en el año 2013 fue reclasificada por Betancur y col. (2013) en el orden Cichliformes (Figura 4). Esta reclasificación se basó en que el orden Perciformes no era un grupo monofilético.

Ubicación taxonómica de *C. dimerus*, según Betancur y col. (2013):

Chordata

Craniata

Vertebrata

Gnathostomata

Teleostomi

Euteleostomi

Actinopterygii

Teleostei

Neoteleostei

Acanthomorphata

Percomorphaceae

Ovalentariae

Cichliformes

Cichlidae

Cichlasoma dimerus (Heckel, 1840)

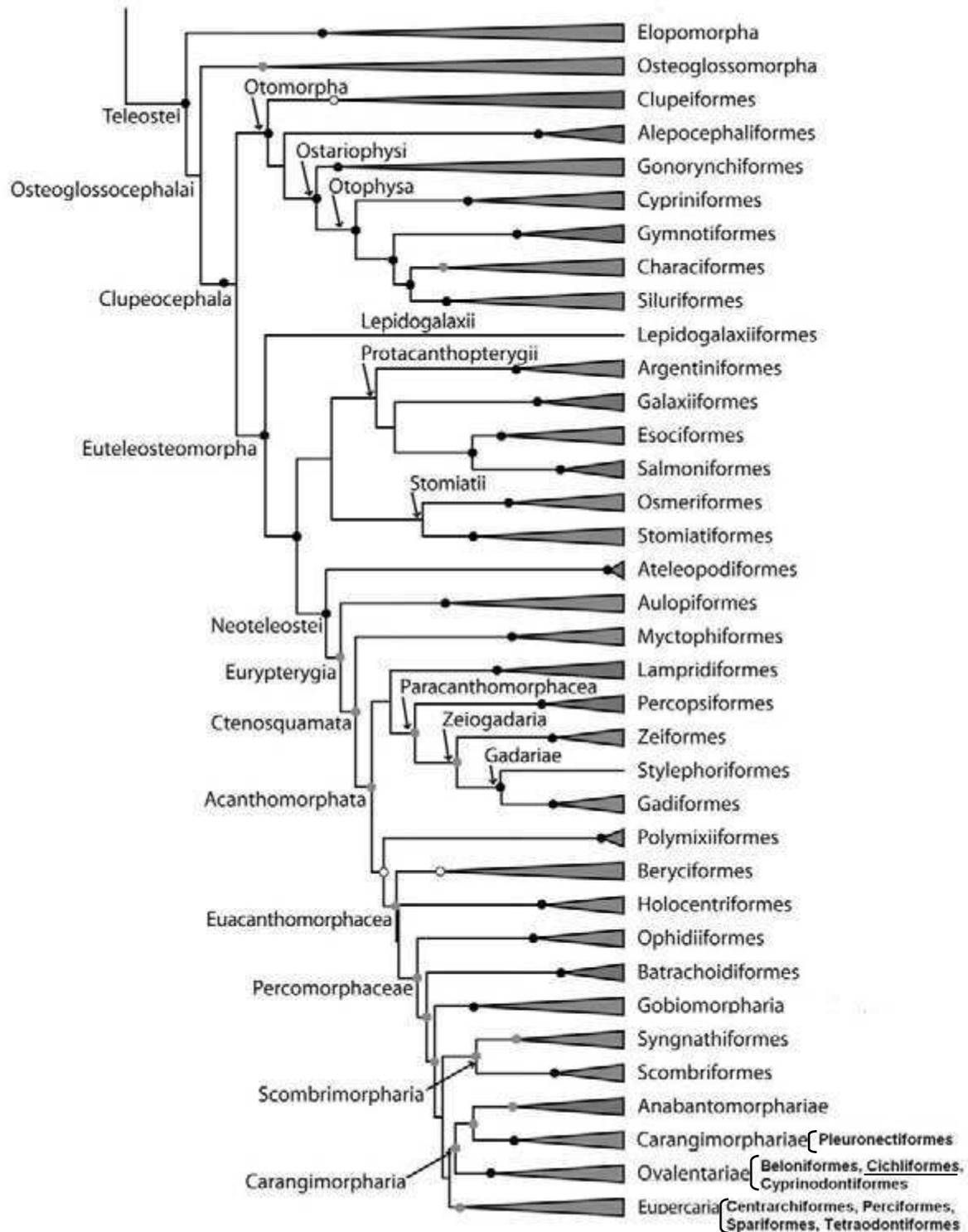


Figura 4: Árbol filogenético de los peces teleósteos, adaptado de Betancur y col. (2013) donde aparece el orden al que pertenece *C. dimerus*, resaltado en negro.

Los ejemplares adultos de *C. dimerus* son de talla mediana, llegando a tener un largo estándar de aproximadamente 12cm, con un cuerpo redondeado comprimido lateralmente. Presenta un patrón de pigmentación típico del género *Cichlasoma* dado por una serie de bandas verticales oscuras a ambos lados del cuerpo (Figura 5). Esta especie se caracteriza por mostrar variabilidad en el patrón de coloración durante situaciones de estrés, formación de parejas y cambios ambientales. Son animales territoriales que poseen un sofisticado comportamiento social, donde se destaca la presencia de una pareja dominante, que será la que se reproduzca, e individuos subordinados. *C. dimerus* constituye un interesante modelo biológico debido a que se adapta fácilmente al cautiverio, tolera un amplio rango de temperatura y posee alta tasas de supervivencia y reproducción (Pandolfi y col., 2009). Además, bajo condiciones de laboratorio, los ejemplares adultos de talla pequeña presentan altas tasas de crecimiento, por lo cual este pez constituye un excelente modelo para llevar a cabo los estudios planteados en esta Tesis Doctoral.



Figura 5: Ejemplares adultos de *C. dimerus*. Nótese el patrón de coloración en bandas verticales oscuras

-Hipótesis y Objetivos-

Objetivo general

Estudiar la relación entre el crecimiento somático y la expresión génica en el eje GH/IGF-1.

Los periodos de restricción alimentaria y realimentación son eventos frecuentes en el ciclo de vida de muchos peces teleósteos, los cuales muestran una gran capacidad de adaptación fisiológica frente a los mismos. En este sentido, la especie en estudio en la presente Tesis es *C. dimerus*, un pez cíclido sudamericano que habita en aguas quietas y poco profundas del litoral argentino y cuyo ambiente puede variar significativamente en relación a la época del año. En este contexto, los periodos de restricción alimentaria pueden ser eventos habituales. Por lo tanto, los objetivos específicos planteados son:

1) Restricción alimentaria: *determinar los efectos del ayuno prolongado sobre el crecimiento somático y sobre la expresión génica de los componentes del eje GH/IGF-1: GH, GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2.*

2) Realimentación: *determinar la presencia o ausencia de crecimiento compensatorio en animales realimentados, su relación con hiperfagia, con la eficiencia de conversión alimentaria y evaluar la expresión génica del eje GH/IGF-1.*

Las hipótesis relacionadas con estos objetivos son las siguientes:

Hipótesis 1: “Los individuos sometidos a un ayuno prolongado disminuyen su tasa de crecimiento como consecuencia de alteraciones en el eje GH/IGF-I a distintos niveles”

Hipótesis 2: “En *Cichlasoma dimerus* se observa crecimiento compensatorio como consecuencia de la realimentación posterior a un período de ayuno. En este crecimiento compensatorio está involucrado el eje GH /IGF-I”

Como se mencionó en la Introducción, los peces teleósteos poseen dos tipos receptores para la hormona de crecimiento, GHR1 y GHR2, de estructuras muy similares pero con diferentes características, que habrían sido el resultado de una duplicación génica ocurrida durante la radiación temprana del grupo de los teleósteos. Por otra parte, los peces tienen SL, una hormona relacionada a PRL y GH que no está presente en tetrápodos, a la cual se le atribuyen efectos biológicos varios relacionados con la coloración y el metabolismo de lípidos. En ese sentido, estudios previos en salmónidos, han propuesto a GHR1 como el receptor para SL y a GHR2 para la GH. Sin embargo, otros estudios muestran que esto no sería una condición generalizada en todas las especies de peces y que ambos receptores son en realidad verdaderos receptores para GH. En *C. dimerus*, estudios previos proveyeron evidencias que sugieren que GHR1 sería el receptor de SL aunque hasta la realización de esta Tesis no se había caracterizado al receptor GHR2. Tomando en cuenta estos antecedentes, se propone el siguiente objetivo específico:

3) Secuenciar GHR2 y determinar su distribución.

La hipótesis relacionada a este objetivo es:

Hipótesis 3: “*Cichlasoma dimerus* presenta ambos tipos de receptores, GHR1 y GHR2, siendo GHR2 y no GHR1 el receptor para GH. Por lo tanto, se espera que el arresto en el crecimiento debido a periodo de restricción alimentaria afecte la expresión de GHR2 y no de GHR1”

-Materiales y Métodos-

Animales

Los animales estudiados en esta tesis fueron ejemplares adultos de *C. dimerus*, capturados en los Esteros del Riachuelo Corrientes, Argentina (27°12'50''S, 58°11'50''W) y transferidos a acuarios de 400L donde fueron aclimatados bajo condiciones de temperatura (25 ± 2 °C) y fotoperiodo (14 luz:10 oscuridad) constante. Los peces fueron alimentados diariamente entre las 12 y 14 hs al 1.5% del peso corporal con alimento comercial (*Tetra Pond Variety Blend*, Tetra®) hasta que fueron trasladados al dispositivo experimental. Periódicamente las peceras fueron limpiadas quitando un 20% de su volumen para mantener el agua en condiciones óptimas.

Secuenciación del receptor de la hormona de crecimiento e IGF-2

Como ocurre en muchos modelos de animales no tradicionales cuyo genoma no está secuenciado, es necesario en primera instancia secuenciar los genes de interés para luego realizar los estudios pertinentes. Para el desarrollo de esta Tesis algunos de los genes ya habían sido secuenciados previamente y puestos a disposición en GENBANK: GHR1 (número de acceso: FJ208943.1), GH (número de acceso: HQ660075.1), IGF-1 (número de acceso: KM005102).

Extracción de ARN, síntesis del ADN copia y amplificación mediante PCR

Se extrajo ARN total a partir del hígado de 5 ejemplares adultos de *C. dimerus*, los cuales fueron anestesiados en benzocaína 0.1% y posteriormente fueron sometidos a eutanasia por decapitación. Luego de la homogeneización de 50mg de hígado en 500µl de TRIzol (Invitrogen) se procedió a la extracción de ARN según las especificaciones del fabricante. Se agregaron 100µl de CHCl₃ al homogenato y luego de incubar por 5min a 30°C las muestras fueron centrifugadas 15min a 12000xG a 4°C. Se tomó la fase acuosa a la cual se le agregó 250µl de alcohol isopropílico para precipitar el ARN, se incubó durante 5min a 30°C y se centrifugó 10min a 12000xG a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 500µl de alcohol etílico al 70%v/v, 5min a 7500xG. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* resuspendido en 100µl agua destilada esterilizada. Las muestras se incubaron 10min a 50°C para disolver completamente el ARN. En algunos casos fue necesario adicionar de 10µl a 50µl de agua para lograr la disolución completa. El ARN total obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro UV. La calidad de la purificación se evaluó mediante la relación $\lambda_{260}/\lambda_{280}$. Cuando fue posible, la cuantificación se hizo en Nanodrop 2000. Para eliminar posibles restos de ADN genómico, las muestras fueron tratadas con ADNasa I (Sigma) durante 30min a 40°C, seguidos de 15min a 90°C con 1µl de *stop solution* para finalizar la reacción. La síntesis de la primera hebra de ADN copia se realizó utilizando la enzima M-MLV (Promega) a partir de 2µg de ARN. Las condiciones de retrotranscripción fueron: 50min a 42°C seguidos de 10min a 70°C utilizando oligo (dT)₁₈ (Sigma) como *primer* en 10 µl de volumen final de reacción. El producto de reacción fue diluido 1/10 y posteriormente amplificado por PCR. Para ello se diseñaron 2 pares de *primers* degenerados (degGHR2fw2/rv2 y degGHR2fw4/rv4) obtenidos a partir de la comparación y alineamiento de secuencias de peces teleósteos filogenéticamente relacionados sobre regiones conservadas (Tabla 1). El par degGHR2fw1/rv1 fue diseñado para amplificar un sector de la región extracelular del receptor mientras que el par degGHR2fw2/rv2 para amplificar parte de la región intracelular (Tabla 1). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial 5min a 95°C seguido de 40 ciclos de desnaturalización por 30seg a 95°C, *annealing* por 30seg a 56°C y elongación por 30seg a 72°C seguidos de un ciclo adicional de elongación final de 10min a 72°C. Los productos de

PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y las bandas obtenidas purificadas utilizando el *Accuprep Gel Purification* Kit (Bioneer). Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados (Unidad Genómica-Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, Argentina y Servicio de Secuenciación y Genotipificado, EGE, FCEN-UBA, Argentina) y comparados con secuencias disponibles en bases de datos utilizando el software BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>).

Tabla 1: secuencia de los *primers* degenerados utilizados en la etapa de secuenciación de GHR2.

<i>Primer</i>	Secuencia 5'-3'
degGHR2 fw2	MCATYGTSCAACCRGAYCCTC
degGHR2 rv2	CCGVACMCGRAYCTCRTG
degGHR2 fw4	CCTGGGTGGAATTCATCG
degGHR2rv4	GTAGCCGYCTGGTGTYGG
degGHR2 fw6	GCACACACTGCTCCCTTTACGG
degGHR2 rv6	TGGAGAGCAGTTGGACGAG

Una vez secuenciadas estas dos regiones no superpuestas del receptor, se procedió a secuenciar la región intermedia. Para ello se diseñó un par de *primers* cuyo *forward* (degGHR2fw6) está ubicado sobre la región extracelular, y cuyo *reverse* (degGHR2rv6) está ubicado sobre la región intracelular. El protocolo de PCR fue 10min a 95°C de desnaturalización inicial, y 40 ciclos de 30seg a 95°C, 30seg a 56°C y 60seg a 72°C, seguidos de un último ciclo de elongación a 72°C por 10min. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa 1%, la banda obtenida purificada (Bioneer) y finalmente secuenciado. Mediante el programa BLASTN se comparó la secuencia con la de otras especies disponibles en base de datos públicas y se confirmó la identidad de la secuencia, correspondiente al receptor tipo 2 de GH (GHR2).

De la misma manera se procedió para secuenciar IGF-2. Se diseñó un par de *primers* degenerados sobre regiones del gen conservadas en relación a otras especies de peces

teleósteos filogenéticamente relacionadas. El producto de amplificación una vez purificado según se especifica en el párrafo anterior fue secuenciado y comparado en la base de datos mediante el software BLASTN.

Análisis de distribución de los receptores de GH (GHR1 y GHR2) y de IGF-1

Se extrajo ARN total de varios tejidos (TRizol Reagent, Invitrogen) y se evaluó la presencia de ARNm mensajero de GHR1, GHR2 e IGF-1 mediante RT-PCR utilizando *primers* específicos. Como control positivo se utilizó ARP (*acidic ribosomal phosphoprotein P0*, por sus siglas en inglés). Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa 2% y fotografiados.

Diseño experimental

El desarrollo de los experimentos descritos en esta Tesis está sujeto a un control estricto de la ingesta de alimento y de la homogeneidad en la calidad del agua. Contemplando estas premisas, se decidió construir un sistema cerrado de flujo continuo de agua. El control de la ingesta se puede realizar con exactitud al asignar un pez por pecera, de manera que la cantidad de alimento es medida directamente al momento de la alimentación. La homogeneidad en la calidad del agua resulta de la recolección del agua de las peceras que luego de pasar por un filtro es nuevamente redistribuida entre las mismas. De esta manera, el agua de las peceras bajo los distintos tratamientos es renovada con el agua filtrada común.

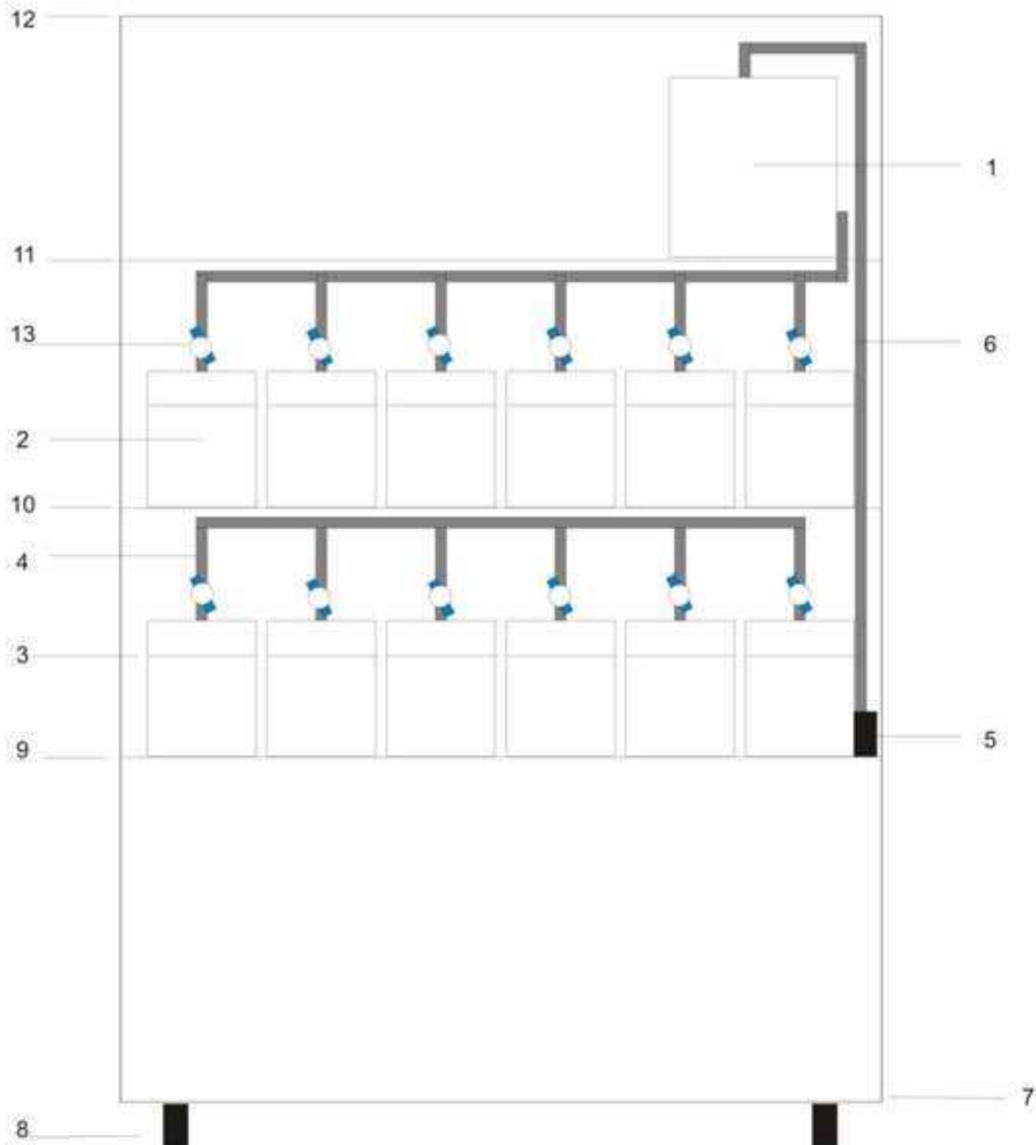
Diseño y construcción del sistema de peceras cerrado y de flujo continuo

Diseño del sistema

El sistema cuenta con un total de 12 peceras de 16L, en medidas 40cmx20cmx20cm (largo, ancho y alto). Están dispuestas en dos filas, una superior y otra inferior (Figura 6 y 7). En la parte posterior de cada pecera se realizó un orificio, cuyo límite inferior, a 20cm de la base, determina el nivel del agua en la pecera. A este orificio se le enrosca una unión tanque de $\frac{1}{2}$ ", el cual recolecta el agua hacia un sistema de cañerías de PVC que desembocan en una canaleta colectora en medidas 130x10x20cm. En esta canaleta se colecta el agua de todas peceras. En el extremo derecho de la misma se colocó una bomba ATMAN 103, que toma el agua de la canaleta y la impulsa hacia el filtro colocado 150 cm hacia arriba, por sobre la fila superior de peceras. La conexión entre la bomba y el filtro se hizo con un caño de PCV de $\frac{1}{2}$ ". El extremo del caño toma forma de L, y anexada a la misma una conexión T orientada hacia abajo con 3 orificio de 0.5 cm de diámetro para provocar una lluvia de agua que incida directamente en la parte superior del filtro. El agua que pasa por el filtro es recolectada en la parte inferior del mismo y sale por un caño de PVC de $\frac{1}{2}$ ". El mismo luego se bifurca, una rama hacia la fila superior de peceras y otro hacia la fila inferior. Cada una de estas ramificaciones tiene 6 canillas plásticas en serie distribuidas una hacia cada pecera. El flujo de agua se regula mediante la apertura diferencial de las mismas. De esta manera queda cerrado el circuito del agua. El flujo de agua por pecera fue establecido en 1000L/Hora, y 83,33 L/Hora por pecera, lo que representa un recambio de 5.2 veces el volumen de la pecera en la hora.

Sobre el techo de cada fila de peceras se colocaron dos tubos fluorescentes de 20W cada uno, colocados en forma tal que la luz sea pareja para todas la peceras. Puesto que *C. dimerus* es un pez que puede desplegar un comportamiento agresivo contra sus coespecíficos, las paredes de las peceras fueron recubiertas en su parte exterior con láminas de color celeste para evitar el contacto visual entre los mismos.

1, filtro dry-wet; 2, pecera; 3, nivel del agua; 4, sistema de distribución del agua desde el filtro hacia las peceras; 5, bomba en la canaleta; 6, caño ascendente que conduce el agua recolectada en la canaleta desde la bomba hacia el filtro; 7, plataforma; 8,rueditas; 9, estante 1; 10, estante 2; 11, estante 3; 12, estante 4; 13, canilla.



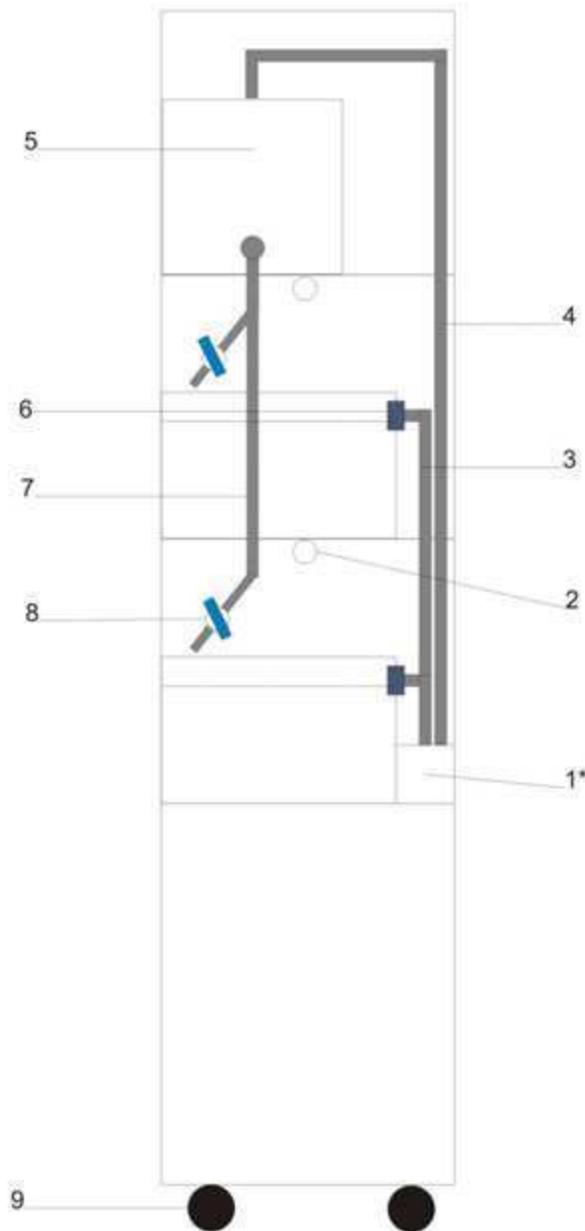
Medidas: ancho, 1,40m; alto, 2,00m; entre estantes, 0,45m; entre plataforma y 9; 0,90m.

