



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicación del Sistema de Melanocortinas en la Reproducción del Pez Cebra

Sandra Ximena Navarro Rojas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

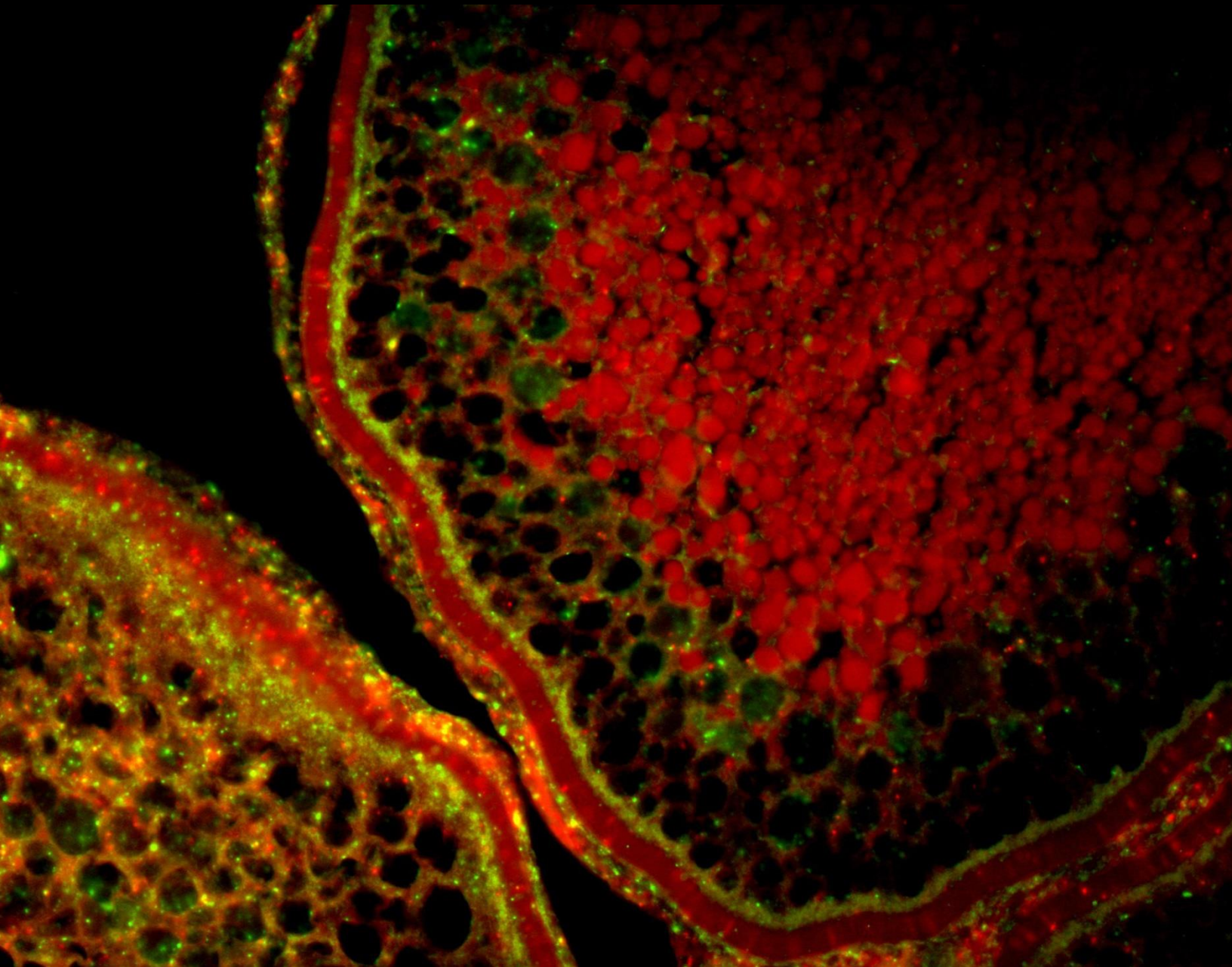
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Implicación del Sistema de Melanocortinas en la Reproducción del Pez Cebra

Sandra Ximena Navarro Rojas

2022





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Biologia

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Programa de Acuicultura

**Implicación del Sistema de Melanocortinas en la
Reproducción del Pez Cebra**

Memoria presentada por

Sandra Navarro Rojas

Para optar al grado de

Doctor por la Universitat de Barcelona

Dr. José Miguel Cerdá-Reverter
Director

Dra. Ana M. dos Santos Rocha
Co-directora

Dra. Isabel Navarro Álvarez
Tutora

Sandra Navarro Rojas
Doctorando

Barcelona, Septiembre de 2022



D. José Miguel-Cerdá-Reverter, Investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS).

Informa que la Tesis Doctoral titulada “Implicación del Sistema de Melanocortinas en la Reproducción del Pez Cebra”, ha sido realizada por Doña Sandra Ximena Navarro Rojas en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) bajo su dirección y que, una vez revisado y comprobado el trabajo, considera que reúne los requisitos necesarios para la obtención del grado de Doctor, por lo que autoriza su presentación.

Para que así conste

A handwritten signature in blue ink, reading 'José Miguel', enclosed within a rectangular box.

José Miguel Cerdá Reverter

Dña. Ana María dos Santos Rocha, Investigadora del Centro Interdisciplinario de Investigaciones Marinas y Ambientales Universidade do Porto

Informa que la Tesis Doctoral titulada “Implicación del Sistema de Melanocortinas en la Reproducción del Pez Cebra”, ha sido realizada por Doña Sandra Ximena Navarro Rojas en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) bajo su co-dirección y que, una vez revisado y comprobado el trabajo, considera que reúne los requisitos necesarios para la obtención del grado de Doctor, por lo que autoriza su presentación.

Para que así conste



Ana María dos Santos Rocha

Dña. María Isabel Navarro Álvarez, Catedrática de Fisiología

Informa que la Tesis Doctoral titulada “Implicación del Sistema de Melanocortinas en la Reproducción del Pez Cebra”, ha sido realizada por Doña Sandra Ximena Navarro Rojas en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) bajo su tutoría y que, una vez revisado y comprobado el trabajo, considera que reúne los requisitos necesarios para la obtención del grado de Doctor, por lo que autoriza su presentación.

Para que así conste



María Isabel Navarro Álvarez

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la obtención de una Beca de Doctorado BECAS CHILE 2013–72140242, otorgada por el ANID (Agencia Nacional de Investigación y desarrollo) y gracias a la financiación obtenida por parte del Doctor José Miguel Cerdá Reverter, en los siguientes proyectos: “Implicación del sistema de melanocortinas en la regulación del crecimiento de peces: estudio de las interacciones estrés-ingesta (MELANOGROWTH) AGL2013-46448-C3-3-R” del Ministerio de Economía y Competitividad, “Aplicación y transferencia de nuevos conocimientos para la mejora de la nutrición y la salud de especies marinas cultivadas” como parte del Programa Prometeo para la realización de proyectos de I+D para grupos de investigación de excelencia, Fase II; 2014/085, “Mejora de la producción en acuicultura mediante herramientas de biotecnología (Aquagenomics) (CSD2007-00002) y “Participación de las proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAPs) en la regulación de la respuesta al estrés en peces AGL2010-22247-C03-01.

Agradecimientos

Después de tanto tiempo de haber partido del laboratorio, por fin hemos podido cerrar el ciclo. Han sido años de espera que llegan a buen puerto gracias al trabajo de un gran equipo-familia del cual formé parte durante 5 años.

Quiero agradecer, en primer lugar, a mis directores de tesis, José Miguel y Ana. Les estoy muy agradecida por vuestra paciencia y por todo el empuje que me dieron durante todo este período. Ha sido una gran suerte poder llegar al laboratorio y, desde cero, conocer el mundo de las melanocortinas y la reproducción en peces con el liderazgo que han impregnado en mí.

Quiero agradecer a mi familia, por toda su paciencia durante este tiempo. Por haberme acompañado en este viaje que partió por allá en el 2010 y, aunque no lo crean, partió con la ecología, trabajando como bióloga marina.

Quiero agradecer, especialmente a Elisa Sánchez y a María Agulleiro, mis dos faroles que me iniciaron en el laboratorio de José Miguel. Ellas me guiaron a lo largo de este camino. Con ustedes aprendí todo lo necesario para llegar a buen puerto. Ustedes se llevan un lugar en mi corazón que nunca se podrá borrar.

También quiero agradecer a todos los colegas del IATS, en especial a Sara, Vanesa, Sebastián, Felipe, Raúl Guillot, Vicky, Víctor, Zhor, Morena, Gaby, Itziar y a todos los becarios con los cuales compartí durante este periplo por las melanocortinas. Con ustedes siempre fue más fácil.

Por supuesto, mis gracias infinitas a todo el personal del IATS, en especial a Joaquim Salvador por su ayuda en los procedimientos con los peces. También a Charo, Inma, Rosita, Pepe y Lucinda y a todo el personal técnico e investigador.

Y finalmente a Raúl, mi compañero de vida. Gracias por tu paciencia infinita y apoyo incondicional en esta aventura.

Resumen

El sistema de melanocortinas es probablemente uno de los sistemas hormonales más complejos involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética. Las melanocortinas son péptidos derivados de un complejo precursor peptídico denominado proopiomelanocortina (POMC). Su procesamiento genera diversos péptidos de melanocortina entre los que se encuentran las hormonas estimulantes de melanocitos (MSHs) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Las funciones de las melanocortinas se median a través de 5 receptores diferentes (MC1R-MC5R). Tanto ACTH como MSH activan los MCRs con diferente afinidad, pero MC2R solo es activado por ACTH. La señalización de melanocortinas también puede ser modulada por dos antagonistas endógenos, la proteína de señalización de agutí (ASIP) y la proteína relacionada con agutí (AGRP) que compiten con los péptidos de melanocortina al unirse a MCR.

Entre los MCR, el MC4R está involucrado en el control de la ingesta y la reproducción. Las mutaciones negativas dominantes de *Mc4r* se han relacionado con un tamaño corporal más grande y un inicio tardío de la pubertad en *Xiphophorus*. Investigaciones en el pez cebra demuestran que la supresión de la actividad central del *Mc4r* es esencial para el crecimiento larvario. De forma similar, la supresión del *Mc4r* resulta en una disminución de la expresión de *fshb* y *lhb*. Esto sugiere que, en los peces, el *Mc4r* participa no solo en el control de la ingesta de alimentos, sino que también en la reproducción.

Experimentos desarrollados en nuestro laboratorio, han demostrado que *Asip1* funciona como un antagonista endógeno tanto de *Mc1R* como de *Mc4R*. Además, la generación de una cepa transgénica de pez cebra que sobreexpresa *asip1* de pez dorado (*asip1-Tg*), demostró la participación del sistema de melanocortinas en la regulación del patrón pigmentario dorsoventral y estimulación del crecimiento. En consecuencia, este modelo transgénico supone una excelente oportunidad para estudiar la relación entre el sistema de melanocortinas, el crecimiento y la reproducción.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la disminución de la actividad del sistema de melanocortina inducida por la sobreexpresión de *asip1* retrasa significativamente el crecimiento temprano de los animales transgénicos, exhibiendo un crecimiento reducido hasta completar el desarrollo gonadal. Además, no tuvo efecto fenotípico sobre la pubertad y mermó el potencial reproductivo en comparación con los peces WT, lo que se refleja en una menor calidad del huevo y diámetro del vitelo, un retraso en el tiempo de eclosión y el crecimiento larvario.

La caracterización de los niveles de expresión relativa de los receptores de melanocortinas, proteínas accesorias, agonistas y antagonistas en gónadas de pez cebra así como la expresión de *mc1r* y *mc4r* en oocitos previtelogénicos y vitelogénicos y en células germinales masculinas, respalda el papel del sistema de melanocortinas en la fisiología gonadal. Además, nuestros experimentos *in vitro* sugieren que los péptidos de melanocortinas pueden modular la síntesis de esteroides gonadales.

Finalmente, la expresión de *mc4r* en gonadotropos y la modulación de la síntesis de gonadotropinas por los péptidos melanocortina sugiere un posible rol paracrino en la síntesis y liberación de hormonas reproductivas desde la adenohipófisis.

Abstract

The melanocortin system is probably one of the most complex hormonal systems involved in the regulation of food intake and energy homeostasis. Melanocortins are peptides processed from a complex precursor named proopiomelanocortin (POMC). Its processing generates different melanocortin peptides, including melanocyte-stimulating hormones (MSHs) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Melanocortin functions are mediated by five receptors (MC1R-5). ACTH and MSHs activate MCRs with different affinities, while MC2R only binds ACTH. Melanocortin signaling can also be modulated by two endogenous antagonists, agouti signaling protein (ASIP) and agouti-related protein (AGRP), that compete with melanocortin peptides for binding to MCRs.

Among the MCRs, MC4R plays a role in the control of food intake and reproduction. Dominant negative mutations of *Mc4r* have been linked to larger body size and delayed onset of puberty in *Xiphophorus*. In zebrafish, it has been demonstrated that suppression of central *Mc4r* activity is essential for larval growth. Similarly, suppression of *Mc4r* results in decreased expression of *fshb* and *lhb*. In fish, *Mc4r* plays a role not only in the control of food intake, but also in reproduction.

Experiments in our laboratory have shown that *Asip1* works as an endogenous antagonist of *Mc1R* and *Mc4R*. In addition, the transgenic zebrafish line overexpressing goldfish *asip1* (*asip1*-Tg), demonstrated the participation of the melanocortin system in the dorsoventral pigmentation pattern and fish growth. This transgenic model is an excellent opportunity to study the relationship between the melanocortin system, body growth and reproduction.

