

UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Doctor Fernando Monckeberg Barros

**“PAPEL DEL RECEPTOR DE ENDOCANABINOIDES TIPO 1 EN LA RESPUESTA A
GLUCOCORTICOIDES EN LA LÍNEA CELULAR DE MÚSCULO ESQUELÉTICO C2C12”**

Tesista

Pamela Recabarren Velasco

Directores de Tesis

Dr. Rodrigo Troncoso

Dr. Miguel Llanos

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS MENCIÓN
NUTRICIÓN HUMANA

Noviembre 2017
Santiago-Chile

Financiamiento

Esta Tesis de Magister se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física, y el Laboratorio de Nutrición y Regulación Metabólica pertenecientes al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

Proyecto FONDECYT 1130106 (Dr. Miguel Llanos)

Proyecto FONDECYT 11130285 (Dr. Rodrigo Troncoso)

Proyecto FONDAP ACCDiS 15130011 (Dr. Rodrigo Troncoso)

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 5 |
| Introducción | 7 |
| Sistema Endocanabinoide | 7 |
| Funcion del Sistema Endocanabinoide a nivel central y periferico | 9 |
| Sistema Endocanabinoide y Glucocorticoides | 11 |
| Hipótesis | 15 |
| Objetivo general | 15 |
| Objetivos específicos | 15 |
| Metodología | 16 |
| Diseño de la investigación | 16 |
| Diseño experimental | 16 |
| Definición de variables | 18 |
| Variables independientes | 18 |
| Variables dependientes | 18 |
| Procedimientos | 19 |
| Análisis estadístico | 22 |
| Resultados | 23 |
| Discusión | 31 |
| Conclusión | 37 |
| Referencias | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Biosíntesis e hidrólisis de los endocannabinoides..... | 8 |
| Figura 2. Estimulación de células con DEX + AEA..... | 17 |
| Figura 3. Estimulación de células con DEX + AEA + Insulina | 14 |
| Figura 4. Análisis por qRT-PCR del efecto de DEX sobre la expresión de RCB1..... | 23 |
| Figura 5. Análisis por Western Blot del efecto de DEX sobre la abundancia de RCB1..... | 23 |
| Figura 6. Análisis por qRT-PCR del efecto de DEX sobre la expresión del RCB1..... | 24 |
| Figura 7. Análisis por Western Blot del efecto del antagonista de GR sobre la expresión del RCB1..... | 24 |
| Figura 8. Análisis por qRT-PCR del efecto de la concentración de AEA sobre la expresión de genes atroficos | 25 |
| Figura 9. Análisis por qRT-PCR del efecto de AEA y DEX sobre la expresión de genes atroficos | 26 |
| Figura 10. Análisis por qRT-PCR del efecto de AEA y DEX sobre la expresión de FkBP5 y RCB1..... | 27 |
| Figura 11. Análisis por Western Blot del efecto de AEA sobre la fosforilación de p70S6K.. | 28 |
| Figura 12. Análisis por Western Blot del efecto de AEA sobre la fosforilación de AMPK | 28 |
| Figura 13. Análisis por Western Blot del efecto de AEA sobre la fosforilación de Akt estimulada por insulina | 29 |
| Figura 14. Análisis por Western Blot del efecto de DEX y AEA sobre la fosforilación de Akt estimulada por insulina | 30 |

Resumen: El sistema endocanabinoide (SEC) es un sistema que lo componen un gran grupo de moléculas endógenas, incluyendo los dos principales neuromoduladores derivados de araquidonato, la anandamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG), conocidos como endocannabinoides (ECs); diversas enzimas implicadas en el metabolismo de AEA y 2-AG; y dos receptores conocidos como receptor canabinoide tipo 1 (RCB1) y tipo 2 (RCB2) los cuales están acoplados a proteína G. A la fecha, algunos estudios han descrito que la actividad del RCB1 controla procesos metabólicos claves en el músculo esquelético como la señalización de la insulina, la captación de glucosa, y la oxidación de ácidos grasos. La evidencia reciente demuestra que los ECs poseen la capacidad de aumentar la señalización de los glucocorticoides, que se sabe regulan el apetito, el balance energético, y los procesos metabólicos a través de vías centrales y periféricas. Sin embargo, no se sabe si los efectos de glucocorticoides en atrofia y resistencia a la insulina en el musculo son mediados por el RCB1.

Objetivo: Determinar la función del SEC en la respuesta a glucocorticoides en la línea celular de músculo esquelético de ratón C2C12.

Metodología: Se estimularon células C2C12 con 1 μ M de dexametasona (DEX) por 6, 18 Y 24 h y se evaluó la expresión del RCB1 en músculo esquelético por qRT-PCR y western blot. Posteriormente, se determinó si AEA modifica la respuesta a glucocorticoides mediante la evaluación del mRNA para Atrogin-1, Murf1, FKBP5 y RCB1. Finalmente, se evaluó la función de AEA en el efecto de los glucocorticoides sobre la respuesta a insulina, evaluando la forma fosforilada y total de Akt mediante western blot.

Resultados: La dexametasona aumentó la expresión del RCB1 en células C2C12. Por otra parte, AEA modifica la respuesta a glucocorticoides disminuyendo la expresión de Atrogin-1 y Murf1 aumentado por DEX, además aumenta la expresión del gen FKBP5 cuando se estimula en conjunto con DEX. Por último, el tratamiento en conjunto con DEX y AEA disminuye la fosforilación de la proteína Akt.

Conclusión: Los efectos que posee DEX en músculo esquelético sobre la atrofia muscular y la resistencia a la insulina podrían estar mediados por AEA a través de RCB1. Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan elementos para una mejor comprensión de los efectos de los glucocorticoides y los ECs en el músculo esquelético, proporcionando de esta manera, posibilidades de nuevas perspectivas terapéuticas para el tratamiento de la atrofia muscular y la resistencia a la insulina.

Abstract: The endocannabinoid system (SEC) is composed of a large group of endogenous molecules, including the two main arachidonate-derived neuromodulators, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), known as endocannabinoids (ECs); several enzymes involved in the metabolism of AEA and 2-AG; and two receptors known as cannabinoid receptor type 1 (CB1R) and type 2 (CB2R), both coupled to G protein. To date, some studies have described that CB1R activity is necessary to modulate key metabolic processes in skeletal muscle, such as insulin signaling, glucose uptake, and fatty acids oxidation. It is also known that endocannabinoids are able to regulate appetite, energy balance, and metabolic processes through central and peripheral pathways. Interestingly, recent evidence shows that endocannabinoids have the ability to increase glucocorticoid signaling. At present however, it is not known if the effects of glucocorticoids on muscular atrophy and insulin resistance are mediated by endocannabinoids.

Objective: To determine the function of the endocannabinoid system in the glucocorticoid response to glucocorticoids in the mouse skeletal muscle cell line C2C12.

Methodology: C2C12 cells were stimulated with 1 μ M dexamethasone (DEX) for 6, 18 and 24 h and the expression of RCB1 in skeletal muscle was evaluated by qRT-PCR and western blot. Subsequently, we determined whether the endocannabinoid AEA modifies the glucocorticoid response by assessing the mRNA for Atrogin-1, Murf1, FKBP5 and RCB1. Finally, we evaluated the effect of anandamide on glucocorticoids regulation of insulin-dependent Akt phosphorylation through measurements of phosphorylated and Akt total forms of by western blot.

Results: Dexamethasone increased the expression of RCB1 in C2C12 cells. On the other hand, AEA modifies the glucocorticoid response by decreasing the expression of Atrogin-1 and Murf1 increased by DEX, in addition it increases the expression of the FKBP5 gene when stimulated in conjunction with DEX. Finally, the treatment in conjunction with DEX and AEA decreases the phosphorylation of Akt protein.

Conclusion: The effects of dexamethasone on skeletal muscle atrophy and insulin resistance may be mediated by AEA through RCB1. Results of this study give support to a better understanding of the effects of glucocorticoids and endocannabinoids on skeletal muscle, thereby providing new chances of therapeutic perspectives to treat muscle atrophy and insulin resistance.

Introducción

El Sistema Endocanabinoide.

La *cannabis sativa* ha sido utilizada como planta medicinal desde hace muchos siglos. Las primeras evidencias de su utilidad terapéutica se remontan al año 2737 a.C. en China, donde se utiliza para el tratamiento de diversas dolencias (Mechoulam & Hanus, 2000). Sin embargo, su principal componente psicoactivo, el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), fue identificado y sintetizado en la década de 1960 (Mechoulam & Gaoni, 1965). Más de dos décadas después se descubrieron dos receptores para THC que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs): i) el receptor canabinoide tipo 1 (RCB1) (Matsuda y cols., 1990; Devane y cols., 1988); y ii) el receptor canabinoide tipo 2 (RCB2) (Munro y cols., 1993). El RCB1 se describió inicialmente, como el receptor canabinoide neuronal, ya que está altamente expresado en diferentes clases de neuronas (Wilson & Nicoll., 2001). El RCB1 se ha encontrado, además, en un número de células de tipos no neuronales y tejidos periféricos, por ejemplo tejido adiposo, páncreas, músculo, riñón y hepatocitos (Chorvat y cols., 2012; Jenkin y cols., 2010; Pagotto y cols., 2006). En estos órganos y tejidos periféricos, la función fisiológica común de RCB1 parece ser la modulación directa del metabolismo de la célula, independiente del sistema de control del apetito en el sistema nervioso central (SNC) (O'Keefe y cols., 2014). Por otra parte, el RCB2 se expresa principalmente en las células inmunes periféricas, como son las células B y natural killers y los órganos del sistema inmunitario, como el bazo o las amígdalas (Breivogel C, 1998; Pertwee R, 1997; Galiegue y cols., 1995), la expresión RCB2 también se encuentra en los osteocitos, los osteoblastos y los osteoclastos (Ofek y cols., 2006). Con el descubrimiento de los receptores de canabinoides se sugirió la existencia de ligandos endógenos capaces de activarlos, los "endocannabinoides", los mejores estudiados son la anandamida (AEA, N-araquidoniletanolamida) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Devane y cols., 1992; Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995). Estos son derivados del metabolismo no oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, especialmente de ácido araquidónico, y exhiben una selectividad variable para los 2 receptores de canabinoides, así como para otros blancos moleculares (Di Marzo y cols., 2002).

La síntesis de ECs (Fig. 1) se estimula principalmente por un aumento del Ca^{2+} intracelular y de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). El aumento de Ca^{2+} puede ser resultado de la apertura de los canales iónicos de la membrana y también de la movilización de los depósitos intracelulares, por medio de la activación de la fosfolipasa-C β . Aunque 2-AG y AEA parecen ser reguladas por mecanismos intracelulares similares, ciertos estímulos pueden aumentar preferencialmente uno u otro ligando (Stella y cols., 1997; Stella & Piomelli, 2001).

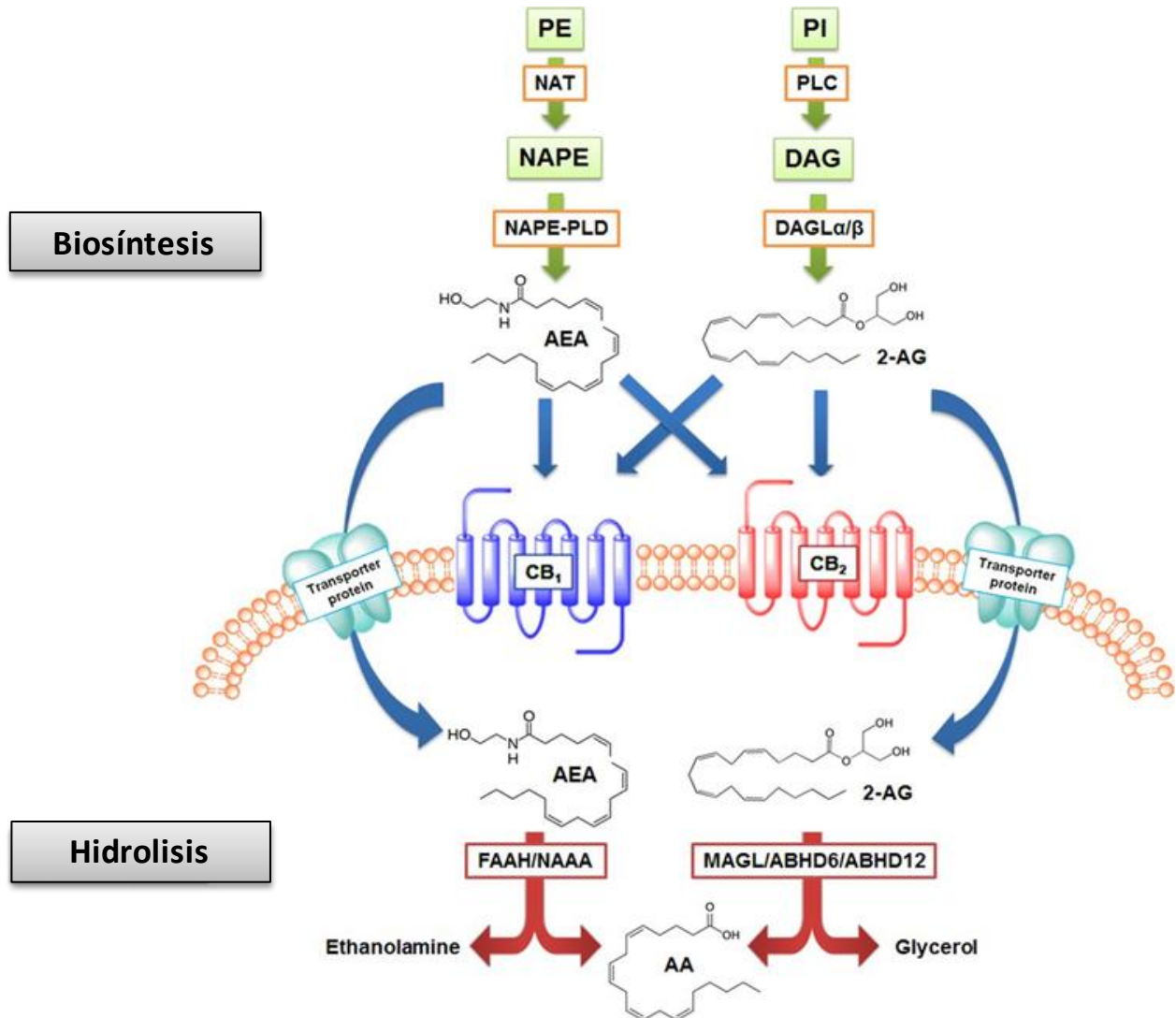


Figura 1. Biosíntesis e hidrólisis de los endocannabinoides. Para la biosíntesis de N- araquidonoil etanolamida (AEA), la fosfatidiletanolamina (PE) se convierte en N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) por la N-aciltransferasa (NAT), y secuencialmente, la NAPE-fosfolipasa D (NAPE-PLD) cataliza NAPE y produce AEA. La biosíntesis del 2-araquidonoilglicerol (2-AG) comienza con la hidrólisis mediada por la fosfolipasa C (PLC) desde el fosfatidilinositol lipídico de membrana (PI) para producir diacilglicerol (DAG), que posteriormente se convierte en 2-AG por la diacilglicerol lipasa (DAGL) α y β . Después de unirse a los receptores de cannabinoides y ejercer sus actividades biológicas, los endocannabinoides se degradan mediante actividades enzimáticas específicas. AEA se degrada en ácido araquidónico (AA) y etanolamina por la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y por la N-aciletanolamina amido hidrolasa (NAAA). El 2-AG se cataboliza en AA y glicerol por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), α , β -hidrolasa-6 (ABHD - 6) y ABHD - 12 (Massa y cols., 2006).