Pecera: largo, 40cm; alto, 25cm; ancho, 20cm.

Altura del agua: 20cm(borde inferior del orificio posterior de la pecera).

Figura 6: Esquema general del sistema de recirculación cerrado diseñado para la realización de los experimentos. En la figura se detallan sus componentes.

1, canaleta; 2, tubo de luz; 3, caño descendente desde las peceras hacia la canaleta; 4 caño ascendente desde la bomba en la canaleta hacia el filtro; 5, filtro dry-wet; 6, unión del caño al orificio posterior de la pecera, determina el nivel del agua en 20cm ; 7, caño descendente desde el filtro hacia el sistema de distribución para las peceras; 8, canilla reguladora del flujo de agua del filtro hacia las peceras; 9, rueditas unidas a la plataforma.



Medidas: profundidad, 0,50m; alto, 2,00m.

Pecera: alto, 25cm; largo, 50cm; ancho, 20cm.

Altura del agua: 20cm(borde inferior del orificio posterior de la pecera).

Figura 7: Vista lateral del sistema de recirculación cerrado. Se puede ver la disposición de la cañería en relación a las peceras y la bomba. Los detalles se marcan con números en la figura.

Filtro

El sistema cuenta con un filtro seco-mojado conocido popularmente como *dry-wet*. Es un filtro mecánico y biológico y que a su vez oxigena el agua que pasa a su través. Es un filtro mecánico por cuanto las partículas grandes, restos de alimentos y excrementos principalmente, son retenidas en mayor medida en las primeras fases del mismo, la región *dry*. Es un filtro biológico pues permite el crecimiento de bacterias nitrificantes que actúan produciendo nitratos y nitritos a partir del amonio producido por la metabolización de los alimentos ingeridos por los peces. El filtro está formado por 4 bandejas plásticas en medidas 8cmx30cmx30cm, ordenadas de manera superpuesta. Las bandejas permiten el flujo de agua desde arriba hacia abajo pues entre las mismas se ubican tapas plásticas perforadas. En la parte inferior de cada bandeja, sobre la base plástica perforada, se coloca una capa de wata (lana de perlón). La bandeja superior, con una tapa plástica perforada sobre la cual cae el agua proveniente de la canaleta, está rellena con wata. Esta bandeja actúa como principal filtro mecánico. La bandeja inmediatamente inferior está rellena con material plástico tubular de 3 cm de largo y 1,5 cm de diámetro hechos a partir de caño corrugado blanco. Aunque también actúa como filtro mecánico, tiene como objetivo incrementar la superficie de contacto entre el agua y el aire para incrementar la difusión de oxígeno (O₂) hacia el agua. Por debajo se ubica una bandeja con bioesferas, las cuales son plásticas y con una gran superficie de contacto entre el agua y el aire. Debajo de estas 3 bandejas se ubica la parte *wet* del filtro, una bandeja que tiene grava sumergida en agua proveniente de la parte superior del filtro.

Recambio de agua

Si bien es un sistema cerrado, es necesario hacer cambios periódicos de agua, pues el sistema es incapaz de eliminar el amonio completamente, como así tampoco puede eliminar los nitratos y nitritos. Estos compuestos nitrogenados son tóxicos a partir de cierta concentración. De esta manera, dos recambios semanales del 20% del volumen de

agua del sistema permiten mantener los niveles de estos compuestos por debajo de los niveles tóxicos. El recambio de agua se efectúa en cada pecera, hecho que permite retirar los restos de excrementos que se depositaron el fondo y no fueron evacuados por el orificio posterior de la pecera. La calidad del agua es evaluada constatando los niveles de amonio, nitratos, nitritos y pH mediante un kit comercial (TETRA®).

Diseño experimental: restricción alimentaria y realimentación

Diseño experimental 1: restricción alimentaria

Esta serie de experimentos consta de un periodo de aclimatación al dispositivo experimental de 2 semanas seguido de un periodo de restricción alimentaria, o ayuno, de 4 semanas (Figura 8a).

Un total de 12 peces por experimento fueron pesados, medidos y colocados individualmente al azar en peceras de 16L del dispositivo experimental de recirculación, a temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo (14 luz: 10 oscuridad) constante. La talla de los peces fue establecida estrictamente entre 8cm y 9cm de largo total, siendo estos adultos de talla pequeña. Los peces se dejaron aclimatar por un periodo de entre una y dos semana. Al finalizar la aclimatación los mismos fueron pesados y medidos y seguidamente se les asignó al azar uno de los siguientes tratamientos: control, alimentado diariamente entre las 14:00 y 15:00 horas al 1,5% del peso corporal durante 4 semanas y no alimentado, definido por ausencia total de alimentación durante el mismo periodo. Cada grupo experimental constó de 6 peces. Transcurridas las 4 semanas de tratamiento los peces fueron retirados de la pecera, pesados, medidos y se les extrajo sangre de la vena del pedúnculo caudal con jeringas 27G heparinizadas, en un lapso no mayor a 4 minutos, durante el cual se les midió la concentración de glucosa (ACCUCHEK kit). Posteriormente los peces fueron anestesiados en benzocaína 0,1% y luego eutanizados por decapitación. Se les extrajeron varios órganos y tejido. El hígado, las gónadas y el bazo fueron pesados

para calcular los índice organosomático correspondientes (peso del órgano/peso corporal total*100). Parte del hígado fue fijado en líquido de Bouin para su posterior análisis histológico. Al mismo tiempo, 50mg de hígado, músculo y la hipófisis entera fueron inmediatamente homogeneizados en 500µl de TRIzol (Invitrogen).

Diseño experimental 2: realimentación

Esta serie de experimentos consta de un periodo de aclimatación de 2 semanas, restricción alimentaria de 4 semanas y un periodo variable de realimentación. Los grupos experimentales fueron 2: el grupo control fue alimentado durante el transcurso completo del experimento, en tanto que el grupo tratado fue privado totalmente de alimento durante 4 semanas, para luego ser realimentados por 3 semanas (experimento A) o 3 días (experimento B) (Figura 8b y 8c). Los animales fueron pesados y medidos al inicio de la aclimatación, al inicio del ayuno y al inicio de la realimentación. En el experimento A las mediciones continuaron a la semana de realimentación, a las 2 semanas y a la tercera semana, que es el fin de la realimentación y del experimento. Para el experimento B, las mediciones se repitieron al tercer día del comienzo de la realimentación. Al finalizar el periodo de realimentación, los animales fueron procesados de la misma manera que en los experimentos de restricción alimentaria.

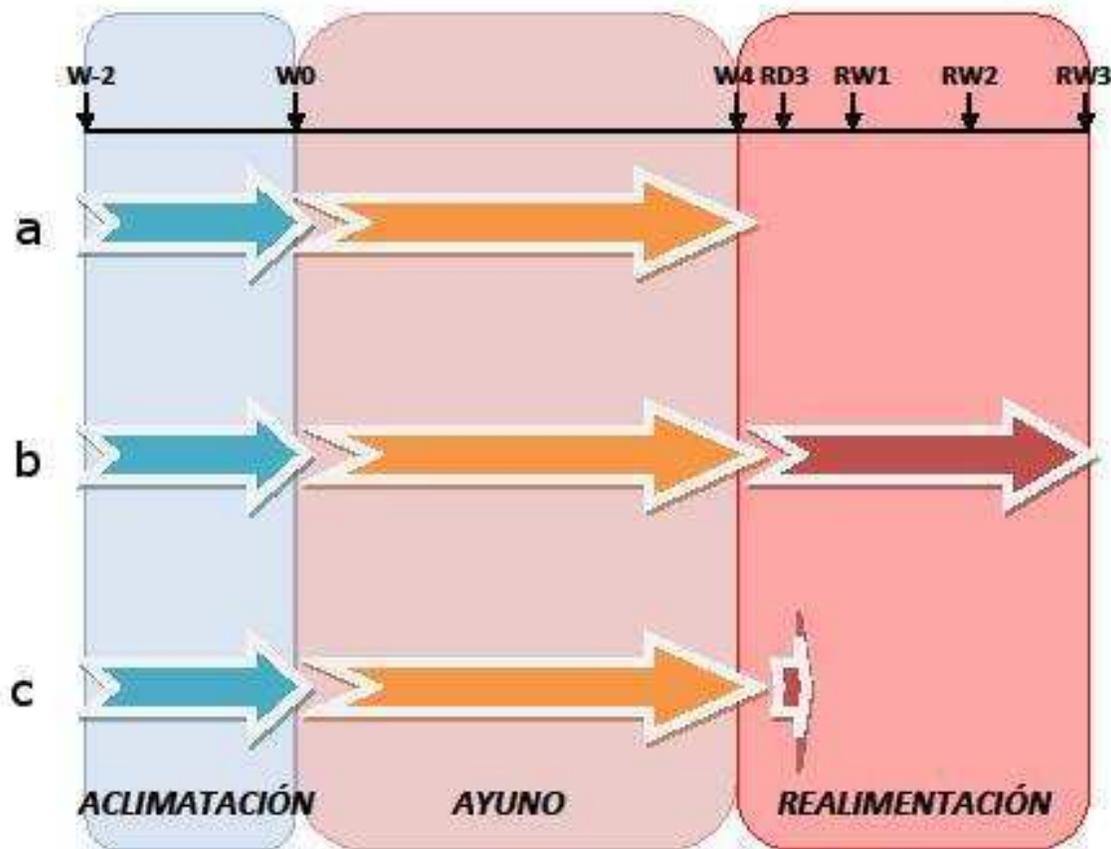


Figura 8: Esquema de los diseños experimentales utilizados en (a) los experimentos de ayuno; (b) realimentación por 3 semanas: experimento A; (c) realimentación por 3 días: experimento B. En la parte superior se indica la escala temporal según la siguiente nomenclatura: W-2, comienzo de la aclimatación por 2 semanas; W0, fin de la aclimatación/comienzo del ayuno por 4 semanas; W4, fin del ayuno/inicio de la realimentación; RD3, fin de la realimentación por 3 días; RW1, primera semana de realimentación; RW2, segunda semana de realimentación; RW3, tercera y última semana de la realimentación. En cada uno de los experimentos indicados el grupo fue siempre alimentado al 1,5% del peso corporal.

Evaluación de la ingesta

Para evaluar si los animales realimentados presentan una fase de hiperfagia, se cuantificó la ingesta de alimento por pez. A cada pecera se asignó una cantidad fija de alimento, 1,5% del peso corporal, que corresponde a un total de 7 pellets de alimento. A partir del momento de la entrega del alimento, tiempo inicial, se fue contando la cantidad de *pellets*

remanentes en la pecera a los 5, 10, 30, 60 y 180 minutos. La cuantificación de la ingesta se realizó al horario habitual de alimentación, todos los días hábiles de la semana.

Determinación de la eficiencia de conversión alimentaria

Para cada uno de los intervalos de tiempo entre mediciones de peso durante el periodo de realimentación, se calcularon los valores de la eficiencia de conversión alimentaria o FCE (*feed conversion efficiency*, por sus siglas en inglés). La misma representa la cantidad de peso corporal ganado en relación de la cantidad de alimento ingerido durante un periodo de tiempo determinado, y se calcula como: $FCE = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso alimento ingerido}$.

Análisis de la expresión génica de GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2

Preparación de las muestras: extracción de ARN y síntesis de ADN copia

Se homogeneizaron 50mg de tejido en 500 μ l de TRIzol (Invitrogen) en el caso del hígado y músculo, mientras que la hipófisis fue homogeneizada entera en el mismo volumen de TRIzol. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para el proceso de extracción de ARN y es el mismo que se describió previamente. El ARN obtenido de hígado y músculo fue resuspendido en 100 μ l de agua destilada esterilizada y en 30 μ l para la hipófisis. La concentración de ARN fue cuantificada por espectrofotómetro UV y la calidad de la purificación evaluada mediante la relación $\lambda_{260}/\lambda_{280}$.

Un total de 2 μ g de ARN por muestra fue tratado con ADNasa I (Sigma) para eliminar posibles restos de ADN genómico durante 30min a 40°C en un volumen de 10 μ l seguidos

por 10min a 70°C con 1µl de *stop solution* para detener la reacción. La retrotranscripción (RT) de ARN mensajero a ADN copia se realizó con la enzima M-MLV (Promega) y *random primers* (nonámeros) a 37°C por 60min, seguidos de 10min a 95°C a partir de 6µl de ARN tratado con ADNasa. El producto de síntesis fue conservado a -20°C hasta su uso.

PCR en tiempo real

Se diseñaron *primers* específicos sobre las regiones secuenciadas de los genes GHR1, GHR2, GH, IGF-1 e IGF-2 (Tabla 2). Para GHR2 se diseñaron dos pares, uno sobre la región extracelular y otro sobre la región intracelular, puesto que, como fue descrito en la sección Introducción, se han identificado diferentes isoformas de GHR: una forma completa anclada a membrana (receptor funcional), una forma truncada también en membrana pero no funcional (carece de la mayor parte de la región intracelular), y otra forma que carece de la región intracelular que es secretada y es la proteína transportadora de GH, GHBP. De esta manera, determinado la relación GHR2ext/GHR2int entre el grupo control y tratado, podemos evaluar ambas poblaciones en caso de que en esta especie GHBP y/o GHR2t se obtengan por *splicing* alternativo.

Tabla 2: Secuencia nucleotídica en sentido 5' a 3' de los *primers* utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real.

<i>Primer</i>	Secuencia 5'-3'
IGF-1 forward	CTCCCAAGATTCTCGCTCTG
IGF-1 reverse	CCCTTCTCCGCTTTACTAACC
IGF-2 forward	GTAGAGGAGTGTTGTTTCCGT
IGF-2 reverse	CCTGTAGAGAGGTGGCTGAC
GH forward	GTCAGTCGTGTGTGTTTGGGTGTC
GH reverse	CGAGCAGGTGGAGGTGTTGG

GHR1 forward	CACCCAAAATCAAAGGCATCG
GHR1 reverse	GGCTCATCTTGGTAGAAATCTGG
GHR2int forward	ACTGCTCTCCACTCTCAATTG
GHR2int reverse	AAAGGTGATGGTTCTGGGTC
GHR2ext forward	TGCTGAATGTGAGTCTGACC
GHR2ext reverse	ACACATTGGAGTTGCCGTC
ARP forward	ACTGTGGGAGCAGACAATG
ARP reverse	TCCAGTGCAGGATTGTTCTC
18S forward	GGAGTATGGTTGCAAAGCTG
18S reverse	TCTGTCAATCCTTTCCGTGTC

Como genes de referencia, necesarios para normalizar la expresión de los genes de interés (GOI, por sus siglas en inglés *gen of interest*), se evaluó al factor de elongación 1 α (EF1 α), β -actina (β -ACT), ARP (*acidic ribosomal phosphoprotein P0*, por sus siglas en inglés), 18S (ARNr de la subunidad pequeña ribosomal) y ubiquitina (UBQ) en todos los experimentos de restricción alimentaria de 4 semanas para hígado, músculo e hipófisis. Para ello fue necesario realizar secuenciaciones parciales de estos genes con la suficiente extensión como para poder diseñar *primers* específicos a ser utilizados en las RT-qPCR. Por tanto, se procedió de igual manera que en la secuenciación de GHR2. Se realizaron PCRs con *primers* degenerados obtenidos por comparación y alineamiento con secuencias de especies de peces teleósteos filogenéticamente relacionados. Los *primers* degenerados fueron diseñados sobre las regiones conservadas. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, purificados (Bionner) y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en GENBANK con la de otras especies. UBQ y EF1 α fueron descartados porque no se ajustaron a los requerimientos de calidad necesarios para ser cuantificados por RT-qPCR (se observó más de un producto de amplificación en la curva de disociación para ambos casos). El análisis mediante el

algoritmo del software NormFinder mostró a ARP como el mejor gen de referencia en hígado y músculo, mientras que 18S para hipófisis.

La longitud del amplicón en todos los casos no fue superior a 130pb y se constató que los mismos no formaran dímeros mediante el análisis de la curva de disociación (*melting curve*).

Las condiciones de reacción para las RT-qPCR se ajustaron de tal manera para que sean iguales para todos los genes. Esto permite medir en una misma placa de reacción varios genes, minimizando posibles variaciones entre placas. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10µl, con 5µl de FastStar Universal SyBR green Master (Roche), 1.5µl de una mezcla equimolar de *primers* (GHR2int: 250 nM; GHR2ext: 250 nM; GHR1:250 nM, GH: 100 nM, IGF-1: 650 nM; IGF-2: 650nM), 2.5µl de cDNA (diluciones: hígado y músculo 1/100, hipófisis 1/50) y 1µl de agua destilada esterilizada. Luego de una desnaturalización inicial de 10min a 95°C, se repitieron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30seg, *annealing* a 58°C por 15seg y elongación a 72°C por 20seg seguidos por una curva de disociación (*melting curve*) para detectar posibles productos no específicos como por ejemplo dímeros de *primers*. En cada reacción se llevaron a cabo controles negativos para cada set de *primers* por omisión de ADN copia.

Histología hepática

Las muestras de hígado fueron fijadas en solución de Bouin por 20 horas a 4°C en oscuridad, deshidratadas mediante graduación creciente de alcohol etílico (70°/90°/96°/100°) y previo pasaje por xilol por cinco minutos, incluidas en parafina por 6 horas. Luego, las muestras fueron cortadas a 7µm y se procedió a realizar la coloración hematoxilina-eosina (H&E). Se fotografiaron 4 campos por preparado. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImagePro Plus, donde se midió el área de la sección transversal de 5 hepatocitos por campo.

Parámetros de crecimiento

El crecimiento fue evaluado tomando varios parámetros morfológicos. En primer lugar se midió el largo total (LT), largo estándar (LS) y el peso corporal total. El largo total comprende la distancia entre el extremo anterior de la cabeza y el inicio de la aleta caudal del pez, mientras que el largo estándar es la distancia entre el extremo anterior de la cabeza y el extremo posterior de la aleta caudal. Luego se calculó la tasa de crecimiento específico, o SGR, para cada uno de esos parámetros. El SGR se define como $\ln(X_f/X_i) \cdot t^{-1} \cdot 1000$, donde t es el intervalo de tiempo en días en el cual se evalúa el crecimiento, X_f es el valor del parámetro al final del periodo y X_i al inicio del mismo.

Análisis estadístico

Análisis general

El crecimiento somático fue evaluado mediante ANCOVAs con Medidas Repetidas, considerando el largo estándar y peso corporal como variables respuesta, Semanas como factor “dentro”, Tratamiento (alimentado-no/alimentado) como factor “entre” y largo estándar y peso corporal al inicio de la aclimatación como covariables. Adicionalmente, el crecimiento fue evaluado mediante la comparación de los SGR del largo estándar y peso corporal entre los tratamientos mediante ANOVA con Medidas Repetidas. Siempre que el término de interacción Semana*Tratamiento fue significativo, se realizaron efectos simples para Tratamiento en cada nivel del factor Semana. Todas las otras variables fueron analizadas mediante ANOVAs de un factor. Algunas de las variables fueron transformadas al $\ln(x)$ para satisfacer los supuestos de normalidad y homocedasticidad del ANOVA. Los p -valores obtenidos fueron ajustados mediante el método FDR (*false*

discovery rate, por sus siglas en inglés) dado que se realizaron múltiples pruebas estadísticas en un mismo experimento (Benjamini & Hochberg, 1995). Se consideró que el tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la variable respuesta cuando el p -valor ajustado fue menor a 0,05.

Análisis de los datos obtenidos por PCR en tiempo real

La metodología utilizada es la presentada por Ramakers y col. (2003) y actualizada por Ruijter y col. (2009). Los datos de fluorescencia correspondientes a la unión de fluoróforo SyBR con el ADN doble cadena en cada ciclo son relativizados a la fluorescencia correspondiente al fluoróforo ROX, el cual no se une al ADN. Esta relación es el dato crudo (*raw data*) de la curva de amplificación, la cual es procesada por el programa LinRegPCR. Este programa arroja las eficiencias de la PCR por tubo de reacción, de modo que es posible determinar la eficiencia promedio por amplicón y por tejido. Tomando en cuenta estas eficiencias, el programa calcula una magnitud inicial de fluorescencia (N_0) que es proporcional a la cantidad de ADN copia presente en cada muestra antes de la amplificación. Por lo tanto, luego del procesamiento de los datos crudos, a cada unidad experimental (pez) le corresponden un dato de N_0 para cada gen y tejido. Posteriormente, la expresión de un gen de interés (N_0^{GOI}) es normalizada a la expresión de un gen de referencia (N_0^{RG}), obteniéndose la expresión normalizada de dicho gen (N_{0N}^{GOI}). Este valor es la variable respuesta que fue utilizada en el análisis estadístico de la expresión génica. Los N_{0N}^{GOI} fueron analizados mediante ANOVAs unifactoriales luego de constatar los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Cada experimento fue repetido al menos dos veces. En los resultados se grafica la media y el error estándar de la media (S.E.M.) de un experimento representativo.

-Resultados-

Secuenciación de GHR2

Se obtuvo una secuencia parcial de 1196 nucleótidos del transcrito maduro del receptor GHR2, correspondiente a 398 aminoácidos (Figura 9). La misma abarca parte de la región extracelular, el dominio transmembrana y parte de la región intracelular. La secuencia obtenida muestra un alto porcentaje de identidad nucleotídica con otros peces cíclidos, siendo del 86% respecto de *Oreochromis niloticus* (Perciformes) (Figura 9).

```

caaccggatccctcccgcagcctcaactggacgctgctgaatgtgagcttgaccggcatt
Q P D P P V S L N W T L L N V S L T G I
cattttgacatatgttgagctggaagcctccgcagctcttcagatgtggagatgggggtgg
H F D I L L S W K P P O S S D V E M G W
atgacactgcagtatgaagttcagcatcgtagcggcaactccaatgtgtgggaaacagtc
M T L Q Y E V Q H R D G N S N V W E T V
ggccccctgaggagcacacactgctccctttacggacttcaaaccaacaagaaccacnag
G P L R S T H C S L Y G L Q T N K N H X
atccgggtccgggtgcaaaatgctcgggtgggaaaaagtttgagcatttcagcgaatccatc
I R V R C K M L G G K K F G A F S E S I
ttcatccgcatcccatcaaaagtttcaagattcccagtggtggctttgctcatccttggc
F I R I P S K V S R F P V V A L L I F G
gccttggttttagtgggcatcctgatgttagttatcatatcgcagcaagaaaagtgtgatg
A L C L V G I L M L V I I S Q Q E K L M
gttattcttttgctcctgttcccgaccacaaaattaaaggaattgacccctgagctgctc
V I L L P P V P G P K I K G I D P E L L
aagaggggaaagcttcgggaactgacatcaatcctgggtgggtccccgtgatttgagaccg
K R G K L R E L T S I L G G P R D L R P
gagctgtacaacaacgacccctgggtggaattcatcgatctggacatcgaagagcagaac
E L Y N N D P W V E F I D L D I E E Q N
gacagactgacagacctgggacacagactgttcatgaaccacccctgtcgtccaactgc
D R L T D L D T D C L M N H P L S S N C
tctccactctcaattggcttcagagacgatgactcgggtcgcgctagctgctgagaccg
S P L S I G F R D D D S G R A S C C E P
gatctccccgtgcgaccagaaaccacacctttcttctcctcgtcccaaacctggccctc
D L P C D P E P S P F L P L V P N L A L
agtcaggagacattgtgctgcagcaacctctgagccaagctccccngtccagagctgcagc
S Q E T L C A A T S E P S S X V Q S C S
cctggagagcttcccttattcatctcaggcagagacgctctgtacaccaggtgagtgag
P G E L P S F I S G R D A L Y T Q V S E
gtgggctcatctggcaaggtgctgctcttacctgaggaagagacggaggtgggaaaaatc
V G S S G K V L L L P E E E T E V G K I
cctcgacagacaaaaggatgacgttacggaaagagaaaagcgaagaaagatttcagctc
P R R D K E D D V T E E K A K K E F Q L
cttgtgatgaacggagatcacagagactacacctcagagatcagcacaggaaaaataagc
L V M N G D H R D Y T S E I S T G K I S
ccggaattatccaccgaccgtgccccacatctccgtcactgaaccacgactcaaacacc
P E L S T E P C P T S P S L N H D S N T
acccccacgccccgtaaacctgctcctgtttacacactggtcgaggggtgttga
T P T P P L T P A P V Y T L V E G V

```

Figura 9: Secuencia aminoacídica y nucleotídica parcial de GHR2 de *C. dimerus*. En negro se muestra el motivo FGEFS, que en *C. dimerus* es FGAFS; en verde el TMD; en marrón el Box1 y en rojo el Box2. Las flechas indican los *primers* utilizados en RT-qPCR, diseñados sobre el ECD (arriba) y sobre el ICD (abajo).