The results presented in this thesis show that a decrease in the activity of the melanocortin system induced by *asip1* overexpression significantly delays early growth in transgenic animals, exhibiting reduced growth until they reach the full gonadal development. The transgene has no phenotypic effect on puberty timing but decreases reproductive performance reflected in egg quality and yolk diameter, delayed hatching time and larval growth.

Characterization of the relative expression levels of melanocortin receptors, their accessory proteins, agonists and antagonists in zebrafish gonads as well as the expression of *mc1r* and *mc4r* in previtellogenic and vitellogenic oocytes and male germ cells supports a role for the melanocortin system in the gonadal physiology. Furthermore, in vitro studies suggest that melanocortin peptides may modulate gonadal steroid synthesis.

Finally, the expression of *mc4r* in the gonadotropes and the modulation of gonadotropin synthesis by melanocortin peptides, suggest a paracrine role in the synthesis and secretion of reproductive hormones from the adenohypophysis.

Abreviaturas frecuentes

-/-	Referencia a un organismo Knock out para algún gen
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
AGRP	Proteína relacionada con agutí
<i>agrp</i>	Proteína relacionada con agutí (gen)
ARC	Núcleo arqueado del hipotálamo
ASIP	Proteína de señalización agutí
<i>asip</i>	Proteína de señalización agutí (gen)
ASIP1-TG	Cepa transgénica que sobreexpresa ASIP de pez dorado
β -ED	β -endorfina
β -LPH	β -lipotropina
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas
CLIP	Péptido del lóbulo intermedio semejante a corticotropina
CPE	Carboxipeptidasa E
cDNA	ADN complementario
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
<i>ddx4</i>	Polipéptido 4 del complejo DEAD (gen)
DIG	Digoxigenina
DMH	Núcleo dorsoventral
LHA	Hipotálamo antero lateral
GABA	Ácido gama aminobutírico

<i>gsdf</i>	Factor de crecimiento derivado del soma gonadal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpf	Días post fecundación
ECL	Extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>ef-1α</i> (<i>efa</i>)	Factor de elongación 1 α (gen)
FLU	Fluoresceína
FCH	Hormona estimulante del folículo
GnRHs	Neuropéptidos liberadores de gonadotropinas
GnRHRs	Receptores de GnRH
Hd	Hipotálamo dorsal
HHA	Hipotálamo Hipófisis Adrenal
hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
HHG	Hipotálamo Hipófisis Gonadal
hpf	Horas post fecundación
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
LH	Hormona luteinizante
<i>lh</i>	Hormona luteinizante (gen)
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante
<i>insl-3</i>	Insulina tipo 3 (gen)
LPH	Lipotropina
MC1R	Receptor 1 de melanocortinas
MC2R	Receptor 2 de melanocortinas
MC3R	Receptor 3 de melanocortinas

MC4R	Receptor 4 de melanocortinas
MC4R KO	Deficiente de receptor 4 de melanocortinas
MC5R	Receptor 5 de melanocortinas
MIS	Esteroides inductor de la maduración
MPF	Factor promotor de la maduración
MRAP	Proteína accesoria del receptor de melanocortinas
mrp	Proteína accesoria del receptor de melanocortinas (gen)
mRNA	RNA mensajero
MSH	Hormona estimuladora de los melanocitos
MTII	Melanotan II
NPY	Neuropéptido Y
npy	Neuropéptido Y (gen)
NTS	Núcleo <i>tractus solitarius</i>
PFA	Paraformaldehido
PAM	Peptidil-glicina- α -amidante monooxigenasa
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PC1	Prohormona convertasa 1
pc1/3	Prohormona convertasa 1 (gen)
PC2	Prohormona convertasa 2
pc2	Prohormona convertasa 2 (gen)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	<i>pars intermedia</i>
<i>piwil-1</i>	Proteína tipo Piwil-1

PKA	Fosfoquinasa A
POMC	Propiomelanocortina
pomc	Propiomelanocortina (gen)
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo paraventricular
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
SEM	Error estándar de la media
SgA	Espermatogonia de tipo A
SgB	Espermatogonia de tipo B
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
Spcl	Espermatocito primario
Spcll	Espermatocito secundario
SpD	Espermátida
SpE	Espermatozoide
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogénica
T	Testosterona
E2	17-β-Estradiol
TESPA	3-aminopropiltriétoxissilano
TU	"Tübingen", cepa de peces cebra
WT	"Wild-Type", peces cebra con fenotipo salvaje
11-KT	11-K-Ketotestosterona
18S	Sub unidad ribosomal 18 (gen)

Contenido

1. Introducción.....	4
1.1. El sistema de melanocortinas	4
1.2. Melanocortinas.....	4
1.3. Receptores de melanocortinas	6
1.3.1. MC1R.....	8
1.3.2. MC2R.....	8
1.3.3. MC3R.....	9
1.3.4. MC4R.....	10
1.3.5. MC5R.....	11
1.4. Antagonistas endógenos de los receptores de melanocortinas	11
1.4.1. ASIP	12
1.4.2. AGRP	13
1.5. Proteínas accesorias del receptor de melanocortinas tipo 2 (MRAP)	14
1.6. Reproducción en teleósteos.....	15
1.6.1. Síntesis de esteroides.....	18
1.7. Reproducción en hembras	19
1.7.1. Estructura del ovario	19
1.7.2. Oogénesis.....	20
1.8. Reproducción en machos	24
1.8.1. Estructura del testículo	24
1.8.2. Espermatogénesis.....	25
1.9. Melanocortinas y Reproducción	27
1.10. El pez cebra como organismo modelo	29
2. Objetivos	31
3. Materiales y Métodos	32
3.1. Manejo de animales de experimentación	32
3.2. Rol del sistema de melanocortinas en el crecimiento y pubertad	33
3.2.1. Diseño experimental	33
3.2.2. Estudio del crecimiento lineal.....	33
3.2.3. Análisis del desarrollo gonadal	34

3.2.4. Curvas de madurez	38
3.2.5. Análisis estadístico	38
3.3. Rol del sistema de melanocortinas en el potencial reproductivo	39
3.3.1. Diseño experimental	39
3.3.2. Análisis estadístico	39
3.4. Rol de las melanocortinas en la esteroidogénesis gonadal	40
3.4.1. Expresión del sistema de melanocortinas en tejido gonadal	40
3.4.2. Localización celular de <i>mc4r</i> y <i>mc1r</i> en tejido gonadal.....	44
3.4.3. Efecto de las melanocortinas en la producción de esteroides	47
3.5 Caracterización del sistema de melanocortinas en la hipófisis	50
3.5.1. Estudio de colocalización celular de <i>mc4r</i> y gonadotropos usando sondas <i>fshb/lhb</i> ..	50
3.5.2 Relación del sistema de melanocortinas en la expresión de gonadotropinas en sistema <i>in vitro</i>	52
4. Resultados.....	55
4.1. Rol del sistema de melanocortinas en el crecimiento y pubertad	55
4.1.1. Crecimiento lineal.....	55
4.1.2. Diferenciación gonadal.....	58
4.1.3. Maduración gonadal	60
4.1.4. Interacción entre el crecimiento y el desarrollo de las gónadas	63
4.1.5. Longitud y edad en la madurez.....	65
4.2. Eficiencia reproductiva	69
4.3. Rol del sistema de melanocortinas en la esteroidogénesis gonadal	72
4.3.1. Expresión del sistema de melanocortinas en gónadas de pez cebra	72
4.3.2. Expresión relativa de <i>mc4r</i> en folículos ováricos	73
4.3.3. Localización celular del RNAm de <i>mc1r</i> y de <i>mc4r</i> en ovarios y testículos	74
4.3.4. Efecto de las melanocortinas sobre la secreción basal de esteroides e inducida por hCG en gónadas de pez cebra	77
4.4. Rol del sistema de melanocortinas en la hipófisis	80
4.4.1. Colocalización celular de <i>mc4r</i> y gonadotropos usando sondas <i>fshb/lhb</i>	80
4.4.2. Efecto de las melanocortinas en la expresión <i>in vitro</i> de gonadotropinas	82
5. Discusión	84
5.1. Rol del sistema de melanocortinas en el crecimiento y pubertad	84

5.1.1. Análisis del crecimiento	84
5.1.2. Adquisición de la pubertad	85
5.1.3. Eficiencia reproductiva	87
5.2. Rol del sistema de melanocortinas en la esteroidogénesis gonadal	89
5.2.1. Expresión del sistema de melanocortinas en tejido gonadal	89
5.2.2. Efecto <i>in vitro</i> de las melanocortinas sobre la secreción basal e inducida de esteroides en ovarios y testículos	93
5.3. Caracterización del sistema de melanocortinas en la hipófisis	96
5.3.1. Estudio de co-localización celular de <i>mc4r</i> y gonadotropos usando sondas <i>fshb/lhb</i>	96
5.3.2. Relación del sistema de melanocortinas en la expresión de gonadotropinas en sistema <i>in vitro</i>	98
6. Conclusiones	101
7. Bibliografía	103

1. Introducción

1.1. El sistema de melanocortinas

El sistema de melanocortinas es un sistema hormonal implicado en funciones fisiológicas como el control de la melanogénesis, la respuesta al estrés, la regulación del balance energético y la secreción glandular periférica. Está compuesto por: a) la proopiomelanocortina (POMC) y sus péptidos derivados como las hormonas estimulantes de los melanocitos (MSHs) y la hormona adrenocorticotropa (ACTH); b) una familia de 5 receptores acoplados a proteína G (MC1R-MC5R); c) los péptidos antagonistas endógenos, la proteína de señalización agutí (ASIP) y la proteína relacionada con agutí (AGRP); y d) las proteínas accesorias del receptor de melanocortinas tipo 2 (MRAPs) (Gantz y Fong, 2003).

1.2. Melanocortinas

Las melanocortinas son un grupo de péptidos estructuralmente relacionados que derivan de un complejo precursor llamado proopiomelanocortina (POMC). Esta proteína da origen a las hormonas ACTH, α - β - y γ -MSH así como el péptido opiáceo β -endorfina (β -EP), de donde deriva el nombre pro-opio-melanocortina (Gantz y Fong, 2003).

La molécula del POMC se compone de tres dominios principales: el N-terminal con γ -MSH, el central que contiene ACTH y el C-terminal que genera β -lipotropina (β -LPH). Cada dominio integra un péptido de MSH y estructuralmente comparten el farmacóforo His-Phe-Arg-Trp (HFRW), secuencia requerida para la actividad biológica de las melanocortinas (Bicknell, 2008).

El POMC es sintetizado principalmente en la hipófisis, tanto en las células corticotropas (productoras de ACTH) de la *pars distalis rostral*, como en las células melanotropas (productoras de MSH) de la *pars intermedia* (Cerdá-Reverter y Canosa, 2009). En el hipotálamo se expresa en el núcleo arqueado (ARC), el núcleo del tracto solitario (NTS), hipocampo y corteza cerebral. Su expresión también ha sido detectada en

diversos órganos periféricos como la piel, las glándulas suprarrenales, el tracto gastrointestinal, sistema inmunitario, ovario, testículo y placenta (Harno *et al.*, 2018; Yeo *et al.*, 2000).

La proteína POMC se procesa postraduccionalmente por las prohormonas convertasas (PC) que muestran especificidad de tejido. La dotación celular de PCs posibilita un procesamiento diferencial del precursor peptídico generando diferentes péptidos en los diversos tipos celulares (Benjannet *et al.*, 1991; Gantz y Fong, 2003). Además, estos productos peptídicos son modificados por amidación y/o acetilación, para adquirir actividad biológica y aumentar su estabilidad contra la acción de aminopeptidasas. En la *pars distalis* de la hipófisis (Fig.1), la prohormona convertasa 1 (PC1, también conocida como PC3) conduce a la escisión de péptidos de alto peso molecular como pro-ACTH y β -LPH. La pro-ACTH es nuevamente procesada para generar ACTH y un péptido que contiene N-POMC (también llamado pro γ -MSH). En el ARC y en el lóbulo intermedio de la hipófisis, la prohormona convertasa 2 (PC2) proteoliza la ACTH para generar ACTH (1-17) y el péptido del lóbulo intermedio semejante a la corticotropina (CLIP). Posteriormente la carboxipeptidasa E (CPE) elimina los aminoácidos básicos desde el extremo COOH terminal de ACTH (1-17), permitiendo la amidación por la peptidil-glicina- α -amidante monooxigenasa (PAM) para formar des-acetil- α -MSH (DA- α -MSH). Finalmente, la N-acetiltransferasa (N-AT) acetila la DA- α -MSH para producir α -MSH. Para el caso de β -LPH, la escisión por la PC2 genera β -EP y γ -lipotropina (γ -LPH), la que posteriormente se escinde en β -MSH. En cuanto al péptido N-POMC, la escisión por PC2 genera γ 3-MSH y a través de procesados adicionales, se producen las isoformas γ 2-MSH y γ 1-MSH (Harno *et al.*, 2018).