La degradación enzimática (Figura 1) de los ECs juega un rol importante en el control de sus niveles extracelulares. La AEA es metabolizada por la FAAH (Cravatt y cols., 1996; Giang & Cravatt, 1997; Bracey y cols., 2002) dando lugar a AA y etanolamina. La FAAH es

una enzima integral de membrana con actividad serina hidrolasa que se expresa de forma abundante en varios órganos, entre ellos el cerebro (Kano y cols., 2009). La distribución de FAAH es complementaria a la del RCB1 (Egertová y cols., 1998). Los mayores niveles para esta enzima aparecen, en humanos, en corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales, médula espinal, tronco encefálico y cerebelo (Romero y cols., 2002). Aunque el 2-AG es también sustrato de la FAAH (Goparaju y cols., 1998), la degradación de este endocanabinoide se realiza mayoritariamente por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL). La enzima MAGL es una serinahidrolasa que degrada 2- y 1- monoacilgliceroles produciendo el ácido graso correspondiente y glicerol (Dinh y cols., 2002).

Tanto AEA y 2-AG también pueden ser degradados por las enzimas de la cascada de araquidonato, tales como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), las lipoxigenasas (LOXS), así como las enzimas del citocromo P450, para producir los correspondientes hidroxí- (en el caso de lipoxigenasas) y epoxi- derivados (en el caso de las monooxigenasas del citocromo P450) o para producir prostamidas y ésteres de glicerol-prostaglandina (PGH₂-G) en el caso de las ciclooxigenasas y sintasas de prostaglandinas (Piscitelli & Di Marzo., 2012).

Función del Sistema Endocanabinoide a nivel central y periférico

El sistema endocanabinoide (SEC) se expresa ampliamente en todo el organismo, participando críticamente en el mantenimiento de la homeostasis de energía [Pagotto y cols., 2006a), siendo un candidato ideal para responder a los requisitos variables a los que los animales son sometidos por el medio ambiente, como por ejemplo la escasez de alimento. Esto se hace posible ya que la liberación de ECs ocurre inmediatamente después de la biosíntesis, generalmente después de alteraciones en las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ (Kirkham y cols., 2002). Se ha documentado que el cerebro actúa como el principal órgano involucrado en la regulación de la ingesta de alimentos por los ECs, los cuales también participan en los mecanismos periféricos asociados en el control de la homeostasis de energía (Gómez y cols., 2002).

Las concentraciones hipotalámicas de ECs, especialmente 2-AG, aumentan durante la privación de alimentos, vuelven a la normalidad después de la realimentación, y disminuyen después del consumo de alimentos, sin cambiar en las áreas cerebrales no implicadas en la alimentación. En otras áreas del cerebro, una función general del SEC es modular la actividad de las vías neuronales centrales y periféricas implicadas en la ingesta de alimentos dulces y grasos (DiPatrizio y cols., 2011). Se ha descrito además, que los niveles de los ECs se desregulan en el hipotálamo y el núcleo acumbens (NAc) durante la obesidad (Malcher-Lopes y cols., 2006; Kola y cols., 2008).

Además de su papel en la modulación de procesos a nivel del sistema nervioso central implicados en la ingesta de alimentos, el SEC está presente en los tejidos periféricos metabólicamente relevantes, como el hígado, tejido adiposo, músculo esquelético y páncreas endocrino, cuya fisiología normal es modulada por el SEC particularmente a través del RCB1.

Se ha descubierto que el RCB1 en el tejido adiposo promueve la lipogénesis mediante varios mecanismos, incluyendo la facilitación de la diferenciación de los adipocitos y el aumento de la expresión de las enzimas adipogénicas. Se observó que la activación farmacológica del RCB1 con WIN55,212-2 (agonista de RCB1) aumenta la actividad de la lipoproteína lipasa en los adipocitos primarios mientras que el rimonabant (antagonista/agonista inverso RCB1) impedía este efecto (Cota y cols., 2003). En el hígado, se ha observado que la activación farmacológica del RCB1 en los hepatocitos induce la expresión de enzimas lipogénicas, lo cual es relevante para el desarrollo de esteatosis hepática durante la obesidad (Cinar y cols., 2014). En este sentido, se ha demostrado que una dieta rica en grasas aumenta los niveles hepáticos de AEA, la densidad de RCB1 y las tasas basales de síntesis de ácidos grasos *de novo*, siendo esta última reducida por el bloqueo de RCB1 (Osei-Hyiaman y cols., 2005)

También es importante destacar que, la desregulación del SEC se ha relacionado con obesidad abdominal y otros factores de riesgo como la diabetes mellitus tipo 2 (Osei-Hyiaman y cols., 2005a; Matias y cols., 2006). Estudios en modelos animales DIO (Obesidad inducida por dieta) muestran niveles de ECs elevados en el hipotálamo y en los tejidos periféricos (Di Marzo y cols., 2001). En personas obesas, incrementos en los niveles plasmáticos de AEA y 2-AG, se asocian con un funcionamiento anormal del endotelio coronario y células del músculo liso vascular arteriolar (Quercioli y cols., 2011). En otro estudio publicado en el año 2005, se reportó que las mujeres obesas posmenopáusicas tenían un aumento del 35 y 52%, respectivamente, en los niveles plasmáticos de AEA y 2-AG, en comparación con las mujeres de peso normal (Engeli y cols., 2005a). El aumento de los ECs en plasma y los niveles de N-aciletanolaminas también se describen en hombres y mujeres diabéticos con sobrepeso y diabetes mellitus tipo 2 (Matias y cols., 2006a; Matias y cols., 2007). A la inversa, el bloqueo farmacológico o genético de RCB1R mejora el estado metabólico, promoviendo la reducción en el peso corporal y masa grasa, así como la mejora de la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en ratas. (Bensaid y cols., 2003; Ravinet Trillou y cols., 2003; Osei-Hyiaman y cols., 2008; Jourdan y cols., 2010).

El músculo es un tejido clave en la regulación de la homeostasis energética, no sólo durante los periodos de alta actividad, donde requiere grandes cantidades de energía, sino también durante el reposo, ya que, es un importante sitio de β -oxidación de ácidos grasos y el principal tejido de captación de glucosa inducida por insulina (Abdul-Ghani & DeFronzo, 2010). En la actualidad, se conoce que las células musculares expresan un gran número de los componentes del SEC, incluyendo las enzimas de síntesis, degradación y sus receptores (Cavuoto y cols., 2007; Crespillo y cols., 2011; Eckardt y cols., 2009; Esposito y cols., 2008; Lipina y cols., 2010). Se ha demostrado, que la activación farmacológica del RCB1 en el musculo sóleo aislado de ratón disminuye el transporte de glucosa tanto a nivel basal como el estimulado por insulina (Lindborg y cols., 2010). El uso de rimonabant mejora directamente la actividad del transporte de glucosa de una manera dosis-dependiente en este tejido (Lindborg y cols., 2010a; Liu y cols., 2005). La respuesta del músculo esquelético a la insulina parece estar mediada por la modulación de las vías de señalización PI3-K/Akt y Raf-MEK1/2-ERK1/2 que pueden ser moduladas por agonistas de RCB1 (Lipina y cols., 2010a). Por otra parte se ha postulado, que el SEC juega un papel fundamental en la formación del músculo esquelético. La activación de RCB1 por los ECs inhibe la diferenciación de mioblastos a miotubos, mientras que el bloqueo de RCB1 por un antagonista de RCB1 o RCB1 siRNA, promueve la diferenciación (Iannotti y cols., 2014). Además, los ratones RCB1 KO producen fibras más grandes (Maccarrone y cols., 2015). Se ha reportado además que, debido a cambios en la expresión de genes implicados en su metabolismo, los niveles de 2-AG se reducen *in vitro* e *in vivo*, tanto durante la formación del miotubo en mioblastos C2C12 murinos, como durante el crecimiento del músculo del ratón. Es importante destacar, que 2-AG también inhibe la diferenciación de las células satélite humanas en cultivos primarios (Iannotti y cols., 2014a).

El Sistema Endocanabinoide y Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GCs) afectan a casi todos los órganos y tejidos del cuerpo, regulando diversos procesos fisiológicos incluyendo la homeostasis de energía, la respuesta inmune, el crecimiento óseo, la reproducción, el comportamiento, la proliferación celular y la supervivencia (Oakley & Cidlowski., 2011). Fisiológicamente, la activación del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA) induce la síntesis y secreción de GC desde la corteza suprarrenal. La misión metabólica de los GC es suministrar suficiente glucosa en la circulación para alimentar el cerebro y asegurar la supervivencia del organismo en condiciones de estrés agudo o hambre (Vegiopoulos & Herzig., 2007). Los estados de exceso de GCs endógeno o exógeno, por ejemplo el síndrome de Cushing o terapia con GCs, respectivamente, se caracterizan por graves perturbaciones en el metabolismo de energía a nivel sistémico mostrando obesidad central, atrofia muscular, hiperglicemia, hígado graso, hipertensión, colesterol elevado, inmunodeficiencia y resistencia a la

insulina (Shibli-Rahhal y cols., 2006). Específicamente en músculo esquelético, se ha reportado que los GCs inhiben la captación y utilización de glucosa promoviendo la resistencia a la insulina (Taiyi Kuo y cols., 2013). Por otra parte, está bien documentado que los GCs aceleran la degradación proteica en músculo esquelético, a la vez que inhiben su síntesis (Ochi y cols., 2015).

Se sabe que los GCs promueven el desarrollo del síndrome metabólico a través de la modulación tanto de las vías asociadas a la ingesta de alimentos, como de procesos metabólicos (Dallman, 2010; McEwen, 2008; Wardle y cols., 2011; Patterson & Abizaid, 2013; Trikudanathan & McMahon, 2008); Sin embargo, actualmente los mecanismos precisos involucrados en estos efectos no son bien comprendidos. La evidencia reciente demuestra que los GCs poseen la capacidad de aumentar la señalización de ECs (Hill & McEwen., 2010; Campolongo y cols., 2009; Coddington y cols., 2007; Evanson y cols., 2010), que se sabe regula el apetito, el balance energético, y los procesos metabólicos a través de vías centrales y periféricas (Engeli y cols., 2005; Silvestri & Di Marzo, 2013; Karatsoreos y cols., 2010; Fraser y cols., 1999; Björntorp & Rosmond, 2000).

A nivel central se han descrito estudios donde el uso de antagonistas de RCB1 y ratones Knockout RCB1 (RCB1 $-/-$) muestran que la pérdida de actividad de RCB1 resulta en un aumento de la liberación de corticosterona en respuesta a un estrés agudo (Cota y cols., 2007; Hill y cols., 2011; Patel y cols., 2004; Wade y cols., 2006). De forma similar, el antagonismo farmacológico de RCB1 central aumenta las concentraciones circulantes de corticosterona y ACTH (hormona adrenocorticotropa) en rata (Manzanares y cols., 1999). Por otra parte, la administración exógena de corticosterona a ratas aumenta el contenido de 2-AG en el hipotálamo (Hill y cols., 2010), corteza pre-frontal (Hill y cols., 2011), y región CA1 del hipocampo (Wang y cols., 2012). La administración de corticosterona también resulta en aumentos rápidos de AEA en la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo (Hill y cols., 2010a). Estos datos dan evidencia de la participación del SEC en los mecanismos de retroalimentación negativa a nivel del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Además, otro estudio donde se midió la actividad de AMPK en el hipotálamo en ratones wild type y *Knockout* RCB1, aquellos ratones carentes del RCB1 mostraron una disminución significativa en la actividad de AMPK en el hipotálamo en comparación con ratones nativos (Scerif y cols., 2013). Por otro lado, en un estudio donde se utilizó un modelo de ratón de exposición excesiva a corticosterona, se encontró que la capacidad de los GCs de aumentar la adiposidad, el aumento de peso, la desregulación hormonal, la esteatosis hepática y la dislipidemia se redujo o se invirtió en ratones que carecían del

RCB1 o donde se utilizó un antagonista del RCB1, AM251 (Bowles y cols., 2015). Estos datos en conjunto indican la importancia del SEC en los efectos producidos por los GCs.