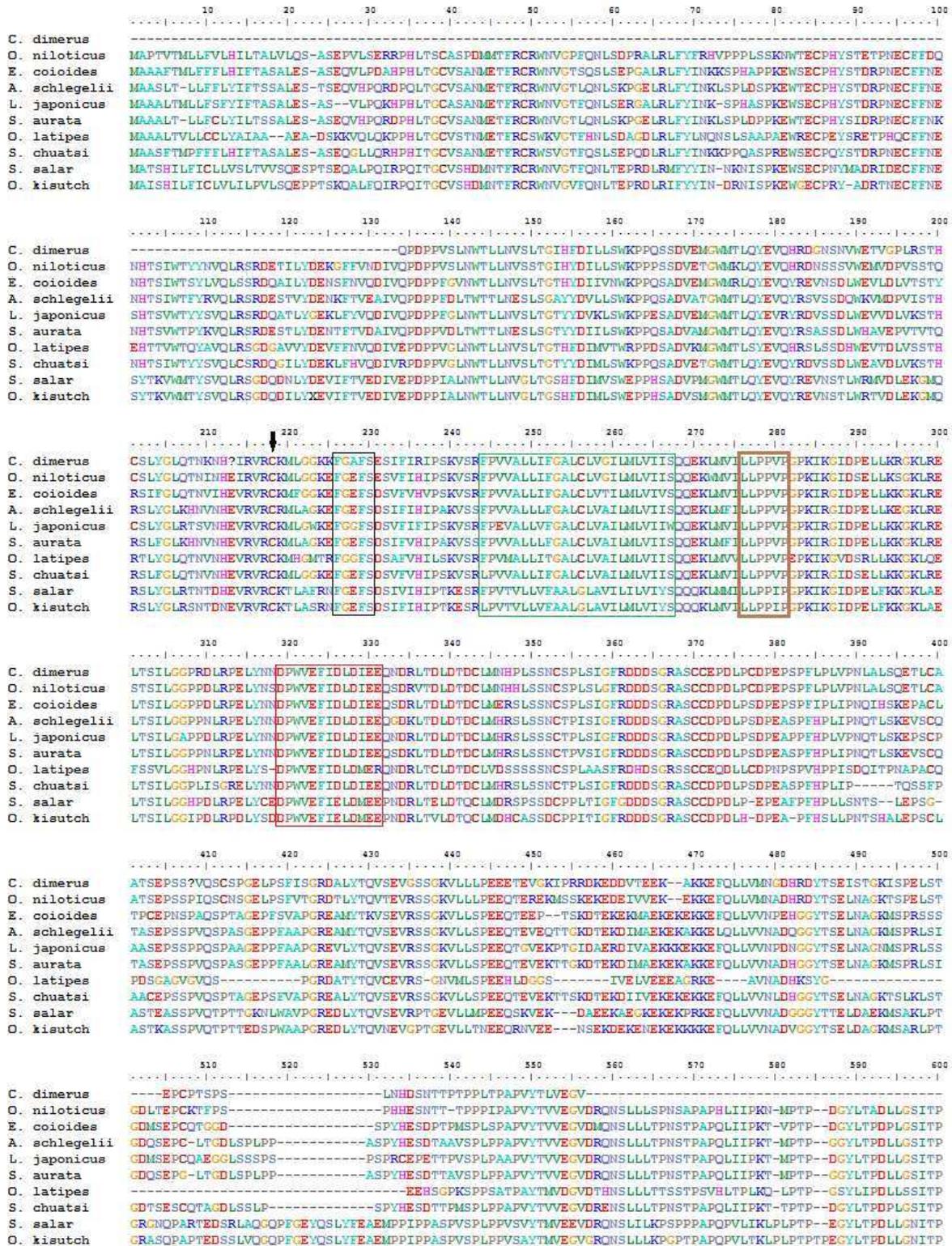


Figura 10: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de GHR2 de *C. dimerus* con otros peces teleosteos. Cada aminoácido se representa por código de letras y colores. Delimitado en negro se muestra el motivo FGEFS, que en *C. dimerus* es FGAFS; en verde el TMD; en marrón el Box1 y

en rojo el Box2. La flecha indica el residuo cisteínas que en teleósteos se ubica hacia el extremo 5' del motivo FGEFS y en mamífero hacia el 3'.

Análisis de distribución de GHR1, GHR2 e IGF-1

Se detectó la expresión de los transcriptos maduros de GHR1, GHR2 e IGF-1 en todos los tejidos analizados por RT-PCR (Figura 11a). En el caso de IGF-1 en hipófisis, fue necesario realizar una segunda PCR para confirmar su presencia en dicha glándula (Figura 11b). Los tejidos en donde se detectó la expresión de estos genes fueron bazo, riñón, tubo digestivo anterior y posterior, piel, cerebro, hipófisis, ovarios, branquias, hígado y músculo.

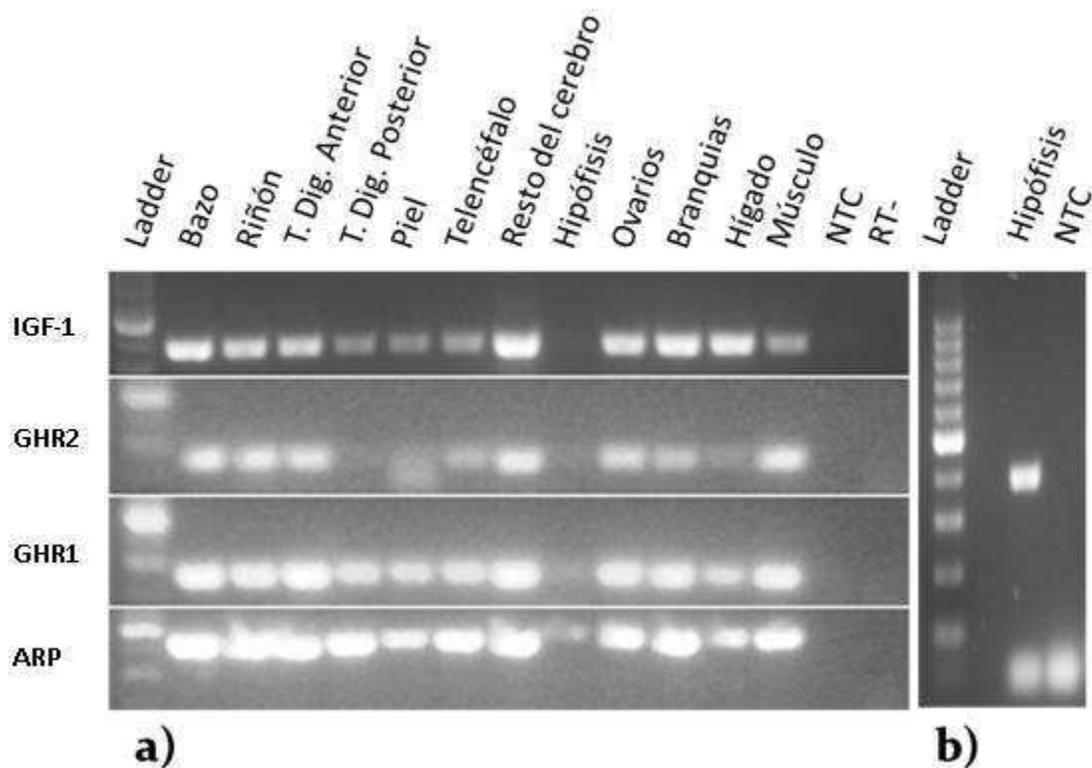


Figura 11: Análisis de distribución de la expresión de GHR1, GHR2 e IGF-1 mediante RT-PCR sobre a) los tejidos mostrados de izquierda a derecha en la parte superior de la imagen y b) en hipófisis. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa 2% y visualizados con SYBR Safe. T. Dig., tubo digestivo. NTC, control negativo sin molde; RT-, control negativo sin la enzima transcriptasa reversa. ARP se utilizó como control positivo.

Restricción alimentaria: 4 semanas

Histología hepática y parámetros de crecimiento

El índice hepatosomático de los animales con 4 semanas de ayuno fue significativamente menor que en los controles ($p < 0,001$, Figura 12), siendo $0,81 \pm 0,06$ y $1,80 \pm 0,10$ respectivamente. Así mismo, el área de los hepatocitos fue significativamente menor en los peces no alimentados ($p < 0,001$; Figura 13 y 14). Por otra parte, los animales en ayuno no mostraron niveles plasmáticos de glucosa diferente a los controles ($p > 0,05$, Figura 15).

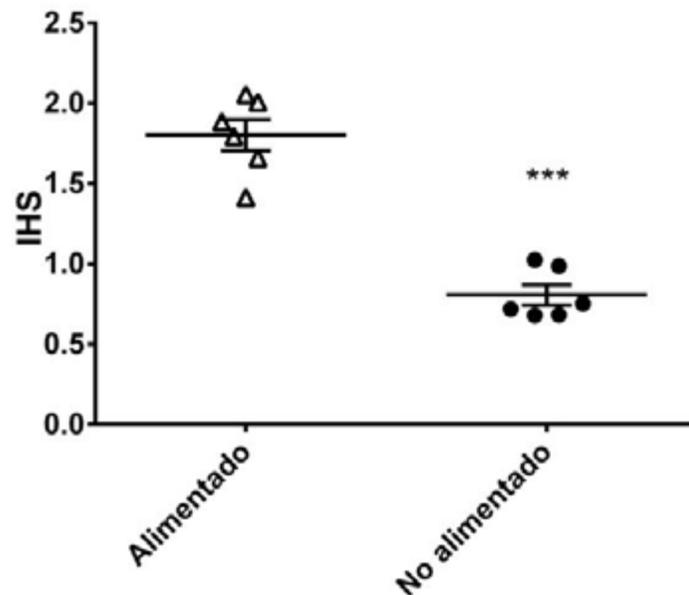


Figura 12: Índice hepatosomático (IHS, peso del hígado/peso corporal*100) en peces alimentados (Δ) y no alimentados (\bullet) durante 4 semanas de tratamiento. Cada punto representa un valor individual, la línea horizontal la media y las barras verticales el error estándar de la media (S.E.M.). ***, $p < 0,001$.

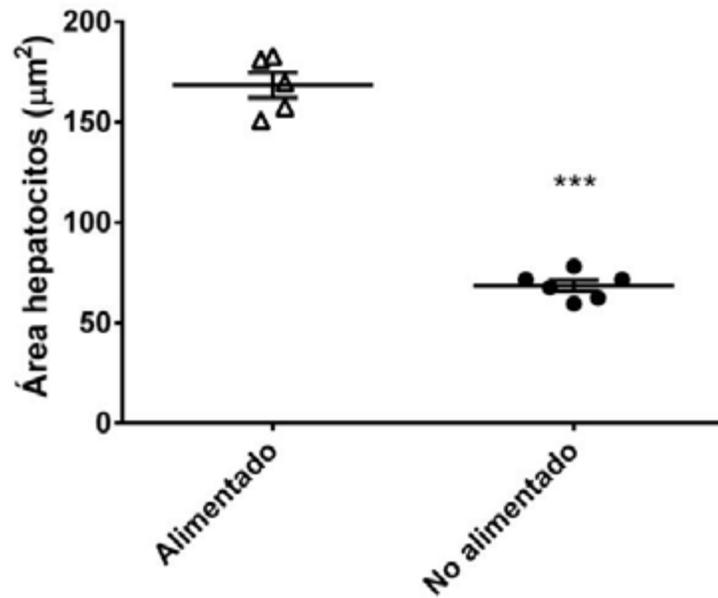


Figura 13: Área en corte transversal a $7\mu\text{m}$ de los hepatocitos de peces alimentados (Δ) y no alimentados (\bullet). Barra horizontal, media; barras verticales, S.E.M. ***, $p < 0,001$.

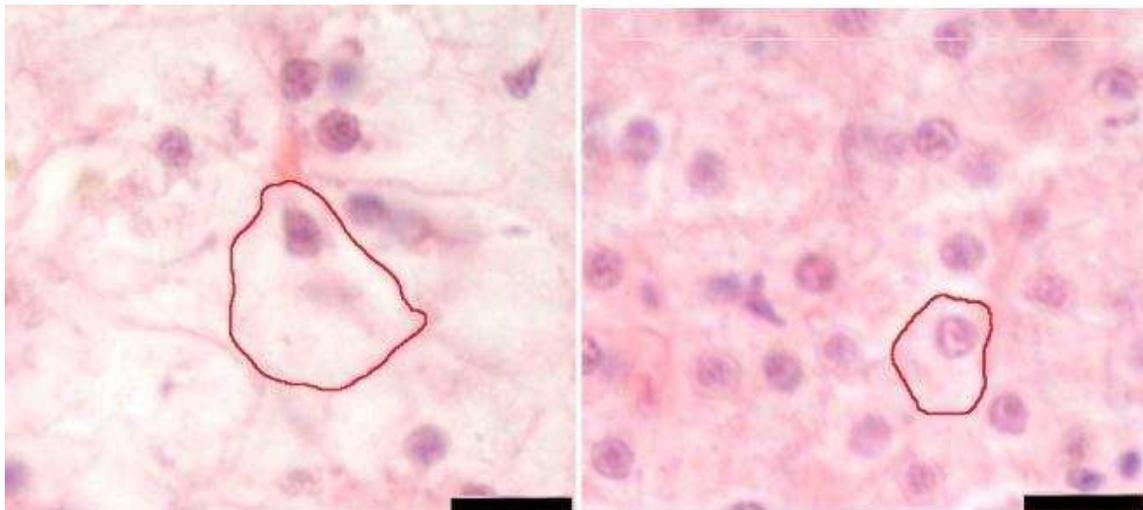


Figura 14: Microfotografías representativas de hepatocitos de peces alimentados (izquierda) y no alimentados (derecha) resaltados en borde color rojo. Coloración: H&E. Secciones de $7\mu\text{m}$. Barra = $10\mu\text{m}$.

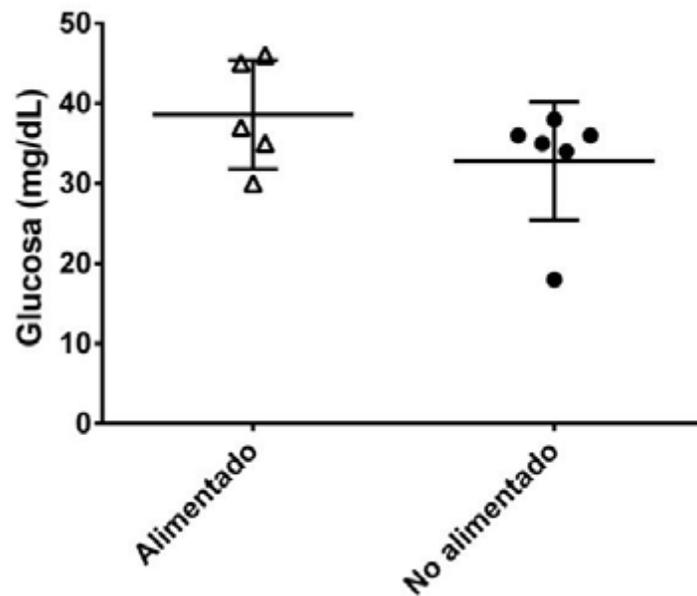


Figura 15: Concentración plasmática de glucosa en peces alimentados (Δ) y no alimentados (●).

Al finalizar las 4 semanas, los peces controles aumentaron un $17,64 \pm 0,51$ % en peso, mientras que los no alimentados perdieron en promedio $5,09 \pm 0,68$ %. Asimismo, el peso corporal de los peces en ayuno fue significativamente menor que en los alimentados ($p=0,0012$) sólo al término del experimento, pues no hubo diferencias en peso al inicio de la aclimatación ni al comienzo del ayuno (Figura 16). Del mismo modo, el largo estándar en el grupo control fue en promedio mayor que en el grupo no alimentado ($p=0,0019$, Figura 17). Paralelamente, las tasas de crecimiento específico para el peso (SGR Peso) y el LS (SGR LS) fueron significativamente menores en los peces no alimentados ($p<0,001$, Figura 18 y 19 respectivamente).

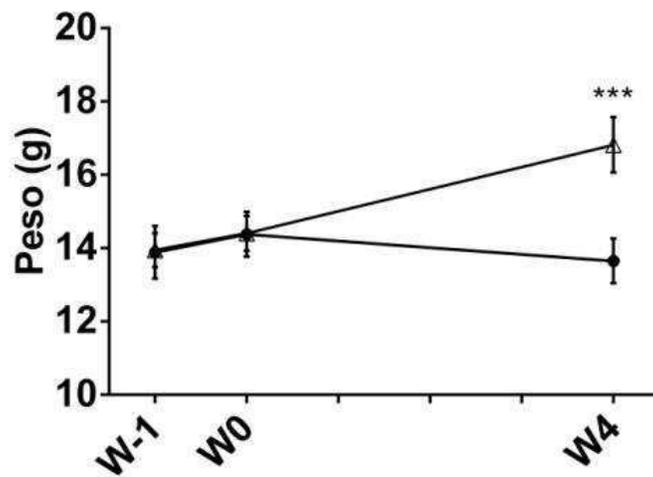


Figura 16: Peso corporal de peces alimentados (Δ) y no alimentados (\bullet) al inicio de la aclimatación (W-1), al comienzo de tratamiento (W0) y al finalizar las 4 semanas ayuno (W4). ***, $p < 0,001$.

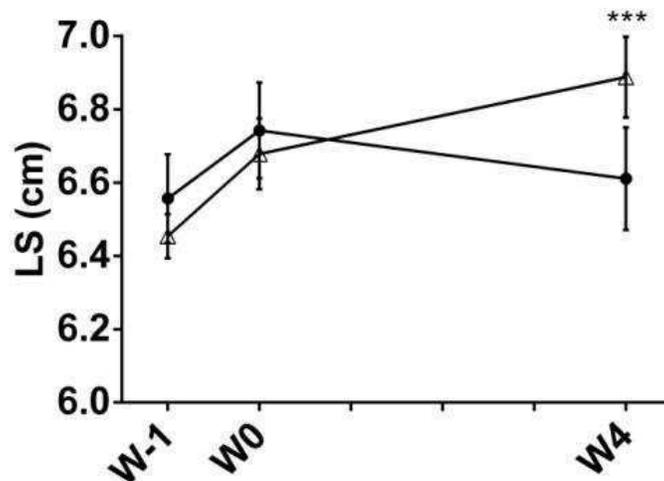


Figura 17: Largo estándar (LS) en peces alimentados (Δ) y no alimentados (\bullet) al inicio de la aclimatación (W-1), al comienzo de tratamiento (W0) y al finalizar las 4 semanas ayuno (W4). Se muestran las medias sin ajustar por la covariable. ***, $p < 0,001$

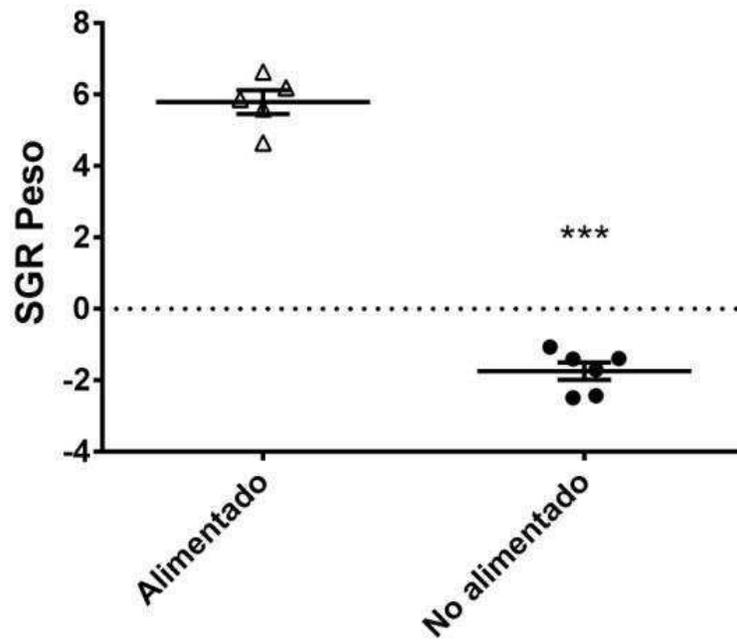


Figura 18: SGR para el peso en peces alimentados (Δ) y no alimentados (●) luego de 4 semanas de ayuno. ***, $p < 0,001$

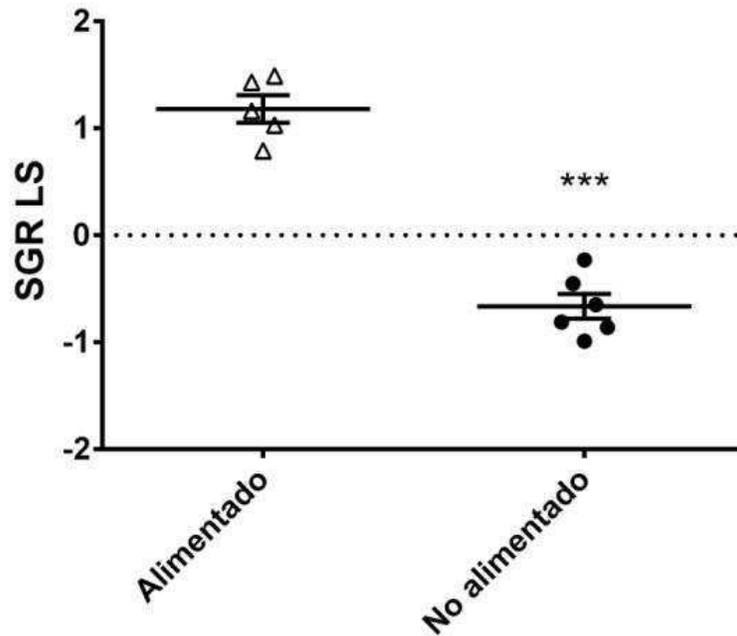


Figura 19: SGR para el largo estándar en peces alimentados (Δ) y no alimentados (●) luego de 4 semanas de ayuno. ***, $p < 0,001$

Expresión de GH, GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2

La expresión de GH no fue afectada por el tratamiento de ayuno ($p > 0,05$, Figura 20). Sin embargo, los niveles de ARNm de GHR2 hepáticos utilizando *primers* diseñados tanto sobre la región extracelular como en la intracelular, fueron mayores en los peces no alimentados (Figura 21). En cambio, los niveles hepáticos de ARNm de GHR1 no fueron afectados por el tratamiento ($p > 0,05$, Figura 21). No hubo diferencias en la relación $GHR2_{ext}/GHR2_{int}$ entre tratamientos en hígado ($p = 0,77$). La expresión en hígado de IGF-1 e IGF-2 tampoco fue diferente entre los peces alimentados y no alimentados ($p < 0,05$, Figura 22 y 23). A nivel muscular, se observó un incremento en la expresión de ARNm de $GHR2_{ext}$ y $GHR2_{int}$, aunque sólo de manera significativa para $GHR2_{int}$ ($p < 0,05$, Figura 24), pero no hubo un efecto significativo del ayuno sobre la expresión de GHR1 ($p > 0,05$, Figura 24). En músculo la relación $GHR2_{ext}/GHR2_{int}$ tampoco fue estadísticamente significativa ($p = 0,15$). Por otra parte, los niveles del transcrito de IGF-1 en músculo fueron menores en los peces no alimentados ($p < 0,01$, Figura 25), pero no se observaron cambios en la expresión de IGF-2 ($p > 0,05$, Figura 26).