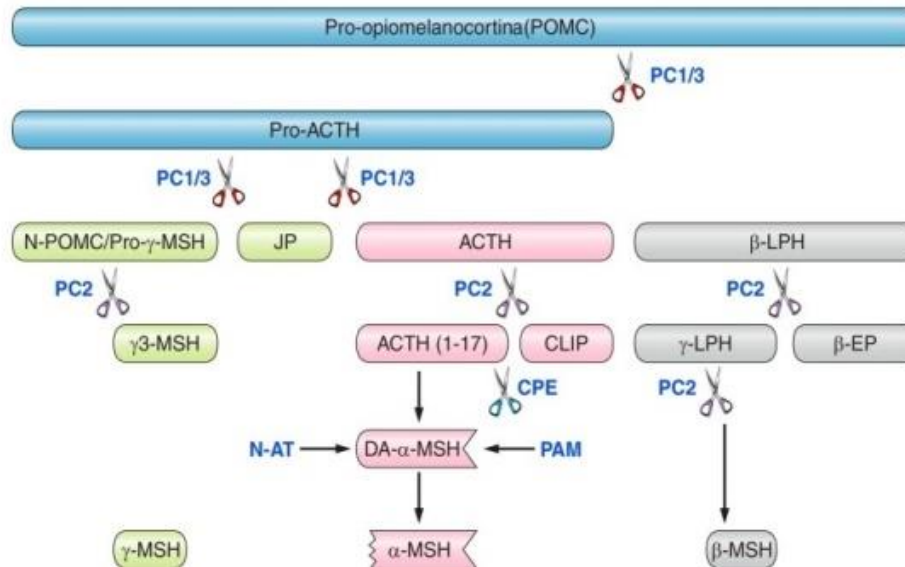


Figura 1. Esquema del procesamiento post-traduccional de la proteína proopiomelanocortina (POMC) por las prohormonas convertidas (PC). Adaptado de Harno *et al.*, 2018

1.3. Receptores de melanocortinas

Los MCRs pertenecen a la familia de Clase A de receptores acoplados a proteína G (GPCR), similares a los receptores de rodopsina (Rodrigues *et al.*, 2013). Estructuralmente están compuestos por 7 dominios α -hélices transmembrana (Fig.2) que están interconectados por 3 bucles extra e intracelulares alternantes (Rosenbaum *et al.*, 2009). Cuando un ligando se une a un receptor, la subunidad α de la proteína G se disocia del resto de subunidades, esto a su vez activa la adenil ciclasa y estimula la producción de adenosín monofostato cíclico (AMPC) (Abdel-Malek, 2001). Existen otras vías de transducción de señal implicadas en la señalización de las melanocortinas, como la activación del trifosfato de inositol (Konda *et al.*, 1994), lo que sugiere que estos péptidos pueden modular diversas vías de señalización de manera específica (Wachira *et al.*, 2003).

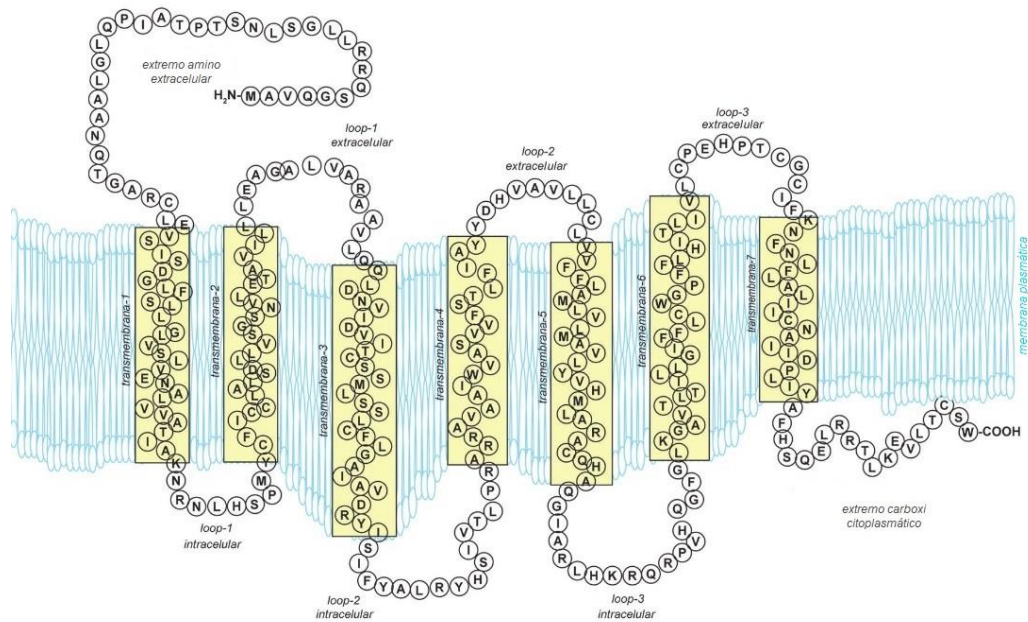


Figura 2. Esquema generalizado de los receptores de melanocortinas. Estructuralmente están compuestos por un dominio N-terminal, siete dominios transmembrana, tres loops intracelulares, tres loops extracelulares y un dominio C-terminal. Adaptada de Wolf Horrell *et al.*, 2016

Actualmente se han caracterizado cinco receptores. ACTH es el único péptido endógeno que se une al MC2R, mientras que α -MSH se une con mayor afinidad a MC1R, seguido por MC3R, MC4R y MC5R. β -MSH tiene mayor afinidad por MC4R mientras que γ -MSH tiene mayor afinidad por MC3R y en relación a las otras MSHs, es una hormona escasamente estudiada (Schiöth, 2001).

1.3.1. MC1R

El MC1R fue el primer MCR en ser clonado (Chhajlani y Wikberg, 1992; Mountjoy *et al.*, 1992) y se le conoce como receptor de α -MSH dada su mayor afinidad por este péptido. (Schiöth *et al.*, 1995).

Codificado por el locus *extension* (Robbins *et al.*, 1993), se expresa predominantemente en los melanocitos (Chhajlani y Wikberg, 1992) y tiene un papel notable en la pigmentación (Abdel-Malek, 2001). En mamíferos, la distribución de feomelanina (pigmento amarillo/rojo) y eumelanina (pigmento marrón/negro), es determinante en la coloración del pelaje (Hearing y Tsukamoto, 1991). La tirosinasa, involucrada en la síntesis de ambos pigmentos, está regulada por el MC1R. En melanocitos foliculares de ratón, la activación de MC1R por α -MSH induce la síntesis de eumelanina (Abdel-Malek, 2001). Alelos dominantes resultan en un receptor constitutivamente activo y asociado con el color negro, mientras que las mutaciones causantes de la pérdida funcional del receptor están asociadas con el fenotipo rojo-amarillo (García Dávila *et al.*, 2015).

En adición, MC1R está expresado en células no pigmentarias (Thörnwall *et al.*, 1997) y en células inflamatorias, aunque puede tener efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores (Catania *et al.*, 2004).

1.3.2. MC2R

El MC2R es el único receptor activado selectivamente por ACTH (Catania *et al.*, 2004). Se expresa principalmente en la corteza adrenal y bajo el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), media los efectos de ACTH sobre la síntesis y secreción de corticosteroides (Beuschlein *et al.*, 2001). En respuesta a una gran variedad de estresores, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) estimula la liberación de ACTH desde la hipófisis. Su unión al MC2R desencadena la cascada de señalización interna esencial para la expresión de las enzimas esteroideogénicas y la producción de cortisol (Novoselova *et al.*, 2013). El

MC2R se expresa en todas las zonas de la corteza adrenal, pero la ACTH actúa principalmente en la zona fascicular estimulando la síntesis y secreción de cortisol (Mountjoy *et al.*, 1992). La acción de la ACTH sobre las células de la zona reticular estimula la producción de andrógenos adrenales (Weber *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que el MC2R se localiza en el retículo endoplasmático (RE) y que una proteína accesoria, denominada proteína accesoria del MC2R (MRAP) es esencial para la su expresión funcional asistiendo su tráfico hasta la membrana celular (Metherell *et al.*, 2005). Las mutaciones en esta proteína accesoria conducen a una función defectuosa de MC2R resultando en una condición letal denominada deficiencia familiar de glucocorticoides (FGD) (ver sección de MRAPs).

Si bien los primeros 13 aminoácidos de ACTH son idénticos a la secuencia aminoacídica de α -MSH, se ha propuesto que el farmacóforo KKRRP sería esencial en la activación del MC2R. El modelo supone que el receptor tiene 2 sitios de unión distintos. Cuando la ACTH se une al sitio de KKRRP, el receptor se activa y abre el sitio de unión del farmacóforo HRFW. Una vez que este segundo sitio esté ocupado, la proteína G se activa y produce la respuesta biológica (Dores y Liang, 2014).

1.3.3. MC3R

El MC3R es el receptor que presenta mayor afinidad por γ -MSH en comparación con los otros MCRs. α -MSH, β -MSH y ACTH se unen al receptor con una afinidad similar entre sí (Schiöth *et al.*, 1995). El MC3R se expresa en el SNC, mayoritariamente en la parte dorsomedial del núcleo ventromedial y el núcleo arqueado del hipotálamo, también en sitios del hipocampo, tálamo y córtex (Gantz *et al.*, 1993; Roselli-Rehfuss *et al.*, 1993). Se ha demostrado su expresión periférica en una variedad de tejidos humanos incluyendo intestino, placenta, riñón, corazón, células inmunitarias, ovario y testículo (Chhajlani, 1996), sin embargo sus funciones fisiológicas siguen siendo enigmáticas. Se ha planteado un rol potencial en la regulación del peso corporal y en el metabolismo energético. Los

ratones “knockout” para MC3R son obesos y no padecen hiperfagia, pero tienen un aumento de la masa adiposa y una disminución de la masa corporal (Butler *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000a). Además, se ha planteado que juega un papel en la función cardiovascular (Getting *et al.*, 2004) y en la homeostasis del sodio (Ni *et al.*, 2003). La activación del MC3R en linfocitos B (Cooper *et al.*, 2005) y macrófagos (Getting *et al.*, 1999) demuestra su efecto anti inflamatorio e inmunomodulador (Catania *et al.*, 2004).

1.3.4. MC4R

El MC4R es el receptor que ha recibido más atención debido a su rol en el control de la ingesta y gasto energético. De manera similar a MC3R, se expresa principalmente en el sistema nervioso central (SNC), incluidos el hipotálamo, el tálamo e hipocampo (Chhajlani, 1996; Gantz *et al.*, 1993). En el hipotálamo está expresado abundantemente en los centros que regulan la alimentación, particularmente en el núcleo paraventricular (PVN), dorsomedial (DMH) y en el área lateral (LHA)(Mountjoy *et al.*, 1994). También es posible encontrarlo en tejidos periféricos como el corazón, pulmón, riñón, músculo y testículos (Mountjoy *et al.*, 2003).

MC4R es conocido como el receptor de β -MSH ya que muestra la más alta afinidad dentro de todos los péptidos de MSH, seguido muy de cerca por α -MSH pero con muy baja afinidad por γ -MSH (Schiöth *et al.*, 1996). Se ha descrito que la acción de α -MSH en conjunto con AGRP, regulan la homeostasis energética (Voisey *et al.*, 2003). La activación de MC4R por α -MSH aumenta el gasto energético e inhibe la ingesta, mientras que el antagonismo por AGRP resulta en hiperfagia y una disminución de la tasa metabólica (Myers y Olson, 2012). Estudios en ratones “knockout” demuestran que la pérdida de MC4R aumenta la ingesta, resultando en obesidad severa, hiperinsulinemia, hiperglicemia y crecimiento lineal acelerado (Huszar *et al.*, 1997). En adición, los ratones MC4R *-/-* no responden a la acción anorexigénica de melanotan II (MTII; un agonista no selectivo de los MCRs) y menos aún, se estimula la tasa metabólica (Chen *et al.*, 2000b; Marsh *et al.*, 1999). En humanos se han descrito que diferentes mutaciones de este receptor son la

causa principal de obesidad de tipo monogénico (Farooqi *et al.*, 2003; Farooqi *et al.*, 2000).

Además MC4R está involucrado en modular funciones reproductivas (ver melanocortinas y reproducción) como la función eréctil y el comportamiento sexual (Van der Ploeg *et al.*, 2002).

1.3.5. MC5R

El MC5R se distribuye ampliamente, pero con bajos niveles de expresión en tejidos periféricos (Chen, 2000). También se ha detectado su expresión en el músculo esquelético, pulmón, bazo y cerebro (Gantz *et al.*, 1994). Sin embargo se expresa principalmente en las glándulas exocrinas como sebáceas, prepuciales, lagrimales y de Harder (Chen *et al.*, 1997). Si bien, las funciones de este receptor todavía no son muy bien comprendidas, se ha planteado que regula la producción de lípidos de las glándulas sebáceas, la repulsión al agua y la regulación térmica (Chen *et al.*, 1997). Estas funciones se evidencian en ratones “knockout” del MC5R, que evidencian un defecto en la impermeabilización al agua y la termorregulación debido a la disminución de la producción de lípidos sebáceos. Debido a su expresión en la glándula prepucial, es probable que el MC5R desempeñe un rol en el comportamiento de mamíferos al regular la síntesis y/o liberación de feromonas (Morgan y Cone, 2006; Morgan *et al.*, 2004a; Morgan *et al.*, 2004b)

1.4. Antagonistas endógenos de los receptores de melanocortinas

Quizás uno de los aspectos más interesantes del sistema de melanocortinas es que tiene dos péptidos endógenos con acción antagónica sobre la señalización de los MCRs, la proteína de señalización agutí (ASIP) y la proteína relacionada con agutí (AGRP). Ambas moléculas de señalización paracrina, regulan el color del pelaje y el peso corporal,

respectivamente, al competir con los agonistas derivados de POMC por la unión y activación de los MCRs (Schiöth, 2001).

La función normal de ASIP es regular la pigmentación en los folículos pilosos a través del antagonismo del MC1R pero también se ha demostrado que inhibe la señalización del MC2R y MC4R (Yang *et al.*, 1997). Mientras que en el hipotálamo, AGRP regula la homeostasis energética por medio del antagonismo selectivo sobre MC3R y MC4R (Ollmann *et al.*, 1997).

