

## Control hormonal y nutricional del crecimiento y desarrollo muscular en dorada (*Sparus aurata*)

E.J. Vélez\*, E. Lutfi\*, E. Capilla, M. Riera, I. Navarro y J. Gutiérrez

Departamento de Fisiología e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal 643, Barcelona 08028.

\* Igual contribución.

e-mail: [evelezve@ub.edu](mailto:evelezve@ub.edu)

### Resumen

El control endocrino del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) converge con el efecto estimulador de los aminoácidos (AA) en la síntesis proteica a nivel de la vía de señalización de mTOR. Usando como modelo el cultivo primario de células satélite de músculo de dorada se investigaron los efectos de IGF-I y/o AA analizando la activación de AKT y mTOR, así como la expresión proteica de PCNA y los factores miogénicos, MyoD y Myogenina. Los resultados mostraron que IGF-I activa AKT solo y en combinación con los AA, pero no mTOR; mientras que los AA estimulan ambas vías. El tratamiento con inhibidores específicos mostró que wortmanina bloquea los efectos sobre AKT sin afectar a mTOR, mientras que rapamicina reduce la fosforilación de ambas moléculas en respuesta a AA, pero no afecta a la activación de AKT por IGF-I. En relación a la proliferación celular, los resultados mostraron un incremento en el número de células PCNA-positivas en respuesta a IGF-I o AA, y un efecto sinérgico en presencia de ambos. AA e IGF-I, juntos o por separado, incrementaron significativamente la expresión proteica de Miogenina, mientras que MyoD no se vio alterada. A nivel de mRNA, no se observaron efectos en la expresión de ninguno de los genes estudiados. En resumen, el presente estudio contribuye a mejorar el conocimiento del papel regulador de los AA e IGF-I sobre el crecimiento muscular de dorada para la optimización de la producción acuícola de esta especie.

*Palabras Clave:* *Sparus aurata*, miocitos, aminoácidos, factores miogénicos y de crecimiento, mTOR, AKT

### Summary

#### Hormonal and nutritional control of muscle growth and development in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

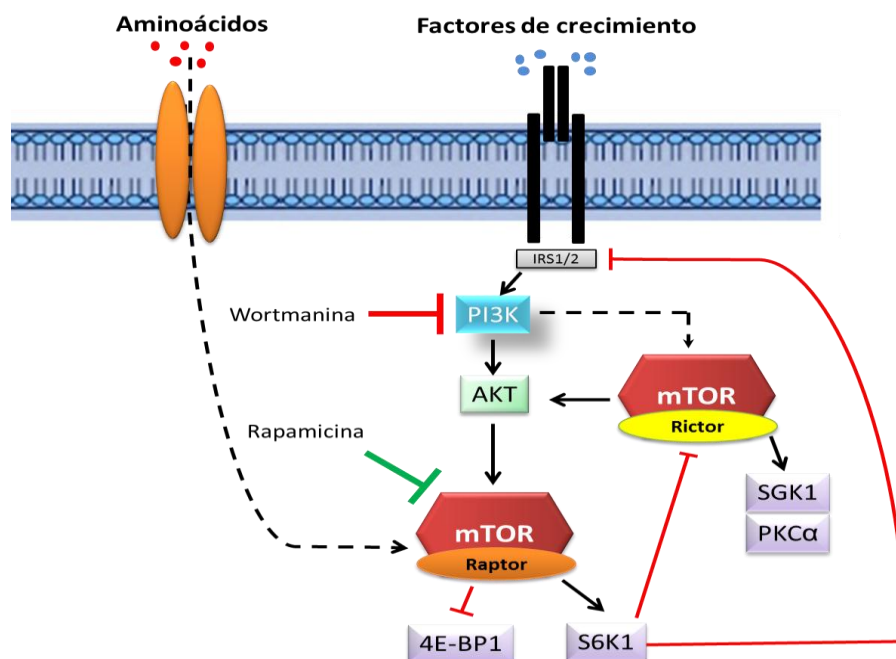
The endocrine control of the insulin-like growth factor (IGF-I) converges with the stimulatory effect of amino acids (AA) on protein synthesis at the level of the mammalian target of rapamycin (mTOR). Using as a model the primary culture of muscle satellite cells from gilthead sea bream, we investigated the effects of IGF-I and/or AA analyzing the activation of AKT and mTOR, as well as the protein expression of PCNA and the myogenic factors, MyoD and Myogenin. The results showed that IGF-I activates AKT alone and in combination with AA, but not mTOR, whereas AA stimulate both pathways. Treatment with specific inhibitors showed that wortmannin blocks the effects on AKT without affecting mTOR, while rapamycin reduces the phosphorylation of both molecules in response to AA, but does not affect AKT activation by IGF-I. In relation with cell proliferation, results showed an increase in the number of PCNA-positive cells in response to IGF-I or AA, and a synergistic effect in the presence of both. AA and IGF-I, combined or separately, increased significantly the protein expression of Myogenin, whereas MyoD was not affected. At the mRNA level, no effects were observed on the expression of any of the genes studied. In summary, the present study contributes to improve the knowledge on the regulatory role of AA and IGF-I in gilthead sea bream muscle growth to optimize the aquaculture production of this species.