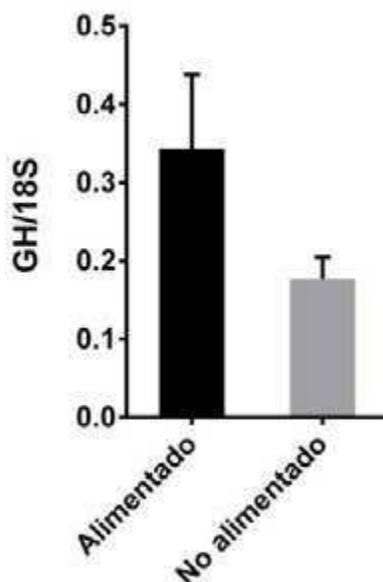


Figura 20: Niveles del transcrito de GH relativos a 18S en hipófisis de peces alimentados (●) y no alimentados (●) luego 4 semanas de ayuno.

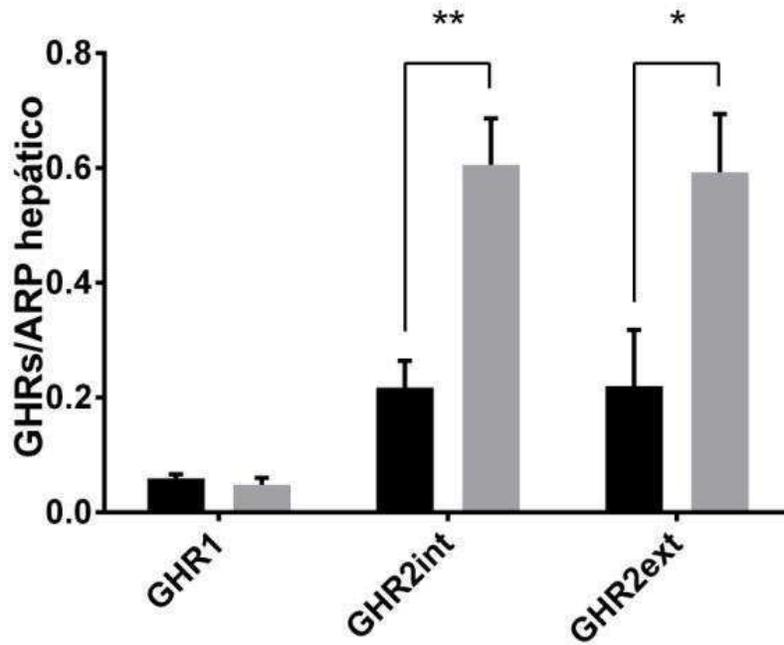


Figura 21: Expresión en tejido hepático de los receptores GHR1, GHR2_{int} y GHR2_{ext} en peces alimentados (●) y no alimentados (◐). Los datos fueron normalizados a la expresión de ARP. *p<0,05; **p<0,01

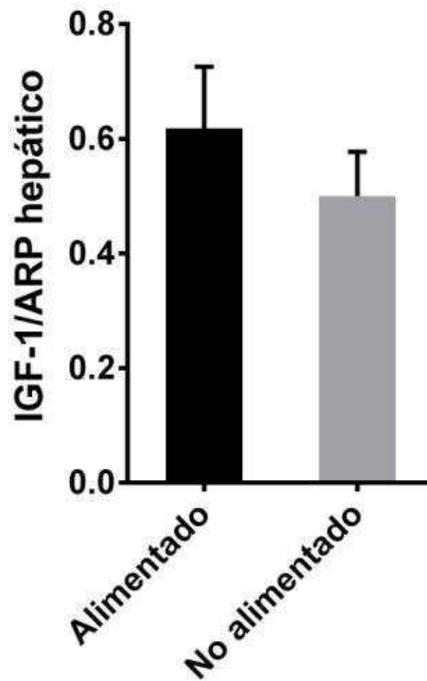


Figura 22: Niveles del transcrito de IGF-1 en hígado en peces alimentados (●) y no alimentados (◐). ARP fue utilizado como gen de referencia.

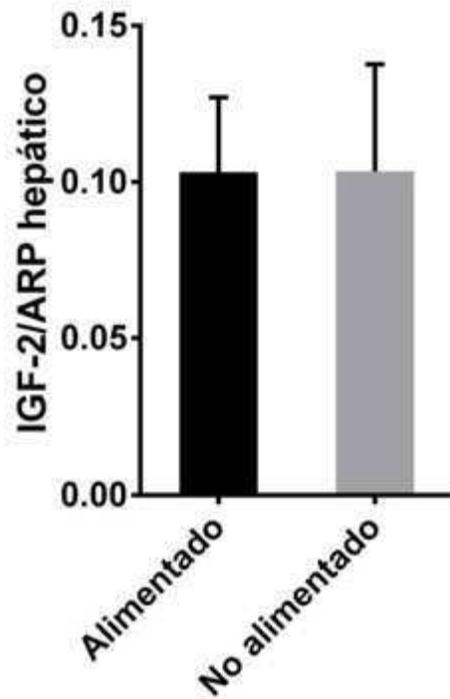


Figura 23: Niveles del transcrito de IGF-2 en hígado en peces alimentados (●) y no alimentados (◐). Valores relativos a ARP.

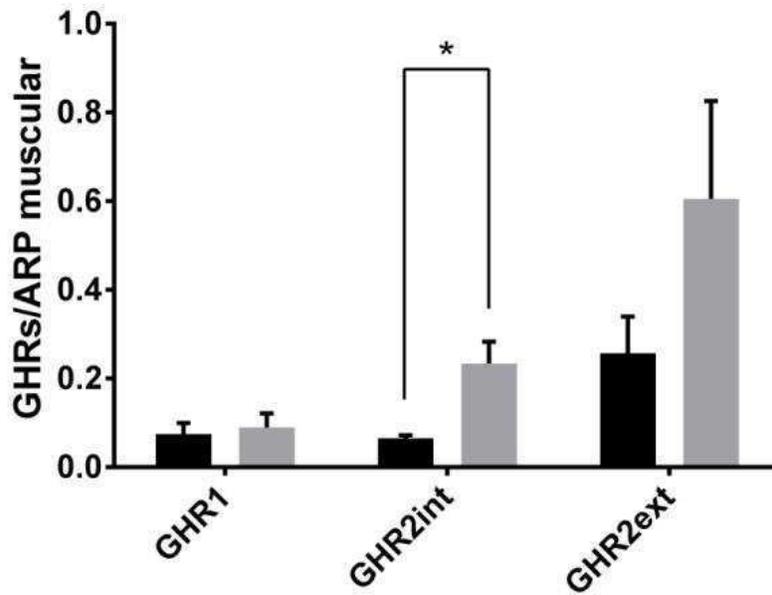


Figura 24: Expresión en músculo de los receptores GHR1, GHR2_{int} y GHR2_{ext} en peces alimentados (●) y no alimentados (◐). Los datos fueron normalizados a la expresión de ARP. *p<0.05

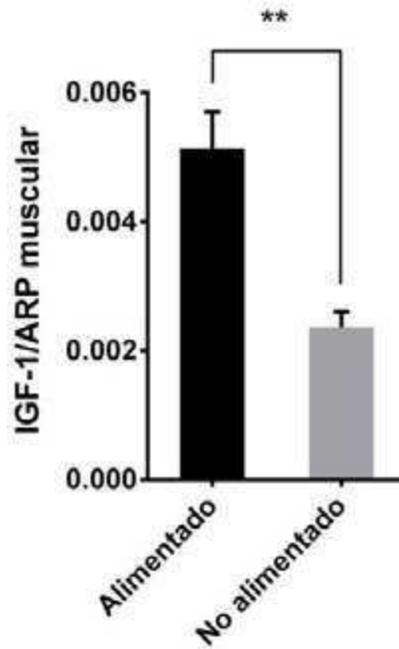


Figura 25: Niveles del transcrito de IGF-1 en músculo en peces alimentados (●) y no alimentados (◐). ARP fue utilizado como gen de referencia. **p<0,01

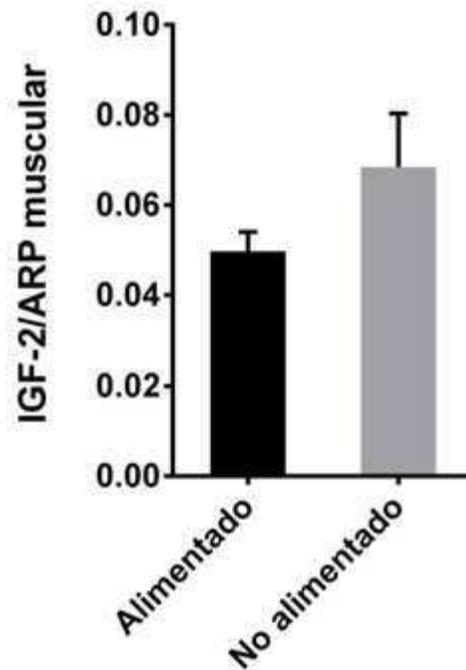


Figura 26: Niveles del ARNm de IGF-2 relativos a ARP en peces controles (●) y no alimentados (◐)

Realimentación

Se realizaron dos experimentos de realimentación: experimento A, de 4 semanas de ayuno y 3 semanas de realimentación; experimento B, de 4 semanas de ayuno y 3 días de realimentación. En primer lugar se llevaron a cabo los experimentos de 3 semanas de realimentación, con el propósito de obtener la curva de crecimiento general durante la realimentación. Posteriormente se desarrollaron los experimentos de realimentación de 3 días para estudiar a tiempos más cortos la respuesta en el crecimiento y fundamentalmente a nivel de la expresión en el eje GH/IGF-1.

A continuación se presentan en primer lugar los resultados de la histología hepática y crecimiento para los experimentos A y B de realimentación. Luego se muestran de manera conjunta los resultados de expresión génica del eje GH/IGF-1.

Histología hepática y parámetros de crecimiento

Experimento A: tres semanas de realimentación

No se detectaron diferencias en el índice hepatosomático ni en el área de los hepatocitos entre los animales alimentados y realimentados ($p > 0,05$, Figura 27 y 28).

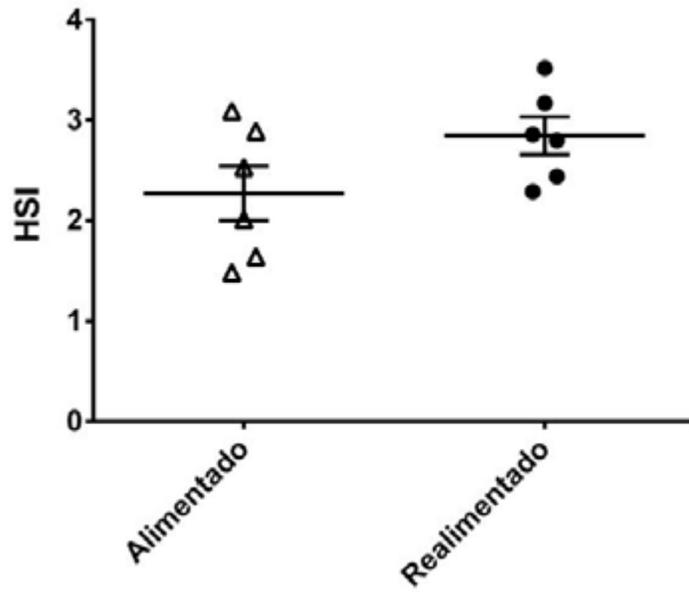


Figura 27: Índice hepatosomático en animales alimentados (Δ) y realimentados (\bullet) por 3 semanas. Se muestran la media y S.E.M.

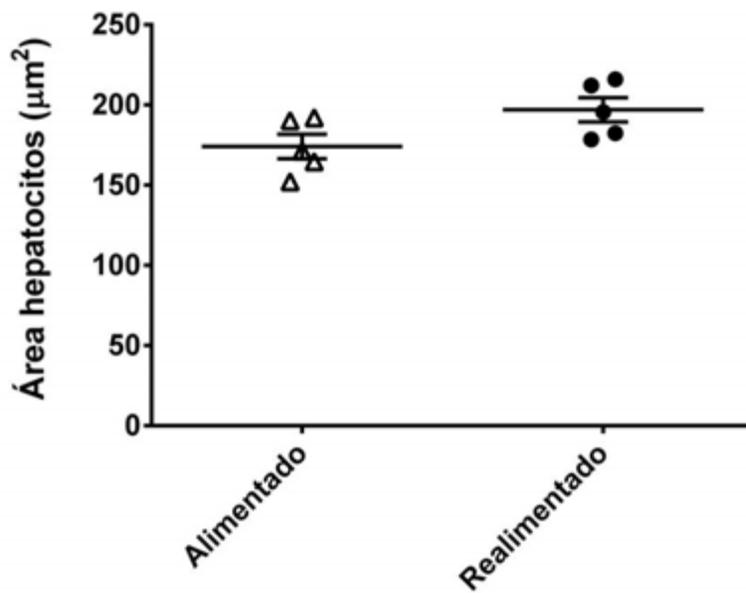


Figura 28: Área de la sección transversal de los hepatocitos correspondientes en cortes de $7\mu\text{m}$ en peces alimentados (Δ) y realimentados por 3 semanas (\bullet) del experimento A. Se muestra la media y el S.E.M.

El experimento de 3 semanas de realimentación muestra que los peces realimentados ganaron más peso y crecieron más durante la primera semana de realimentación (Figura 29). En este periodo, los SGR Peso y SGR LS fueron mayores en el grupo realimentado ($p < 0,001$ en ambos casos). Sin embargo, los SGRs a partir de la segunda semana de realimentación no difieren entre los peces realimentados y controles ($p > 0,05$, Figura 30).

La eficiencia de conversión alimentaria, asimismo, fue mayor en el grupo realimentado durante la primera semana de realimentación ($p < 0,01$, Figura 31), pero no fueron diferentes durante la segunda y tercera semana al compararlas con el grupo control ($p > 0,05$). Por otra parte, no hubo diferencia en la cantidad de alimento ingerido durante las 3 primeras horas luego de la entrega del alimento, ni en ninguno de los puntos intermedio: 10min, 30min, 60min y 180min (Figura 32) durante el periodo de realimentación. A las 24 hs, en ninguno de los casos quedaron *pellets* de alimento no ingeridos.

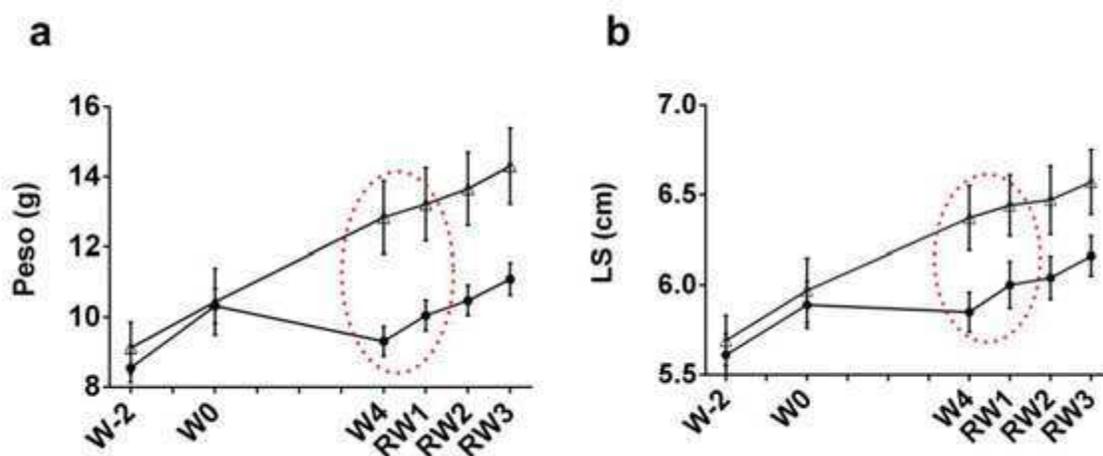


Figura 29: Peso corporal (a) y largo estándar (b) al inicio de la aclimatación (W-2), inicio del ayuno (W0), fin de las 4 semanas de ayuno (W4) y luego de una (RW1), dos (RW2) y tres (RW3) de realimentación en peces alimentados (Δ) y no alimentados-realimentados (\bullet). En rojo (::) se resalta el intervalo donde se registra una tasa de crecimiento acelerado.

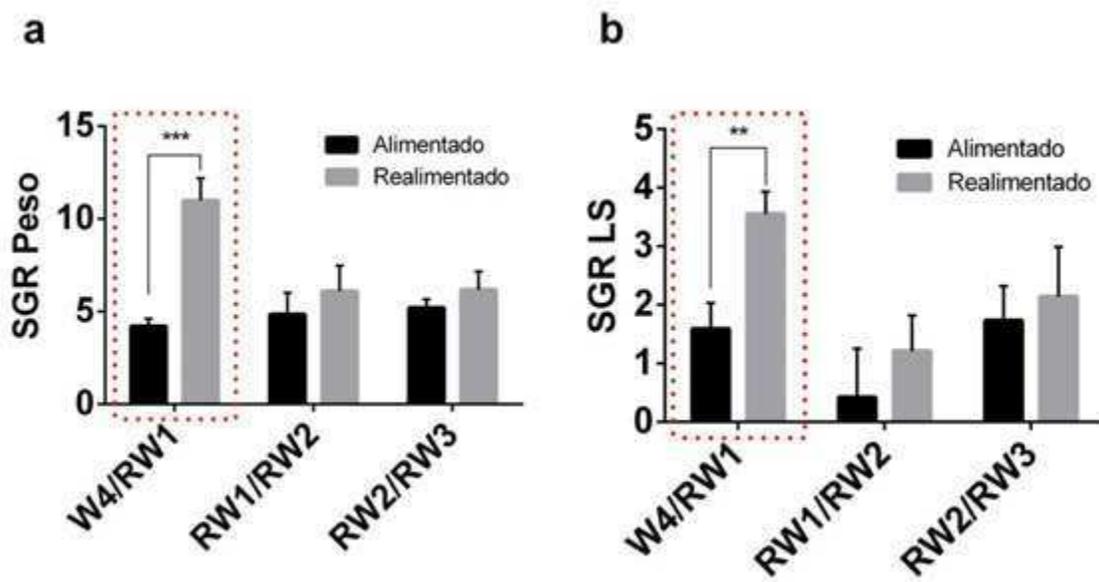


Figura 30: SGR para el peso corporal (a) y largo estándar (b) calculados sobre los intervalos fin del ayuno-primer semana de realimentación (W4/RW1), primera y segunda semana de realimentación (RW1/RW2) y segunda y tercera semana de realimentación (RW2/RW3). En rojo (::) se resalta la fase de crecimiento acelerado. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

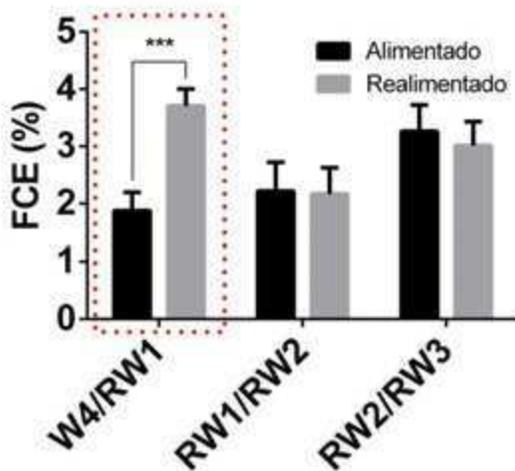


Figura 31: Eficiencia de conversión alimentaria (FCE) en peces alimentados y realimentados durante los intervalos indicados. En rojo (::) se resalta la fase de crecimiento acelerado. *** $p < 0,001$

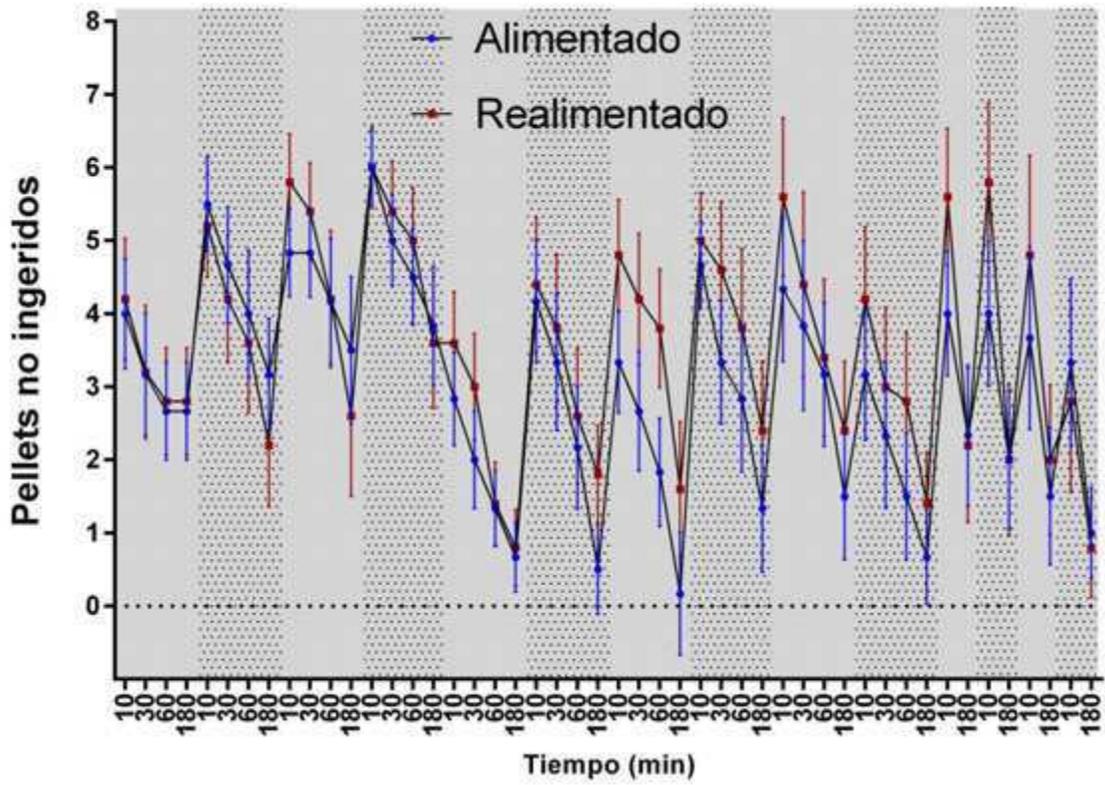


Figura 32: Perfil temporal de la ingesta de alimento durante el periodo de realimentación. Se muestra la cantidad de *pellets* no ingeridos a los 10, 30, 60 y 180 minutos por día luego de la entrega de alimento para los peces alimentados y realimentados.