1.4.1. ASIP

La proteína de señalización agutí o simplemente agutí en el caso del ratón, debe su nombre al patrón de color de pelaje comúnmente visto en los mamíferos, que se caracteriza por una banda amarilla subapical sobre otra negra o marrón. El papel de agutí en la determinación del color del pelaje es actuar junto α -MSH y MC1R. La activación de MC1R por α -MSH estimula la síntesis de eumelanina (pigmento café/negro), mientras que agutí producido por la célula papilar dérmica, actúa sobre el melanocito adyacente bloqueando la acción de la melanocortina en el MC1R. Esto da como resultado un cambio de la síntesis de eumelanina a feomelanina (pigmento amarillo/rojo), responsable de la banda subapical (Gantz y Fong, 2003). Además, es responsable del patrón de coloración dorso-ventral característico de muchos mamíferos, donde el pelaje dorsal es más oscuro que el pelaje ventral. Esta distribución espacial se relaciona con la baja expresión de *asip* en la zona dorsal favoreciendo la producción de eumelanina, mientras que una mayor expresión en la zona ventral conduce a la síntesis de feomelanina (Vrieling *et al.*, 1994).

Ratones con mutaciones dominantes del gen *agutí*, presentan pelaje amarillo, obesidad, resistencia a la insulina, aumento del crecimiento somático y una predisposición a la tumorigénesis (Bultman *et al.*, 1992; Yen *et al.*, 1994). Si bien el fenotipo amarillo se atribuye al antagonismo de ASIP sobre MC1R, diversas investigaciones demostraron que la obesidad se debe a la expresión ectópica y ubicua de ASIP, actuando como antagonista de α -MSH en la señalización del MC4R (Lu *et al.*, 1994).

En roedores, *agutí* se expresa solo en la piel mientras que en humanos tiene un patrón más amplio de expresión, incluyendo tejido adiposo, testículos, ovario y corazón, con niveles más bajos de expresión en prepucio, riñón e hígado (Wilson *et al.*, 1995).

1.4.2. AGRP

La acción de *agutí* sobre el balance energético vía MC4R, hizo suponer la existencia a nivel cerebral de una proteína similar a ASIP que estimularía el comportamiento alimentario. A través del estudio de librerías de “expressed sequence tags” (ESTs), AGRP fue identificado y clonado basado en su homología con ASIP (Ollmann *et al.*, 1997). Tanto AGRP como ASIP, contienen un dominio C-terminal rico en residuos de cisteína, además de contener el triplete Arg-Phe-Phe, esencial para sus propiedades antagónicas (Takeuchi, 2016). Ratones que sobreexpresan AGRP exhiben hiperfagia y obesidad, pero no presentan la coloración característica de los ratones *agutí* puesto que AGRP no es capaz de antagonizar los efectos de las melanocortinas sobre MC1R (Graham *et al.*, 1997; Ollmann *et al.*, 1997)

AGRP se expresa principalmente en el núcleo arqueado del hipotálamo, la región subtalámica, y la corteza adrenal, con una baja expresión en pulmón y riñón (Ollmann *et al.*, 1997; Shutter *et al.*, 1997). En el núcleo arqueado colocaliza en más de un 95% de los casos con el neuropéptido Y (NPY), además de coexpresar con el neurotransmisor inhibitorio, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Hahn *et al.*, 1998). En condiciones de ayuno o de pérdida de peso inducida por la dieta, las neuronas AGRP se activan, mientras que las neuronas POMC se inhiben. Sin embargo, las neuronas POMC también son inhibidas directamente por las neuronas AGRP a través de la liberación de GABA (Cowley *et al.*, 2001). Por lo tanto, el núcleo arqueado contiene dos tipos de neuronas con efectos opuestos: las neuronas POMC/CART que conducen señales anorexigénicas represoras de la ingesta, y las neuronas AGRP/NPY que conducen señales estimuladoras de la ingesta (Santos, 2014).

Experimentos *in vitro* han demostrado que AGRP es un antagonista altamente competitivo del MC3R y MC4R (Yang *et al.*, 1999). Sin embargo, MC4R exhibe actividad

constitutiva, es decir, muestra activación en ausencia de ligando por lo que además AGRP actúa como agonista inverso suprimiendo la actividad constitutiva del MC4R (Nijenhuis *et al.*, 2001)

1.5. Proteínas accesorias del receptor de melanocortinas tipo 2 (MRAP)

Mutaciones en el MC2R resultan en una rara condición denominada deficiencia familiar de glucocorticoides (FGD). De origen autosómico recesivo, esta enfermedad se caracteriza por una deficiencia de cortisol y altos niveles de ACTH en el plasma (Clark *et al.*, 1993; Tsigos *et al.*, 1993). Sin embargo, estudios clínicos muestran que aproximadamente solo el 25 % de los casos de FGD eran atribuibles a mutaciones de MC2R (FGD tipo 1) mientras que en el 75% restante, el receptor era completamente normal (FGD tipo 2) (Chan *et al.*, 2009). Experimentos *in vitro*, revelaron que el MC2R es incapaz de alcanzar la membrana plasmática cuando se expresa en líneas celulares distintas a las derivadas de un linaje suprarrenal, lo que sugiere la presencia de una proteína accesoria específica suprarrenal (Noon *et al.*, 2002). A través del mapeo de polimorfismo de único nucleótido (SNP) en familias con FGD tipo 2, se identificaron mutaciones en el gen que codifica una proteína transmembrana de adipocito murino (Xu *et al.*, 2002) como causante de FGD tipo 2 (Metherell *et al.*, 2005). La proteína originalmente fue llamada como proteína de bajo peso molecular específica del tejido adiposo (FALP). Posteriormente, este gen se denominó proteína accesoria del receptor de melanocortina-2 (MRAP) debido a su asociación con la función del MC2R.

Se ha demostrado que MRAP adopta una conformación única de homodímero antiparalelo en la superficie celular (Cooray *et al.*, 2008; Sebag y Hinkle, 2007). Las isoformas MRAP α y MRAP β están presentes junto con MC2R en tejido suprarrenal humano (Metherell *et al.*, 2005) donde la presencia de una u otra isoforma es esencial para la expresión y señalización de la superficie celular de MC2R (Roy *et al.*, 2007).

Tras el descubrimiento de MRAP, en el cromosoma 6 se identificó un gen con estructura comparable y alto grado de similitud, el que fue denominado como MRAP2 (Chan *et al.*, 2009; Metherell *et al.*, 2005). Se postula que adopta una topología dual similar a MRAP en la superficie celular (Chan *et al.*, 2009). El gen *mrp2* de ratón difiere en que tiene dos pequeños exones 1 y 1a no traducidos (Asai *et al.*, 2013). El pez cebra tiene un solo MRAP y dos formas de MRAP2, denominadas *mrp2a* y *mrp2b* (Aguilleiro *et al.*, 2010). MRAP2a y MRAP2b parecen tener diferentes acciones y aparecen en diferentes momentos del desarrollo del pez cebra (Sebag *et al.*, 2013). El estudio de la conservación entre MRAPs de lampreas, peces cartilagosos, teleósteos y tetrápodos ha indicado que MRAP2 es el gen ancestral (Dores, 2013; Webb and Clark, 2010).

Los MRAPs interactúan con los 5 receptores de melanocortinas. Se demostró que no tienen efecto sobre el tráfico de MC1R y MC3R, pero reducen la expresión en la superficie celular de MC4R y MC5R (Chan *et al.*, 2009; Sebag y Hinkle, 2010). Además tiene un efecto negativo sobre la dimerización de MC5R (Sebag y Hinkle, 2009). Contrariamente a su papel de mejorar la función de MC2R, MRAP tiene un papel inhibitor en la función de MC1R, MC3R, MC4R y MC5R en respuesta al análogo NDP-MSH (Chan *et al.*, 2009).

En tejidos humanos, se ha descubierto que la expresión de las MRAP está más extendida que la expresión del MC2R (Chan *et al.*, 2009; Metherell *et al.*, 2005). Tanto MRAP como MRAP2 están expresadas en la región hipotalámica del cerebro que expresa MC3R y MC4R (Gardiner *et al.*, 2002; Lein *et al.*, 2007) lo que sugiere que pueden regular la función de estos MCR en el sistema nervioso.

1.6. Reproducción en teleósteos

En todos los vertebrados la reproducción es controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG), el que integra la información de las señales sociales y ambientales con el estado nutricional y hormonal del organismo (Maruska y Fernald, 2011). Estas señales actúan sobre el cerebro (Fig.3) desencadenando la síntesis y liberación de una familia de

péptidos cerebrales, los neuropéptidos liberadores de gonadotrofinas (Gnrhs). Secretadas de manera pulsátil, las Gnrhs llegan por invasión directa desde las neuronas hipotalámicas hacia las células gonadotropas de la adenohipófisis. Una vez unidas a sus receptores (Gnrhrs), estimulan la síntesis y secreción de las gonadotrofinas: la hormona estimulante del folículo (Fsh) y la hormona luteinizante (Lh). Además, se han descrito otros factores cerebrales, neuropéptidos y neurotransmisores, que regulan la producción de las gonadotrofinas entre los que cabe destacar el GABA, dopamina, neuropéptido Y, péptidos opioides, leptina (Muñoz-Cueto, 2009) y más recientemente las kisspeptinas (Messenger *et al.*, 2005; Parhar *et al.*, 2004), la hormona inhibidora de las gonadotrofinas (Muñoz-Cueto *et al.*, 2017), neurokinina B (Biran *et al.*, 2012), secretoneurina (Mitchell *et al.*, 2020) y el péptido vasoactivo intestinal (Vip) (Tanaka *et al.*, 2022). Estudios inmunocitoquímicos han permitido la localización de las células gonadotropas en la hipófisis de numerosas especies de teleósteos, sobre todo en la *pars distalis proximal* (PDP) y en ocasiones, en el borde de la *pars intermedia* (PI). En la hipófisis de peces, a diferencia de los vertebrados superiores, hay ausencia de co-localización celular de Fsh y Lh y por tanto, ambas hormonas se producen en células gonadotropas distintas (Weltzien *et al.*, 2004). Tanto la Fsh como la Lh son secretadas al torrente sanguíneo y actúan sobre las gónadas, a través de receptores específicos, para inducir la gametogénesis y producir esteroides sexuales y factores de crecimiento, que a su vez actuarán sobre las gónadas directamente de forma paracrina o autocrina, o indirectamente a través de mecanismos de retroalimentación sobre el cerebro (Weltzien *et al.*, 2004).

Las gonadotropinas, Fsh y Lh, pertenecen a la familia de las glicoproteínas y se caracterizan por ser hormonas heterodiméricas. Estructuralmente, en una misma especie, comparten una subunidad alfa común unida de forma no covalente a una y difieren en la subunidad beta específica quien otorga la especificidad biológica de la hormona (Pierce y Parsons, 1981). Cada subunidad, alfa, Fsh beta y Lh beta esta codificada por un gen diferente (Fiddes y Talmadge, 1984) y difiere en su secuencia de aminoácidos y conservación filogenética. Solo el heterodímero intacto alpha/beta es capaz de unirse específicamente a su receptor localizado en la membrana plasmática de las células diana,

siendo las subunidades por si solas biológicamente inactivas (Pierce y Parsons, 1981). La expresión génica y los niveles de ambas gonadotrofinas en la hipófisis y en el plasma de los teleósteos varían a lo largo del ciclo reproductor e incluso entre machos y hembras (Swanson *et al.*, 2003; Yaron *et al.*, 2003; Yaron y Sivan, 2006). Los estudios realizados en aquellas especies de teleósteos en las que ha sido posible cuantificar los niveles de ambas gonadotrofinas en plasma, muestran que la Fsh está presente a lo largo de todo el ciclo, incrementando de forma notable durante la ovogénesis y espermatogénesis tempranas y durante la postovulación y postespermiogénesis, en hembras y machos, respectivamente. Por el contrario, los niveles de Lh en plasma son bajos o indetectables durante las primeras fases de desarrollo gonadal y muestran un pico durante la fase de maduración final y ovulación en las hembras y espermiogénesis y espermiación en los machos (Gomez *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 1991)

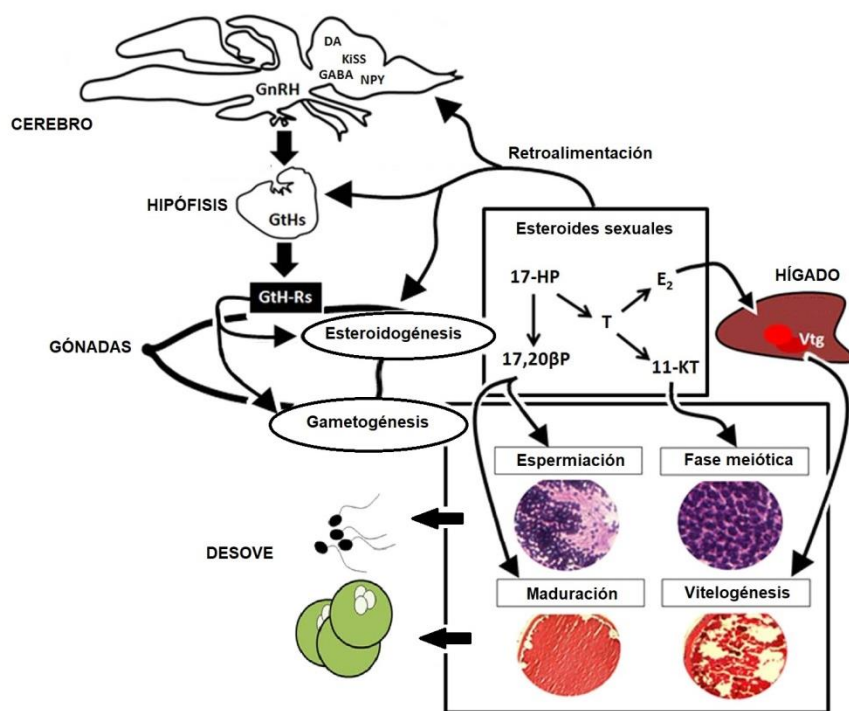


Figura 3. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Factores externos como internos, desencadenan en el cerebro una serie de eventos hormonales que regulan las funciones reproductivas. Adaptada de Miranda *et al.*, 2013