Por otra parte, el receptor de glucocorticoides (GR), es un factor de transcripción dependiente de glucocorticoides ampliamente distribuido a través del cerebro y los tejidos periféricos, que media los efectos fisiológicos de los glucocorticoides (Heitzer y cols., 2007; Smoak & Cidlowski, 2004). El GR posee tres dominios funcionales principales: el dominio N-terminal (NTD), el dominio de unión al DNA central (DBD) y el dominio de unión al ligando C-terminal (LBD). El DBD consta de dos *finger zinc* importantes para la dimerización del GR, la translocación nuclear y la unión de DNA (Smith y cols., 1993). En ausencia de ligando, el GR se encuentra predominantemente en el citoplasma en complejo con proteínas chaperonas y co-chaperonas, entre ellas, la proteína de choque térmico 90 (HSP-90), la proteína de choque térmico 70 (HSP-70), una co-chaperona de 23 kDa (p23) e inmunofilinas (IMM) (Kirschke y cols., 2014; Vandevyver y cols., 2012). FKBP52 y FKBP51 son inmunofilinas asociadas al GR, capaces de formar complejos con otros factores. Estas dos IMM tienen un 75% de similitud (Cox y cols., 2007), y se unen al mismo sitio aceptor en HSP-90 (Silverstein y cols., 1999; Galigniana y cols., 2010). Sin embargo, sus funciones difieren drásticamente. Aunque FKBP52 es considerado como un regulador positivo de la actividad del GR, FKBP51 es un regulador negativo. Por consiguiente, su sobreexpresión impide la regulación positiva por FKBP52 debido a la competencia de FKBP51 con el mismo sitio de unión en HSP-90 (Galigniana y cols., 2012). Se ha descrito además, que el complejo GR-FKBP51 se une con menor afinidad a los GCs y la translocación nuclear del receptor se ve afectada (Wochnik y cols., 2005), por lo tanto, puede actuar como un regulador de retroalimentación negativa en las acciones de los GCs. Es importante destacar además, que los glucocorticoides autorregulan sus propios efectos induciendo la expresión de FKBP51 (Vermeer y cols., 2003). Es más, se ha descrito que en tejido adiposo subcutáneo y omental, obtenido de donantes no diabéticos, el RCB1 y FKBP51 fueron los genes con mayor incremento de expresión después de la incubación con dexametasona. También se muestra que la expresión génica de FKBP5 en el tejido adiposo subcutáneo se correlaciona con marcadores de resistencia a la insulina in vivo, es decir, insulina y HOMA-IR (Lundgren y cols., 2007). En resumen, estos datos dan evidencia que la regulación positiva de FKBP5 causada por los GCs puede tener implicaciones negativas o positivas en las acciones de los glucocorticoides.

En base a estos antecedentes, donde se evidencia el papel del RCB1 en los efectos de los Gcs, sumado a la función de estos en la inducción de atrofia y resistencia a insulina en músculo esquelético, se postula una nueva pregunta de investigación: ¿serán los efectos de los GCs en atrofia y resistencia a la insulina en el musculo, mediados por el RCB1?. Este estudio tiene como objetivo determinar la función del SEC en la respuesta a GCs en la línea celular de músculo esquelético de ratón C2C12. Los resultados de este estudio proporcionaran una nueva visión conceptual de cómo los ECs actúan en el musculo esquelético, generando nuevas preguntas de interés en el ámbito fisiológico y terapéutico.

Hipótesis

La activación del RCB1 regula la expresión de genes atróficos y la disminución de la respuesta a insulina, inducida por glucocorticoides, en la línea celular de músculo esquelético de ratón C2C12.

Objetivo general

Determinar la función del SEC en la respuesta a glucocorticoides en la línea celular de músculo esquelético de ratón C2C12.

Objetivos específicos

- 1) Determinar si la DEX regula la expresión del RCB1 en musculo esquelético.
- 2) Determinar si la AEA regula la expresión de genes atróficos inducidos por glucocorticoides.
- 3) Determinar si la AEA regula los efectos de los glucocorticoides sobre la fosforilación de Akt dependiente de insulina.

Metodología

Diseño de la investigación

Se realizó un estudio experimental *in vitro*, utilizando la línea celular C2C12 *wild type*, que corresponde a células de músculo esquelético de ratón. Los experimentos fueron realizados al menos en cuatro repeticiones independientes por condición experimental.

Definición de la muestra

La línea celular C2C12, de músculo esquelético de ratón, en cultivo forma miotubos multinucleados y fibras estriadas (Yaffe & Saxel., 1977). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM, más 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibióticos, y mantenidas a 37°C con una atmosfera humedecida de 5% de CO₂ y 95% de aire. Para la diferenciación de las células a miotubos, estas fueron cultivadas con DMEM, más 1% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibióticos y fueron mantenidas en las mismas condiciones.

Diseño experimental

Objetivo n°1. Determinar si la DEX regula la expresión del RCB1 en músculo esquelético.

Para este objetivo, se estimularon células C2C12 con 1 µM de DEX por 6, 18 Y 24 h. Posteriormente, se determinó la expresión del RCB1 y los niveles de proteína mediante qRT-PCR y western blot, respectivamente. Además, se analizó la expresión del RCB1 mediante qRT-PCR en musculo gastrocnemio de ratón, para ello se utilizaron ratones C57BL/6 provenientes del Instituto de Salud pública de Santiago. Al destete, fueron trasladados al bioterio del INTA, y se les dio una semana de aclimatación, posteriormente recibieron dieta normal durante 12 semanas. Para evaluar la respuesta a glucocorticoides se les administró una inyección intraperitoneal de dexametasona (2 mg/kg) y PBS al grupo control. Después de 8 horas los animales fueron sacrificados con isofluorano, y se les extrajo el musculo gastrocnemio. Todos los experimentos de esta propuesta fueron aprobados por el Animal Care y el comité de bioética de la Universidad de Chile conformado por la guía del cuidado y el uso de animales de laboratorio publicado por Nacional Insitutes of Health (NIH Publicado No. 85-23,1996).

Por otra parte, se determinó si el efecto que tiene dexametasona sobre la expresión del RCB1 es dependiente del GR. Para esto, las células fueron estimuladas con 1 µM de DEX por 24 h y con una concentración 10 µM del antagonista del receptor de GC RU486, y se midieron los niveles proteicos del RCB1 mediante western blot.

Objetivo n°2. Determinar si AEA regula la expresión de genes atroficos inducidos por glucocorticoides. En primer lugar se determinó si la AEA, modifica la expresión del mensajero para los marcadores de atrofia muscular Atrogin-1 y Murf1. Para esto, las células C2C12 fueron estimuladas con AEA en tres diferentes concentraciones: 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M por 24 h (Kim y cols., 2014), además se utilizó 1 μ M de DEX (Cea y cols., 2016) como control positivo y se midió la expresión de los genes Atrogin-1 y Murf1 mediante qRT-PCR.

Para evaluar el efecto de la activación del RCB1 en la inducción de genes atroficos por DEX, las células se sometieron a un estímulo de 12 h con 1 μ M de DEX, luego se lavaron con PBS y fueron estimuladas con 1 μ M de AEA por 8 horas (Figura 2) y se evaluó la expresión de Atrogin-1, Murf1, FKBP5 y RCB1 mediante qRT-PCR. Además, las células recibieron otros tres estímulos: etanol, 1 μ M de DEX por 12 h y 1 μ M de AEA por 8 h.



Figura 2. Estimulación de células con DEX + AEA.

Por otra parte, se determinaron los niveles de las formas fosforiladas y totales de la proteína ribosomal quinasa S6 (p70S6K) y proteína quinasa dependiente de monofosfato de adenosina (AMPK). Para esto, las células C2C12 se estimularon con 1 μ M de AEA a diferentes tiempos (30 minutos, 1, 6, 18 y 24 h) para determinar p70S6k y 1 μ M de AEA por 1, 3, 6, 15, 18 y 24 h para determinar los niveles de proteína de AMPK. Se evaluaron los niveles de proteína de p-p70S6k y p-AMPK mediante western blot.

Objetivo n°3. Determinar si AEA regula los efectos de los glucocorticoides sobre la fosforilación de Akt dependiente de insulina. Para este objetivo las células C2C12 se estimularon con 1 μ M de AEA por 6, 18 y 24 h, 30 minutos antes de remover el estímulo se agregó insulina al medio. Posteriormente, se determinaron los niveles de la forma fosforilada y total de la proteína Akt mediante western blot. Luego, para evaluar el efecto de la activación del RCB1 sobre la fosforilación de Akt por DEX, las células se sometieron a un estímulo de 12 h con 1 μ M de DEX, luego se lavaron con PBS y fueron estimuladas con 1 μ M de AEA por 8 horas (Figura 3). Además, las células recibieron otros tres estímulos: etanol, 1 μ M de DEX por 12 h y 1 μ M de AEA por 8 h. Luego, 30 minutos antes de remover el estímulo se agregó insulina al medio. Posteriormente, se evaluaron los niveles de la forma fosforilada y total de la proteína Akt mediante western blot.



Figura 3. Estimulación de células con DEX + AEA + Insulina

Definición de variables

Variables independientes:

- Anandamida (AEA)
- Dexametasona
- RU486

Variables dependientes:

| Variable | Tipo de variable | Métodos |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------|
| Atrogin-1 | Dependiente, cuantitativa, continua | RT-PCR |
| Murf1 | Dependiente, cuantitativa, continua | RT-PCR |
| FKBP5 | Dependiente, cuantitativa, continua | RT-PCR |
| RCB1 | Dependiente, cuantitativa, continua | RT-PCR, Western Blot |
| p-Akt | Dependiente, cuantitativa, continua | Western Blot |
| p-AMPK | Dependiente, cuantitativa, continua | Western Blot |
| p-P70S6K | Dependiente, cuantitativa, continua | Western Blot |

Procedimientos

Cultivo celular

Células de mioblastos C2C12 se sembraron a una densidad de $1,2 \times 10^6$ células por pocillo en placas de 60mm y se incubaron, en medio Dulbecco modificado (DMEM) que contiene 4,5 g/L de D-glucosa, 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de penicilina-estreptomicina, a 37°C y 5% CO₂. Después que las células alcancen el 70% de confluencia, el medio se cambió a un medio de diferenciación celular (DMEM suplementado con 2% de suero de caballo y 1% de penicilina-estreptomicina) durante 2 a 6 días. El medio de diferenciación se cambió cada dos días para permitir que el 90% de las células forme miotubos (3-5 días más tarde) antes de comenzar los tratamientos adicionales.

RT-PCR:

- Extracción del RNA:

Se sembraron las células C2C12 en una placa de 100 mm, y se dejaron crecer hasta una alta afluencia. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x se lisaron utilizando 1 ml de TRIzol®, se recuperaron en tubos Eppendorf y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Luego, se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitaron vigorosamente, se incubaron en hielo durante 5-10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante y se agregó 500 µL de isopropanol, se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, luego se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol 75 % y se agito con vortex antes de centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se secó el pellet al aire, se disolvió en 50 µL de agua libre de RNAasa y se incubó por 10 minutos a 60°C en la placa calefactora. Finalmente se cuantificó la cantidad de RNA presente en las muestras con el espectrofotómetro Bioware UV/Visible. Para esto, se agregó en la cubeta 198 µL de H₂O de agua DEPC y 2 µL de muestra. Finalmente, se descartaron las muestras con índice A_{260/280} inferior a 1,5 o superior a 2 y las con una concentración menor a 100 ng/µL.

- PCR Transcriptasa Reversa (RT- PCR):

Para la formación de cDNA se utilizó SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Life Technologies, referencia 18080-051. Primeramente, se tomó 1 µg de RNA, 1 µL de partidores, 50 µM de oligo(dT)₂₀, 1 µL de mix de dNTP 10 mM, se agregó agua DEPC hasta completar 10 µL y se incubó a 65°C por 5 minutos en un tubo eppendorf autoclavado y libre de RNAsas. Luego se incubó en hielo durante 1 minuto y se añadió 10 µL de mix de síntesis de cDNA (2 µL Buffer 10X RT, 4 µL

MgCl₂ 25 mM, 2 μL DTT 0,1 M, 1 μL RNAsaOUTTM y 1μL SuperScript® III RT (200U/μL), se centrifugo brevemente y se incubo durante 50 minutos a 50°C. Luego se incubo a 85°C por 5 minutos, se enfriará en hielo, se añadirá 1 μL de RNAsa H (2 U/μL) y se incubo por 20 minutos a 37°C. El cDNA formado se guardó a – 20°C.

- PCR Cuantitativo (PCR en Tiempo Real):

Para la amplificación se mezcló (volumen total 10 μL): 1 μL Master Mix Kapa SYBR® 2X (Biosystems, USA, KK4602), 3μL de Agua destilada ultra pura (Gibco® By Life TechnologiesTM, 10977-015), 0,5 μL de partidor forward, 0,5 μL de partidor reverse (Tabla 1) y 1 μL de cDNA. El DNA total se utilizó en concentraciones de 1 ng/μL.

Para la amplificación, se utilizó el siguiente ciclo; 1 ciclo de 95°C de 5 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C por 1 minuto, usando los primers y probe (Du J y cols., 2013c).

Los espectros de fluorescencia se controlaron mediante ECOillumina® Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Suiza). La fluorescencia limitante (Ct), se calculó mediante el software LinRegPCR Versión 11.0 (Amsterdam, Netherlands) y se utilizó el método 2-ΔΔCt para obtener los niveles relativos de expresión de cada muestra.

Wester blot o Inmunoblot:

- Extracción y cuantificación de proteína:

Las células C2C12, se sembraron en placas de 35 mm y se colocaron en hielo y se lavaron 3 veces con PBS 1x frío. A continuación, se rasparon las placas con 50 μL de buffer de lisis NP40 con inhibidores de proteasas y fosfatasas y se transfirió a un tubo eppendorf. Se centrifugo a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, el pellet se descartó y el sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf, este se utilizó para la cuantificación de proteínas. Luego, se agregó 15 μL de buffer de carga 4X, se incubo por 10 minutos a 100°C y se almaceno a -20°C para su posterior uso.

- Cuantificación de proteínas:

Se utilizó el método Bradford (Bradford M., 1976). En una placa de 96 pocillos se agregó 145 μL de Reactivo Bradford, 4 μL de agua destilada y 1μL de muestra; para el blanco se agregó en vez de la muestra, 1 μL de buffer de lisis. Se leyó la absorbancia a 600 nm.

- Western Blot o Inmunoblot:

Los lisados de proteína de cada grupo en estudio se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 5% de gel concentrador y 10% de gel separador y posteriormente se efectuó la migración de las proteínas con una cámara Bio Rad Mini-Vertical PAGE/Blotting System California, EE.UU. Los anticuerpos primarios policlonales que se utilizaron son; p-Akt (1:1000), Akt total (1:1000), p-70S6K (1:1000), P70S6K total (1:1000), p-AMPK (1:1000), AMPK total (1:1000) y GAPDH (1:5000), mientras como anticuerpo secundario se utilizará anti-rabbit (1:5000) y Anti-mouse (1:5000). Ambos anticuerpos se prepararon en TBS-T.