Experimento B: tres días de realimentación

Luego de tres días de realimentación tras 4 semanas de ayuno, el hígado de los peces realimentados no difiere del de los control, pues no se observan diferencias estadísticamente significativas en el IHS ni tampoco en el área de los hepatocitos ($p < 0,05$, Figura 39 y 40). Por otra parte, se observa una ganancia en peso mayor en los peces realimentados respecto de los controles (Figura 41a), aunque no en LS (Figura 41b). Así mismo, el SGR Peso fue mayor en el grupo realimentado ($p < 0,05$, Figura 42a), pero no hubo diferencias para el SGR LS ($p > 0,05$, Figura 42b). Por otra parte, los peces realimentados mostraron una FCE mayor que los peces del grupo control ($p < 0,05$, Figura 43). No hubo diferencias en la dinámica de la ingesta durante estos 3 días de realimentación.

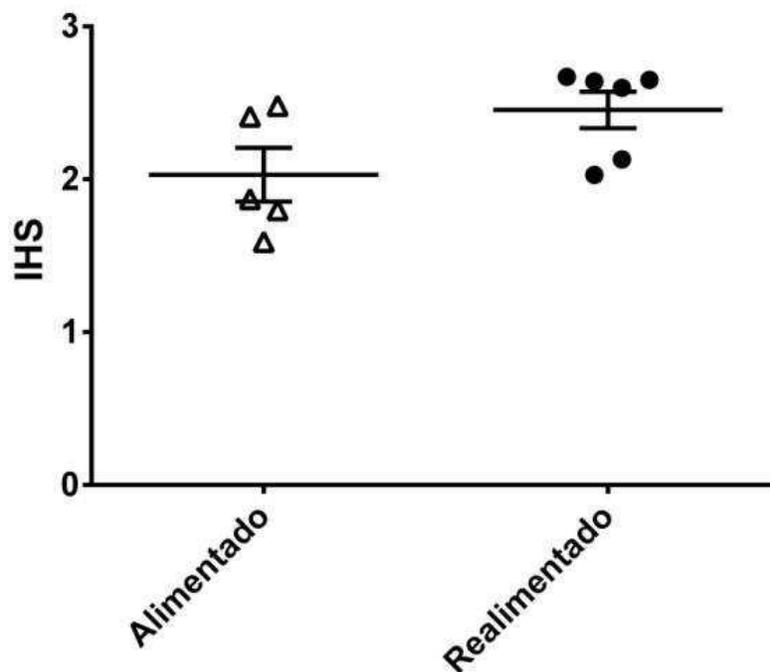


Figura 33: Índice hepatosomático en animales alimentados (Δ) y realimentados (\bullet) por 3 días.

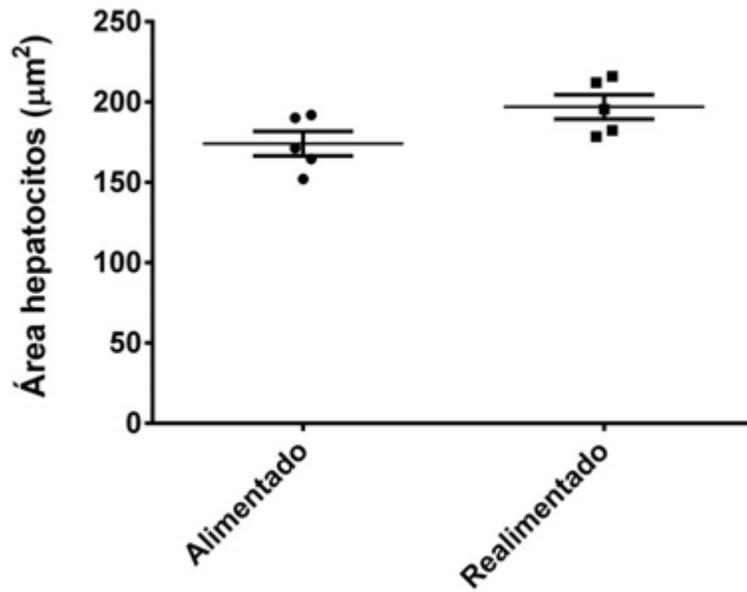


Figura 34: Área de la sección transversal de los hepatocitos correspondientes en cortes de 7µm en peces alimentados (Δ) y realimentados por 3 días (●) del experimento B.

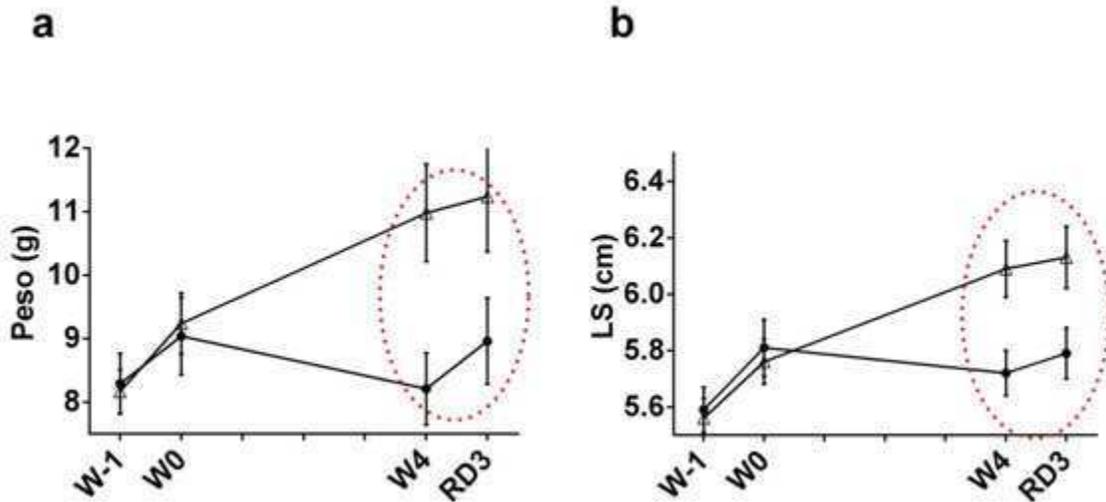


Figura 35: Peso corporal (a) y largo estándar (b) al inicio de la aclimatación (W-1), inicio del ayuno (W0), fin de las 4 semanas de ayuno (W4) y luego de 3 días de realimentación (RD3) en peces alimentados (Δ) y no alimentados-realimentados (●). En rojo (::) se resalta el intervalo donde se registra una tasa de crecimiento acelerado.

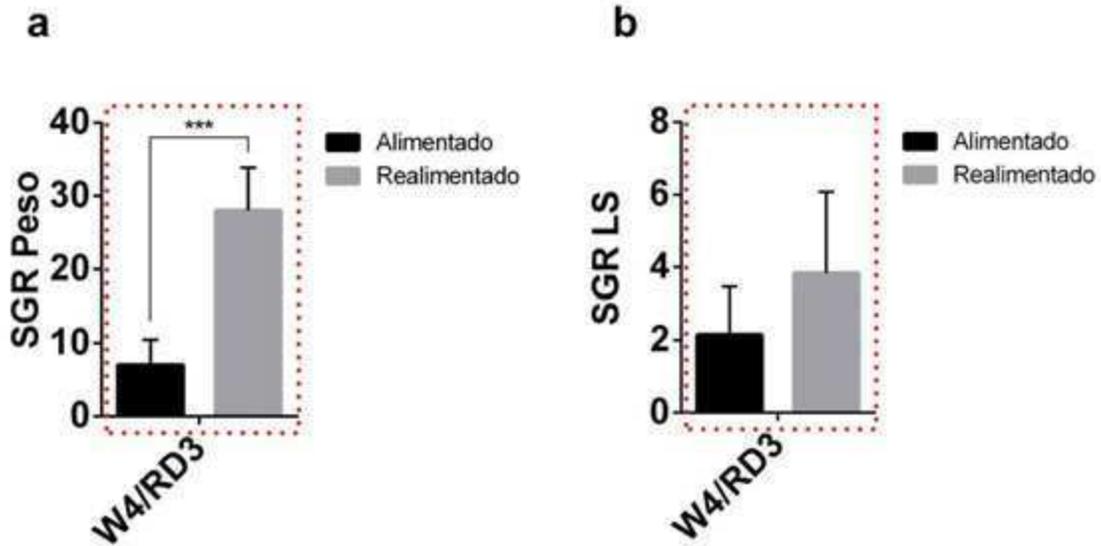


Figura 36: SGR para el peso corporal (a) y largo estándar (b) calculados sobre los intervalos fin del ayuno-primeros 3 días de realimentación (W4/RD3). En rojo (::) se resalta la fase de crecimiento acelerado. *** $p<0,001$

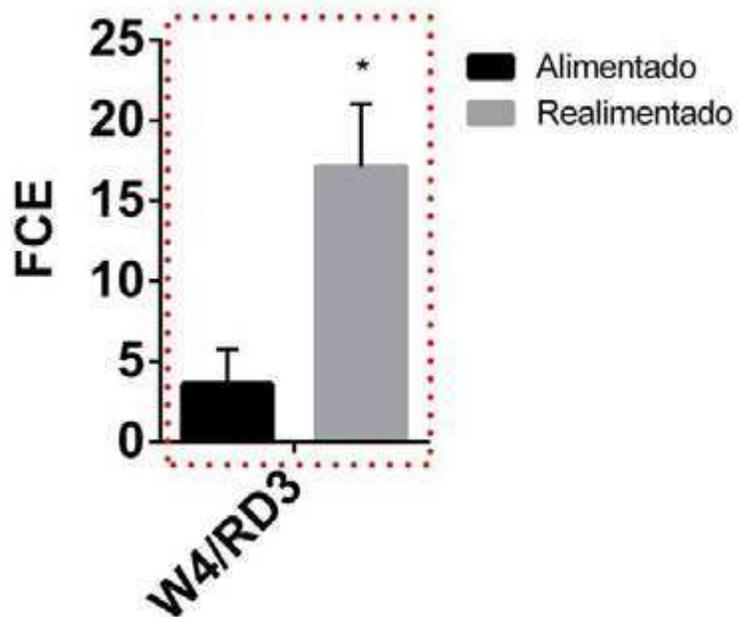


Figura 37: Eficiencia de conversión alimentaria (FCE) en peces alimentados y realimentados durante 3 días de realimentación (W4/RD3). En rojo (::) se resalta la fase de crecimiento acelerado. * $p<0.05$

Expresión de GH, GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2 durante la realimentación a 3 días y 3 semanas

Dado que se observó una fase de crecimiento acelerado hasta la primera semana de realimentación, los cambios a nivel del eje GH/IGF-1 necesariamente debieron haber ocurrido en algún tiempo intermedio. Por tanto, se decidió analizar los niveles de transcrito de GH, GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2 a los 3 días y 3 semanas de realimentación.

La expresión génica de GH fue más alta en los peces realimentados por 3 días en relación al control ($p = 0,023$), aunque a la tercera semana de realimentación ya no se detectaron diferencias (Figura 38). A su vez, los niveles del transcrito de GHR1 en hígado no fueron estadísticamente diferentes entre los peces realimentados por 3 días y 3 semanas comparado a sus respectivos controles (Figura 39). En cuanto a GHR2 hepático, no se observaron diferencia entre los peces realimentados y los controles en ninguno de los experimentos de realimentación (Figura 40). También a nivel hepático, no hubo diferencias en la expresión de IGF-1 entre los animales realimentados y controles a los días ni tampoco a las 3 semanas (Figura 41). Los niveles de IGF-2 tanto hepático como muscular no fueron diferentes entre los peces realimentados por 3 días y el control (Figura 42). No fue posible medir IGF-2 en el experimento A debido a dificultades técnicas.

A nivel muscular, no hubo diferencias de expresión entre los peces realimentados y control para ninguno de los genes analizados a los 3 días y 3 semanas de realimentación, GHR1 (Figura 43), GHR2 (Figura 44), IGF-1 (Figura 45) e IGF-2 (Figura 42). No fue posible medir IGF-1 en músculo en el experimento A debido a problemas técnicos.

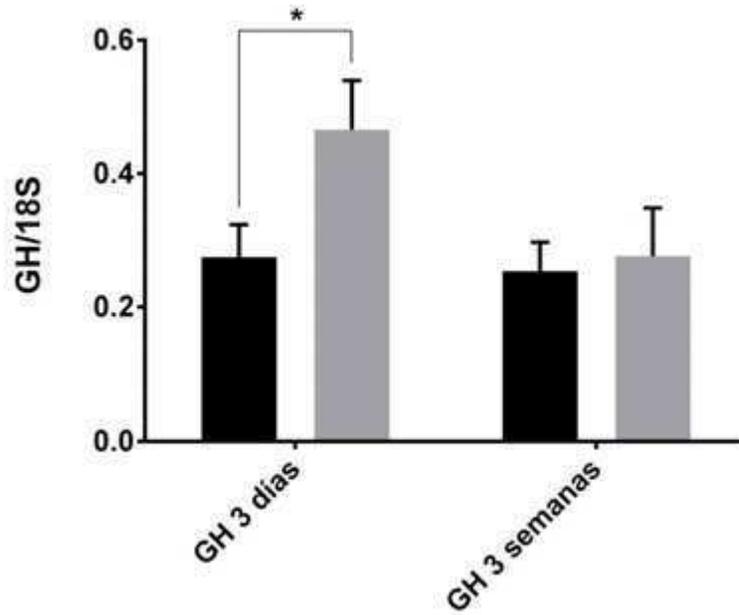


Figura 38: Niveles del transcrito de GH relativos a 18S en hipófisis de peces alimentados (●) y no alimentados (◐) luego a los tres días (RD3) y tres semanas de realimentación (RW3). * $p < 0.05$

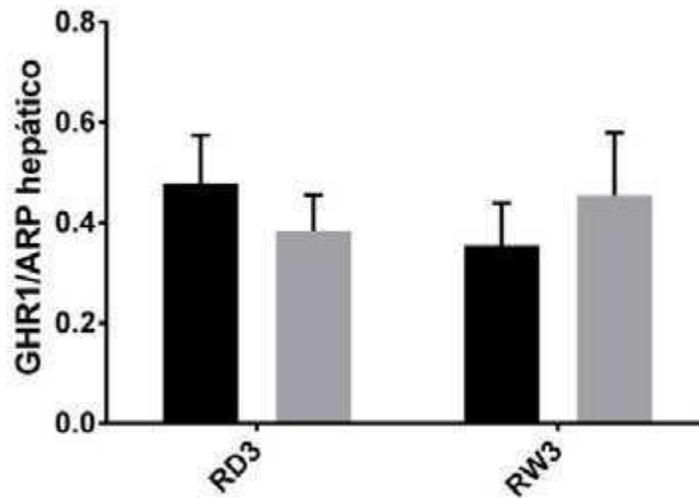


Figura 39: Niveles de ARNm de GHR1 hepático relativos a ARP en peces alimentados (●) y realimentados (◐) a los 3 días y 3 semanas de realimentación.

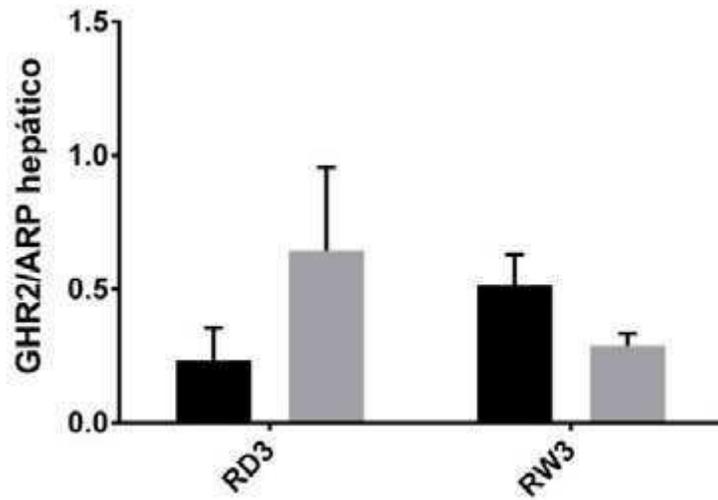


Figura 40: Expresión de GHR2 en hígado relativo a ARP a los tres días y tres semanas de realimentación en peces alimentados (●) y realimentados (◐) a los 3 días y 3 semanas de realimentación.

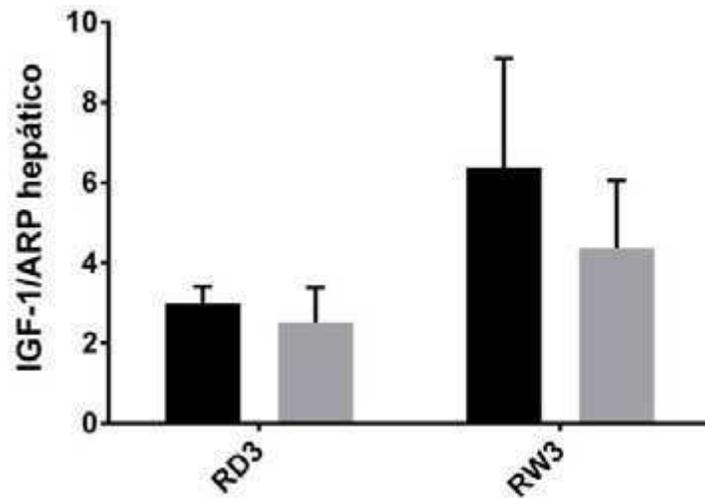


Figura 41: Niveles de ARNm de IGF-1 relativos a ARP en hígado en animales alimentados (●) y realimentados (◐) a los tres días y 3 semanas de realimentación.

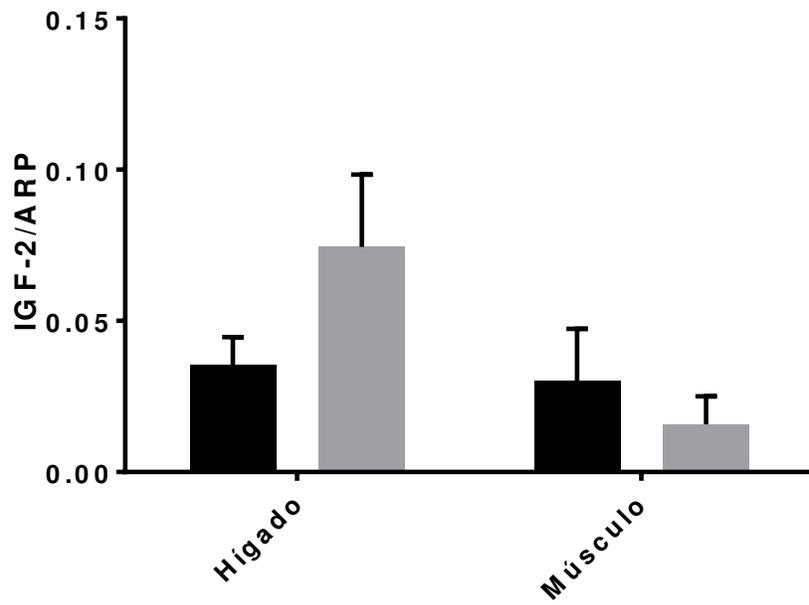


Figura 42: Niveles de IGF-2 relativos a ARP en hígado y músculo en animales control (●) y realimentados por 3 días (◐).

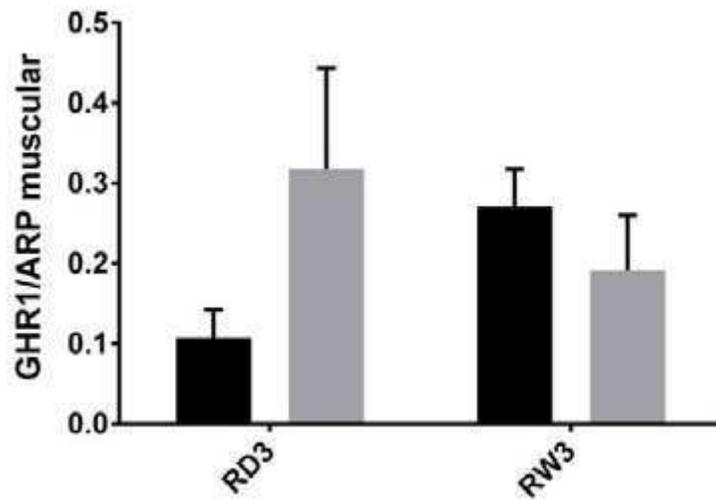


Figura 43: Expresión de GHR1 relativo a ARP en músculo en peces alimentados (●) y realimentados (◐) a los tres días y tres semanas de realimentación.

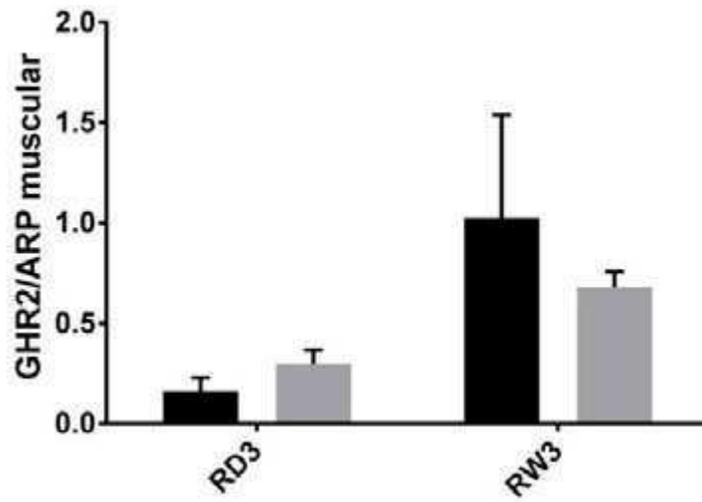


Figura 44: Niveles de ARNm de GHR2 relativos a ARP en músculo en peces alimentados (●) y realimentados (◐) por 3 días o tres semanas de realimentación.

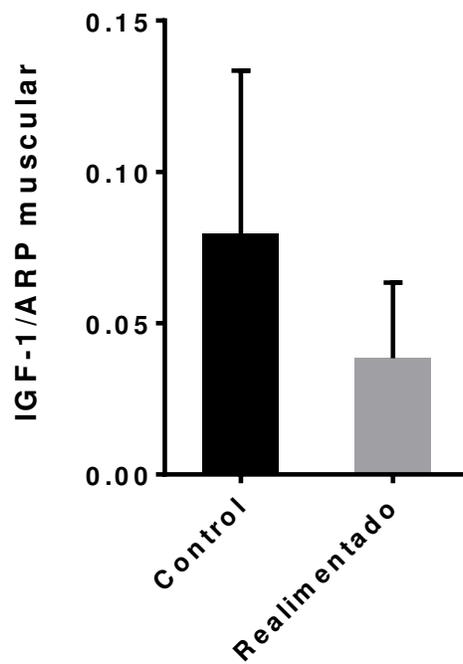


Figura 45: Niveles de IGF-1 relativos a ARP al tercer día de realimentación en músculo para animales control (●) y realimentados (◐).