1.6.1. Síntesis de esteroides

En todos los vertebrados, los esteroides sexuales son el producto de secreción más importante de las gónadas y su concentración en el plasma, cambia drásticamente durante el proceso de maduración gonadal. Comprenden a los progestágenos, andrógenos y estrógenos, siendo estos dos últimos los más importantes para la diferenciación sexual (Piferrer, 2009). Los esteroides sexuales se sintetizan a partir de un precursor común, el colesterol, el que gracias a la proteína transportadora StAR es trasladado hacia el interior de la mitocondria de las células esteroidogénicas (Arukwe, 2008). La ruta sintética es soportada por numerosas enzimas, incluyendo diferentes tipos de citocromo P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas (Fig.4). La síntesis de los esteroides inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona por la enzima citocromo P450_{scc}/Cyp11A1 localizada en la membrana interna mitocondrial. Esta reacción es considerada como el paso limitante en el proceso biosintético y está controlada principalmente por la Lh. La pregnenolona puede ser convertida a progesterona por acción del complejo enzimático de la 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ 4-5 isomerasa (3 β -HSD) (Gomez-Chang *et al.*, 2012). La 17 α -hidroxilasa (P450_{c17}/Cyp17a1), cataliza la hidroxilación de la pregnenolona a 17 α -hidroxipregnenolona o de la progesterona a 17 α -hidroxiprogesterona, para luego convertirse en dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, respectivamente (Hinfray *et al.*, 2013). Sin embargo, la 17 α -hidroxiprogesterona, a través de la 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 β -HSD), puede seguir la ruta hacia la formación de 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α , 20 β -DHP) también conocido como esteroide inductor de la maduración (MIS)(Nagahama y Yamashita, 1989). La síntesis de andrógenos, principalmente 11 ketotestosterona (11-KT) y testosterona (T) se da por la acción de la Fsh. Existe una estrecha relación entre 17 β -estradiol (E2) y 11-KT, ya que ambos dependen de la bioconversión de la T. Por la vía de la 11 β -hidroxilasa/11 β hidroxisteroide deshidrogenasa se convierte en 11-KT, principal andrógeno en teleósteos (Schulz *et al.*, 2010) mientras que en hembras, la T por acción de la P450 aromatasa es transformada en E2 (Tokarz *et al.*, 2015).

Durante el desarrollo ovárico, una porción del epitelio germinal se invagina y atrapa una porción del celoma, generando el lumen del ovario. A esta cavidad interna, se liberan los oocitos tras ser ovulados, mientras que las oogonias permanecen en la pared interna (Saborido-Rey, 2008). Por lo tanto el ovario consiste en las oogonias, los oocitos y sus células foliculares circundantes, además del tejido conjuntivo, vascular y nervioso (Nagahama, 1983).

Desde un punto de vista funcional y morfológico, la unidad básica del ovario es el folículo ovárico, cuya organización es similar en la mayoría de los teleósteos. El oocito ubicado en el centro está rodeado por la envuelta vitelina, capa acelular que formará la zona radiata. A continuación, lo rodean una serie de células foliculares organizadas en varias capas, una capa interna homogénea de células de la granulosa y una o dos capas exteriores heterogéneas de células de la teca, encontrándose fibroblastos, fibras de colágeno y capilares. Ambas capas celulares están separadas por una membrana basal (Valdebenito *et al.*, 2011).

De acuerdo con el patrón de desarrollo de los oocitos, el ovario puede ser clasificado en 3 tipos (Wallace y Selman, 1981). El sincrónico donde todos los oocitos están en la misma etapa de desarrollo. Este tipo se encuentra en los teleósteos que se reproducen una sola vez y luego mueren. El sincrónico por grupos consta de al menos dos poblaciones de oocitos en diferentes etapas de desarrollo. El asincrónico contiene oocitos en todas las etapas de desarrollo. Este tipo ocurre en especies que desovan muchas veces durante una temporada de reproducción prolongada.

1.7.2. Oogénesis

Varios criterios han sido empleados para definir morfológicamente el proceso de oogénesis, como el tamaño, la cantidad y distribución de las inclusiones celulares, especialmente los gránulos de vitelo y la morfología de los cromosomas. En la mayoría de los teleósteos sigue un patrón similar (Fig.5), por lo que es posible distinguir 6 etapas consecutivas (Valdebenito *et al.*, 2011):

1. Oogonias: Una vez que las células germinales primordiales se transforman en oogonias, estas células proliferan y se distribuyen de una manera no uniforme, aisladas o formando cistos, con características celulares en función a la especie. Tras varias divisiones mitóticas, inician su primera división meiótica dando lugar a los oocitos primarios, que aislados y rodeados de sus correspondientes envolturas foliculares, forman el folículo ovárico (Zanuy *et al.*, 2009).

1. Fase de Cromatina nucleolar: comprende desde leptoteno a paquiteno de la primera profase meiótica. En esta etapa existe una redistribución de los cromosomas por todo el núcleo adoptando variadas figuras cromosomales, además de una redistribución de organelos citoplasmáticos. Durante esta etapa se desarrolla el cuerpo vitelino de Balbiani o núcleo vitelino, el que se compone por diversos organelos como retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi, mitocondrias, gránulos lipídicos y cuerpos multivesiculares (Wallace y Selman, 1980).

2. Fase Perinucleolar: El núcleo del oocito, desde ahora llamado vesícula germinal, aumenta de tamaño y aparecen múltiples nucléolos, hacia el nucleoplasma periférico. La meiosis está detenida en diploteno, pero el crecimiento oocitario y la diferenciación de la pared folicular continúa. Tanto la capa de células de la granulosa y de células de la teca se hacen distinguibles, mientras que el cuerpo de Balbiani está en posición yuxtannuclear (Takashima y Hibiya, 1995).

3. Alvéolos corticales: Se caracteriza por la aparición de alvéolos corticales alrededor de la vesícula germinal o como gotas lipídicas en el citoplasma. Estas estructuras contienen una sialoglicoproteína de alto peso molecular sintetizada endógenamente por el propio oocito durante la mitad y hacia el final del crecimiento previtelogénico (Wallace y Selman, 1990). A medida que el desarrollo progresa, los alvéolos aumentan en número y tamaño hasta formar varias filas en la periferia del citoplasma, contribuyendo al incremento de tamaño del oocito. Estas vesículas liberan su contenido en el espacio perivitelino dentro de las

membranas del huevo durante la fecundación. La aparición de estas estructuras significa que el oocito ha comenzado el proceso de maduración y el pez ha entrado en la fase adulta (Saborido-Rey, 2008). Además, otra característica de importancia es la aparición del corion y microvellosidades (Honji *et al.*, 2006; Takashima y Hibiya, 1995).

4. Vitelogénesis: Estructuralmente, los oocitos vitelogénicos están rodeados de dos capas de células principales: una exterior (la teca) y otra interior (la granulosa), que están separadas por una membrana basal (Saborido-Rey, 2008). Esta etapa inicia con una fase de crecimiento citoplasmático donde se produce un incremento de los organelos citoplasmáticos, como mitocondrias, cuerpos multivesiculares, retículo endoplasmático y los elementos del Golgi. Posteriormente el oocito aumenta de tamaño considerablemente con respecto a las demás fases, debido al cúmulo de grandes reservas de vitelogenina, (Valdebenito *et al.*, 2011). Varios trabajos han demostrado que todo el proceso de vitelogénesis está bajo el control de los esteroides gonadales. Bajo el control de la gonadotrofinas, mayoritariamente la Fsh, las células de la teca producen un sustrato andrógeno, probablemente la T, que se difunde en la capa vascular de células de la granulosa donde es aromatizado a E2. Una vez liberado al torrente sanguíneo, llega al hígado donde estimula la síntesis y secreción de la vitelogenina. Luego por vía sanguínea es transportada hasta el ovario y, vía receptores específicos de vitelogenina mediante micropinocitosis, es incorporada al oocito. Posteriormente, por proteólisis es transformada para formar los gránulos de vitelo, los que inicialmente son pequeños y se encuentran dispersos en el citoplasma. A medida que el oocito crece, los gránulos son de mayor tamaño y numerosos en el ooplasma, desplazando a los alveólos corticales hacia la periferia (Nagahama *et al.*, 1995).

5. Maduración: Es caracterizada por la migración de la vesícula germinal hacia el polo animal y la fusión de su membrana, además el vitelo se clarifica y el oocito aumenta de tamaño. El proceso de maduración es inducido por la Lh cuya acción lleva a la síntesis y secreción del esteroide inductor de la maduración (MIS). La unión del MIS a su receptor

activa al factor promotor de la maduración (MPF) en el citoplasma del oocito, responsable de la reactivación de la meiosis (Nagahama *et al.*, 1995).

Después de haber finalizado la primera división meiótica, una de las células haploides se quedará con la totalidad del material citoplasmático, mientras que la otra denominado primer cuerpo polar, degenerará. Nuevamente la meiosis se detiene, ahora en la metafase II. La finalización de la segunda división meiótica y la liberación del segundo cuerpo polar, procederá solo si el oocito es fecundado (Yaron y Sivan, 2011).

En algunas especies de teleósteos, se produce un marcado aumento del volumen oocitario debido a procesos de hidratación del oocito. Este aumento es muy marcado en especies de peces marinos y de estuario que producen huevos flotantes. Al final de la maduración se produce la ovulación, proceso que se relaciona con la ruptura del folículo que contiene el oocito y su liberación a la cavidad peritoneal o al lumen del ovario. Los folículos postovulatorios que resultan de este proceso se identifican fácilmente cuando son recientes, pero se deterioran rápidamente dentro de algunos días (Valdebenito *et al.*, 2011).

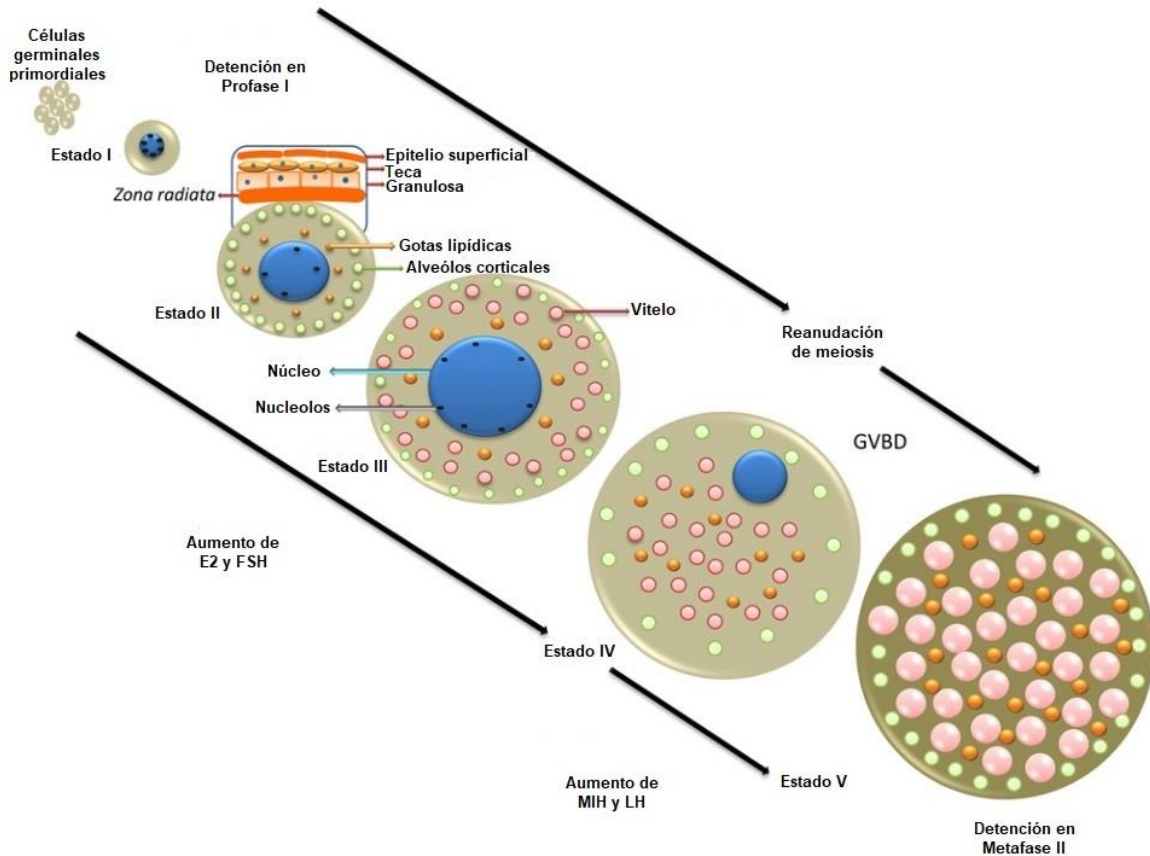


Figura 5. Esquema general de la ovogénesis en peces teleósteos Adaptada de Urbatzka *et al.*, 2011

1.8. Reproducción en machos

1.8.1. Estructura del testículo

En la mayoría de los teleósteos, los testículos son un par de órganos alargados y están unidos a la pared dorsal de la cavidad corporal, aunque en algunas especies pueden combinarse en un solo saco. El espermiducto sale de la superficie medio dorsal posterior de cada testículo y desemboca en la papila urogenital, situada entre el recto y los ductos urinarios (Zanuy *et al.*, 2009).