Antes que todo, se preparó un gel separador, se dejaron a temperatura ambiente hasta que gelificaron (15-30 minutos). A continuación, se preparó el gel concentrador, se colocó la peineta de acuerdo el número de muestras y se dejó a temperatura ambiente hasta que gelificara. Luego, se pusieron los vidrios en la cámara de Western Blot Bio-Rad®, se llenó con buffer de corrida y se retiró la peineta. Se cargaron las muestras, de acuerdo a la cuantificación de proteínas, y el estándar de peso molecular para proteínas, se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrió la electroforesis a 80v, constante en tiempo.

Para la electrotransferencia, se utilizó una membrana de PVDF que se pre-incubo en metanol por 10 minutos, luego se comenzó la electrotransferencia a amperaje constante de 400mA por 90 minutos. Se mantuvo la membrana en buffer TBS-T al final de la electrotransferencia.

Luego se tiñó con rojo ponceau (10 g de rojo ponceau, 150 g de ácido tricloroacético, 150 g de sulfosalicílico y 500 mL con agua destilada) durante 1 minuto, se eliminó el rojo ponceau y se lavó reiteradamente la membrana con TBS-T. A continuación, se incubó la membrana con la solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó la solución de bloqueo, se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario y se lavó 3 veces por 5 minutos con TBS-T. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con TBS-T por 5 minutos.

Para el revelado, la membrana se expuso a soluciones quimioluminiscente EZ-ECL, las bandas se obtuvieron por medio del C-DiGitBlot Scanner y se cuantificó por medio del software Image Studio versión 3.1.

Análisis estadístico

Se realizaron entre 4-6 experimentos independientes y se realizó un análisis estadístico por ANOVA one-way y t-student, seguido de un test post-hoc, según corresponda. Todos los datos son presentados como media \pm la desviación estándar en tablas y gráficos. Se determinó la significancia estadística con $p < 0.05$. Se utilizó el software GraphPad Prism 6.

Resultados

La **figura 4** muestra la cantidad relativa del mRNA determinado por qRT-PCR del RCB1. Se puede observar una diferencia significativa ($p < 0,05$) a las 6, 18 y 24 h de tratamiento con dexametasona 1 μM . Posteriormente, se analizaron los niveles proteicos del RCB1 mediante la técnica de Western Blot, utilizando muestras sometidas a los mismos tiempos mencionados anteriormente, con el fin de evaluar si el aumento en los niveles de mRNA encontrados se asocian con un aumento en los niveles de proteína del receptor. La **figura 5** muestra los niveles proteicos del RCB1, al igual que en el grafico anterior se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) a las 6, 18 y 24 h con el tratamiento de dexametasona 1 μM , con respecto al control.

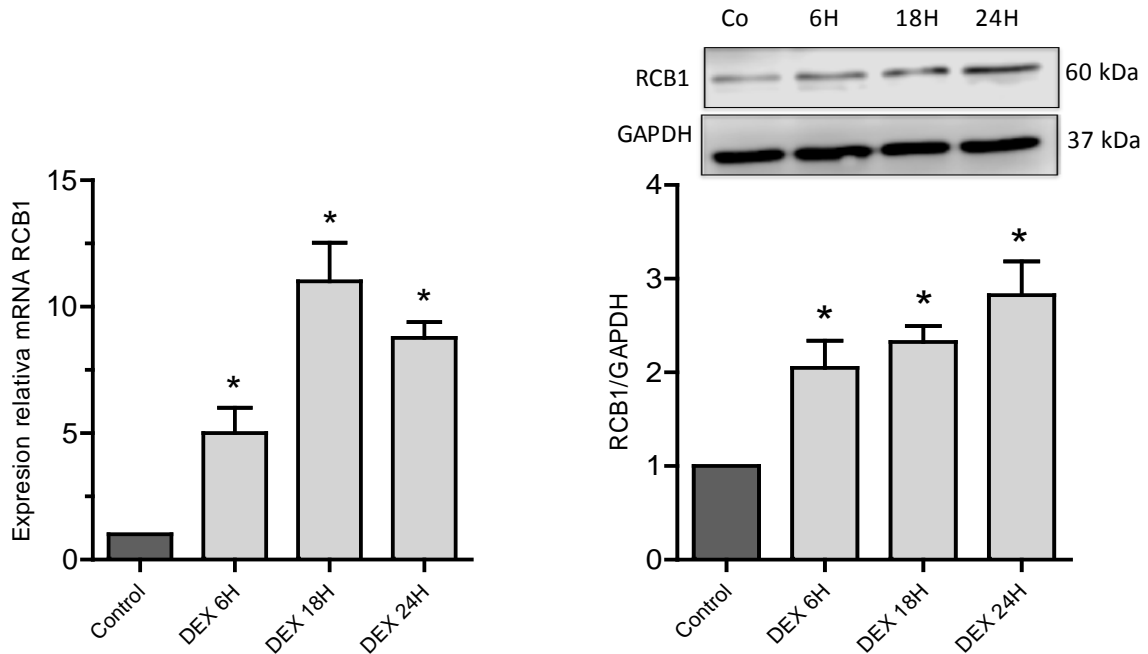


Figura 4: Análisis por qRT-PCR del efecto de dexametasona sobre la expresión del RCB1 en células de músculo esquelético de ratón C2C12. Los niveles de expresión del RCB1 estimuladas con 1 μM de dexametasona por 6, 18 y 24 horas fueron determinados por qRT-PCR. Los valores se presentan como Media + SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Dunnett's. * $p < 0,05$ v/s control. n: 4

Figura 5: Análisis por Western Blot del efecto de dexametasona sobre la abundancia del receptor de endocannabinoides CB1. Células de músculo esquelético de ratón C2C12 fueron estimuladas con 1 μM de dexametasona por 6, 18 y 24 horas. Los valores se presentan como Media + SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Dunnett's. * $p < 0,05$ v/s control. Para el análisis de los western blot se utiliza GAPDH como control de carga. n: 4

A continuación, se determinó la expresión del mensajero para el RCB1 en muestras de músculo gastrocnemio de ratón. Los ratones recibieron una dieta normal durante 3 meses, luego, 8 h antes del sacrificio, a la mitad del grupo se les administró una inyección intraperitoneal de dexametasona (2 mg/kg) y al otro grupo se les administró una inyección intraperitoneal de PBS. La **figura 6** muestra la cantidad relativa del mRNA determinado por qRT-PCR del RCB1 en el músculo gastrocnemio de ratón. Se observa que los ratones tratados con un pulso de dexametasona tienen significativamente mayor expresión del RCB1 ($p < 0,05$) que aquellos ratones no tratados. Por otra parte, se quiso determinar si el efecto que tiene dexametasona sobre el RCB1 es dependiente o no del GR. Entonces, para este experimento las células fueron estimuladas con dexametasona (DEX) 1 μ M por 24 h y con una concentración 10 μ M de RU486, y se midieron los niveles de proteína del RCB1. La **figura 7** muestra los niveles proteicos del RCB1. Se puede apreciar que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) al estimular con DEX con respecto al control, también se puede observar que los niveles del RCB1 en DEX+RU486 son significativamente ($p < 0,05$) menores al compararlos con el tratamiento de DEX.

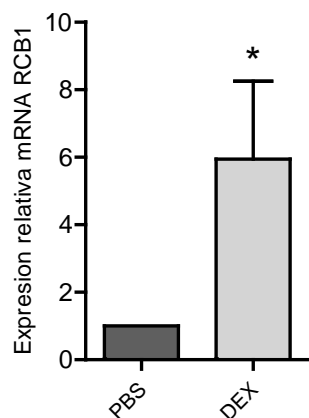


Figura 6: Análisis por qRT-PCR del efecto de dexametasona sobre la expresión del receptor de endocannabinoides CB1 en músculo gastrocnemio de ratón. Los valores se presentan como Media + SEM. Análisis estadístico *t tests*. * $p < 0,05$ v/s PBS. n: 4

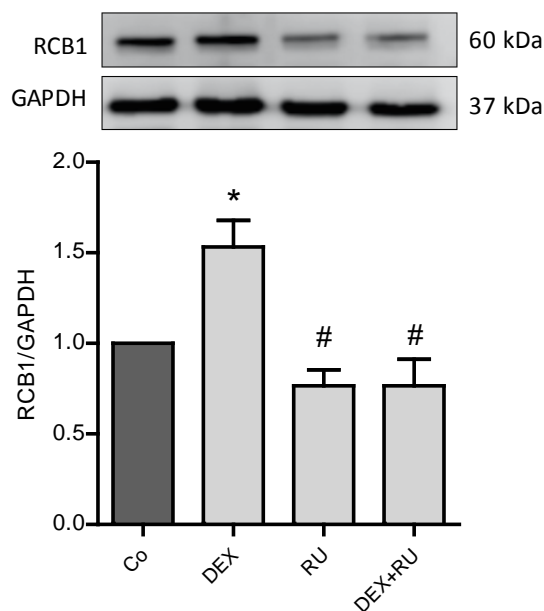


Figura 7: Análisis por Western Blot del efecto del antagonista del GR (RU) sobre la expresión del RCB1 en células de músculo esquelético de ratón C2C12. Los valores se presentan como Media + SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Bonferroni's. * $p < 0,05$ v/s Co; # $p < 0,05$ v/s DEX. n: 4

Para el siguiente objetivo, en primer lugar se determinó si la activación del RCB1 modifica la expresión del mensajero para los marcadores de atrofia muscular Atrogin-1 y Murf1. Las Figuras 8a y 8b muestran los niveles de mRNA de Atrogin-1 y Murf1 determinados por qRT-PCR al ser estimulados con las distintas concentraciones de AEA por 24 h. El resultado de este experimento no muestra diferencias significativas con respecto al vehículo para ninguno de los genes (Atrogin-1 y Murf1), por lo tanto, y tomando en consideración los resultados anteriores donde DEX aumenta la expresión del RCB1, se decidió estimular las células con DEX por 12 h (para aumentar la expresión del receptor) y luego estimular con AEA por 8 h, y de esta manera determinar nuevamente la expresión del mensajero para los marcadores de atrofia muscular Atrogin-1, Murf1. Para esto, las células recibieron 3 distintos estímulos: DEX 1 μ M por 12 h, AEA 1 μ M por 8 h y por último DEX 1 μ M por 12 h más AEA 1 μ M por 8 h, con sus respectivos controles. La figura 9a muestra la cantidad relativa de mRNA determinado por qRT-PCR de Atrogin-1. Como se esperaba, las células al ser tratadas con DEX 1 μ M por 12 h muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de Atrogin-1 con respecto al control, sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con DEX 1 μ M por 12 h y luego reciben un estímulo con AEA 1 μ M por 8 h, este efecto en la expresión de Atrogin-1 se ve disminuido. La figura 9b muestra resultados similares en la expresión de Murf1, sin embargo estos sólo muestran una tendencia.

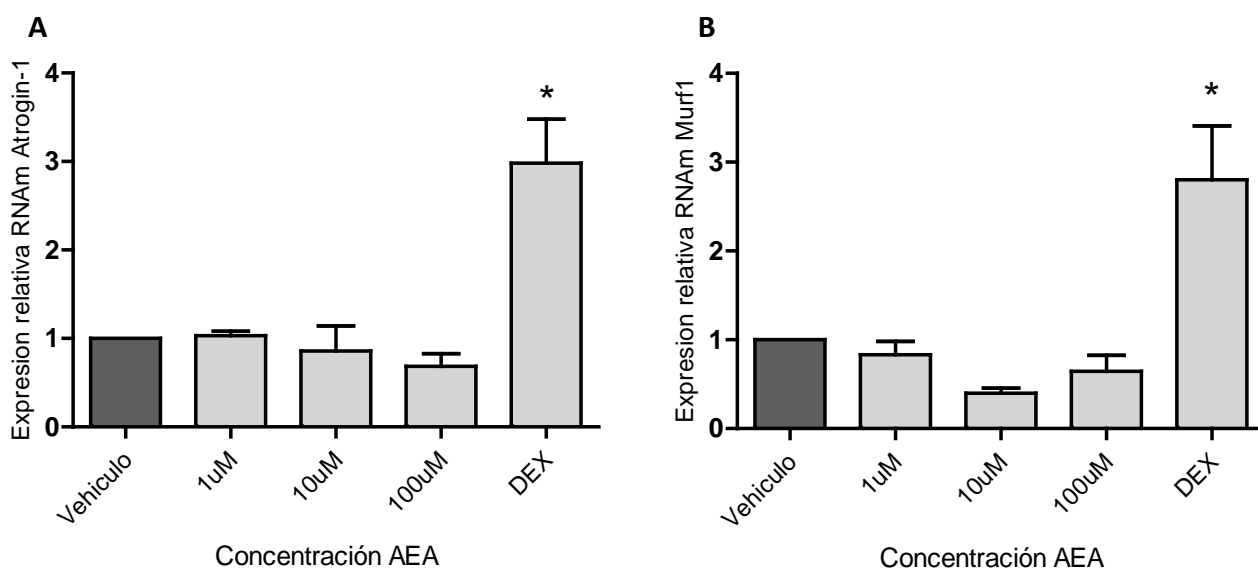


Figura 8: Análisis por qRT-PCR del efecto de la concentración de AEA sobre la expresión de genes atróficos en células de músculo esquelético de ratón C2C12. Los valores se presentan como Media \pm SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Dunnett's. (A) Expresión relativa de mRNA Atrogin-1. (B) Expresión relativa de mRNA Murf1. * $p < 0,05$ v/s Vehículo. n: 8