*Key words:* *Sparus aurata*, myocytes, amino acids, growth and myogenic factors, mTOR, AKT

## Introducción

El crecimiento y desarrollo muscular en peces es el resultado de una combinación de efectos mediados por factores hormonales y nutricionales. El principal sistema encargado de dicha regulación endocrina es el formado por la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I). Por otro lado, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) conecta la señalización hormonal de IGF-I con la estimulación nutricional de la síntesis proteica mediada por los aminoácidos (AA), como se puede apreciar en la Figura 1 (Bower and Johnston, 2010; Foster and Fingar, 2010; Lansard *y cols.*, 2010). A nivel molecular, la miogénesis está regulada por diversos factores de transcripción, entre los que se encuentran los MRFs (*Myogenic Regulatory Factors*). Algunos de estos factores son esenciales para determinar el linaje y estimular la proliferación celular (por ejemplo MyoD), mientras que otros como Myogenina contribuyen a activar el proceso de diferenciación (García de la serrana *y cols.*, 2014; Jiménez-Amilburu *y cols.*, 2013; Rius-Francino *y cols.*, 2011). A fin de determinar cómo dichos factores regulan el crecimiento muscular en peces, utilizamos como sistema modelo, el cultivo primario de células satélite de dorada. Para ello, estimulamos células a día 4 de cultivo, bien con IGF-I, un cóctel de AA o una combinación de ambos para analizar: a) la fosforilación de AKT y mTOR por western blot (WB); b) la expresión proteica de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) por inmunocitoquímica (ICC); c) la expresión proteica de MyoD y Myogenina por inmunofluorescencia (IF); y d) la expresión génica de diferentes factores miogénicos mediante PCR cuantitativa (qPCR).

**Figura 1.** Representación esquemática de la activación de las vías de señalización de AKT y mTOR por AA y factores de crecimiento tipo IGF-I. Adaptado de Foster and Fingar, 2010.



## Materiales y métodos

Para este estudio se utilizaron doradas de un peso medio de 5-10g procedentes de una piscifactoría del norte de España. El cultivo primario de células satélite se realizó siguiendo el protocolo previamente establecido en nuestro grupo (Montserrat *y cols.*, 2007). Primero, para caracterizar el desarrollo del cultivo, la proliferación celular fue analizada

mediante ICC para PCNA a días 2, 4, 8 y 12 de cultivo (Rius-Francino *y cols.*, 2011); y a continuación se estudió la expresión proteica de MyoD y Myogenina mediante IF a días 4 y 8 (Gabillard *y cols.*, 2010). Posteriormente, células a día 4 fueron estimuladas con IGF-I recombinante humano a 100nM y/o una mezcla de AA (esenciales y no esenciales, Sigma-Aldrich, España) con el fin de analizar mediante WB las posibles diferencias en la activación de las vías de señalización de mTOR y AKT en presencia o no de sus inhibidores específicos (rapamicina y wortmanina, respectivamente). Finalmente se estudió el efecto de dichos tratamientos a nivel de la expresión génica de diferentes factores miogénicos por qPCR y de la expresión proteica de PCNA (ICC) y de Myogenina y MyoD (IF).