Como ocurre en otros vertebrados, los testículos están constituidos por dos compartimentos, el lobular y el intersticial, ambos separados por una membrana basal. El primero contiene las células germinales y las células somáticas asociadas a ellas, las células de Sertoli, constituyendo un espermatocisto. Entre las funciones de las células de Sertoli se incluyen, proporcionar soporte para la supervivencia, proliferación, diferenciación y desarrollo fisiológico de las células germinales. Además, se encargan de la fagocitosis de células germinales apoptóticas y de cuerpos residuales durante la espermiogénesis. El compartimento intersticial, situado entre lóbulos, está compuesto por las células de Leydig, fibroblastos, fibras de colágeno, células mioideas, macrófagos, vasos sanguíneos y linfáticos (Schulz *et al.*, 2010).

De acuerdo al modo de diferenciación del tejido germinal, es posible distinguir dos patrones de estructura testicular: lobular y tubular (Billard, 1986). El testículo lobular es el que presentan la mayoría de los teleósteos y está formado por lóbulos ramificados. Las células germinales están dispersas a lo largo del lóbulo y a medida que avanza la espermatogénesis, los espermatozoides son liberados a un lumen central. El testículo tubular es poco común y se caracteriza por no presentar lumen. Las espermatogonias primarias se localizan al final ciego de los túbulos, los que se orientan desde la periferia hacia una cavidad central en la que se liberan los espermatozoides.

1.8.2. Espermatogénesis

Es un proceso altamente organizado y coordinado, en el que espermatogonias diploides proliferan y se diferencian en espermatozoides maduros y funcionales. En ambos tipos de testículos, el desarrollo de células germinales tiene lugar dentro del espermatocisto (o cisto) lo que implica que todas las células germinales en ello contenidas derivan de una sola espermatogonia primaria. Esta, al dividirse sincrónicamente, constituye un clon de células germinales isogénicas bordeadas por extensiones citoplasmáticas de las células de Sertoli que les acompañaran durante todo el proceso de

espermatogénesis (Nagahama, 1983). Morfológicamente y fisiológicamente, la espermatogénesis (Fig.6) se puede dividir en 3 fases diferentes (Nóbrega *et al.*, 2009).

1. Proliferación mitótica: fase en que las células madre espermatogoniales experimentan una proliferación mitótica, para dar origen a nuevas células germinales (autorrenovación) y espermatogonias de tipo A (SgA), las que a su vez entran en una serie de divisiones celulares para renovar y aumentar su número, además de dar lugar a las Sg de tipo B, (SgB).

Según la especie de teleosteo, las espermatogonias sufren un número específico de ciclos celulares mitóticos. La fase de mitosis está caracterizada por una lenta renovación y una rápida proliferación de espermatogonias diferenciadas hacia la meiosis y está regulada por la Fsh que, actuando a nivel de las células somáticas (células de Sertoli y Leydig), estimula la producción de andrógenos, factores de crecimiento y otros factores con acción paracrina/ autocrina (Safian *et al.*, 2019).

2. Meiosis: La última generación de SgB, emerge del final de la mitosis y entra en meiosis pasando a formar un espermatocito primario (Spc I) en etapa de preleptonema. En la primera división se separan los cromosomas homólogos y se producen los espermatocitos secundarios haploides de vida corta (Spc II), que rápidamente avanzan a través de la segunda división meiótica dando lugar a las espermátidas (Spd) (Schulz y Miura, 2002). Los progestágenos y andrógenos son indispensable para el inicio de la meiosis y ejercen sus efectos sobre las células germinales de forma paracrina o autocrina (Yaron y Sivan, 2011).

3. Espermiogénesis: Proceso en que las Spd comienzan a diferenciarse en espermatozoides (Spz). Una vez liberadas las Spd desde los espermatocitos hacia el lumen, el citoplasma y el núcleo se reorganizan, formando una cabeza, un cuello y un flagelo o cola. La espermiación implica una maduración o capacitación del esperma, acompañado de una producción de fluido o hidratación del conducto eferente. Esta fase se regula en gran medida por la Lh, la que estimula la producción de esteroides tales como 11-KT y progestágenos, induciendo la espermiación (Schulz *et al.*, 2010).

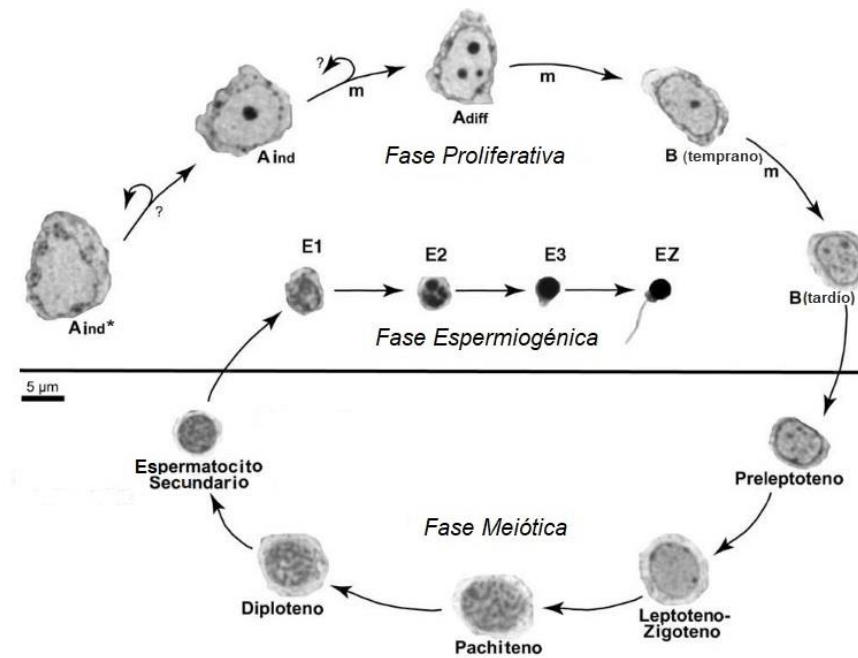


Figure 6. Representación secuencial de la espermatogénesis en el pez cebra Adaptada de Schulz *et al.*, 2009

1.9. Melanocortinas y Reproducción

Diversos estudios en vertebrados sugieren la implicación del sistema de melanocortinas en la modulación del eje HHG. Tratamientos con α -MSH estimulan la liberación de LH en humanos (Limone *et al.*, 1997; Limone *et al.*, 1994) e inducen la ovulación en ratas pretratadas con progesterona (Alde y Celis, 1980). A nivel cerebral, actúan como un neuromodulador fisiológico de la liberación de prolactina (PRL) y LH (Khorram *et al.*, 1984a). Experimentos *in vitro* han demostrado que γ -MSH estimula la secreción de GnRH en células clonales hipotalámicas de ratón (Stanley *et al.*, 2003).

Evidencia anatómica señala que neuronas POMC proyectan desde el núcleo arqueado hacia el área preóptica medial (Leranth *et al.*, 1988) donde establecen sinapsis directa con

neuronas GnRH (Naftolin *et al.*, 1996). Se ha demostrado que α -MSH, a través de MC3R y MC4R, produce una despolarización de larga duración en neuronas GnRH (Roa y Herbison, 2012). Un estudio en ratones, encontró que aproximadamente el 50% de las neuronas GnRH expresan transcritos de MC4R y que la activación de las neuronas GnRH peripuberales es abolida por AGRP (Israel *et al.*, 2012). En explantes hipotalámicos, AGRP bloquea la secreción de GnRH estimulada por γ -MSH (Stanley *et al.*, 2003). En el mono *rhesus*, la administración central de AGRP inhibe la liberación pulsátil de LH, lo que sugiere que AGRP puede mediar el efecto de un balance energético negativo sobre el eje reproductivo al suprimir los pulsos GnRH (Vulliémoz *et al.*, 2005). En ratas hembra, AGRP previene la liberación de LH y PRL inducida por esteroides (Schioth *et al.*, 2001), mientras que en ratas macho aumenta los niveles plasmáticos de LH, FSH y testosterona (Stanley *et al.*, 1999). La expresión ectópica ubicua del gen *agouti* en ratones *agouti* amarillos (Ay), resulta en una reducción de la fertilidad en ratones Ay obesos de edad avanzada (Granholm *et al.*, 1986).

De todos los receptores, el MC4R es, quizás, el mejor candidato para explicar la modulación melanocortinérgica de la función sexual. En ratas, MC4R media los efectos de la leptina en la secreción de LH y PRL (Watanobe *et al.*, 1999) y el pico preovulatorio de PRL (Watanobe *et al.*, 2001). La deficiencia de MC4R provoca hiperfagia, obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia, ciclos estrales irregulares, secreción reducida de LH y disfunción ovárica (Chen *et al.*, 2017). Los ratones hembra deficientes en MC4R (MC4R KO) muestran envejecimiento reproductivo con un mayor número de folículos quísticos y una reducción en el número de cuerpos lúteos desarrollados (Sandrock *et al.*, 2009), mientras que los machos MC4R KO se caracterizan por disfunción eréctil y cambios en el comportamiento sexual (Van der Ploeg *et al.*, 2002).

Notablemente en teleósteos, el *mc4r* se expresa en gónadas de diversas especies como el pez dorado (Cerdá-Reverter *et al.*, 2003), pez Ya (Wei *et al.*, 2013b), guramí de piel de serpiente (Jangprai *et al.*, 2011), lubina (Sánchez *et al.*, 2009), platy (Volf *et al.*, 2013), scat moteado (Li *et al.*, 2016b), anguila de pantano (Yi *et al.*, 2018), tilapia del Nilo (Liu *et al.*, 2020b), medaka (Liu *et al.*, 2019a), carpa plateada (Tao *et al.*, 2020), lenguado

barfin (Kobayashi *et al.*, 2008), pez roca negro (Zhang *et al.*, 2020) y el pez cebra (Agulleiro *et al.*, 2013a; Ringholm *et al.*, 2002). En el tejido ovárico, la expresión relativa de *mc4r* aumenta proporcionalmente con el desarrollo gonadal, sugiriendo un posible rol en la maduración de los folículos (Zhang *et al.*, 2020). Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* en *Scatophagus argus*, han demostrado que la activación de *Mc4r* en el hipotálamo aumenta la expresión de *gnrh*, modulando la síntesis de *fshb* y *lhb* en la hipófisis (Jiang *et al.*, 2017).

Los peces del género *Xiphophorus* muestran polimorfismos en el inicio de la pubertad, la longitud del cuerpo y las tácticas de reproducción (Kallman y Borkoski, 1978). Se ha demostrado que la primera maduración sexual, la fecundidad en hembras y el tamaño corporal en machos de *X. maculatus* está controlada genéticamente por el locus *P* (Kallman y Schreibman, 1973). Situado en el cromosoma sexual, este *locus* es ocupado por múltiples copias tanto funcionales (alelo A) como no funcionales (alelos B1 y B2) del *mc4r*. La presencia de mayor número de alelos B está directamente relacionada con el retraso en la pubertad, presumiblemente al disminuir la señalización de los alelos. Los machos dejan substancialmente de crecer en el momento que alcanzan la madurez sexual, la talla en la edad adulta, refleja a su vez, el momento en el que ocurrió la pubertad. Machos portadores de alelos funcionales son más pequeños y precoces, mientras que portadores con un mayor número de alelos no funcionales exhiben una mayor talla y pubertad tardía (Lampert *et al.*, 2010).

1.10. El pez cebra como organismo modelo

El pez cebra (*Dario rerio*) miembro de la familia Cyprinidae, es nativo de la India donde vive en ríos, arroyos y en pequeños lagos resultantes de las inundaciones de los ríos (Engeszer *et al.*, 2007). Múltiples características han contribuido a su popularidad como especie modelo de estudio entre las que destacan la completa secuenciación de su genoma, las condiciones de manejo simples, descendencia numerosa y su pequeño tamaño (4-5 cm de longitud). Además, la transparencia de los embriones permite hacer

seguimiento directo del desarrollo embrionario con técnicas de microscopía convencional (Grunwald y Eisen, 2002; Lieschke y Currie, 2007).

Esta especie tiene una vida de alrededor de tres años. Son organismos ovíparos con fertilización externa y sin cuidado parental. La reproducción puede ser inducida de forma natural o artificial durante todo el año en condiciones de laboratorio, alcanzando la madurez reproductiva los 3 meses de vida. Son reproductores asincrónicos con alta fecundidad. Una hembra puede producir entre 100 y 200 huevos semanalmente (McGonnell y Fowkes, 2006; Nasiadka y Clark, 2012).

Como vertebrado comparte características comunes con los mamíferos, incluso con humanos. En la actualidad, el pez cebra se utiliza en una amplia variedad de investigaciones, aportando un valor sustancial a la acuicultura sostenible y a la biología de la conservación (Li y Ge, 2020). Investigaciones en el pez cebra han demostrado que la supresión de la actividad central del Mc4r, es esencial para el crecimiento larvario. Así mismo, la supresión del Mc4r resulta en una disminución de la expresión de *fshb* y *lhb*. Además, tanto las neuronas POMC como las AGRP proyectan a la hipófisis del pez cebra apoyando un rol hipofisiotrófico para el sistema de melanocortinas (Zhang *et al.*, 2012).

Experimentos desarrollados en nuestro laboratorio, han demostrado que *Asip1* funciona como un antagonista endógeno tanto de MC1R como de MC4R (Cerdá-Reverter *et al.*, 2005; Guillot *et al.*, 2016). Además, la generación de una cepa transgénica de pez cebra que sobre-expresa *asip1* de pez dorado, demostró la participación del sistema de melanocortinas en la regulación del patrón pigmentario dorsoventral (Ceinos *et al.*, 2015) y estimulación del crecimiento (Guillot *et al.*, 2016).