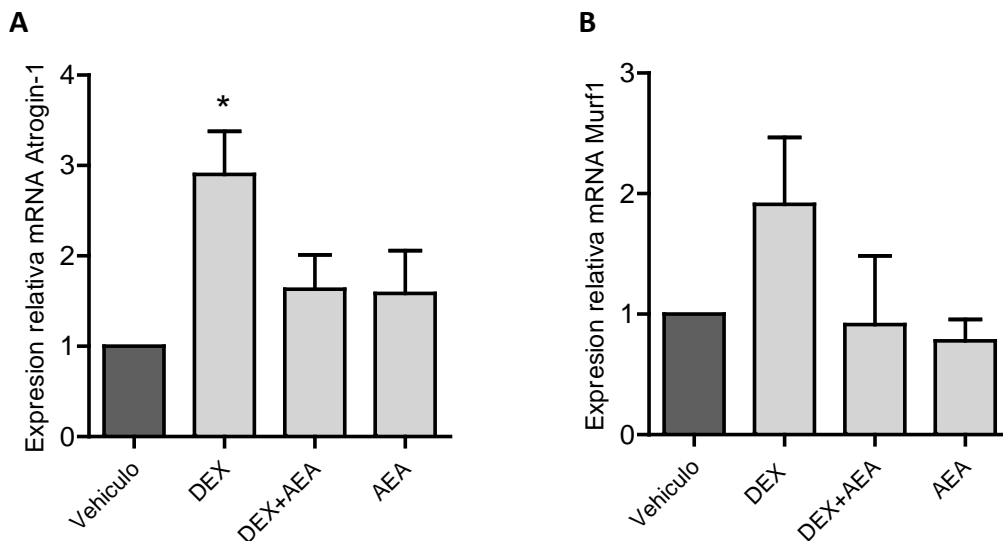


Figura 9: Análisis por qRT-PCR del efecto de AEA y dexametasona sobre la expresión de genes atróficos en células de musculo esquelético de ratón C2C12. Los valores se presentan como Media \pm SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Dunnett's. (A) Expresión relativa de mRNA Atrogin-1. (B) Expresión relativa de mRNA Murf1. * $p < 0,05$ v/s Vehículo. n: 6

A continuación, quisimos evaluar si otros genes de respuesta a GCs también eran modificados por la estimulación con AEA. Se determinó la expresión del mensajero de FKBP5, la cual es una proteína co-chaperona del GR y su expresión está regulada por GCs, además FKBP5 ha sido relacionada con resistencia a la insulina. La **figura 10a** muestra la expresión relativa del mRNA de FKBP5. La estimulación con DEX 1 μ M induce un aumento en la expresión del mRNA de FKBP5. Sin embargo, cuando esta en presencia de AEA la expresión se incrementa significativamente en mas del doble. AEA no produce un aumento en la expresión de FKBP5. Este resultado podría explicar de cierta forma porque AEA estaría disminuyendo la expresión de los genes atróficos inducidos por DEX. Posteriormente, se determinó la expresión del RCB1 con las mismas muestras antes mencionadas. La **figura 10b** muestra la cantidad relativa del mRNA determinado por qRT-PCR del RCB1. Las células al ser tratadas con DEX 1 μ M por 12 h muestran un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión del RCB1 con respecto al control, posteriormente, al estimular las células con DEX 1 μ M por 12 h seguido del estímulo con AEA 1 μ M por 8 h, se observa una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la expresión del RCB1 con respecto al control, pero solo se ve una tendencia al aumento de expresión. No se observan diferencias significativas con AEA 1 μ M por 8 h con respecto al control.

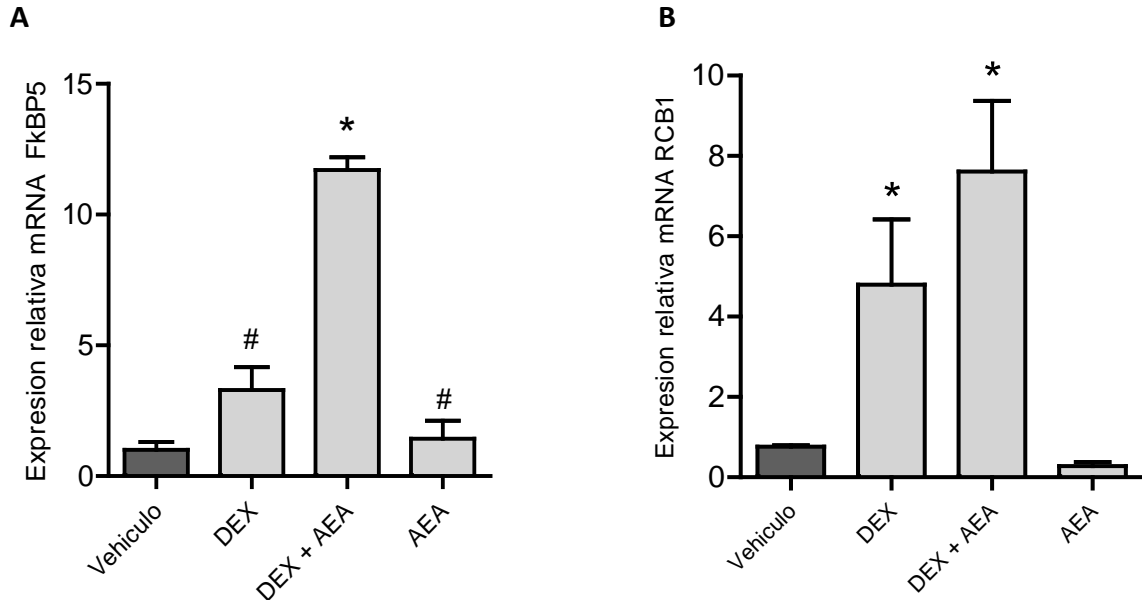


Figura 10: Análisis por qRT-PCR del efecto de AEA y dexametasona sobre la expresión de FkBP5 y RCB1 en células de musculo esquelético de ratón C2C12. Las células recibieron 3 distintos estímulos: DEX 1 μ M por 12 h, AEA 1 μ M por 8 h y por último DEX 1 μ M por 12 h más AEA 1 μ M por 8 h, con sus respectivos controles. Los valores se presentan como Media \pm SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Bonferroni's. y Dunnett's (A) Expresión relativa de mRNA FkBP5. (B) Expresión relativa de mRNA RCB1. * $p < 0,05$ v/s Vehículo; # $p < 0,05$ v/s DEX. n: 6

Debido a que los resultados muestran que el tratamiento con AEA no aumenta la expresión de genes atroficos, y que además ejerce cierto efecto protector frente a los estímulos de atrofia ejercidos por dexametasona, se quiso determinar si este endocanabinoide podría activar alguna vía anabólica, lo que podría explicar también este fenómeno. Para ello, se determinaron los niveles de las formas fosforiladas y totales de la proteína ribosomal quinasa S6 (p70S6K) y la proteína quinasa dependiente de monofosfato de adenosina (AMPK) para determinar si además AEA está apagando esta vía catabólica. Para esto, las células se estimularon con AEA 1 μ M a diferentes tiempos (30 minutos, 1, 6, 18 y 24 h) para determinar p70S6k y AEA 1 μ M por 1, 3, 6, 15, 18 y 24 h para determinar los niveles de proteína de AMPK. En la **Figura 11** se observa, que los niveles proteicos de p-p70s6k llegan a un máximo a las 6 h, siendo este valor significativo ($p < 0,05$) con respecto al vehículo, para luego disminuir hasta las 24 h. Los niveles proteicos de p-AMPK (**Figura 12**) van disminuyendo paulatinamente en el tiempo. A partir de las 6 h se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al vehículo.

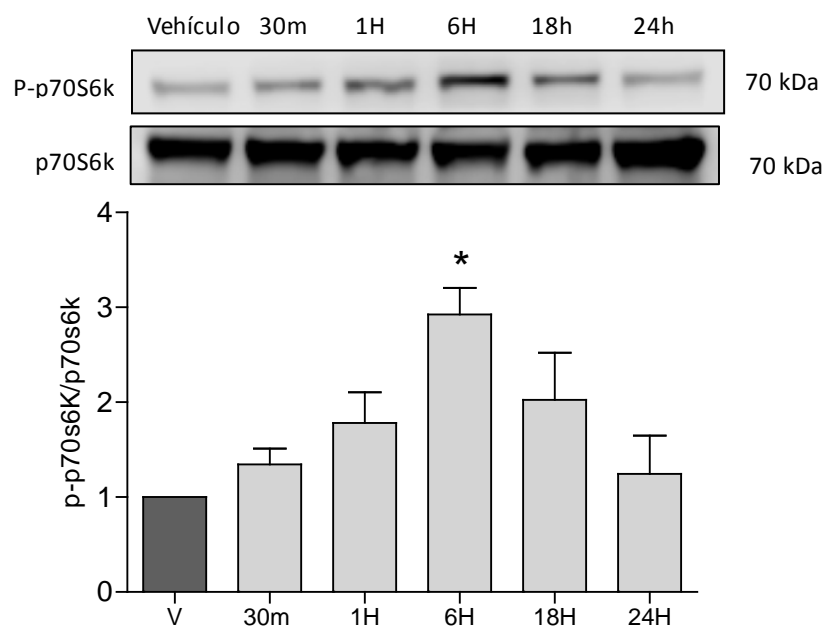


Figura 11: Análisis por Western Blot del efecto de AEA sobre la fosforilación de p70S6K. Células de musculo esquelético de ratón C2C12 fueron estimuladas con 1 μ M de AEA por 0.5, 1, 6, 18 y 24 h. Los valores se presentan como Media \pm SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Dunnett's. * $p < 0,05$ v/s Vehículo. n: 4

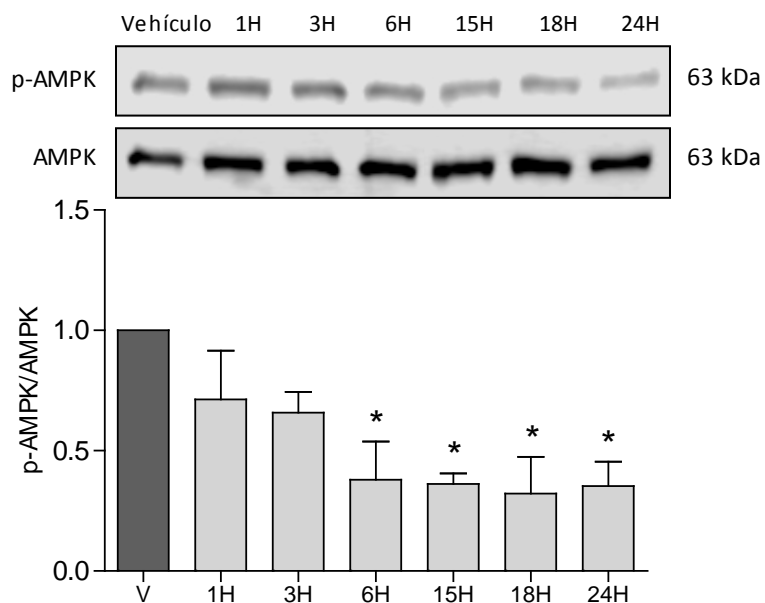


Figura 12: Análisis por Western Blot del Efecto de AEA sobre la fosforilación de AMPK. Células de musculo esquelético de ratón C2C12 fueron estimuladas con 1 μ M de AEA por 1, 3, 6, 15, 18, y 24 h. Los valores se presentan como Media \pm SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Dunnett's. * $p < 0,05$ v/s Vehículo. n: 4

Considerando que AEA aumenta la expresión del gen FKBP5 y regula la actividad de vías relacionadas con procesos anabólicos y catabólicos. Se quiso determinar si AEA afecta la respuesta a insulina, mediante la determinación de la fosforilación de Akt en respuesta a insulina. La **figura 13** muestra los niveles proteicos de p-Akt determinados por western blot, se observa que los niveles relativos de la proteína p-Akt disminuyen paulatinamente en el tiempo hasta las 24 h, observándose a las 6 h diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control y al estímulo de 24 h. Además, para evaluar el efecto en conjunto de dexametasona y anandamida sobre la fosforilación de Akt, las células recibieron 3 distintos estímulos DEX 1 μM por 12 h, AEA 1 μM por 8 h y por último DEX 1 μM por 12 h seguido de AEA 1 μM por 8 h, media hora antes de quitar el estímulo se agregó insulina al medio. La **figura 14** muestra los niveles proteicos de p-Akt determinados por western blot, se puede observar que al estimular con DEX+AEA la fosforilación de Akt disminuye con respecto al tratamiento solo con dexametasona, lo que indica una acción concentrada de ambas moléculas sobre la fosforilación de Akt estimulada por insulina.