## Resultados y Discusión

Los resultados iniciales de caracterización mostraron que el número de células PCNA-positivas es significativamente mayor durante los primeros días de cultivo (2 y 4) y que disminuye progresivamente (8 y 12) en consonancia con la menor capacidad proliferativa de las células a medida que el cultivo avanza. La expresión proteica de MyoD no cambió durante el proceso de miogénesis, mientras que la expresión de Myogenina aumentó del día 4 al 8 coincidiendo con la diferenciación de las células de miocitos a miotubos. En la tabla 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos y técnicas. Los resultados de WB mostraron que IGF-I incrementa la fosforilación de AKT pero no de mTOR mientras que los AA estimulan ambas vías, y que IGF-I en combinación con AA produce un efecto sinérgico tanto en la activación de AKT como de mTOR. El tratamiento con inhibidores específicos mostró que wortmanina bloquea completamente los efectos sobre AKT sin afectar a mTOR. Sin embargo, el tratamiento con rapamicina redujo la fosforilación de ambos, mTOR y AKT en respuesta a AA, pero sin afectar la activación de AKT por IGF-I. En relación a la proliferación, los resultados mostraron un incremento en el número de células PCNA-positivas en respuesta a IGF-I, y un efecto sinérgico ante el tratamiento combinado. Por otro lado, los resultados de IF indicaron que los AA incrementan la expresión proteica de Myogenina mientras que ningún tratamiento produjo cambios significativos en el caso de MyoD. Finalmente, no se observó ningún efecto sobre la expresión de los genes estudiados, sugiriendo que los cambios observados en las proteínas ocurren a nivel post-transcripcional.

**Tabla 1.** Resumen de resultados obtenidos en el presente estudio (WB: Western Blot, ICC: Inmunocitoquímica, IF: Inmunofluorescencia).

Proteína	AA	IGF-I	AA + IGF-I
<i>mTOR-P (WB)</i>	↑	=	↑
<i>AKT-P (WB)</i>	=	↑	↑
-----			
<i>PCNA (ICC)</i>	=	↑	↑
-----			
<i>Myogenina (IF)</i>	↑	↑	↑
<i>MyoD (IF)</i>	=	=	=

En resumen, en este estudio se han caracterizado los patrones de proliferación y diferenciación celular del cultivo primario de miocitos de dorada y se ha corroborado la capacidad de los AA y el IGF-I de modular la actividad de dos moléculas clave en la transducción celular, como son mTOR y AKT, implicadas en la inducción de la síntesis proteica en el músculo. Los resultados indican que un tratamiento con AA e IGF-I, ya sea de forma separada o en combinación, modifica la expresión de importantes factores relacionados con la proliferación (PCNA) o la diferenciación celular (Myogenina), confirmando su función en la estimulación del crecimiento muscular. Podemos concluir que el estado nutricional (AA) y hormonal (IGF-I) ejerce un importante papel regulador en el desarrollo muscular de la dorada, y el conocimiento de sus vías de señalización puede ser utilizado para la optimización del crecimiento y la calidad de esta especie.

## Agradecimientos

Financiado por la Unión Europea (Proyecto LIFECYCLE FP7-222719), el Ministerio de Ciencia e Innovación (HF2008-0019 y AGL2012-39768) y la Generalitat de Catalunya (2009SGR-00402 y XRAq). En colaboración con Tinamenor.

## Bibliografía

1. Bower, N.I., and Johnston, I. A (2010). Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and insulin-like growth factors during myogenesis in Atlantic salmon. *PLoS One* 5, e11100.
2. Foster, K.G., and Fingar, D.C. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J. Biol. Chem.* 285, 14071–14077.
3. Gabillard, J.C., Sabin, N., and Paboeuf, G. (2010). *In vitro* characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell Tissue Res.* 342, 471–477.
4. Jiménez-Amilburu, V., Salmerón, C., Codina, M., Navarro, I., Capilla, E., and Gutiérrez, J. (2013). Insulin-like growth factors effects on the expression of myogenic regulatory factors in gilthead sea bream muscle cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 188, 151–158.
5. García de la serrana, D., Codina, M., Capilla, E., Jiménez-Amilburu, V., Navarro, I., Du, S.-J., Johnston, I.A., and Gutiérrez, J. (2014). Characterisation and expression of myogenesis regulatory factors during *in vitro* myoblast development and *in vivo* fasting in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 167, 90-99.
6. Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seilliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2010). Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39, 801–810.
7. Montserrat, N., Sánchez-Gurmaches, J., García de la Serrana, D., Navarro, M.I., and Gutiérrez, J. (2007). IGF-I binding and receptor signal transduction in primary cell culture of muscle cells of gilthead sea bream: changes throughout *in vitro* development. *Cell Tissue Res.* 330, 503–513.

8. Rius-Francino, M., Acerete, L., Jiménez-Amilburu, V., Capilla, E., Navarro, I., and Gutiérrez, J. (2011). Differential effects on proliferation of GH and IGFs in sea bream (*Sparus aurata*) cultured myocytes. Gen. Comp. Endocrinol. 172, 44–49.