2. Objetivos

Basados en los antecedentes existentes, es posible hipotetizar una relación entre el sistema de melanocortinas, el crecimiento y la reproducción de los peces. El modelo transgénico supone, además, una excelente oportunidad para estudiar la implicación del sistema de melanocortinas en la reproducción y por extensión la presencia/identidad del locus *P* en otras especies de peces. Para ello se desarrollaron los siguientes objetivos:

1. Analizar el rol del sistema de melanocortinas en el crecimiento y la pubertad.
2. Analizar el efecto de la disminución de la actividad del sistema de melanocortinas inducida por la sobreexpresión de *asip1* sobre el potencial reproductivo.
3. Caracterizar la expresión del sistema de melanocortinas y su efecto sobre la esteroidogénesis gonadal.
4. Estudiar el efecto del sistema de melanocortinas en la expresión de gonadotrofinas hipofisiarias.

3. Materiales y Métodos

3.1. Manejo de animales de experimentación

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la legislación española (Real Decreto 53/2013) y europea (EU 86/609) relativa a la protección de animales utilizados en experimentación. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el comité interno del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el comité de ética del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Número de Registro 09-0201)

Los peces cebra (*Danio rerio*) utilizados en esta tesis doctoral fueron seleccionados de manera aleatoria a partir de poblaciones criadas en nuestro laboratorio. Tanto los peces silvestres WT (+/+) como los transgénicos provienen de la cepa TU (Tuebingen, Nüsslein-Volhard Lab). La línea transgénica [*Tg(Xla.Eef1a1:Cau.Asip1)]im4 (asip1-Tg)* fue generada mediante el sistema de transposón Tol2 (Ceinos *et al.*, 2015). Para la obtención de peces *asip1/asip1*, se realizaron cruces entre ejemplares heterocigotos *asip1/+*. La descendencia fue genopitada (Guillot *et al.*, 2016) para así generar poblaciones *asip1/asip1* y WT con el mismo acervo genético. Los peces fueron mantenidos en un sistema de recirculación de agua dulce, la que de forma constante, pasó a través de filtros mecánicos y biológicos. Los parámetros fisicoquímicos como temperatura (28 ± 2 °C), pH (7-8) y conductividad (300-500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) fueron controlados diariamente y corregidos cuando fuese necesario. El fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad se controló mediante un temporizador. Los peces se alimentaron 3 veces al día a saciedad con una combinación de nauplios de artemia (*Artemia* sp.) recién eclosionadas y alimento inerte en escamas Sera Vipan (Sera, Heinsberg, Alemania).

Para la obtención de embriones, solo se utilizaron peces adultos y saludables de ambas poblaciones. Antes del apareamiento, los peces progenitores fueron colocados individualmente en tanques de 2 L durante 1 semana. Una vez transcurrido el período de aclimatación, las parejas fueron colocadas en parideras de 1 L, que disponen de una pieza que permite separar el macho de la hembra grávida. Las parideras fueron mantenidas en oscuridad hasta el día siguiente. El pez cebrado desova en las primeras horas después del

amanecer (Hisaoaka y Firlit, 1962). Una vez retirada la división, el desove tuvo lugar después de las 7.30 de la mañana, cuando las luces fueron encendidas. Tras 1-2 horas, se recogieron los embriones y fueron puestos en incubadores a 28 °C hasta su eclosión. A los 5 días post fertilización (dpf) fueron introducidos en el sistema de recirculación en acuarios de 6 L, pero con el circuito de agua cerrado, que fue reestablecido a los 12 dpf. Durante este período los peces fueron alimentados con rotíferos y a partir de los 13 dpf, comenzaron a alimentarse con nauplios de artemia recién eclosionadas. A los 20 dpf la dieta fue reemplazada gradualmente por dieta comercial (Sera Vipar) para peces tropicales.

3.2. Rol del sistema de melanocortinas en el crecimiento y pubertad

3.2.1. Diseño experimental

600 embriones de peces WT y *asip1*-Tg procedentes de la misma época de puesta, fueron criados en tanques de 15 litros, bajo las condiciones descritas anteriormente. A los 20 dpf, los peces de cada genotipo se transfirieron a 2 tanques de 45 litros (n = 150 / tanque). Para incrementar la validez y solidez del estudio, se realizaron experimentos idénticos e independientes. Durante el primer y segundo experimento, los peces (n=30) se seleccionaron aleatoriamente desde ambos tanques y se muestrearon a 30-32-35-40-46-54-60-75 dpf y a 30-34-38-42-46-60-75 dpf, respectivamente. Los peces fueron seleccionados aleatoriamente desde los dos tanques.

3.2.2. Estudio del crecimiento lineal

Las larvas se sacrificaron por sobredosis de anestésico con metasulfonato de triclaína (MS222, 200-300 mg/l). Posteriormente, se fotografiaron mediante un microscopio estereoscópico (Olympus SZX16) con el fin de medir su longitud estándar con el software ImageJ® version 1.52.

3.2.3. Análisis del desarrollo gonadal

Las larvas se fijaron en glutaraldehído al 1%, deshidratadas e incluyeron en resina de metacrilato (Technovit 7100, Heraeus Klzer, Alemania). Cortes de 2 μm de espesor se tiñeron con azul de toluidina al 1%. La clasificación de las gónadas en testículos u ovarios, se realizó según (Maack y Segner, 2003), de acuerdo a la presencia de células espermatogénicas u oocitos. Las gónadas con ambos tipos celulares se clasificaron como ovario en transición, mientras que las gónadas sin distinción de células germinales se clasificaron como indiferenciadas. Las etapas de maduración se categorizaron utilizando un sistema de atribución numérica basado en la presencia de la célula germinal en etapa más avanzada (Fig.7). La identificación de las células germinales en diferentes etapas de la gametogénesis se realizó de acuerdo a (Leal *et al.*, 2009; Selman *et al.*, 1993). El desarrollo ovárico se clasificó en 6 estadios (Fig.8) en función de su tamaño y estado vitelogénico (Wang y Ge, 2004): I, crecimiento primario ($\sim 0,1$ mm); II, previtelogénico ($\sim 0,25$ mm); III, vitelogénico temprano ($\sim 0,35$ mm); IV, vitelogénico medio ($\sim 0,45$ mm); V, vitelogénico tardío ($\sim 0,55$ mm) y VI, máximo desarrollo ($\sim 0,65$ mm). El desarrollo testicular se ajustó a 4 estadios (Fig.9) basado en (Begtashi *et al.*, 2004): estado 1, inmaduro (espermatogonias tipo A); estado 2, maduración temprana (espermatogonias tipo B); estado 3, maduración media (espermatogonias a espermatocitos) y estado 4, maduración tardía (espermatocitos, espermatidas y espermatozoides).

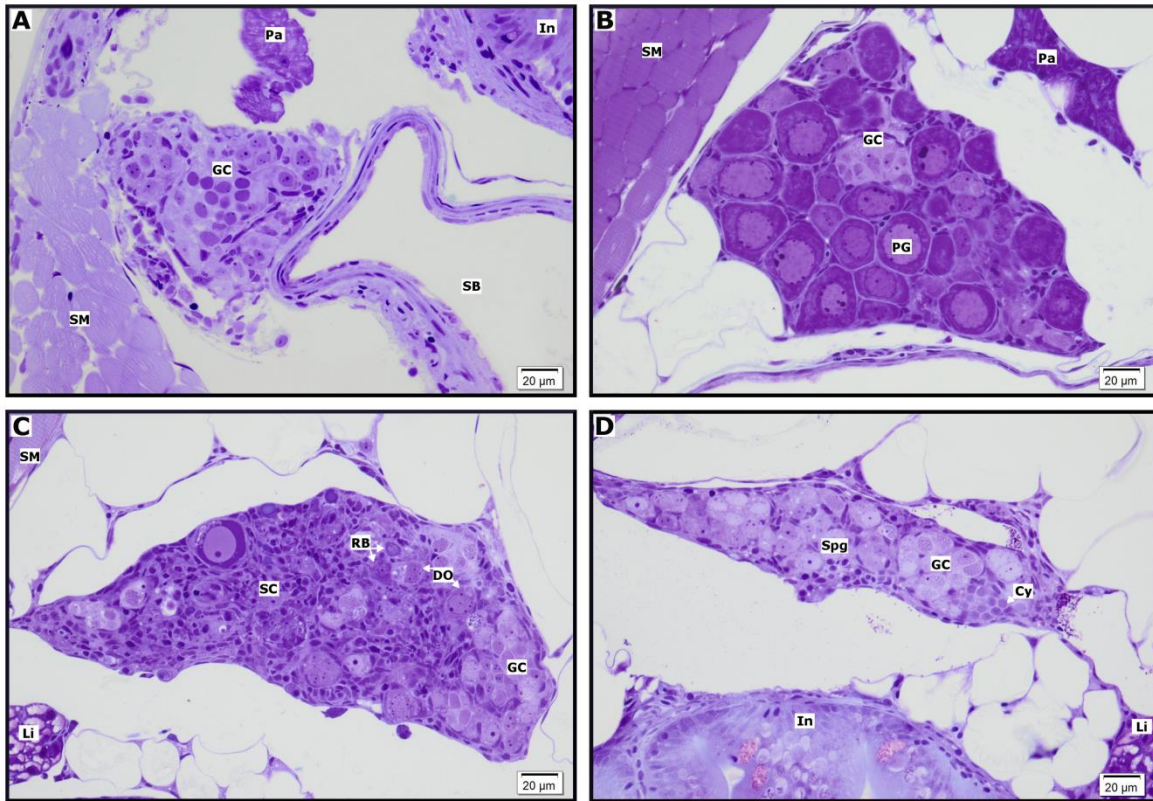


Figura 7. Tipos morfológicos de gónadas del pez zabra. A) Las gónadas indiferenciadas se caracterizan por la presencia de células germinales (GC). B) Los ovarios que contienen oocitos densamente empaquetados en la etapa de crecimiento primario (PG). C) Los ovarios en transición contienen unos pocos oocitos degenerativos (DO) que pueden convertirse en estructuras similares a cuerpos residuales (RB). Las células del estroma (SC) representan la mayoría de las gónadas. D) Los testículos están ocupados por diferentes tipos de espermatogonias (Spg) donde las células goniales se distribuyen en cistos (Cy). SM: músculo esquelético; In: Intestino; PA: páncreas; SB: vejiga natatoria; Li: Hígado.

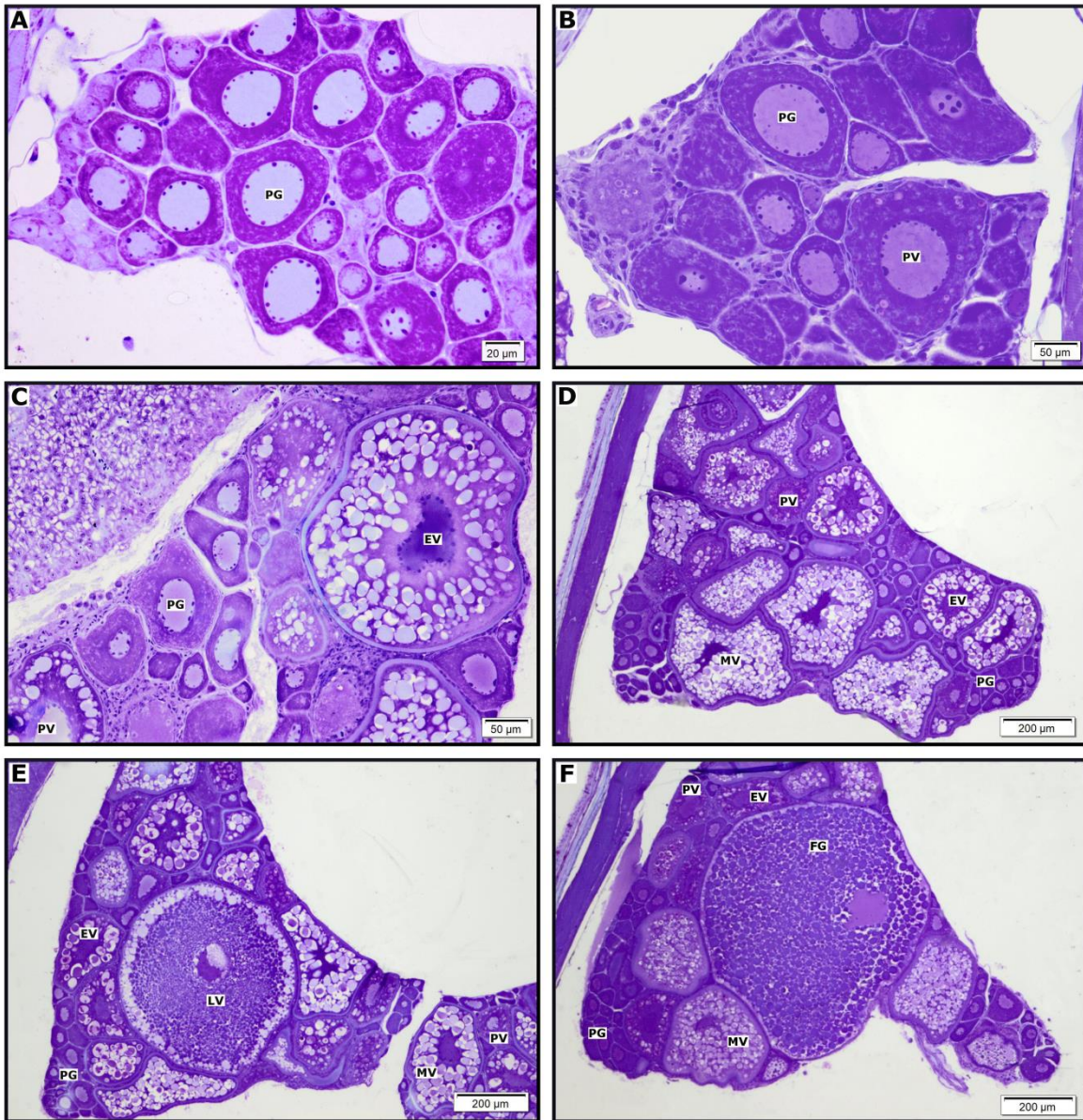


Figura 8. Ovarios de pez cebra en diferentes estados de desarrollo. A) I: crecimiento primario (PG). B) II: previtelogénico (PV). C) III: vitelogénico temprano (EV). D) IV: vitelogénico medio (MV). E) V: vitelogénico tardío (LV) y F) VI: máximo desarrollo (FG).