-Discusión-

Impacto del ayuno prolongado sobre el crecimiento somático

Los resultados obtenidos muestran que el ayuno prolongado tiene un efecto negativo en el crecimiento somático. Cuatro semanas de tratamiento condujeron a una disminución promedio del $5,09 \pm 0,68\%$ del peso corporal en los peces ayunados, mientras que los controles aumentaron un $16,61 \pm 2,57\%$ en el mismo lapso (Figura 16). Sin embargo, para evaluar el crecimiento somático no es suficiente con analizar el peso corporal, pues la variación en peso es la resultante de cambios en el tamaño de las vísceras, como el hígado y las gónadas, tejido adiposo y tejido muscular, y pueden no estar reflejando el crecimiento somático directamente sino más bien evidenciar un proceso de engorde (Beckman, 2011). Así, las mediciones del largo estándar mostraron que los peces ayunados fueron significativamente más chicos que los controles tras 4 semanas de ayuno, pero que no diferían entre sí al comienzo del mismo (Figura 17). Esto demuestra que el ayuno efectivamente condujo al arresto del crecimiento longitudinal. Además de tomar los valores absolutos del peso corporal y el largo estándar, se calcularon los valores de la tasa específica de crecimiento para ambos parámetros (Figuras 18 y 19). Tanto el SGR del peso como del largo fueron menores en los peces no alimentados. En particular, se puede observar que el SGR del peso fue negativo en éstos últimos, lo cual denota la pérdida neta de masa corporal. Sorprendentemente, el SGR para el largo también fue menor a 0 en estos peces, lo cual indicaría un decrecimiento en largo. Una explicación posible es la introducción de un sesgo durante la toma de datos, hecho que se descarta pues el operador no poseía conocimiento *a priori* del tratamiento ni de las mediciones previas de cada unidad experimental. Otra alternativa posible es que el ayuno provoque un cambio en la forma anatómica de estos animales.

El índice hepatosomático es un indicador del estado nutricional en los peces. Picha y col. (2008) en el híbrido *Morone chrysops* (Perciformes) x *Morone saxatilis* (Perciformes) y Uchida y col. (2003) en la tilapia *O. mossambicus* han observado una gran reducción en el IHS en experimentos de ayuno de 3 y 2 semanas respectivamente. Los resultados de la presente Tesis están en línea con estos antecedentes y muestran una caída significativa en el IHS tras 4 semanas de ayuno (Figura 12). La reducción en el IHS podría deberse a una disminución en el número total de hepatocitos y/o a una reducción en el tamaño de los mismos. En este trabajo, a partir de técnicas histológicas aplicadas a las muestras de hígado se determinó que el área de los hepatocitos, utilizado como indicador del tamaño celular, fue significativamente menor en los peces no alimentados (Figura 13 y 14). No se realizaron estudios específicos para evaluar si hubo una disminución en el número de los mismos. Sin embargo, en estudios realizados en ratas, se ha observado que el ayuno puede inducir apoptosis (Grasl-Kraupp y col., 1994). Por otra parte, los niveles de glucosa plasmática no fueron alterados por el ayuno (Figura 15), lo cual sugiere que el nivel de glucosa plasmática no sería un buen indicador general del estado nutricional en esta especie.

Impacto del ayuno sobre el sistema GH/IGF-1

Los niveles de ARNm de la hormona de crecimiento no fueron alterados por las 4 semanas de ayuno (Figura 20), lo cual estaría de acuerdo con que tampoco se detectaron cambios en la expresión de IGF-1 hepático (Figura 22). Estos resultados son similares a los obtenidos para la expresión de GH en otras especies. Por ejemplo, los niveles de ARNm de GH no fueron alterados por 2 semanas de ayuno en *Ictalurus punctatus* (Siluriformes) (Small & Peterson, 2005), aunque sí a las 4 semanas, donde se observó un incremento en los peces no alimentados (Peterson y col., 2009). En general, se espera que los niveles plasmáticos de GH aumenten durante el ayuno prolongado, o que no varíen, según la hipótesis de resistencia a GH (Fox y col., 2006; Gabillard y col., 2006; Fuentes y col. 2011).

Desafortunadamente, no fue posible medir GH en plasma para contrastar esta hipótesis debido a que la técnica de ELISA para esta hormona está siendo desarrollada actualmente en una especie filogenéticamente relacionada. Por este motivo se espera obtener mediciones para GH una vez esté disponible la técnica.

En peces teleósteos hay dos tipos de receptores para GH, denominados GHR1 y GHR2 (Saera-Vila y col., 2005; Jiao y col., 2006) y se sabe que los mismos pueden ser regulados diferencialmente en distintas condiciones experimentales (Saera-Vila y col., 2005; Gabillard y col., 2006; Benedito-Palos y col., 2007; Sitjà -Bobadilla y col., 2008; Saera-Vila y col., 2009; Jiao y col., 2006). Los resultados de la presente Tesis muestran que 4 semanas de ayuno conducen a un incremento en la expresión de GHR2 (Figura 21) pero no de GHR1 (Figura 21), mostrando que ambos receptores son regulados diferencialmente en estas condiciones experimentales. Por otra parte, los niveles de ARNm de IGF-1 hepático no fueron alterados por el ayuno. En estudios previos se ha observado un aumento en la concentración plasmática de GH durante el ayuno, pero un descenso en la concentración plasmática de IGF-1. La pérdida de sensibilidad del hígado, principal fuente de IGF-1 en plasma, frente al aumento de GH se ha denominado “resistencia a GH” y es explicada por el descenso en la expresión de los receptores de GH en hígado (Fuentes y col., 2011). Sin embargo, varios estudios han mostrado que no siempre se satisface este modelo. Uchida y col. (2003) no observaron cambios en los niveles plasmáticos de GH tras 2 semanas de ayuno en *O. mossambicus*, como así tampoco Vijayan y col. (1996) luego de 17 días de ayuno en la misma especie. En cuanto a IGF-1 hepático, otros estudios no observaron cambios en los niveles de ARNm debido al ayuno prolongado (Pierce y col., 2007; Gao y col., 2011). Además, Pierce y col. (2007) han mostrado que la expresión en hígado de los receptores de GH no son alterados por el ayuno en *O. mossambicus*, resultados similares a los obtenidos por Fox y col. (2009) en *O. niloticus* tras 1, 2 y 3 semanas de ayuno. Más aún, otros estudios muestran incluso que los niveles de ARNm en hígado de GHR1 y/o GHR2 se ven incrementados por el ayuno (Gao y col., 2011; Gabillard y col., 2006). De esta manera, los resultados obtenidos en la presente Tesis no conciben con el modelo de “resistencia a GH” y apoyan una visión más amplia en la regulación del sistema GH/IGF-1 tal como ha

sido descrito en los trabajos mencionados. Sin embargo, es posible que los cambios ocurran a nivel de regulación postraduccional. En relación a GHR2, existe otra posibilidad para el aumento en su expresión en hígado tras el ayuno. En mamíferos se han descrito otras isoformas del receptor para GH, una isoforma larga (GHR_{fl}), una isoforma truncada anclada a membrana plasmática (GHR_{tr}) y una isoforma soluble o proteína de unión a GH (GHBP). Estas isoformas también han sido descritas en algunas especies de peces teleósteos. Tanto GHR_{tr} como GHBP carecen de la región intracelular del receptor, sin los motivos Box1 ni Box2, siendo en consecuencia no funcionales. De modo que el aumento en GHR2 que se observa en el presente trabajo podría deberse a un aumento de su isoforma truncada y/o soluble, no funcional. Sin embargo esto podría ser en principio descartado, pues la relación entre GHR2_{int}/GHR2_{ext} medidos por RT-qPCR no fue significativamente distinta entre los peces controles y ayunados. Si los niveles de ARNm de las isoformas truncadas del receptor fueran mayores a las del receptor entero, entonces la señal amplificada por RT-qPCR con *primers* diseñados sobre la región extracelular (GHR2_{ext}) debería ser mayor a la obtenida por *primers* diseñados sobre la región intracelular en los peces ayunados, pues en el primer caso se estaría amplificando tanto la forma completa del receptor como las truncadas. Este resultado indica que no se estaría produciendo GHR2_{tr} ni GHBP mediante *splicing* alternativo. Otra posibilidad es que tal como se ha descrito en algunos mamíferos, GHBP se esté produciendo por proteólisis (Edens & Talamantes, 1998). Si este fuera el caso, el aumento de GHR2 sería debido al aumento de la síntesis de GHBP en los peces no alimentados. Se ha propuesto que GHBP puede actuar como un antagonista del receptor para GH dado que competiría por la unión al ligando y/o por la formación de heterodímeros con el monómero funcional de GHR2 (Baumann, 2002). Hay otras explicaciones alternativas, como por ejemplo que las variaciones se den a nivel proteico más que a nivel de ARNm. Se necesitan de experimentos adicionales para dilucidar estas hipótesis.

A nivel muscular los resultados muestran un aumento en los niveles del transcripto de GHR2 (Figura 24) y una disminución de IGF-1 (Figura 25) en los peces ayunados. El

aumento de GHR2 muscular parece ser un hecho general inducido por el ayuno prolongado, pues se ha observado en varias especies de teleósteos como por ejemplo en *O. mossambicus* (Pierce y col., 2007; Fox y col., 2010), *O. mykiss* (Gabillard y col., 2006), *S. aurata* (Saera-Vila y col., 2005) y *Morone chrysops X Morone saxatilis* (Picha y col., 2008). Al igual que en hígado, no se detectaron diferencias en la relación GHR2ext/GHR2int y por tanto el ayuno no estaría induciendo la síntesis de las isoformas truncadas de GHR2 por *splicing* alternativo. Por otra parte, la disminución en la síntesis de ARNm de IGF-1 parece contraponerse al aumento de GHR2. Sin embargo, tal como se explicó para los resultados obtenidos en hígado, GHR2 puede ser clivado por proteólisis para dar GHBP, pues se ha descrito que GHBP es sintetizado ubicuamente (Baumann, 2002).

En relación a los GHRs, la expresión en músculo de GHR1 no se vio afectada por el ayuno, como así tampoco en hígado. Estos resultados resaltan la regulación diferencial de GHR1 y GHR2 en condiciones de ayuno. Además, se ha demostrado en *C. dimerus* que los niveles de GHR1 aumentan luego de 15 días de adaptación a un ambiente oscuro al mismo tiempo que aumentan los niveles de ARNm y el contenido proteico de SL en hipófisis, aunque no se analizó a GHR2 (Cánepa y col., 2012). Los estudios de Fukada y col. (2004, 2005) y Fukamachi & Meyer (2007) propusieron a GHR1 como el receptor para SL y a GHR2 para GH. Los resultados de la presente Tesis están en línea con estas propuestas debido al hecho de que el ayuno afecta a diferencialmente a GHR2 y no a GHR1, y por otra parte, a que la expresión de GHR1 está asociada a cambios en la coloración y a los niveles de SL. Sin embargo, a pesar de que son resultados esperados bajo la hipótesis planteada, no constituyen evidencia suficiente para determinar la especificidad de los receptores por GH o SL. De hecho, los estudios realizados por Chen y col. (2011) en *D. rerio* contradicen de manera rotunda las propuestas de Fukada y col. (2004) y Fukamachi & Meyer (2007).

Al igual que IGF-1, los niveles de IGF-2 en hígado no fueron alterados por el ayuno (Figura 23). Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Fox y col. (2006) en *O. mossambicus*, donde 4 semanas de ayuno no afectaron la expresión de IGF-2 en hígado y tampoco en músculo. Además, Montserrat y col. (2007) en *O. mykiss* no observaron cambios en los niveles del transcripto de IGF-2 en ninguno de los tejidos tras 1, 2 y 4

semanas de ayuno. Por otra parte, otros investigadores han encontrado que el ayuno conduce a una disminución en la expresión de IGF-2 en hígado (Gabillard y col., 2006; Picha y col. 2008). Gabillard y col. (2006) además, mostraron una disminución en la concentración plasmática de IGF-2. A nivel muscular, IGF-2 tampoco fue afectada por 4 semanas de ayuno (Figura 26), mientras que sí se detectó una disminución en la expresión de IGF-1. Estos resultados ponen de manifiesto una regulación diferencial entre IGF-1 e IGF-2 en músculo en *C. dimerus*, lo cual resulta interesante pues ambas hormonas actuarían a través del mismo receptor, IGF-2R.

Impacto de la realimentación sobre el crecimiento somático

Habiendo demostrado que el ayuno prolongado provoca un arresto en el crecimiento somático y un descenso en el peso, surge la pregunta de si estos cambios son completa o parcialmente revertidos luego de un período de realimentación. Así, tras 3 semanas de realimentación no se lograron revertir completamente los efectos del ayuno por 4 semanas sobre el largo y peso (Figura 29). A las 3 semanas de realimentación los peces realimentados fueron significativamente más pequeños y de menor peso que los controles. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras especies de peces teleósteos. Por ejemplo, Fox y col. (2010) realizaron un protocolo de realimentación tras 4 semanas de ayuno en la tilapia *O. niloticus* en el cual el peso de los peces realimentados seguía siendo menor a los controles tras ocho semanas de realimentación. Desafortunadamente, este último estudio no incluyó datos del largo, que como se ha discutido previamente, reflejan en modo directo el crecimiento somático. Resultados similares fueron obtenidos en *Seriola quinqueradiata* (Perciformes) por Fukada y col. (2012), con 3 semanas de ayuno y 2 de realimentación; en *O. mykiss* por Montserrat y col. (2007), con 2 y 3 semanas de ayuno y 4 semanas de realimentación; en *S. aurata* por Peres y col. (2011) con una y 2 semanas de ayuno y 8 semanas de realimentación; en *Lates calcarifer* (Perciformes) por Tian y col. (2003) con 2 y 3 semanas de ayuno y 4 y 3 semanas

de realimentación respectivamente; y en la tilapia híbrida *O. mossambicus* X *O. niloticus* por Wang y col. (2000) con 2 y 4 semanas de ayuno y 6 y 4 semanas de realimentación respectivamente. Sin embargo, en algunos de estos estudios, el descenso en el peso pudo ser revertido completamente con la realimentación cuando el ayuno fue de una semana (Wang y col., 2000; Tian y col., 2003; Montserrat y col., 2007). Por otra parte, en un estudio llevado a cabo en *Leiocassis longirostris* (Siluriformes) (Zhu y col., 2005) se observó una recuperación total del peso corporal a partir de las 2 semanas de realimentación luego de 2 y 3 semanas de ayuno. Además, en un estudio de revisión (Ali y col., 2003) se mencionan casos en los cuales la realimentación conduce a una sobrecompensación en el crecimiento en peso, donde los animales realimentados llegan a tener mayor peso que los controles. A pesar de que la realimentación en muchos casos no logra revertir completamente los efectos del ayuno sobre el crecimiento, frecuentemente se observa que la ganancia en peso y/o largo durante las primeras semanas de realimentación es mayor en los animales realimentados. Esto significa un aumento en la tasa de crecimiento específico en la realimentación y se denomina “crecimiento compensatorio”. En la Figura 29 se puede apreciar que el aumento en peso y largo durante la primera semana de realimentación (marcada en un círculo rojo) es más pronunciado en los peces realimentados, indicativo de crecimiento compensatorio. Para poner a prueba esa hipótesis, se calcularon los SGR para el peso y largo en ese periodo y en las 2 semanas subsiguientes (Figura 30a,b). Estos resultados muestran que el SGR para ambos parámetros en los peces realimentados es más de dos veces que el valor registrado en los controles, dando soporte a la hipótesis de crecimiento compensatorio. Sin embargo, este fenómeno ya no se observa a partir de la segunda semana, donde los controles y realimentados crecen a igual tasa. De manera interesante, es justamente durante la primera semana de realimentación donde se observa un aumento significativo en la eficiencia de conversión alimentaria en los peces realimentados, volviendo al valor de los controles a partir de la segunda semana (Figura 31). Por tanto, se puede inferir que el crecimiento acelerado durante la primera semana se debe, al menos en parte, al aumento en la FCE. Alternativamente o de modo complementario, el crecimiento compensatorio

puede ser explicado por el aumento en la cantidad de alimento ingerido o hiperfagia. Este último caso es descartado en el presente trabajo ya que a todos los peces se les administró una cantidad única de alimento correspondiente al 1,5% del peso corporal. El perfil de ingesta durante las 3 primeras horas no fue diferente entre los realimentados y controles durante toda la fase de realimentación (Figura 32), pues es esperable que si hubiese habido hiperfagia, la misma podría haber sido reflejada por un corrimiento hacia la izquierda en el perfil de ingesta, es decir, un aumento en la cantidad de alimento ingerido por unidad de tiempo, hecho que no fue observado. De este modo, queda claro que el crecimiento compensatorio puede tener dos causas principales, la hiperfagia y el aumento en la FCE. Al respecto, algunos estudios adjudican dicho fenómeno únicamente a la hiperfagia (Miglav & Jobling, 1989; Jobling & Koskela, 1996; Wang y col., 2000; Tian y col., 2003), al aumento en la FCE (Boujard y col., 2000) o a ambos (Russell & Wootton, 1992; Qian y col., 2000). En el presente trabajo la evidencia indica que el crecimiento compensatorio observado durante la primera semana de realimentación es debido al aumento en la eficiencia de conversión alimentaria. Inesperadamente, el SGR del peso calculado a los 3 días de realimentación fue mayor (aproximadamente tres veces respecto al control) al obtenido a la semana (aproximadamente el doble respecto al control) (comparar Figuras 30 y 36), perfil repetido para los valores de FCE (Figuras 31 y 37). Estos datos muestran que el organismo responde de manera inmediata al restablecimiento de la alimentación, ganando peso rápidamente debido al rápido incremento en la eficiencia de conversión alimentaria. Durante estos primeros 3 días de realimentación tampoco se observó hiperfagia. Por otra parte, este periodo de realimentación no fue suficiente para inducir un aumento en el SGR para el largo. Esto sugiere que el primer parámetro en responder a la realimentación es el peso corporal.

Puesto que a las 3 semanas de realimentación tanto los controles como los peces realimentados crecen a igual tasa, se espera que su estado nutricional no sea diferente. De hecho, el cálculo del índice hepatosomático no evidenció diferencias entre ambos grupos, como así tampoco en lo que respecta al tamaño de los hepatocitos (Figuras 27 y 28). Es importante notar que estos parámetros fueron severamente reducidos tras 4

semanas de ayuno, lo cual demuestra que un protocolo de 3 semanas de realimentación es capaz de restablecer completamente el estado nutricional de los peces ayunados. Tampoco se han observado cambios en los niveles plasmáticos de glucosa durante el ayuno ni la realimentación. En este aspecto, no se ha podido encontrar a la fecha referencia bibliográfica que evalúe el tamaño de los hepatocitos durante la realimentación.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que *C. dimerus* presenta crecimiento compensatorio parcial, tanto en largo como en peso. Es parcial porque si bien se demuestra la presencia de crecimiento acelerado durante la realimentación, el tamaño corporal de los animales realimentados no alcanza a los controles que fueron siempre alimentados. Ahora bien, los resultados mostrados en la presente Tesis sólo abarcan un protocolo de 3 semanas de realimentación. Es lógico cuestionar que si el periodo de realimentación hubiese sido más extenso los animales realimentados hubiesen podido alcanzar, en algún intervalo de tiempo, a los controles. Una inspección más detallada de los valores de las tasas específicas de crecimiento (SGR peso y SGR SL) conduce al rechazo de tal escenario. Durante la primera semana de realimentación es notable el aumento del SGR, lo cual indica que estos animales están creciendo más rápido que los controles. Ahora bien, durante el transcurso de esta primera semana, los peces realimentados no alcanzan en talla a los controles. Puesto que el SGR de la segunda semana no difiere entre grupos, ambos están creciendo a igual ritmo, y dado que los peces realimentados son más pequeños al término de la primera semana, éstos no podrán lograr el tamaño de los controles. A menos que haya un aumento del SGR en los realimentados luego de la segunda semana, la talla de ambos grupos será diferente en cualquier punto temporal posterior. Por este motivo se decidió continuar el periodo de realimentación sólo hasta la tercera semana, en donde se observó que el SGR de los realimentados no fue diferente al de los controles. A partir de estos resultados, se puede inferir que las diferencias en talla se mantendrán, pues no resulta ilógico suponer que los SGR se mantendrán iguales en ambos grupos tras 2 semanas previas de no diferencia. Por otra parte, es interesante notar que el crecimiento compensatorio parcial que mostraron los ejemplares de *C.*

dimerus corresponden a animales con una talla de entre 7 y 8 centímetros de largo total, cuando la talla máxima para la especie es de aproximadamente 12 centímetros. Sería factible que en etapas más tempranas del crecimiento, con peces de talla más pequeñas, la compensación pueda ser total, teniendo en cuenta que la tasa de crecimiento disminuye con la edad. En este sentido, se ha demostrado en peces que la hiperplasia muscular se detiene cuando el animal alcanza el 44% de la talla final (Weatherley y col., 1988). Si se considera que el crecimiento corporal puede ser reflejado por el crecimiento muscular entonces se puede sugerir que la falta de crecimiento compensatorio total obtenida en este trabajo se deba, al menos en parte, a que los peces bajo estudio superaban ampliamente el 44% del tamaño final.

Si bien el estudio del crecimiento compensatorio ha sido ampliamente documentado en una variedad de especies de peces teleósteos, incluso también en mamíferos, Ali y col. (2003) cuestionan la mayoría de los mismos. En primer lugar se hace una crítica intrínseca al diseño experimental, en el cual se pueden analizar varios de sus aspectos. Así, existen variedad de protocolos experimentales con distintos periodos de ayuno y realimentación, e incluso algunos experimentos realizan ciclos de ayuno/realimentación con diferentes intervalos. Así mismo, algunos estudios son realizados con determinado porcentaje de alimento por peso corporal o incluso algunos protocolos son realizados con alimentación a saciedad. Otros factores pueden diferir entre experimentos también, como son el horario de la ingesta, la iluminación, temperatura, calidad del agua, entre otros. Otro aspecto muy relevante es el tamaño de las muestras. Ali y col. (2003) muestran que muchos experimentos fallan en adjudicar el nivel de replicación (n) correcto a cada grupo experimental, lo cual conduce a lo que se denomina pseudorréplica. En estos diseños cada grupo experimental consiste de un estanque con varios peces dentro, tantos estanques como tratamientos, y se consideran erróneamente como unidad experimental o réplica biológica a cada pez. En rigor, la unidad experimental es el estanque y por tanto en este tipo de diseños no hay réplicas biológicas. Como consecuencia de este tipo de arreglo experimental no se puede realizar inferencia estadística alguna, pues cualquier diferencia entre los tratamientos puede ser debida a diferencia entre los tanques (efecto del

estanque), como por ejemplo la presencia de algún agente patogénico en alguno de ellos que haya podido infectar los peces del mismo y en consecuencia haya conducido a un cambio en la variable que se esté estudiando que no resulte del tratamiento. Este fenómeno se denomina “confusión de efectos”. Por otra parte, la biología comportamental puede variar mucho entre las especies. En particular muchos peces teleósteos despliegan un comportamiento agresivo, donde se pueden reconocer una relación jerárquica entre dominantes y no dominantes que puede afectar el grado de compensación durante la realimentación. En este aspecto, Jobling & Koskela (1996) observaron en la trucha arcoíris *O. mykiss* que durante un periodo de restricción alimentaria los peces dominantes presentaron las mayores tasas de crecimiento, probablemente debido a un mayor acceso al alimento, pero durante la realimentación la tasa de crecimiento fueron mayores en los no dominantes. Este tipo de heterogeneidad, si no es tenida en cuenta, puede incrementar la variabilidad y disminuir la potencia estadística. Por este motivo, Ali y col. (2003) cuestionan los experimentos realizados con peces agrupados en un mismo estanque y sugieren en consecuencia utilizar una aproximación experimental donde haya un pez por pecera. De este modo se podrían evitar los efectos sobre el crecimiento y otras variables de interés que pudieran llegar a tener las interacciones sociales presentes en un mismo acuario. A esto se agrega que en el mismo estanque puede haber peces de distinto sexo y una relación macho/hembra diferente entre los estanques, lo cual estaría adicionando variabilidad experimental. Por estos motivos, los experimentos realizados en la presente Tesis se basaron en un diseño experimental con peces aislados, un pez por pecera. *Cichlasoma dimerus* presenta un comportamiento social característico, donde se establece una jerarquía social con peces dominantes y no dominantes (Alonso y col., 2011), dimorfismo sexual en el crecimiento (Delgadín y col., 2015) y diferente dinámica en la formación de parejas en relación a la cantidad de peces y relación de sexos por pecera (Delgadín y col., 2015). Así, los posibles efectos distorsivos de estos factores pudieron ser controlados por el diseño de un pez por pecera. Este diseño además, permitió realizar un seguimiento individual de cada una de las unidades experimentales durante el transcurso del experimento, realizar las

mediciones sobre los mismos especímenes sin la necesidad de marcar a los peces para su identificación, lo cual podría representar un evento estresante para los mismos. Otra de las consideraciones mencionadas por Ali y col. (2003) es el parámetro de crecimiento utilizado. La gran mayoría de los experimentos sólo consideran el peso corporal y como ya se ha discutido previamente (Beckman, 2011) el peso puede no representar unívocamente al crecimiento somático, siendo necesario incorporar al análisis la medición del largo corporal. En un trabajo reciente, se muestra cómo el aumento en peso depende del incremento del peso por el proceso de engorde, medido mediante un parámetro denominado factor de condición, y del crecimiento estructural, indicado por el largo (Bavčević y col., 2010). En ese trabajo, se demuestra en *S. aurata* que hay crecimiento compensatorio sólo para el peso, pero no para el largo, y que sin embargo dicho crecimiento compensatorio es parcial, demostrando la importancia de considerar ambos parámetros en los estudios relacionados al crecimiento somático.