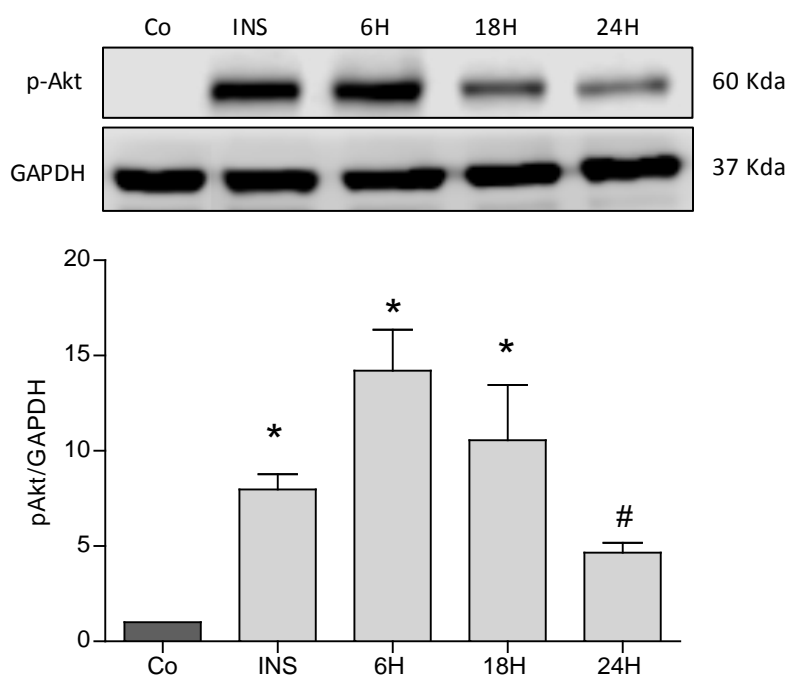


Figura 13: Análisis por Western Blot del efecto de AEA sobre la fosforilación de Akt estimulada por insulina. Células de musculo esquelético de ratón C2C12 fueron estimuladas con 1 μM de AEA por 6, 18 y 24 h. Los valores se presentan como Media \pm SEM. Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Bonferroni's. * $p < 0,05$ v/s control; # $p < 0,05$ v/s 24 h. n: 4

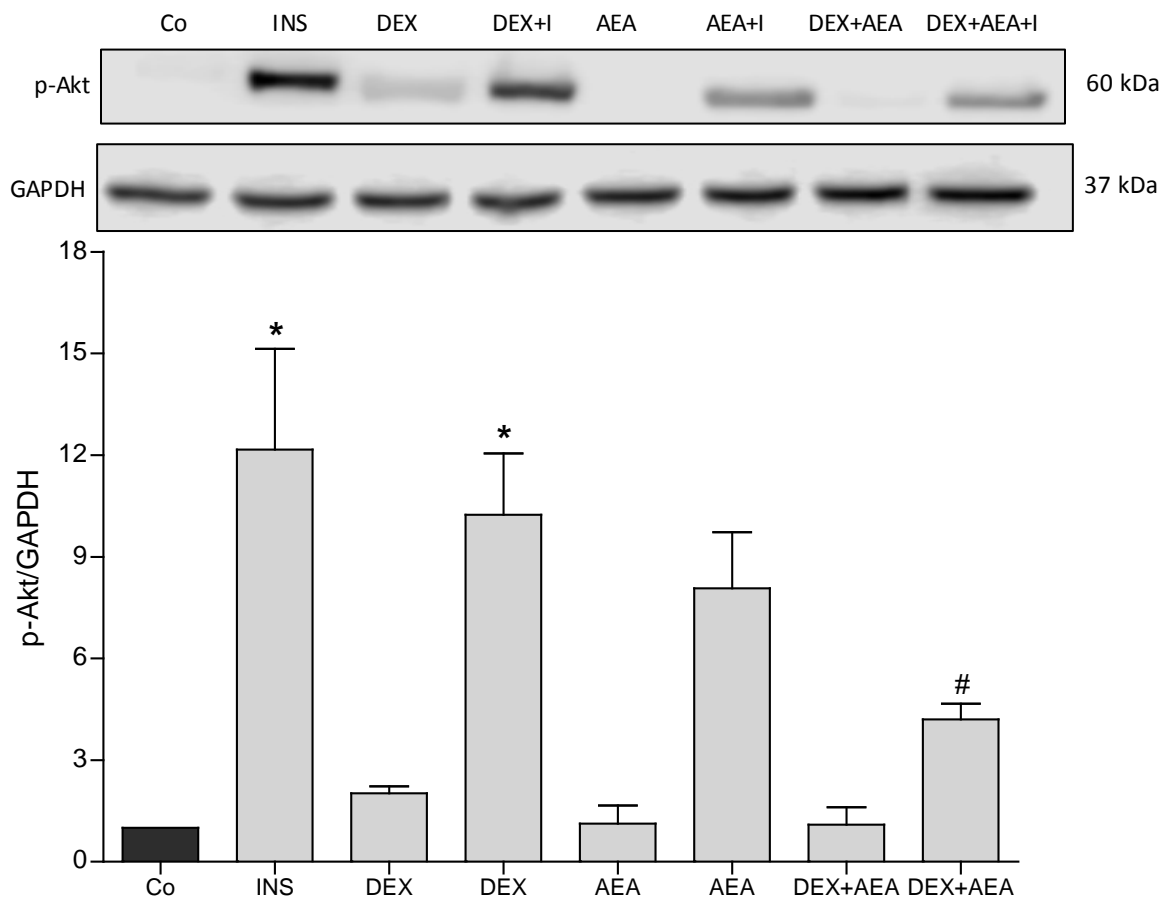


Figura 14: Análisis por Western Blot del efecto de dexametasona y anandamida sobre la fosforilación de Akt. Células de musculo esquelético de ratón C2C12 fueron estimuladas con: Etoh, INS 0.5 h, DEX 12 h, DEX 12 h más insulina, AEA 8 horas, AEA horas más insulina, DEX+AEA y por ultimo DEX 12 horas más AEA 8 h más insulina. Los valores se presentan como Media \pm SEM Análisis estadístico One way ANOVA seguido de post test de Bonferroni's. * $p < 0,05$ v/s control; # $p < 0,05$ v/s INS. n: 4

Discusión

La secreción de GCs por la corteza suprarrenal es el punto final de la respuesta bioquímica iniciadas por la exposición a estímulos estresantes o aversivos. En el corto plazo, los GCs pueden generar respuestas beneficiosas y necesarias para mantener la regulación homeostática de los procesos metabólicos dentro del organismo. Sin embargo, la hipersecreción crónica de los GCs se asocia con varios efectos adversos como obesidad central, atrofia muscular, hiperglucemia, hígado graso, hipertensión, colesterol elevado, inmunodeficiencia y resistencia a la insulina (Shibli-Rahhal y cols., 2006a). Además, se ha demostrado claramente que los GCs pueden movilizar el SEC, que es esencial para muchos de los efectos de los GCs, incluyendo la regulación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, la supresión del comportamiento sexual y las alteraciones en la consolidación de la memoria (Hill & McEwen., 2010a; Campolongo y cols., 2009a; Coddington y cols., 2007a; Evanson y cols., 2010a). Estas observaciones nos llevaron a la investigación del vínculo entre los GCs y el SEC en el músculo esquelético.

En este trabajo hemos encontrado una asociación significativa entre la exposición a DEX y el aumento en la expresión del RCB1 en células de músculo esquelético de ratón C2C12. Interesantemente, un estudio reciente ha demostrado que el tratamiento por 24 horas con DEX en adipocitos aumenta significativamente la expresión del RCB1 (Pereira y cols., 2014), además, un estudio realizado por Wang y cols., ha sugerido que los GCs aumentan la densidad del RCB1 en la médula espinal (Wang et al., 2007). Por otra parte, un estudio realizado en ratas muestra que el tratamiento con GCs por 21 días, pero no agudo (24 h), da como resultado una reducción significativa en la expresión de la proteína del RCB1 en el hipocampo. Sin embargo, debe observarse que la regulación de los GCs en la expresión del RCB1 es tipo celular específica en todo el SNC; se ha demostrado que el mismo régimen de GCs empleado en este estudio no afecta a la densidad del RCB1 en la amígdala (Hill y cols., 2005). Esto indica que un periodo corto de GCs elevados da como resultado un aumento de la señalización de ECs mientras que un período más largo de GCs elevados conduce a una reducción de la señalización de ECs (en hipocampo) mediante una reducción en el número de RCB1 disponibles. Estos datos sugieren que los GCs regulan la expresión del RCB1 a nivel central y también en tejidos periféricos como en músculo esquelético, tal como lo hemos demostrado en el presente estudio.

El GR, pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción activado por ligando (Ortlund y cols., 2007; Thornton y cols., 2001). Al unirse el GC en el citoplasma, el GR transloca al núcleo, y modula positivamente o negativamente la transcripción de distintos conjuntos de genes a través de múltiples mecanismos; Por ejemplo, uniéndose directamente a secuencias de DNA específicas (GRE, elementos de

respuesta a glucocorticoides) y a través de interacciones directas proteína - proteína con otros factores de transcripción y/o correguladores (Rogatsky y cols., 2003; Luecke y cols., 2005). En el presente estudio hemos demostrado que el dímero GR-GC activa la expresión génica del RCB1 uniéndose a secuencias de DNA específicas en las regiones promotoras de este gen, debido a que al utilizar mifepristona (o RU-486) un inhibidor no específico del GR, no existe un aumento en los niveles de proteína del RCB1. En conjunto estos datos dan evidencia que el RCB1 podría ser un elemento de respuesta a GCs, y que los efectos de estos en el musculo podrían estar mediados por el RCB1.

Diversos estudios han demostrado que los GCs causan atrofia del musculo esquelético, (Dekhuijzen y cols., 1995; Fournier y cols., 2003; Goldberg y cols., 1980; Lofberg y cols., 2002; Tomas y cols., 1979) sin embargo, ningún estudio ha relacionado si existe alguna conexión entre la atrofia producida por los GC y el SEC. La atrofia muscular se produce como resultado de cambios en el equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos, con el resultado de pérdida de masa muscular cuando el catabolismo proteico supera la síntesis de proteínas. El aumento de la proteólisis se produce en una variedad de condiciones de pérdida de músculo, incluyendo sepsis, cáncer, quemaduras, diabetes y ayuno, y la vía principal responsable del aumento de la proteólisis muscular bajo estas condiciones catabólicas es la vía ubiquitin-proteasoma dependiente de ATP (Mitch y cols., 1994; Price y cols., 1996; Wing y cols., 1993). El Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) y el Muscle Atrophy f-box (MAFbx)/atrogen-1 fueron identificados hace más de 10 años como dos ubiquitina ligasas E3 musculo específicas que se incrementan transcripcionalmente en el músculo esquelético en condiciones de inducción de atrofia, haciéndolos excelentes marcadores de atrofia muscular (Bodine y cols., 2001; Gomes y cols., 2001). En el presente estudio se demostró que el endocanabinoide AEA no produce aumento en la expresión de los marcadores de atrofia muscular Atrogen-1 y MuRF1, lo que sugiere que no hay participación de RCB1 sobre estos dos marcadores de atrofia muscular. Aunque el presente estudio sugiere que no hay participación del SEC en la atrofia muscular, AEA al contrario, podría tener un rol protector frente a la atrofia inducida por los GCs, al disminuir la expresión de Atrogen-1 y MuRF1. Los mecanismos por los cuales los GCs inducen atrofia muscular son diversos, sin embargo, se ha reportado que el GR es esencial para el desarrollo de la atrofia muscular en respuesta a GC, tanto *in vitro* (Zhao y cols., 2009) como *in vivo* (Watson y cols., 2012). Además, ratones GR-knockout músculo-específicos son resistentes a la acción inductora de atrofia muscular producida por GC (Watson y cols., 2012a). Como se mencionó anteriormente, el GR es un factor de transcripción activado por ligando que transloca desde el citosol hasta el núcleo después de la unión al ligando. Este proceso de activación y translocación, y la posterior acción de GR sobre la transcripción de genes, está regulada por un complejo molecular de gran

tamaño (Pratt y cols., 2006). Esta maquinaria multiproteica se centra alrededor de chaperonas moleculares (moléculas que permiten el plegado adecuado de péptidos y proteínas) de la proteína de shock térmico 70 (hsp70) y la proteína de shock térmico 90 (hsp90). Esta maquinaria basada en hsp90/hsp70 incluye una serie de co-chaperones las cuales son críticas para el plegado, maduración, tráfico correcto al núcleo y posterior unión al DNA receptor (Grad & Picard., 2007). Varias líneas de evidencia sugieren que la proteína de unión a FK506-51, una proteína de 51 kDa codificada por el gen FKBP5 (Nair y cols., 1997) es un importante regulador funcional del GR (Grad & Picard., 2007a; Pratt & Toft., 1997). FKBP5 es una cochaperona de la proteína de choque térmico 90 del receptor de esteroides, que regula la actividad del receptor de glucocorticoides (Vermeer y cols., 2003a). La importancia de FKBP5 en la señalización del GR, es que el complejo GR-FKBP5 se une con menor afinidad a los GCs y la translocación nuclear del receptor es menos eficiente (Wochnik y cols., 2005a). Otra característica interesante de FKBP5 es que su expresión es inducida por esteroides, incluyendo GCs (Vermeer y cols., 2003b). Esto da evidencia que FKBP5 puede actuar como un regulador de retroalimentación negativa en las acciones de los GCs. En el presente estudio, se demostró que cuando las células tienen una estimulación con DEX seguido de una estimulación con AEA se aumenta significativamente la expresión el gen FKBP5, con respecto a DEX solo. Es probable que el efecto protector que ejerce AEA frente a la atrofia producida por los GCs, sea debido al aumento en la expresión del gen FKBP5, el cual a su vez provoca una menor afinidad entre el GR y su ligando disminuyendo de esta manera los efectos producidos en la atrofia muscular. Cabe recordar, que dexametasona estimula la expresión de RCB1 lo cual sugiere que la acción de AEA esta mediada por un mecanismo que involucra la activación de este receptor.

Por otra parte, es conocido que en el músculo esquelético, los GCs no solo aumentan la tasa de catabolismo proteico sino que también disminuyen la tasa de síntesis de proteínas (Goldberg y cols., 1980a; Lofberg y cols., 2002a; Tomas y cols., 1979a) donde ambos procesos contribuyen a la atrofia. El efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas resulta de diferentes mecanismos. En primer lugar, los GCs inhiben el transporte de aminoácidos en el músculo esquelético (Kostyo & Redmond., 1966) que podría limitar la síntesis de proteínas. En segundo lugar, los GCs inhiben la acción estimuladora de la insulina, sobre la fosforilación de la proteína de unión a eIF4E 1 (4E-BP1) y también defosforila ciertos aminoácidos (Thr389 y Thr421/Ser424) que son claves para la activación de la proteína ribosómica S6 quinasa 1 (p70S6K), factores que Juegan un papel clave en la maquinaria de síntesis de proteínas (Liu y cols., 2004, 2001; Shah y cols., 2000a, b). El presente estudio muestra que el AEA posee un efecto contrario al de los GCs, en la fosforilación de p70S6K, aumentándola significativamente a las 6 h de tratamiento.

Nuestros resultados son concordantes con estudios donde muestran que la estimulación con THC aumenta la fosforilación de p70S6K en T421/S424 en el hipocampo, los cuales son críticos para su actividad enzimática. Por otra parte, se observó, que tanto la vía de señalización de mTOR como ERK participan en la fosforilación de p70S6K (T421/S424) estimulada por THC. (Puighermanal y cols., 2009). Otro estudio muestra, que en un modelo de atrofia inducido por dexametasona en miotubos L6, la activación de la vía ERK, previene los efectos deletéreos de DEX en la degradación de proteína al mostrar una disminución en la actividad de FoxO3a. Estos efectos se tradujeron en una menor actividad dependiente de ubiquitina y una reducción de los niveles de mRNA de Atrogin-1 y MuRF1 (Salto y cols., 20014). Sobre la base de estos resultados, se sugiere que otro de los mecanismos por el cual AEA podría contrarrestar los efectos de DEX en los marcadores de atrofia muscular, es mediante la activación de la vía p70S6K teniendo un efecto contrario a DEX en esta proteína, el cual a su vez podría provocar una disminución de los niveles de mRNA de Atrogin-1 y MuRF1 y aumentar las tasas de traducción proteica (Meyuhas., 2008; Ferrari y cols., 1994).

Dada la demostración de la participación de mTOR en los mecanismos previamente descritos, quisimos indagar en los efectos de alguna molécula moduladora de dicha proteína. En este sentido, es sabido que AMPK es una serina/treonina quinasa que controla la activación de mTOR y la síntesis de proteínas a través de varios mecanismos posibles. En primer lugar, AMPK fosforila TSC2 (complejo de escleriosis tuberosa 2) directamente para inhibir la función de mTOR (Gao y cols., 2002). En segundo lugar, AMPK también puede inhibir la actividad de mTOR directamente por fosforilación en Thr2446 (Cheng y cols., 2004). En tercer lugar, AMPK fosforila e inhibe la actividad de eEF-2 (factor de elongación eucariótico 2) (Browne y cols., 2004). Y por último, AMPK fosforila raptor en mTORC1 (Gwinn y cols., 2008). Nuestros resultados muestran que AEA es capaz de apagar o disminuir la actividad de AMPK, lo que contribuiría en la reducción de los efectos catabólicos de dexametasona. Nuestros resultados que indican una disminución en la fosforilación de AMPK son concordantes con otros estudios realizados en hígado y tejido adiposo de ratón, donde THC disminuye la actividad de AMPK en estos tejidos, sin embargo, pareciera que el efecto de los cannabinoides en la actividad de AMPK fuera tejido específica, ya que aumenta en hipotálamo y musculo cardiaco tras un estímulo con THC (Kola y cols., 2005). Por otra parte, estudios muestran que dexametasona aumenta la actividad de AMPK en miotubos diferenciados C2C12, dando como resultado la inducción del factor de transcripción FOXO3, que es reconocido como un regulador maestro de la atrofia muscular por su papel en la regulación de las dos ligasas E3 Atrogin-1 y MuRF1 (Liu y cols., 2016). Otro estudio realizado en miotubos L6, muestra que el tratamiento con dexametasona estimula la fosforilación de AMPK (Troncoso y cols., 2014). En conjunto

estos resultados dan cuenta del efecto contrario a DEX que posee AEA en la activación de AMPK, lo que contribuiría al efecto protector de AEA frente a la atrofia producida por los GCs, disminuyendo la expresión de los marcadores de atrofia muscular Atrogin-1 y MuRF1.

La relevancia positiva del SEC en el músculo esquelético está asociado a la protección de la atrofia muscular como lo hemos demostrado en este estudio, sin embargo, su aspecto negativo está relacionado a la patogénesis de los estados resistentes a la insulina (Scheen y cols., 2008; Matias y cols., 2007; Wierzbicki y cols., 2006). La resistencia a la insulina, está definida como una reducción en la capacidad de la insulina para estimular la actividad del transporte de glucosa, lo que conduce al desarrollo de prediabetes y diabetes tipo 2 (Ferrannini., 1998). El músculo esquelético es el principal tejido implicado en la captación de glucosa dependiente insulina (baron y cols., 1988). La resistencia a la insulina en el músculo esquelético conduce a una reducida tolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia compensatoria (Nistala y cols., 2006). El presente estudio muestra, que la exposición a AEA en células de musculo esquelético de ratón disminuye significativamente la fosforilación de Akt. La disminución de la señalización AKT se ha asociado con eventos que inhiben la señalización de insulina, así como la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) y la captación de glucosa estimulada por insulina (Langin y cols., 2005; Bugianesi y cols., 2005). Nuestros resultados son similares a los encontrados por Lindborg y cols donde se determinó que el agonismo directo y selectivo del RCB1 con AEA, en el músculo sóleo de ratas Zucker, disminuye la actividad del transporte de glucosa basal y, en un grado más sustancial, la estimulada por insulina, donde además, muestra que es reversible con la adición de un antagonista del RCB1 (Lindborg y cols., 2010b). Otros estudios muestran, que la fosforilación de Akt se incrementó en presencia de un antagonista selectivo del RCB1 en cultivo primario de miocitos humanos (Eckardt y cols., 2009a) y en miotubos L6 (Esposito y cols., 2008a). Los efectos agudos de la manipulación del RCB1 en la sensibilidad a la insulina y la captación de glucosa, también se investigó en músculo esquelético de ratón, donde el agonista del RCB1, HU210 redujo significativamente la captación de glucosa en el músculo esquelético y disminuyó significativamente las vías de señalización estimuladas con insulina. Este efecto se invirtió cuando se administró a los animales un antagonista del RCB1 (AM251) (Song y cols., 2011). Por el contrario, otros estudios in vitro indicaron que la captación de glucosa se incrementa en adipocitos murinos 3T3-L1 y adipocitos humanos por agonismo del RCB1 en lugar del antagonismo (Pagano y cols., 2007; Gasperi y cols., 2007). Las discrepancias podrían explicarse por diferentes efectos biológicos de los antagonistas/agonistas del RCB1 en los diferentes modelos celulares.

Por otra parte, se ha demostrado que los glucocorticoides modulan la secreción pancreática de insulina, así como las respuestas hepáticas y extrahepáticas a la insulina

(McMahon y cols., 1988). Más recientemente, se ha informado que en el músculo esquelético, los GCs pueden bloquear la capacidad de la insulina para movilizar los transportadores intracelulares de glucosa a la membrana plasmática (Weinstein y cols., 1998). También se ha reportado, que la administración a corto plazo de GCs puede inducir resistencia a la insulina (Perry y cols., 2003; Willi y cols., 2002; Schneiter y cols., 1998; Rooney y cols., 1993). Hasta la fecha, los mecanismos responsables de la resistencia a la insulina inducida por GCs no han sido claramente elucidados. Sin embargo, el presente estudio trata de dar luces del posible mecanismo inducido por GCs, donde se puede apreciar que el tratamiento en conjunto de DEX y luego AEA disminuye significativamente la fosforilación de Akt dependiente de insulina. Aunque no existen reportes donde se estudie el mecanismo en conjunto de DEX y AEA sobre la resistencia a la insulina en musculo esquelético, si existe un estudio donde se investiga la posible asociación entre dexametasona y un antagonista del RCB1 en la captación de glucosa. Los autores aquí reportan que el antagonista/agonista inverso específico AM281 del RCB1 no afectó el efecto inhibitor de dexametasona sobre la captación de glucosa in vitro (Sidibeh y cols., 2017). Este efecto puede ser debido a que el antagonista AM281 fue agregado a la células las últimas 4 de 20 horas de estímulo con DEX, y no las primeras horas, lo que provocaría una inhibición parcial del RCB1.

Lo que el presente estudio propone finalmente, es que los GCs podrían estar ejerciendo sus efectos de resistencia a la insulina a través del RCB1 o simplemente se potencia el efecto cuando están presentes estos dos componentes. Por último, como el músculo esquelético es uno de los principales contribuyentes a la euglucemia del cuerpo, las acciones en el antagonismo del RCB1 para mejorar la actividad del transporte de glucosa directamente en el músculo esquelético convierten a este sistema en un nuevo objetivo en el tratamiento de la resistencia a la insulina y la hiperglicemia.

Conclusiones.

- Dexametasona aumenta la expresión del RCB1 en células de músculo esquelético de ratón, efecto que es dependiente del receptor de glucocorticoides.
- AEA estimula la expresión del gen FKBP5, revirtiendo a través de este, el efecto de dexametasona sobre marcadores de atrofia muscular. FKBP5 ejerce una acción inhibitoria en la unión de GR a su ligando.
- AEA contrarresta los efectos de dexametasona mediante la activación de la vía p70S6K, efecto contrario a dexametasona en esta proteína.
- AEA disminuye la fosforilación de AMPK, lo que también contribuiría al efecto protector de AEA frente a marcadores atroficos estimulados por dexametasona.
- AEA disminuye la fosforilación de Akt, potenciando la acción de dexametasona sobre la resistencia a insulina en el musculo esquelético.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son el punto de partida para el desarrollo de estudios futuros necesarios para entender los efectos e interrelación de GR, glucocorticoides y SEC en el músculo esquelético, y de esta manera estimular el desarrollo de nuevas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de la atrofia muscular y la resistencia a insulina.

Bibliografía

Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:476279.

Adams JM 2nd, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes.* 2004;53(1):25-31.

Arrabal S, Lucena MA, Canduela MJ, Ramos-Uriarte A, Rivera P, Serrano A, et al. Pharmacological Blockade of Cannabinoid CB1 Receptors in Diet-Induced Obesity Regulates Mitochondrial Dihydrolipoamide Dehydrogenase in Muscle. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145244.

Baron A, Brechtel G, Wallace P, Edelman S. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1988; 255: E769-E774.

Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acip30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol.* 2003;63(4):908-14.

Björntorp P, Rosmond R. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24(Suppl 2):S80–S85.

Bodine S, Baehr L. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(6):E469-84.

Bodine S, Latres E, Baumhueter S, Lai V, Nunez L, Clarke B, Poueymirou W, y cols. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294: 1704–1708.

Bowles NP, Karatsoreos IN, Li X, y cols. A peripheral endocannabinoid mechanism contributes to glucocorticoid-mediated metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;112(1):285-290.

Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*. 2002; 298:1793–1796.

Breivogel C, Childers S. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors, *Neurobiol. Dis.* 1998; 5:417–431.

Browne GJ, Finn SG, Proud CG. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J Biol Chem*. 2004; 279:12220-31.

Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005; 42(5):987–1000

Campolongo P, et cols. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(12):4888–4893.

Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade: a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*. 2004; 29:18-24.

Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Cameron-Smith D, Wittert GA. Effects of cannabinoid receptors on skeletal muscle oxidative pathways. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;267(1-2):63-9.

Cea LA, Balboa E, Puebla C, Vargas AA, Cisterna BA, Escamilla R, et al. Dexamethasone-induced muscular atrophy is mediated by functional expression of connexin-based hemichannels. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(10):1891-1899.

Cheng SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem*. 2004; 279:15719-22.

Chorvat R, Berbaum J, Seriacki K, McElroy J. Peripherally restricted (PR) cannabinoid-1 receptor blockers related to SLV-319 (Ibipinabant) as metabolic disorder therapeutics devoid of CNS liabilities. *Bioorg Med*. 2012; 22:6173–6180.

Cinar R, Godlewski G, Liu J, y cols. Hepatic CB₁ Receptors Mediate Diet-Induced Insulin Resistance by Increasing de novo Synthesis of Long Chain Ceramides. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2014;59(1):10.1002/hep.26606.

Coddington E, Lewis C, Rose JD, Moore F. Endocannabinoids mediate the effects of acute stress and corticosterone on sex behavior. *Endocrinology*. 2007;148(2):493–500.

Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grubler Y. Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary- adrenal axis function. *Endocrinology*.2007; 148: 1574-1581.

Cota D, Marsicano G, Tschöp M, y cols. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(3):423-431.

Cox M, Smith D. Functions of the Hsp90-Binding FKBP Immunophilins, in *The Networking of Chaperones by Cochaperones* 2007 (Blatch G. L. ed.), pp. 13–25

Cravatt B, Giang D, Mayfield S, Boger D, Lerner R, Gilula N. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996; 384:83–87.

Crespillo A, Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Rivera P, Vida M, Alonso M, et al. Expression of the cannabinoid system in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. *Biochem J*. 2011;433(1):175-85.

Dallman MF. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(3):159–165.

Dekhuijzen P, Gayan-Ramirez G, Bisschop A, DecramerM. Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *Journal of Applied Physiology* 1995;78:629–37.

Devane W, Dysarz F, Johnson M, Melvin L, Howlett A. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988; (34)605–613.

Devane W, Hanus L, Breuer A, Pertwee R, Stevenson L, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptors. *Science*. 1992; 258(5090): 1946-1949.

Dinh, T, Carpenter D, Leslie F, Freund T, Katona I, Sensi S, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99, 10819–10824.

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Jári Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature.* 2001;410(6830):822-5.

Di Marzo V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66(2-3): 377-391.

DiPatrizio N, Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011; 108:12904-12908.

Eckardt K, Sell H, Taube A, Koenen M, Platzbecker B, Cramer A, et al. Cannabinoid type 1 receptors in human skeletal muscle cells participate in the negative crosstalk between fat and muscle. *Diabetologia.* 2009;52(4):664-74.

Egertova M, Giang D, Cravatt B, Elphick M. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci.* 1998; 265:2081–2085.

Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Bátkai S, et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes.* 2005;54(10):2838-43.

Esposito I, Proto MC, Gazerro P, Laezza C, Miele C, Alberobello AT, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant stimulates 2-deoxyglucose uptake in skeletal muscle cells by regulating the expression of phosphatidylinositol-3-kinase. *Mol Pharmacol.* 2008;74(6):1678-86.

Evanson N, Tasker J, Hill M, Hillard C, Herman J. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology.* 2010; 151(10): 4811–4819.

Ferrannini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev.* 1998; 19: 477-490.

Ferrari S, Thomas G. S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1994; 29:385-413.

Fournier M, Huang Z, Li H, Da X, Cercek B, Lewis M. Insulin-like growth factor-I prevents corticosteroid-induced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2003; 285:R34-43.

Fraser R, y cols. Cortisol effects on body mass, blood pressure, and cholesterol in the general population. *Hypertension*. 1999; 33(6):1364–1368.

Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations, *Eur. J. Biochem/FEBS*. 1995; 232:54–61.

Galigniana NM, Ballmer L, Toneatto J, Erlejman A, Lagadari M, Galigniana MD. Regulation of the glucocorticoid response to stress-related disorders by the Hsp90-binding immunophilin FKBP51. *J Neurochem*. 2012 Jul;122(1):4-18.

Galigniana NM, Erlejman A, Monte M, Gomez-Sanchez C, Piwien-Pilipuk G. The hsp90-FKBP52 Complex Links the Mineralocorticoid Receptor to Motor Proteins and Persists Bound to the Receptor in Early Nuclear Events. *Mol. Cell. Biol*. 2010; 30, 1285–1298.

Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS. Tsc tumour suppressor proteins antagonize aminoacid-TOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002; 4:699-704

Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agro AF, Maccarrone M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell. Mol. Life Sci*. 2007; 64(2):219–229.

Giang DK, Cravatt BF. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amidehydrolases. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94:2238–2242.

Goldberg AL, Tischler M, DeMartino G, Griffin G. Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. *Federation Proceedings* 1980;39:31–6.

Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo J, Bilbao A. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J. Neurosci*. 2002; 22:9612–9617.

Gomes M, Lecker S, Jagoe R, Navon A, Goldberg A. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci*. 2001: 14440–14445.

Goparaju S, Ueda N, Yamaguchi H, and Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.* 1998; 422:69–73.

Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 275:2-12.

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008; 30:214-26.

Hannun Y, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 2000; 10(2):73-80.

Heitzer M, Wolf I, Sanchez E, Witchel S, DeFranco D. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007; 8(4):321-30.

Hill M, McLaughlin R, Pan B, Fitzgerald M, Roberts CJ. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci.* 2011; 31:10506-10515.

Hill M, McEwen B. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioral effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; 34:791–797.

Hill M, Karatsoreos IN, Hillard CJ, McEwen BS. Rapid elevations in limbic endocannabinoid content by glucocorticoid hormones in vivo. *Psychoneuroendocrinology.* 2010; 35: 1333-1338.

Hill M, Ho W, Meier S, Gorzalka B, Hillard C. Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2- arachidonoylglycerol in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol* 2005, 528:99-102.

Hyde R, Hajduch E, Powell D, Taylor P, Hundal H. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *FASEB J.* 2005; 19: 461-3.

Iannotti F, Silvestri C, Mazarella E, Martella A, Calvigioni D, Piscitelli F, et al. The endocannabinoid 2-AG controls skeletal muscle cell differentiation via CB1 receptor-

dependent inhibition of Kv7 channels. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2014; 17;111(24):E2472-81.

Jaafar R, Zeiller C, Pirola L, Di Grazia A, Naro F, Vidal H, et al. Phospholipase D regulates myogenic differentiation through the activation of both mtorc1 and mTORC2 complexes. *J Biol Chem.* 2011; 286:22609–22621.

Jenkin K, McAinch A, Grinfeld E, Hryciw D,. Role for cannabinoid receptors in human proximal tubular hypertrophy. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010; 26:879–886.

Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degrace P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes.* 2010;59(4):926-34.

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 2009; 89:309–380.

Karatsoreos IN, y cols. Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: A potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology.* 2010; 151(5):2117–2127.

Kim J, Carlson ME, Watkins BA. Docosahexaenoyl ethanolamide improves glucose uptake and alters endocannabinoid system gene expression in proliferating and differentiating C2C12 myoblasts. *Front Physiol.* 2014;5:100.

Kirkham T, Williams C, Fezza, F, Di Marzo, V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136:550–557.

Kirschke E, Goswami D, Southworth D, Griffin PR, Agard DA. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell.* 2014; 157(7):1685-97.

Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One.* 2008;3(3):e1797.

Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, García EA. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2005; 280(26):25196-201.

Kostyo JL, Redmond AF. Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on amino acid transport by muscle. *Endocrinology*. 1966; 79:531-40.

Kuo T, Harris CA, Wang JC. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Nov 5;380(1-2):79-88.

Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryde'n M. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*. 2005; 54(11):3190–3197

Lindborg KA, Teachey MK, Jacob S, Henriksen EJ. Effects of in vitro antagonism of endocannabinoid-1 receptors on the glucose transport system in normal and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12(8):722-30.

Lipina C, Stretton C, Hastings S, Hundal JS, Mackie K, Irving AJ. Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes*. 2010;59(2):375-85.

Liu J, Peng Y, Wang X, Fan Y, Qin C, Shi L. Mitochondrial Dysfunction Launches Dexamethasone-Induced Skeletal Muscle Atrophy via AMPK/FOXO3 Signaling. *Mol Pharm*. 2016 ;13(1):73-84.

Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(2):183-7.

Liu Z, Li G, Kimball SR, Jahn LA, Barrett EJ. Glucocorticoids modulate amino acid-induced translation initiation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. 2004; 287:E275-81.

Liu Z, Jahn LA, Long W, Fryburg DA, Wei LP, Barrett EJ. Branched chain amino acids activate messenger ribonucleic acid translation regulatory proteins in human skeletal muscle, and glucocorticoids blunt this action. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86:2136-43.

Lofberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, y cols. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *European Journal of Clinical Investigation* 2002;32:345–53

Luecke H., Yamamoto k. The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NF-kappa B to effect promoter-specific transcriptional repression, *Genes Dev.* 2005; 9: 1116–1127.

Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, y cols. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia.* 2007;50(3):625–33.

Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral G, Dey S, Di Marzo V, et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(5):277-96.

Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli V, Weng F, Stuart T. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J. Neurosci.* 2006; 26:6643–6650.

Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta (9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res.* 1999; 839: 173-179.

Massa F, Monory K. Endocannabinoids and the gastrointestinal tract. *J Endocrinol Invest.* 2006;29(3 Suppl):47-57.

Matsuda L, Lolait S, Brownstein M, Young A, Bonner T. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature.* 1990; 346:561–564.

Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18: 27–37.

Matias I, Gonthier MP, Petrosino S, et al. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br J Pharmacol.* 2007; 152:676–90.

Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(8):3171-80.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-4.

McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol*. 2008; 583(2-3):174–185.

McMahon M, Gerich J, Rizza R. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes/Metabolism Rev*. 1988; 4: 17–30.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski N, Schatz A, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptor. *Biochem Pharmacol*. 1995; 50(1): 83-90.

Mechoulam R, Hanuš L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2000; 108:1–13.

Mechoulam R, Gaoni Y. A total synthesis of Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the active constituent of Hashish- J. Am. Chem. Soc. 1965; 87:3273–3275.

Meyuhas O. Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. 2008; 268:1-37.

Mitch W, Medina R, Griebler S, May R, England B, Price S, y cols. Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. *J Clin Invest*. 1994; 93: 2127–2133.

Model MA, Reese JL, Fraizer GC. Measurement of wheat germ agglutinin binding with a fluorescence microscope. *Cytometry A*. 2009;75(10):874-81.

Munro S, Thomas K, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993; 365:61–65.

Nair S, Rimerman R, Toran E, Chen S, Prapapanich V. Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. *Mol Cell Biol*. 1997; 17:594–603.

Nistala R, Stump C. Skeletal muscle insulin resistance is fundamental to the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr*. 2006; 1:47-52.

Oakley R, Cidlowski J. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids, *J. Biol. Chem*. 2011;286 (5) 3177–3184.

Ochi A, Abe T, Nakao R, Yamamoto Y, Kitahata K, Takagi M, Hirasaka K. N-myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 2015 Mar 15;570:23-31

Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, et al. Peripheral cannabinoid receptor, CB2R, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2006; 103:696–701.

O'Keefe L, Simcocks A, Hryciw D, Mathai M, McAinch A. The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism. *Diabetes Obes. Metab*. 2014; 16:294–304.

Ortlund E., y cols. Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis, *Science* 317, 2007; 5844:1544–1548.

Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1298-1305.

Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3160-9.

Pagano C, Pilon C, Calcagno A, Urbanet R, Rossato M, Milan G. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2007; 92(12):4810–4819.

Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*. 2006; 27:73–100.

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. 2004; 145: 5431- 5438.

Patterson ZR, Abizaid A. Stress induced obesity: Lessons from rodent models of stress. *Front Neurosci*. 2013; 7:130.

Pereira M, Palming J, Svensson M, Rizell M, Dalenbäck J, Hammar M, y cols. FKBP5 expression in human adipose tissue increases following dexamethasone exposure and is associated with insulin resistance. *Metabolism*. 2014 Sep;63(9):1198-208.

Perry C, Spiers A, Cleland S, Lowes G, Petrie J, Connell J. Glucocorticoids and insulin sensitivity: dissociation of insulin's metabolic and vascular actions. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 6008-6014.

Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30 Suppl 1:S13-8.

Piscitelli F, Di Marzo V. "Redundancy" of endocannabinoid inactivation: new challenges and opportunities for pain control. *ACS Chem Neurosci*. 2012; 3:356-363.

Pratt W, Morishima Y, Murphy M, Harrell M. Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 111-138.

Pratt W, Toft D. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 1997; 18:306-360.

Price S, Bailey J, Wang X, Jurkowitz C, England B, y cols. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest*. 1996; 98: 1703–1708.

Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A. Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci*. 2009;12(9):1152-8.

Quercioli A, Pataky Z, Vincenti G, Makoundou V, Di Marzo V, Montecucco F, et al. Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J*. 2011;32(11):1369-78.

Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand J. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(2):R345-53.

Rogatsky I., y cols. Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2003; 24:13845–13850.

Romero J, Hillard C, Calero M, Rábano A. Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 2002; 100:85–93.

Rooney D, Neely R, Cullen C. The effect of cortisol on glucose/glucose-6-phosphate cycle activity and insulin action. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 77:1180-1183.

Salto R, Vílchez JD, Cabrera E, Guinovart JJ, Girón MD. Activation of ERK by sodium tungstate induces protein synthesis and prevents protein degradation in rat L6 myotubes. *FEBS Lett*. 2014; 588(14):2246-54.

Scerif M, Füzesi T, Thomas JD, Kola B, Grossman AB, Fekete C, Korbonits M. CB1 receptor mediates the effects of glucocorticoids on AMPK activity in the hypothalamus. *J Endocrinol*. 2013;219(1):79-88.

Scheen AJ, Paquot N. Inhibitors of cannabinoid receptors and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 505–511.

Schneiter P, Tappy L. Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998; 275: 806-813.

Shah O, Kimball S, Jefferson L. Acute attenuation of translation initiation and protein synthesis by glucocorticoids in skeletal muscle. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. 2000a; 278:E76–82.

Shah O, Kimball S, Jefferson L. Among translational effectors, p70S6k is uniquely sensitive to inhibition by glucocorticoids. *Biochemical Journal*. 2000b; 347:389–97.

Shibli-Rahhal A, Van Beek M, Schlechte J. Cushing's syndrome, *Clin. Dermatol*. 2006; 24(4):260–265.

Sidibeh C, Pereira M, Lau Börjesson J, Kamble P, Skrtic S. Role of cannabinoid receptor 1 in human adipose tissue for lipolysis regulation and insulin resistance. *Endocrine*. 2017; 55(3):839-852.

Silverstein A, Galigniana M, Kanelakis K, Radanyi C, Renoir J. Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* 1999;274, 36980–36986.

Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* 2013; 17(4):475–490.

Smoak K, Cidlowski J. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev.* 2004; 125(10-11):697-706.

Song D, Bandsma R, Xiao C. Acute cannabinoid receptor type 1 (CB1R) modulation influences insulin sensitivity by an effect outside the central nervous system in mice. *Diabetologia*. 2011; 54: 1181-1189.

Soriano J, González L, Catalá A. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog Lipid Res.* 2005;44(6):345-56.

Stella N, Piomelli D. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 2001; 425:189–96.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* 1997; 388:773–8.

Stitt T, Drujan D, Clarke B, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* 2004; 14:395–403.

Smith D, Toft D. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993;7: 4-11.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 215(1): 89-97.

Tardif N, Salles J, Guillet C, Tordjman J, Reggio S, Landrier JF, Giraudet C, et al. Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation. *Aging Cell*. 2014; 13(6):1001-11.

Thornton J., y cols. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2001;5671–5676.

Tomas FM, Munro HN, Young VR. Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N tau-methylhistidine. *Biochemical Journal*. 1979;178:139–46.

Trikudanathan S, McMahon GT. Optimum management of glucocorticoid-treated patients. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008; 4(5):262–271.

Troncoso R, Paredes F, Parra. Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle*. 2014; 13(14):2281-2295.

Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, Foster D. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2009; 29:1411–1420.

Vandevyver S, Dejager L, Libert C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic*. 2012;13(3):364-74.

Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases, *Mol. Cell Endocrinol*. 2007;275 (1–2) 43–61.

Vermeer H, Hendriks-Stegeman B, van der Burg B. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic fkbp51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(1):277–84.

Wade MR, Degroot A, Nomikos GG. Cannabinoid CB1 receptor antagonism modulates plasma corticosterone in rodents. *Eur J Pharmacol*. 2006; 551: 162-167.

Wang M, Hill MN, Zhang L, Gorzalka BB, Hillard CJ, Alger BE. Acute restraint stress enhances hippocampal endocannabinoid function via glucocorticoid receptor activation. *J Psychopharmacol.* 2012; 26: 56-70.

Wang S, Lim G, Mao J, Sung B, Yang L, Mao J. Central glucocorticoid receptors regulate the upregulation of spinal cannabinoid- 1 receptors after peripheral nerve injury in rats. *Pain* 2007, 141:96–105.

Wardle J, Chida Y, Gibson EL, Whitaker KL, Steptoe A. Stress and adiposity: A meta-analysis of longitudinal studies. *Obesity (Silver Spring).* 2011; 19(4):771–778.

Watson ML, Baehr LM, Reichardt HM, Tuckermann JP, Bodine SC, Furlow JD. A cell autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism.* 2012;302:E1210–20.

Weinstein S, Wilson C, Pritsker A, Cushman S. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism* 1998; 47: 3–6.

Wierzbicki AZ. Rimonabant: endocannabinoid inhibition for the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 1697–1706.

Willi S, Kennedy A, Wallace P, Ganaway E, Rogers N, Garvey W. Troglitazone antagonizes metabolic effects of glucocorticoids in humans. *Diabetes.* 2002; 51: 2895-2902.

Wilson R, Nicoll R. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature.* 2001; 410:588–592.

Wing S, Goldberg A. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1993; 264: E668–E676.

Wochnik GM, Ruegg J, Abel GA. Fk506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4609–16.

Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270(5639):725-7.

Zhao W, Qin W, Pan J, Wu Y, Bauman WA, Cardozo C. Dependence of dexamethasone induced Akt/FOXO1 signaling, upregulation of MAFbx, and protein catabolism upon the glucocorticoid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;378:668–72.