Impacto de la realimentación sobre el sistema GH/IGF-1

Como se ha mostrado, *C. dimerus* presenta una fase crecimiento compensatorio durante la primera semana de realimentación, fenómeno que ya no es observado a partir de la segunda semana. Estos cambios fueron acompañados por una elevada eficiencia de conversión alimentaria durante la primera semana de realimentación que no se observan a la tercera semana de tratamiento, donde además, el estado nutricional es completamente normal según la evaluación del índice hepatosomático y el tamaño de los hepatocitos. Estos resultados sugieren dos etapas diferenciadas en la realimentación sobre el crecimiento somático en *C. dimerus*, una primera fase de crecimiento acelerado tanto en largo como en peso; y una segunda fase donde se restablecen los parámetros de crecimiento. Puesto que el efecto de la realimentación sobre el crecimiento somático se observó a la primera semana, es lógico asumir que los cambios a nivel de regulación en el sistema GH/IGF-1 debieron haber ocurrido antes. Por esta razón se realizó un segundo

experimento de realimentación, esta vez por 3 días. Se espera que la expresión de los genes de sistema GH/IGF-1 estén alterados en este periodo y no a las 3 semanas.

Luego de 3 semanas de realimentación, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los receptores para GH (GHR1, GHR2) e IGF-1 en hígado ni de GHR1 y GHR2 en músculo (Figuras 39, 40, 41, 43, 44 y 45) entre los peces realimentados y los controles. Si bien estos resultados son los esperados, pues conciben con los datos morfológicos, la variabilidad obtenida fue elevada. Sorprendentemente, los 3 días de realimentación no provocaron diferencias en los niveles de transcritos en hígado de GHR1, GHR2 e IGF-1 respecto del control ni en los niveles de GHR1 y GHR2 en músculo. Sin embargo, estos resultados pueden entenderse mejor a la luz de los obtenidos en el ayuno. Las 4 semanas de ayuno condujeron a un incremento en la expresión de GHR2 en hígado y en músculo (Figuras 21 y 24), que fueron revertidos a los valores del control tras 3 días de realimentación. Estos resultados pueden ser interpretados de hecho como una disminución de los niveles de GHR2 en el grupo ayunado/realimentado. Así mismo, los niveles del transcritos de IGF-1 en hígado no fueron alterados por el ayuno ni por la realimentación. A nivel muscular sin embargo, la expresión de IGF-1 desciende significativamente en el ayuno, pero retorna al valor de los controles a los 3 días de realimentación. Por otra parte, la expresión del receptor tipo 1 de GH, GHR1, no fue alterado en ninguno de los protocolos experimentales realizados, el ayuno ni la realimentación. Esta observación podría reforzar la hipótesis de que GHR1 es el receptor de SL, tal como es propuesto en varios estudios (Fukada y col., 2005; Cánepa y col., 2012). Estudios llevados a cabo en otras especies muestran que el perfil de expresión del sistema GH/IGF-1 durante la realimentación es variable, lo cual puede tener una implicancia biológica real, ser el resultado de aplicar distintos protocolos de ayuno y realimentación o ambas. En uno de los primeros trabajos sobre IGF-1 en la realimentación, Chauvigné y col. (2003) vieron en la trucha arcoíris que los niveles de expresión de IGF-1 en músculo eran 8 y 15 veces mayores a los detectados tras 10 semanas de ayuno en animales realimentados por 4 y 12 días respectivamente. Sin embargo este estudio no contaba con los controles adecuados, pues no dispusieron de un grupo control alimentado durante todo el

experimento. En línea con estos resultados, Gabillard y col. (2006) mostraron que los niveles bajos de IGF-1 plasmáticos provocados por el ayuno eran revertidos por 4 días de realimentación volviendo al valor de los controles. Los resultados presentados por Fox y col. (2010) en tilapia *O. niloticus* son similares a los obtenidos en la presente tesis, donde si bien el ayuno condujo a una caída en los niveles plasmáticos y de ARNm de IGF-1 en hígado, no observaron diferencias en el mismo durante la realimentación a nivel del transcripto ni de la proteína respecto de los controles siempre alimentados. En el mismo estudio la expresión de GHR2, al igual en *C. dimerus*, fue elevada por el ayuno y revertida a los niveles del control por la realimentación a partir de la primera semana y hasta la semana 8. En línea con esto, tampoco observaron variaciones en la expresión hepática de GHR1 tras 4 semanas de ayuno ni en la realimentación. Más aun, el paralelismo se extiende a la expresión de GHR2 hepático, el cual fue mayor en los peces ayunados. Estas coincidencias no resultan ilógicas sabiendo que ambas especies de peces cíclidos están filogenéticamente relacionadas, y cuya similitud en la secuencia nucleotídica de los receptores GHR1 y GHR2 es superior al 86%. Sin embargo, durante la realimentación pueden observarse discrepancias en cuanto la respuesta de estos receptores a nivel muscular. Fox y col. (2010) observaron que la expresión de GHR1 es menor en los peces realimentados por 1 y 2 semanas, pero no difieren de los controles a partir de la semana 3 y observan el mismo perfil para GHR2. Así mismo, al igual que en *C. dimerus*, la expresión de IGF-1 muscular se ve reducida en el ayuno, pero también hasta la primera semana de realimentación. En un estudio más reciente realizado en *Pardalichthys adspersus* (Pleuronectiformes), Fuentes y col. (2011) muestran un descenso en los niveles plasmáticos y de ARNm de IGF-1 muscular tras 3 semanas de ayuno, pero que revierten a los niveles de los controles a partir de la primera semana de realimentación.

Si bien los datos obtenidos en los experimentos de realimentación de 3 días y 3 semanas no muestran diferencias en la expresión para ninguno de los genes analizados del sistema GH/IGF-1, resulta llamativo el perfil de expresión de la hormona de crecimiento GH. La expresión de esta hormona se mantuvo dentro de un rango poco variable en los controles de los experimentos de ayuno ($0,34 \pm 0,09$) y realimentación por 3 días ($0,28 \pm 0,05$) y 3

semanas ($0,26\pm 0,04$). Pero llamativamente la expresión del transcripto de esta hormona en los peces realimentados por 3 semanas fue muy similar a dichos valores ($0,28\pm 0,07$), bajo en el grupo ayunado por 4 semanas ($0,18\pm 0,03$) y alta en los realimentados por 3 días ($0,47\pm 0,07$). Por otra parte, este perfil difiere de lo que se observa en otras especies de peces teleósteos, donde los niveles de GH o bien no cambian durante el ayuno y la realimentación (Fox y col., 2010) o se incrementan en el ayuno y bajan en la realimentación hasta los niveles del control (Gabillard y col., 2006; Fuentes y col. 2011). El perfil obtenido en la presente Tesis en el ayuno prolongado y la realimentación para GH y GHR2 pone de manifiesto que la regulación del eje GH/IGF-1 en *C. dimerus* difiere de la hipótesis tradicional de resistencia a GH, la cual establece que en el ayuno los niveles de GH aumentan y la expresión de los receptores de GH en hígado disminuye, conduciendo a una declive en la liberación de IGF-1 a circulación y en consecuencia atenuando la retroalimentación negativa de IGF-1 sobre la expresión de GH en hipófisis. En este sentido, no es posible descartar posibles variaciones en las IGFBPs que puedan alterar los efectos biológicos de IGF-1, o incluso que puedan tener efectos independientes de IGF-1, adicionando complejidad al sistema GH/IGF (Duan y col., 1997; Le Roith y col., 2001; Wood y col., 2005).

Al igual que en el ayuno, los niveles de IGF-2 hepático y muscular no difirieron entre en los peces realimentados y los controles (Figura 42). Fox y col. (2006) han sugerido algún rol para IGF-2 muscular durante la realimentación en relación al crecimiento compensatorio en *O. mossambicus*, pues observaron una disminución en su expresión durante las dos primeras semanas de realimentación que coinciden con el incremento del SGR(peso) en el grupo realimentado. En la presente Tesis, si bien se observa un aumento en el SGR durante la primera semana de realimentación, la expresión de IGF-2 en músculo no condice con la propuesta de Fox y col. (2006), atribuibles posiblemente a diferencias en la edad de los ejemplares utilizados respecto de aquellos experimentos.

Sobre GHR2

Durante la última década, se han publicado una gran cantidad de secuencias del receptor para GH, lo que ha permitido ampliar la visión sobre los mismos en un contexto evolutivo. Notablemente, a diferencia de los que ocurre en tetrápodos, los peces teleósteos, hoy se sabe, tiene dos tipos de receptores, probablemente como consecuencia de la duplicación genómica específica de peces (Meyer & Van de Peer, 2005). Los primeros trabajos se centraron sobre uno de los 2 tipos, hoy denominado GHR1, pero posteriormente fue evidente que otro grupo de peces teleósteos, los salmónidos, tenían un receptor para GH distinto a GHR1, hoy denominado GHR2. Poco tiempo después, basado en los trabajos de Saera-Vila y col (2005) y Jiao y col. (2006), se concluyó que todos los peces teleósteos poseen ambos tipos de receptores. En este sentido, la presente Tesis muestra que *C. dimerus* posee además de GHR1 (Cánepa y col., 2012) a GHR2 (Figura 9,10). GHR2, secuenciado en esta Tesis, presenta características típicas a los GHRs, como por ejemplo el motivo FGEFS, que en el caso de *C. dimerus* es FGAFS para este receptor (Figura 9,10), y FGEFS para GHR1 (Cánepa y col., 2012). Esta discrepancia es llamativa, por cuanto la alanina es un aminoácido no polar, mientras que el glutamato tiene carga negativa. No obstante, en otros peces teleósteos se puede observar que el glutamato es sustituido por glicina en esa posición, cuyo residuo es no polar al igual que alanina, como por ejemplo en *O. latipes* (Figura 10). En lo que refiere al resto del receptor, tanto la Box1 como la Box2 se encuentran altamente conservadas en los receptores para GH, y en este sentido la secuencia encontrada para *C. dimerus* muestra un alto grado de similitud con la secuencias de otras especies (Figura 10).

La hipótesis clásica de las somatomedinas establecía que el crecimiento estimulado por GH era mediado por IGF-1 hepático, el cual actuaría en los tejidos blanco promoviendo el crecimiento. Sin embargo, el hallazgo de que GHR es expresado ampliamente en varios tejidos extrahepáticos, sugirió la posibilidad de una acción directa de GH sobre esos tejidos, sumado al hecho de que los mismo son capaces también de expresar IGF-1 e IGF-2. Estos hechos, junto con otras evidencias adicionales, sugirieron un escenario en donde

la regulación autocrina/paracrina podría tener un lugar importante en el crecimiento. Al respecto, la presente Tesis muestra que tanto GHR1, GHR2 e IGF-1 se expresan en todos los tejidos analizados (Figura 11), en concordancia con la visión de una regulación autocrina/paracrina del crecimiento. En este sentido, es importante notar que durante el ayuno, la expresión de IGF-1 es inalterada, mientras que a nivel muscular se encuentra significativamente reducida, y que durante la realimentación, en la etapa de crecimiento acelerado, los niveles del transcritto de IGF-1 hepáticos no son afectados mientras que sus niveles a nivel muscular se recuperan a los valores del ayuno. Es decir, estos resultados están en línea con el planteo de una regulación a nivel local.

-Conclusiones-

En base a las hipótesis planteadas en la presente Tesis y los resultados obtenidos en la misma, se presentan las siguientes conclusiones.

Hipótesis 1: “Los individuos sometidos a un ayuno prolongado disminuyen su tasa de crecimiento como consecuencia de alteraciones en el eje GH/IGF-1 a distintos niveles”

Los resultados obtenidos a partir del ayuno por cuatro semanas están de acuerdo con la hipótesis planteada. El crecimiento longitudinal fue abolido por completo en los peces no alimentados y la tasa de crecimiento referida al peso fue significativamente reducida en los mismos. Por otra parte, aunque no se pueda conocer la relación de causalidad, la interrupción del crecimiento estuvo acompañada por alteraciones en la expresión génica de varios componentes del eje GH/IGF-1, en particular los receptores de GH tipo 2 e IGF-1 muscular, mostrándose así en línea con la hipótesis planteada.

Hipótesis 2: “En *Cichlasoma dimerus* se observa un crecimiento compensatorio como consecuencia de la realimentación posterior a un período de ayuno. En este crecimiento compensatorio está involucrado el eje GH/IGF-1”

Los resultados de los experimentos de realimentación apoyan a la hipótesis propuesta. La presente Tesis demuestra que *C. dimerus* presenta crecimiento compensatorio parcial durante la primera fase de la realimentación y en paralelo el retorno a valores normales en la expresión génica de los componentes del eje GH/IGF-1 que habían sido alterados durante el ayuno prolongado.

Hipótesis 3: “*Cichlasoma dimerus* presenta ambos tipos de receptores: GHR1 y GHR2 siendo GHR2 y no GHR1 el receptor para GH. Por lo tanto se espera que el arresto en el crecimiento debido a periodo de restricción alimentaria afecte la expresión de GHR2 y no de GHR1”

Esta hipótesis es apoyada por los resultados obtenidos en la presente Tesis. Se demostró la presencia de GHR2 en *C. dimerus*, con lo cual esta especie, al igual que todos los teleósteos en los cuales se estudió su presencia, tiene ambos tipos de receptores: GHR1 y GHR2. Por otra parte, los experimentos de ayuno y realimentación sólo provocaron cambios en la expresión de GHR2 y no GHR1, sugiriendo por tanto que GHR2 sería el receptor para GH bajo estas condiciones experimentales.

Conclusión general

Tomando de manera conjunta los resultados del ayuno y realimentación, se puede sugerir que *C. dimerus* es un buen modelo biológico para el estudio del crecimiento somático dada su alta tasa de crecimiento y su respuesta a la manipulación experimental mediante el ayuno prolongado sumado a una buena recuperación de su estado nutricional tras la reversión de las condiciones experimentales desfavorables. Así mismo, los resultados obtenidos en la presente Tesis muestran que el ayuno y la realimentación tiene un efecto directo sobre la expresión génica a nivel transcripcional de GH, GHR1, GHR2, IGF-1 e IGF-2 asociados a cambios en el crecimiento somático, la histología hepática y la eficiencia de conversión alimentaria. Por otra parte, la presencia de crecimiento compensatorio parcial no excluye la posibilidad que en peces de talla más pequeñas el crecimiento compensatorio pueda ser completo.

-Bibliografía-

Albalat, A., Gómez-Requeni, P., Rojas, P., Médale, F., Kaushik, S., Vianen, G.J., Van den Thillart, G., Gutiérrez, J., Pérez-Sánchez, J., Navarro, I., 2005. Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(1), pp.R259-R265.

Alele, J., Jiang, J., Goldsmith, J.F., Yang, X., Maheshwari, H.G., Black, R.A., Baumann, G., Frank, S.J., 1998. Blockade of Growth Hormone Receptor Shedding by a Metalloprotease Inhibitor 1. *Endocrinology*, 139(4), pp.1927-1935.

Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4(2), pp.147-190.

Alonso, F., Cánepa, M., Moreira, R.G., Pandolfi, M., 2011. Social and reproductive physiology and behavior of the Neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus* under laboratory conditions. *Neotropical Ichthyology*, 9(3), pp.559-570.

Andress, D.L. & Birnbaum, R.S., 1992. Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31), pp.22467-22472.

Argetsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., Carter-Su, C., 1993. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*, 74(2), pp.237-244.

Asdell, S.A., 1946. Comparative chronologic age in man and other mammals. *Journal of Gerontology*, 1(2 Part 1), pp.224-236.

- Bagenal, T.B. & Tesch, F.W., 1978. Age and growth In: Methods for assessment of fish production in fresh waters 3rd Edition,(Ed. BAGENAL, T.), 101–136. IBP Handbook No. 3.
- Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., Efstratiadis, A., 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75(1), pp.73-82.
- Baumann, G., 2002. Growth hormone binding protein. The soluble growth hormone receptor. *Minerva Endocrinologica*, 27(4), pp.265-276.
- Bavčević, L., Klanjšček, T., Karamarko, V., Aničić, I., Legović, T., 2010. Compensatory growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) compensates weight, but not length. *Aquaculture*, 301(1), pp.57-63.
- Bazan, J.F., 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(18), pp.6934-6938.
- Beckman, B.R., Larsen, D.A., Moriyama, S., Lee-Pawlak, B., Dickhoff, W.W., 1998. Insulin-like growth factor-I and environmental modulation of growth during smoltification of spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and Comparative Endocrinology*, 109(3), pp.325-335.
- Beckman, B.R., Shimizu, M., Gadberry, B.A., Cooper, K.A., 2004. Response of the somatotrophic axis of juvenile coho salmon to alterations in plane of nutrition with an analysis of the relationships among growth rate and circulating IGF-I and 41kDa IGFBP. *General and Comparative Endocrinology*, 135(3), pp.334-344.
- Beckman, B.R., 2011. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), pp.233-252.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, pp.289-300.

Bernier, N.J., Van Der Kraak, G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. eds., 2009. *Fish Physiology: Fish Neuroendocrinology: Fish Neuroendocrinology* (Vol. 28). Academic Press.

Betancur-R, R., Broughton, R.E., Wiley, E.O., Carpenter, K., López, J.A., Li, C., Holcroft, N.I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton, J.C., Zhang, F., Buser, T., Campbell, M.A., Ballesteros, J.A., Roa-Varon, A., Willis, W., Calvin Borden, W., Rowley, T., Reneau, P.C., Hough, D.J., Lu, G., Grande, T., Arratia, G., Ortí, G. 2013. The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS Currents*, 5, pp.1-33.

Biga, P.R., Schelling, G.T., Hardy, R.W., Cain, K.D., Overturf, K., Ott, T.L., 2004. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 135(3), pp.324-333.

Binoux, M., 1995. The IGF system in metabolism regulation. *Diabete & Metabolisme*, 21(5), pp.330-337.

Bisbal, G.A. & Bengtson, D.A., 1995. Description of the starving condition in summer flounder, *Paralichthys dentatus*, early life history stages. *Fishery Bulletin*, 93(2), pp.217-230.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., Cerretti, D.P., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumournecrosis factor- α from cells. *Nature* 385(6618), pp.729-733.

Brinkman, A., Kortleve, D.J., Zwarthoff, E.C., Drop, S.L.S., 1991. Mutations in the C-terminal part of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 result in dimer formation and loss of IGF binding capacity. *Molecular Endocrinology*, 5(7), pp.987-994.

Brooks, A.J., Wooh, J.W., Tunny, K.A., Waters, M.J., 2008. Growth hormone receptor; mechanism of action. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(10), pp.1984-1989.

Brooks, A.J., Dai, W., O'Mara, M.L., Abankwa, D., Chhabra, Y., Pelekanos, R.A., Gardon, O., Tunny, K.A., Blucher, K.M., Morton, C.J., Parker, M.W., Sierrecki, E., Yann Gambin, Y., Gomez, G.A., Alexandrov, K., Wilson, I.A., Doxastakis, M., Alan E. Mark, A.E., Waters, M.J., 2014. Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science*, 344(6185), p.1249783.

Brusle, J. & Anadon, G.G., 1996. The structure and function of fish liver. *Fish Morphology*, pp.77-93.

Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology*, 142(7), pp.3269-3273.

Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., de Celis, S.V.R., Boujard, D., 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: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(1), pp.1-13.

Camargo, M.M. & Martinez, C.B., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), pp.327-336.

Cánepa, M.M., Zhu, Y., Fossati, M., Stiller, J.W., Vissio, P.G., 2012. Cloning, phylogenetic analysis and expression of somatolactin and its receptor in *Cichlasoma dimerus*: Their role in long-term background color acclimation. *General and Comparative Endocrinology*, 176(1), pp.52-61.

Canosa, L.F., Chang, J.P., Peter, R.E., 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 151(1), pp.1-26.

Cao, Q.P., Duguay, S.J., Plisetskaya, E., Steiner, D.F., Chan, S.J., 1989. Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA. *Molecular Endocrinology*, 3(12), pp.2005-2010.

Carter-Su, C., Stubbart, J.R., Wang, X.Y., Stred, S.E., Argetsinger, L.S., Shafer, J.A., 1989. Phosphorylation of highly purified growth hormone receptors by a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(31), pp.18654-18661.

Carter-Su, C., Schwartz, J., Smit, L.J., 1996. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual Review of Physiology*, 58(1), pp.187-207.

Cavari, B., Le Bail, P.Y., Levavi-Sivan, B., Melamed, P., Kawauchi, H., Funkenstein, B., 1994. Isolation of growth hormone and in vitro translation of mRNA isolated from pituitaries of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *General and Comparative Endocrinology*, 95(3), pp.321-329.

Chang, J.P. & Wong, A.O., 2009. Growth hormone regulation in fish: a multifactorial model with hypothalamic, peripheral and local autocrine/paracrine signals. *Fish Physiology*, 28, pp.151-195.

Chauvigné, F., Gabillard, J.C., Weil, C., Rescan, P.Y., 2003. Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology*, 132(2), pp.209-215.

Chelius, D., Baldwin, M.A., Lu, X., Spencer, E.M., 2001. Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4. *Journal of Endocrinology*, 168(2), pp.283-296.

Chen, M., Huang, X., Yuen, D.S., Cheng, C.H., 2011. A study on the functional interaction between the GH/PRL family of polypeptides with their receptors in zebrafish: Evidence against GHR1 being the receptor for somatolactin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 337(1), pp.114-121.

Chen, Y., Jackson, D.A., Harvey, H.H., 1992. A comparison of von Bertalanffy and polynomial functions in modelling fish growth data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(6), pp.1228-1235.

Clemmons, D.R., 2001. Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships. *Endocrine Reviews*, 22(6), pp.800-817.

Codina, M., Castillo, J., Gutiérrez, J. and Navarro, I., 2004. Role of IGF-II in the metabolism and proliferation of rainbow trout muscle cells. *General and Comparative Endocrinology*. (Abstract of 5th ISFE, O41).

Collins, A.L. & Anderson, T.A., 1995. The regulation of endogeneous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *Journal of Fish Biology*, 47(6), pp.1004-1015.

Cunningham, B.C., Ultsch, M., De Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R., Wells, J.A., 1991. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*, 254(5033), pp.821-825.

Dastot, F., Sobrier, M.L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Goossens, M., Amselem, S., 1996. Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), pp.10723-10728.

Dastot, F., Duquesnoy, P., Sobrier, M.L., Goossens, M. and Amselem, S., 1998. Evolutionary divergence of the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone binding protein. *Molecular and cellular endocrinology*, 137(1), pp.79-84.

Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, W.D., Van Den Brande, J.L., Van Wyk, J.J., 1972. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*, 235, pp.107-107.

Daughaday, W.H. & Rotwein, P., 1989. Insulin-Like Growth Factors I and II. Peptide, Messenger Ribonucleic Acid and Gene Structures, Serum, and Tissue Concentrations*. *Endocrine Reviews*, 10(1), pp.68-91.

De Chiara, T. M., Efstratiadis, A., Robertson, E. J., 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*, 345, pp.78-80.

De Vos, A.M., Ultsch, M., Kossiakoff, A.A., 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 255(5042), pp.306-312.

Delgadin, T.H., Pérez Sirkin, D.I., Karp, P.J., Fossati, M., Vissio, P.G., 2015. Inter-individual variability in reproductive success and somatic growth in *Cichlasoma dimerus* (Heckle, 1840). *Belgian Journal of Zoology*, 144(2).

Deng, L., Jiang, J., Frank, S.J., 2012. Growth hormone-induced JAK2 signaling and GH receptor down-regulation: role of GH receptor intracellular domain tyrosine residues. *Endocrinology*, 153(5), pp.2311-2322.

Denko, C.W. & Bergenstal, D.M., 1955. The effect of hypophysectomy and growth hormone on S35 fixation in cartilage 1 2. *Endocrinology*, 57(1), pp.76-86.

Duan, C., 1997. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *American Zoologist*, 37(6), pp.491-503.

Duan, C., 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *The Journal of nutrition*, 128(2), pp.306S-314S.

Duan, C., 2002. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *Journal of Endocrinology*, 175(1), pp.41-54.

Duan, C., Ren, H. & Gao, S., 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3), pp.344-351.

Edens, A. & Talamantes, F., 1998. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts . *Endocrine Reviews*, 19(5), pp.559-582.

Ellens, E.R., Kittilson, J.D., Hall, J.A., Sower, S.A., Sheridan, M.A., 2013. Evolutionary origin and divergence of the growth hormone receptor family: insight from studies on sea lamprey. *General and Comparative Endocrinology*, 192, pp.222-236.

Eppler, E., Shved, N., Moret, O., Reinecke, M., 2007. IGF-I is distinctly located in the bony fish pituitary as revealed for *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia, using real-time RT-PCR, in situ hybridisation and immunohistochemistry. *General and Comparative Endocrinology*, 150(1), pp.87-95.

Firth, S.M. & Baxter, R.C., 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Reviews*, 23(6), pp.824-854.

Forbes, B.E., Turner, D., Hodge, S.J., McNeil, K.A., Forsberg, G., Wallace, J.C., 1998. Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(8), pp.4647-4652.

Fox, B.K., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., 2006. Effects of fasting on growth hormone, growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 148(3), pp.340-347.

Fox, B.K., Breves, J.P., Hirano, T., Grau, E.G., 2009. Effects of short-and long-term fasting on plasma and stomach ghrelin, and the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Domestic animal endocrinology*, 37(1), pp.1-11.

Fox, B.K., Breves, J.P., Davis, L.K., Pierce, A.L., Hirano, T., Grau, E.G., 2010. Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), pp.573-580.

Froesch, E.R., Bürgi, H., Ramseier, E.B., Bally, P., Labhart, A., 1963. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *Journal of Clinical Investigation*, 42(11), p.1816.

Fuentes, E.N., Einarsdottir, I.E., Valdes, J.A., Alvarez, M., Molina, A., Björnsson, B.T., 2011. Inherent growth hormone resistance in the skeletal muscle of the fine flounder is modulated by nutritional status and is characterized by high contents of truncated GHR, impairment in the JAK2/STAT5 signaling pathway, and low IGF-I expression. *Endocrinology*, 153(1), pp.283-294.

Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A.L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 2004. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 139(1), pp.61-71.

Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A.L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 2005. Identification of the salmon somatolactin receptor, a new member of the cytokine receptor family. *Endocrinology*, 146(5), pp.2354-2361.

Fukada, H., Murashita, K., Furutani, T., Masumoto, T., 2012. Yellowtail insulin-like growth factor 1: molecular cloning and response to various nutritional conditions. *Domestic Animal Endocrinology*, 42(4), pp.220-229.

Fukamachi, S., Sugimoto, M., Mitani, H., Shima, A., 2004. Somatolactin selectively regulates proliferation and morphogenesis of neural-crest derived pigment cells in medaka. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), pp.10661-10666.

Fukamachi, S., Yada, T., Mitani, H., 2005. Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptors. *Genetics*, 171(4), pp.1875-1883.

Fukamachi, S. & Meyer, A., 2007. Evolution of receptors for growth hormone and somatotactin in fish and land vertebrates: lessons from the lungfish and sturgeon orthologues. *Journal of Molecular Evolution*, 65(4), pp.359-372.

Gabillard, J.C., Kamangar, B.B., Montserrat, N., 2006. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology*, 191(1), pp.15-24.

Gahete, M.D., Durán-Prado, M., Luque, R.M., Martínez-Fuentes, A.J., Quintero, A., Gutiérrez-Pascual, E., Córdoba-Chacón, J., Malagón, M.M., Gracia-Navarro, F., Castaño, J.P., 2009. Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1), pp.137-153.

Gao, F.Y., Lu, M.X., Ye, X., Huang, Z.H., Wang, H., Zhu, H.P., Yang, L.P., 2011. Identification and expression analysis of two growth hormone receptors in zanzibar tilapia (*Oreochromis hornorum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(3), pp.553-565.

Gomez, J.M., Loir, M. & Le Gac, F., 1998. Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenetic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*, 58(2), pp.483-491.

Gómez-Requeni, P., Calduch-Giner, J., de Celis, S.V.R., Médale, F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2005. Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 94(03), pp.353-361.

Grasl-Kraupp, B., Bursch, W., Ruttkay-Nedecky, B., Wagner, A., Lauer, B., Schulte-Hermann, R., 1994. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21), pp.9995-9999.

Guler, H.P., Zapf, J., Schmid, C., Froesch, E.R., 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. *Acta Endocrinologica*, 121(6), pp.753-758.

Hall, K. & Uthne, K., 1971. Some biological properties of purified sulfation factor (SF) from human plasma. *Acta Medica Scandinavica*, 190(1-6), pp.137-143.

Hayward, R.S., Noltie, D.B., Wang, N., 1997. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. *Transactions of the American Fisheries Society*, 126(2), pp.316-322.

Hibiya, T., Yokote, M., Oguri, M., Sato, H., Takashima, F., Aida, K., 1982. *An atlas of fish histology. Normal and Pathological Features*. Gustav Fischer Verlag.

Hinton, D.E. & Lauren, D.J., 1990, December. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *In American Fisheries Society Symposium* (Vol. 8, pp. 51-66).

Hobba, G.D., Löthgren, A., Holmberg, E., Forbes, B.E., Francis, G.L., Wallace, J.C., 1998. Alanine screening mutagenesis establishes tyrosine 60 of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 as a determinant of insulin-like growth factor binding. *Journal of Biological Chemistry*, 273(31), pp.19691-19698.

Hodgkinson, S.C., Davis, S.R., Burleigh, B.D., Henderson, H.V., Gluckman, P.D., 1987. Metabolic clearance rate of insulin-like growth factor-I in fed and starved sheep. *Journal of Endocrinology*, 115(2), pp.233-240.

Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., Takahashi, M.O., Okimura, Y., Nose, O., Abe, H., Chihara, K., 1999. Functional Characterization of Truncated Growth Hormone (GH) Receptor-(1-277) Causing Partial GH Insensitivity Syndrome with High GH-Binding Protein 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(3), pp.1011-1016.

Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., Yoshioka, S., Murata, M., Iguchi, G., Okimura, Y., Chihara, K., 2003. Diverse regulation of full-length and truncated growth hormone receptor expression in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 210(1), pp.21-29.

Jensen, A.J., 1979. Energy content analysis from weight and liver index measurements of immature pollock (*Pollachius virens*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 36(10), pp.1207-1213.

Jiao, B., Huang, X., Chan, C.B., Zhang, L., Wang, D., Cheng, C.H., 2006. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(1), pp.23-40.

Jobling, M., 1993. Bioenergetics: feed intake and energy partitioning. In *Fish ecophysiology* (pp. 1-44). Springer Netherlands.

Jobling, M. & Koskela, J., 1996. Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. *Journal of Fish Biology*, 49(4), pp.658-667.

Johansson, V., Winberg, S., Björnsson, B.T., 2005. Growth hormone-induced stimulation of swimming and feeding behaviour of rainbow trout is abolished by the D 1 dopamine antagonist SCH23390. *General and Comparative Endocrinology*, 141(1), pp.58-65.

Jones, J.I., Gockerman, A., Busby, W.H., Wright, G., Clemmons, D.R., 1993. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), pp.10553-10557.

Jones, J.I. & Clemmons, D.R., 1995. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocrine Reviews*, 16(1), pp.3-34.

Jönsson, E., Johansson, V., Winberg, S., 2003. Central nervous system actions of growth hormone on brain monoamine levels and behavior of juvenile rainbow trout. *Hormones and Behavior*, 43(3), pp.367-374.

Kajimura, S., Kawaguchi, N., Kaneko, T., Kawazoe, I., Hirano, T., Visitacion, N., Grau, E.G., Aida, K., 2004. Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. *Journal of Endocrinology*, 181(1), pp.65-76.

Karlsen, Ø., Holm, J.C., Kjesbu, O.S., 1995. Effects of periodic starvation on reproductive investment in first-time spawning Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 133(2), pp.159-170.

Kawauchi, H. & Sower, S.A., 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *General and Comparative Endocrinology*, 148(1), pp.3-14.

Kjesbu, O.S., Klungsøyr, J., Kryvi, H., Witthames, P.R., Walker, M.G., 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(12), pp.2333-2343.

Klapper, D.G., Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J., 1983. Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 112(6), pp.2215-2217.

Kopchick, J.J. & Chen, W.Y., 1999. Structure–function relationships of growth hormone and other members of the growth hormone gene family. In: *Kostyo, J.L., Goodman, H.M. (Eds.), Handbook of Physiology. Hormonal Control of Growth, vol. V. Oxford University Press, New York*, pp. 129–143.

Kornfeld, S., 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 61(1), pp.307-330.

Kullander, S.O., 1983. A revision of the South American Cichlid genus *Cichlasoma* (Teleostei: Cichlidae). *Swedish Museum of Natural History, Stockholm*.

Larsson, Å. & Lewander, K., 1973. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 44(2), pp.367-374.

Le Roith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., Roberts JR, A.T., 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine Reviews*, 16(2), pp.143-163.

Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L., Butler, A., 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews*, 22(1), pp.53-74.

Lee, L.T., Nong, G., Chan, Y.H., Dicky, L.Y., Cheng, C.H., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene*, 270(1), pp.121-129.

Leung, L.Y. & Woo, N.Y., 2010. Effects of growth hormone, insulin-like growth factor I, triiodothyronine, thyroxine, and cortisol on gene expression of carbohydrate metabolic enzymes in sea bream hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157(3), pp.272-282.

Li, W.S., Chen, D., Wong, A.O., Lin, H.R., 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and comparative endocrinology*, 144(1), pp.78-89.

Liao, Z.Y. & Zhu, S.Q., 2004. Identification and characterization of GH receptor and serum GH-binding protein in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 36(12), pp.811-816.

Liao, Z., Chen, X., Wu, M., 2009. Molecular cloning and functional analysis of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) growth hormone receptor. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(10), pp.911-921.

Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., Efstratiadis, A., 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75(1), pp.59-72.

Loughna, P.T. & Goldspink, G., 1984. The effects of starvation upon protein turnover in red and white myotomal muscle of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 25(2), pp.223-230.

Machado, C.R., Garofaloj, M.A.R., Roselino, J.E.S., Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H., 1988. Effects of starvation, refeeding, and insulin on energy-linked metabolic processes in

catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. *General and Comparative Endocrinology*, 71(3), pp.429-437.

MacKenzie, D.S., VanPutte, C.M., Leiner, K.A., 1998. Nutrient regulation of endocrine function in fish. *Aquaculture*, 161(1), pp.3-25.

Mancera, J.M., Carrión, R.L., del Río, M.D.P.M., 2002. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 129(2), pp.95-103.

Marquardt, H., Todaro, G.J., Henderson, L.E., Oroszlan, S., 1981. Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cell cultures. Homology with human insulin-like growth factor II. *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), pp.6859-6865.

Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., Pérez-Sánchez, J., Valdivia, M.M., 1994. Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead seabream growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 96(2), pp.179-188.

McCormick, S.D., Kelley, K.M., Young, G., Nishioka, R.S., Bern, H.A., 1992. Stimulation of coho salmon growth by insulin-like growth factor I. *General and Comparative Endocrinology*, 86(3), pp.398-406.

McCormick, S.D., Moriyama, S., Björnsson, B.T., 2000. Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(5), pp.R1352-R1361.

Meyer, A. & Van de Peer, Y., 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 27(9), pp.937-945.

Miglav, I. & Jobling, M., 1989. Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, with particular respect to compensatory growth. *Journal of Fish Biology*, 34(6), pp.947-957.

Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology*, 129(2), pp.207-219.

Montserrat, N., Gabillard, J.C., Capilla, E., Navarro, M.I., Gutiérrez, J., 2007. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 150(3), pp.462-472.

Mortensen, A. & Damsgård, B., 1993. Compensatory growth and weight segregation following light and temperature manipulation of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, 114(3), pp.261-272.

Moss, M.L., Jin, S.L.C, Milla, M.E., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Warner, J., Willard, D., Becherer, J.D., 1997 Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 385, pp.733–736

Moutoussamy, S., Kelly, P.A., Finidori, J., 1998. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *European Journal of Biochemistry*, 255(1), pp.1-11.

Nakao, N., Higashimoto, Y., Ohkubo, T., Yoshizato, H., Nakai, N., Nakashima, K., Tanaka, M., 2004. Characterization of structure and expression of the growth hormone receptor gene of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Endocrinology*, 182(1), pp.157-164.

Neumann, G.M. & Bach, L.A., 1999. The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor-binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), pp.14587-14594.

Nicieza, A.G. & Metcalfe, N.B., 1997. Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. *Ecology*, 78(8), pp.2385-2400.

Oh, Y., Muller, H.L., Lamson, G., Rosenfeld, R.G., 1993. Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells: Cell surface binding and growth inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 268(20), pp.14964-14971.

Ozaki, Y., Fukada, H., Kazeto, Y., Adachi, S., Hara, A., Yamauchi, K., 2002. Isolation of two types of cDNA encoding growth hormone receptor-like genes in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 68(sup1), pp.959-960.

Pandolfi, M., Cánepa, M.M., Meijide, F.J., Alonso, F., Rey Vázquez, G., Maggese, M.C., Vissio, P.G., 2009. Studies on the reproductive and developmental biology of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Biocell*, 33(1), pp.1-18.

Panepucci, R.A., Panepucci, L., Fernandes, M.N., Sanches, J.R., Rantin, F.T., 2001. The effect of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in pacu (*Piaractus mesotamicus*). *Brazilian Journal of Biology*, 61(4), pp.547-554.

Peres, H., Santos, S., Oliva-Teles, A., 2011. Lack of compensatory growth response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles following starvation and subsequent refeeding. *Aquaculture*, 318(3), pp.384-388.

Pérez-Sánchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., de Celis, S.V.R., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., Valdivia, M.M., 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(3-4), pp.243-258.

Pérez Sirkin, D.I., Cánepa, M.M., Fossati, M., Fernandino, J.I., Delgadín, T., Canosa, L.F., Somoza, G.M., Vissio, P.G., 2012. Melanin concentrating hormone (MCH) is involved in the regulation of growth hormone in *Cichlasoma dimerus* (Cichlidae, Teleostei). *General and Comparative Endocrinology*, 176(1), pp.102-111.

Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson,

M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J., Black, R.A., 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282(5392), pp.1281-1284.

Peterson, B.C., Bilodeau-Bourgeois, A.L., Small, B.C., 2009. Response of the somatotrophic axis to alterations in feed intake of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(4), pp.457-463.

Picha, M.E., Turano, M.J., Tipsmark, C.K., Borski, R.J., 2008. Regulation of endocrine and paracrine sources of Igfs and Gh receptor during compensatory growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Journal of Endocrinology*, 199(1), pp.81-94.

Pierce, A.L., Fox, B.K., Davis, L.K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T., 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(1), pp.31-40.

Pierson, R.W. & Temin, H.M., 1972. The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *Journal of Cellular Physiology*, 79(3), pp.319-329.

Pozios, K.C., Ding, J., Degger, B., Upton, Z., Duan, C., 2001. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(4), pp.R1230-R1239.

Purchase, C.F. & Brown, J.A., 2001. Stock-specific changes in growth rates, food conversion efficiencies, and energy allocation in response to temperature change in juvenile Atlantic cod. *Journal of Fish Biology*, 58(1), pp.36-52.

Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), pp.62-66.

Reindl, K.M. & Sheridan, M.A., 2012. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163(3), pp.231-245.

Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Gutiérrez, J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1), pp.20-24.

Reinecke, M. & Collet, C., 1998. The phylogeny of the insulin-like growth factors. *International Review of Cytology*, 183, pp.1-94.

Rinderknecht, E. & Humbel, R.E., 1978a. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS letters*, 89(2), pp.283-286.

Rinderknecht, E. & Humbel, R.E., 1978b. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *Journal of Biological Chemistry*, 253(8), pp.2769-2776.

Rose-John, S. & Heinrich, P.C., 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal*, 300(Pt 2), p.281.

Ross, R.J.M., Esposito, N., Shen, X.Y., Von Laue, S., Chew, S.L., Dobson, P.R.M., Postel-Vinay, M.C., Finidori, J., 1997. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Molecular Endocrinology*, 11(3), pp.265-273.

Rousseau, K. & Dufour, S., 2004. Phylogenetic evolution of the neuroendocrine control of growth hormone: contribution from teleosts. *Cybium*, 28(3), pp.181-198.

Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), pp.e45-e45.

Russell, N.R. & Wootton, R.J., 1992. Appetite and growth compensation in the European minnow, *Phoxinus phoxinus* (Cyprinidae), following short periods of food restriction. *Environmental Biology of Fishes*, 34(3), pp.277-285.

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., 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(1), pp.193-203.

Saito, Y., Ikebuchi, H., Yamazaki, T., Sawada, J.I., 1995. Release of a soluble form of growth hormone receptors (growth hormone-binding proteins) from human IM-9 cells by proteolytic cleavage. *Journal of Biochemistry*, 118(3), pp.521-525.

Salmon Jr, W.D. & Daughaday, W.H., 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 49(6), p.825.

Sakamoto, T. & McCormick, S.D., 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147(1), pp.24-30.

Sciara, A.A., Rubiolo, J.A., Somoza, G.M., Arranz, S.E., 2006. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(3), pp.284-292.

Shved, N., Berishvili, G., Mazel, P., Baroiller, J.F., Eppler, E., 2011. Growth hormone (GH) treatment acts on the endocrine and autocrine/paracrine GH/IGF-axis and on TNF- α expression in bony fish pituitary and immune organs. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6), pp.944-952.

Sitjà-Bobadilla, A., Calduch-Giner, J., Saera-Vila, A., Palenzuela, O., Álvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2008. Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish & shellfish immunology*, 24(5), pp.610-619.

Sjögren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Törnell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., Ohlsson, C., 1999. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), pp.7088-7092.

Small, B.C. & Peterson, B.C., 2005. Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone (GH) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology*, 28(2), pp.202-215.

Sohm, F., Manfroid, I., Pezet, A., Rentier-Delrue, F., Rand-Weaver, M., Kelly, P.A., Boeuf, G., Postel-Vinay, M.C., de Luze, A., Edery, M., 1998. Identification and modulation of a growth hormone-binding protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology*, 111(2), pp.216-224.

Sotiropoulos, A., Goujon, L., Simonin, G., Kelly, P.A., Postel-Vinay, M.C., Finidori, J., 1993. Evidence for generation of the growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinology*, 132(4), pp.1863-1865.

Souza, V.L., Urbinati, E.C., Nakaghi, L.S.O., Oliveira, E.G., Vasques, L.H., 1995. Estudo morfométrico em hepatocitos de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos à restrição alimentar. In: *Resumos da II Semana de Histologia de Peixes, Jaboticabal (SP) Brazil*, 17-21 July, 116.

Souza, V.L., Lunardi, L.O., Vasques, L.H., Casaletti, L., Nakaghi, L.S.O., Urbinati, E.C., 2001. Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen

in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 18(1), pp.15-20.

Talbot, C., 1993. Some aspects of the biology of feeding and growth in fish. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52(03), pp.403-416.

Tian, X. & Qin, J.G., 2003. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 224(1), pp.169-179.

Tse, D.L.Y., Tse, M.C.L., Chan, C.B., Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R., Cheng, C.H., 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1625(1), pp.64-76.

Uchida, K., Kajimura, S., Riley, L.G., Hirano, T., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 134(2), pp.429-439.

Van Wyk, J.J., Underwood, L.E., Hintz, R.L., Clemmons, D.R., Voina, S.J., Weaver, R.P., 1974. The somatomedins. *Recent Progress in Hormone Research*, 30, pp.259-318.

Wang, Y., Cui, Y., Yang, Y., Cai, F., 2000. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*, reared in seawater. *Aquaculture*, 189(1), pp.101-108.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(6), pp.719-726.

Wilson, P.N. & Osbourn, D.F., 1960. Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biological Reviews*, 35(3), pp.324-361.

Won, E.T., Borski, R.J., 2013. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 4.

Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*, 243, pp.215-285.

Woods, K.A., Camacho-Hübner, C., Savage, M.O., Clark, A.J., 1996. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *New England Journal of Medicine*, 335(18), pp.1363-1367.

Xie, S., Zhu, X., Cui, Y., Wootton, R.J., Lei, W., Yang, Y., 2001. Compensatory growth in the gibel carp following feed deprivation: temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Journal of Fish Biology*, 58(4), pp.999-1009.

Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., LeRoith, D., 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(13), pp.7324-7329.

Zhang, M., Xuan, S., Boussein, M.L., von Stechow, D., Akeno, N., Faugere, M.C., Malluche, H., Zhao, G., Rosen, C.J., Efstratiadis, A., Clemens, T.L., 2002. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), pp.44005-44012.

Zhang, Y., Jiang, J., Black, R.A., Baumann, G., Frank, S.J., 2000. Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE) Is a Growth Hormone Binding Protein (GHBP) Sheddase: The Metalloprotease TACE/ADAM-17 Is Critical for (PMA-Induced) GH Receptor Proteolysis and GHBP Generation 1. *Endocrinology*, 141(12), pp.4342-4348.

Zhang, Y. & Marchant, T.A., 1999. Identification of serum GH-binding proteins in the goldfish (*Carassius auratus*) and comparison with mammalian GH-binding proteins. *Journal of Endocrinology*, 161(2), pp.255-262.

Zhu, X., Cui, Y., Ali, M., Wootton, R.J., 2001. Comparison of compensatory growth responses of juvenile three-spined stickleback and minnow following similar food deprivation protocols. *Journal of Fish Biology*, 58(4), pp.1149-1165.

Zhu, X., Xie, S., Lei, W., Cui, Y., Yang, Y., Wootton, R.J., 2005. Compensatory growth in the Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* following feed deprivation: temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Aquaculture*, 248(1), pp.307-314.