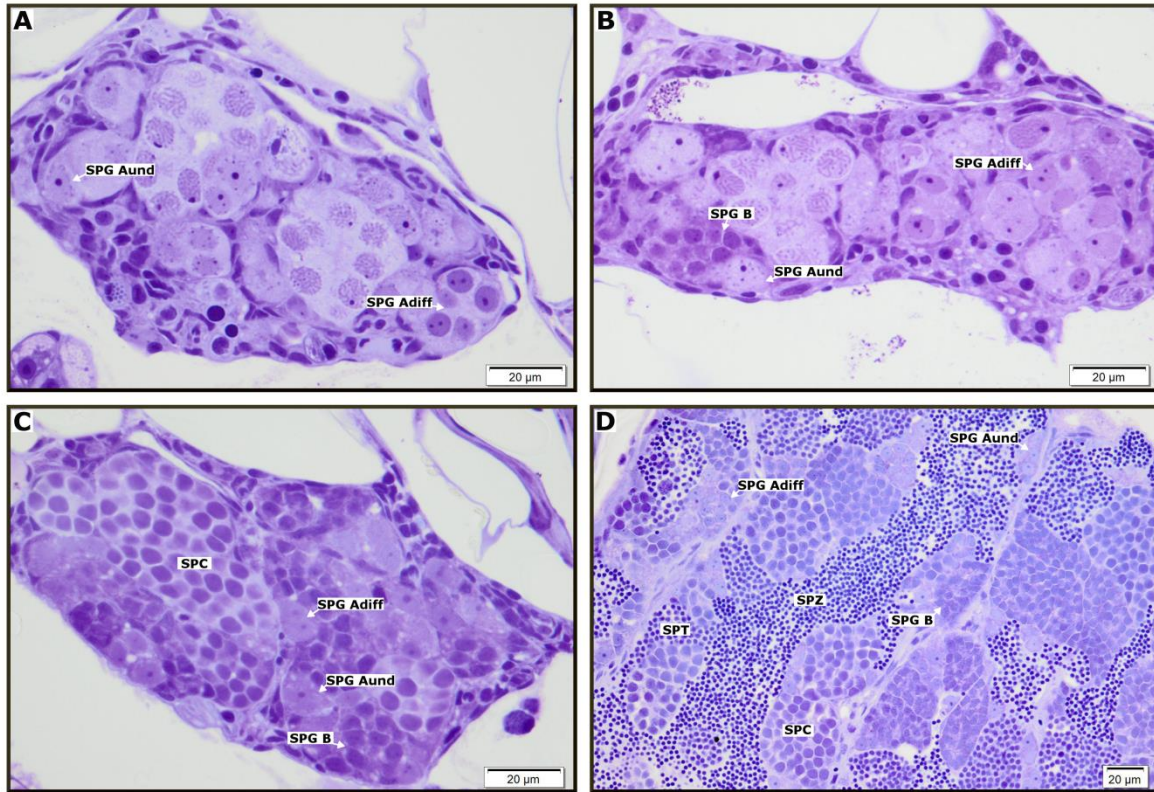


Figura 9: Testículos de pez cebra en diferentes estados de desarrollo. A) 1: inmaduro). B) 2: maduración temprana. C) 3: maduración media y D) 4: maduración tardía. SPG Aund: espermatogonia indiferenciada tipo A; SPG Adiff: espermatogonia diferenciada tipo A; SPG B: espermatogonia tipo B; SPC: espermatocistos; SPT: espermátidas; SPZ: espermatozoa.

3.2.4. Curvas de madurez

Según el criterio histológico de (Vazzoler, 1996), se estableció una escala de madurez de 3 estadios: A, inmaduro; B, madurando y C, desove. Se consideró como peces que inician su madurez, a los individuos en estado B y C, donde las hembras se caracterizan por la presencia de folículos en estado previtelogénico (aparición de alvéolos corticales) y los machos por la presencia de espermatogonias tipo B en el cisto. Los peces fueron agrupados por edad (dpf) y por intervalos de 2.5 mm de longitud. La fracción de peces maduros por edad, talla y sexo se estimó a través de la ecuación logística descrita por (O'Brien *et al.*, 1993):

$$P = \frac{1}{1 + e^{-(a+bX)}}$$

donde P corresponde a la proporción de peces en maduración, X es la longitud o edad y a y b son los coeficientes estimados de la ecuación. Los parámetros fueron estimados por un análisis de regresión lineal. La edad (A_{50}) y talla (L_{50}) en el que 50% de los machos y hembras están en pubertad, se estimó como la ratio (a/b).

3.2.5. Análisis estadístico

Las diferencias en la talla entre los peces WT y *asip1*-Tg se analizaron mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov. Para comparar diferencias en la tallas entre días, para cada cepa se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para comparar las proporciones de desarrollo gonadal. Para cuantificar la asociación entre la longitud y desarrollo gonadal, se utilizó el coeficiente de correlación no paramétrico rho de Spearman. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con Graphpad Prism versión 8.3. con un nivel de significación $p < 0.05$.

3.3. Rol del sistema de melanocortinas en el potencial reproductivo

3.3.1. Diseño experimental

Peces adultos WT y *asip1-Tg*, de aproximadamente de 1 año de edad, se sexaron de acuerdo a su color y forma. Un total de 35 parejas fueron ensayadas durante 7 eventos de desove (5 parejas por evento). Se registró el número de parejas desovantes y el total de huevos por cada hembra. Los huevos fertilizados fueron reconocidos por la presencia de un blastodisco multicelular (Kimmel *et al.*, 1995), los que posteriormente fueron recolectados e incubados a 28 C. Se registró la mortalidad a las 24 hpf y el número de embriones eclosionados a las 48 y 72 hpf. Durante 3 eventos de desove, 50 huevos fueron fotografiados en la etapa de gastrulación. El tamaño del huevo y el diámetro del vitelo se midieron con el software ImageJ versión 1.52. Además, al menos 30 larvas de 4 dpf fueron fotografiadas individualmente para comparar la longitud estándar de eclosión y el volumen del saco vitelino, el que se estimó usando la siguiente fórmula (Chambers *et al.*, 1989):

$$V = \pi(6LH^2)^{-1}$$

Donde *L* representa la longitud (medida horizontalmente; mm) y *H* la altura (medida verticalmente; mm) del saco vitelino.

3.3.2. Análisis estadístico

Las diferencias en el éxito de desove entre los peces WT y *asip1-Tg* se analizaron con el test exacto de Fisher, mientras que las diferencias entre el número total de huevos, el número de huevos fertilizados, la mortalidad (24 hpf) y la tasa de eclosión (48 y 72 hpf) fueron analizados con el test t no pareado con la corrección de Welch. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con Graphpad Prism versión 8.3. con un nivel de significación de 0.05.

3.4. Rol de las melanocortinas en la esteroidogénesis gonadal

3.4.1. Expresión del sistema de melanocortinas en tejido gonadal

3.4.1.1. Aislamiento de tejido gonadal y folículos ováricos

Peces adultos WT y *asip1-Tg*, de aproximadamente de 1 año de edad, se sexaron en función de su color y forma. Cuatro peces de cada sexo y grupo se sacrificaron por exposición progresiva a bajas temperaturas. Las gónadas fueron diseccionadas e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido para su procesado.

Para el aislamiento de folículos, se seleccionaron hembras grávidas en base a la presencia de la papila genital y el aumento volumétrico de su zona abdominal. Cuatro hembras WT y *asip1-Tg* se sacrificaron por sobredosis de anestesia en agua fría. Los folículos fueron separados manualmente bajo un microscopio de disección Olympus SZX16, y medidos con un ocular micrométrico. Solamente los folículos sanos se aislaron y clasificaron de acuerdo a su tamaño y estado vitelogénico (Wang y Ge, 2004) en: crecimiento primario (PG, ~0.15 mm), previtelogénesis (PV, ~0.25 mm), vitelogénesis temprana (EV, ~0.35 mm), vitelogénesis media (MV, ~0.45 mm), vitelogénesis tardía (LV, ~0.55 mm) y máximo desarrollo (FG, ~0.65 mm).

3.4.1.2. Purificación de ARN total y transcripción inversa

El RNA total de testículos y ovarios así como de folículos ováricos, se extrajo usando TRI-Reagent® (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total fue tratado con RQ1-DNase (Promega Corp., Madison, WI, Estados Unidos), secado parcialmente al aire y resuspendido en H₂O tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC). Posteriormente, la cantidad de ácidos nucleicos se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-2000 Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

La transcripción inversa se realizó a partir del RNA total (1 µg para gónadas y 300 ng para folículos), y se primó utilizando 300 ng de una mezcla de hexámeros aleatoria (Invitrogen), 2.5 mM de dNTPs (Invitrogen), 200 unidades de transcriptasa reversa (SuperScript™ III, Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA, USA) y 40 unidades de inhibidor

recombinante de ribonucleasas (RNAsin, Promega). La reacción, con un volumen final de 20 µl, se incubó a 25°C durante 10 min y se colocó sobre hielo durante 1 min, para ser incubada posteriormente durante seguida de 60 min a 50°C e inactivada a 70°C durante 15 min. La calidad del ADN complementario (cDNA) fue evaluada a través de la amplificación del gen *18s* (ver secuencia de cebadores en Tabla 1) mediante PCR convencional en un Termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf). Para la reacción se utilizó 0.5 ul de cDNA, tampón para PCR 1x, 2.5 mM de dNTP (mezcla de nucleótidos), 1.5 de mM MgCl₂, 0.4 uM de cada cebador y media unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Finalmente, el cDNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

3.4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Para la cuantificación de la expresión del *mc2r*, *mc4r*, *mrp1*, *mrp2a* y *mrp2b* en ovario y testículo y la expresión de *mc4r* en folículos, se llevaron a cabo reacciones en un volumen final de 20 µl donde 1 µl de cDNA fue agregado a 10 µl de TaqMan PCR Master Mix 2X (ABgene, Thermo Scientific) con sondas TaqMan y cebadores específicos (Tabla 1). Las amplificaciones fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Para el *mc1r*, *mc3r*, *mc5ra*, *mc5rb*, *pomca*, *pomcb*, *asip*, *agrp1* y *agrp2*, 1 µl de cDNA fue agregado a 7.5 µl de SYBR® Green PCR Master Mix 2X (ABgene, Thermo Scientific) con cebadores específicos (Tabla 1) en un volumen final de reacción de 15 µl. Las amplificaciones se realizaron siguiendo el protocolo: 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 15 seg a la temperatura de hibridación específica, 15 seg a 72°C y 1 min a 95°C. Para confirmar la especificidad de los productos de PCR, se finalizó con una curva de disociación desde 55°C a 95.5°C, aumentando 0.5°C cada 10 seg. Como control interno, se amplificó un fragmento de RNA ribosomal 18S (*18s*), donde 1µl de cDNA (dilución 1/10.000 para ovarios y testículos; dilución 1/1.000 para folículos) y cebadores específicos fueron agregados a 7.5µl de SYBR® Green PCR Master Mix 2X. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado en el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad Laboratories USA). Los datos fueron recopilados y analizados con iCycler iQ™ software

(version 3.0.6070). La expresión génica relativa se calculó con el método matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

3.4.1.4. Análisis estadístico

Los niveles de expresión génica se expresaron como media \pm SE (error estándar). Para evaluar diferencias entre los peces WT y *asip1*-Tg, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido de la prueba post-hoc Sidak. El análisis estadístico fue realizado con GraphPad Prism versión 9.1.1, con un nivel de significación de 0.05.

Tabla 1. Cebadores y sondas utilizados en estudios de expresión génica por qPCR. F: cebador directo (forward primer), R: cebador reverso (reverse primer) y P: sonda de hidrólisis TaqMan (Taqman probe).

Gen	Referencia	Secuencia (5' → 3')	T° de hibridación	[] Cebador
<i>mc1r</i>	Cortés <i>et al.</i> , 2014	F:TCCCACAAACCCTTACTGCAAG	57	250 nM
		R:TACTACTGCAAAGCACCACGAAC		
<i>mc2r</i>	Agulleiro <i>et al.</i> , 2013	F:CCTGTTAGCACGCCATCATG	60	300 nM
		R:AGGCCGCTTTTCCTGTGTT		
		P:[6FAM]AAACCGAATCGCGTCTATGCCTGGT[TAM]		
<i>mc3r</i>	Present work	F:TGTGATTGACCCGCTCATCTATG	65	200 nM
		R:TCTTCCCACATCCATTCTCAGTTC		
<i>mc4r</i>	Agulleiro <i>et al.</i> , 2013	F:GCCTCGCTCTACGTCCACAT	60	300 nM
		R:CGGCGATCCGTTTCATG		
		P:[6FAM]TTCCTTCTAGCCCGGCTG[TAM]		
<i>mc5ra</i>	Present work	F:ATCATCTGCTGCTATAGTCTGA	57	200 nM
		R:ATCCACCGATCATATCCATCT		
<i>mc5rb</i>	Present work	F:CGCACTCAGGAGCCAAGAGATG	65	200 nM
		R:AGTTCCTCCAGGCACCTTCTTC		
<i>mrp1</i>	Agulleiro <i>et al.</i> , 2013	F:CTTCTTCTTGATTTTGTCACTTATTTAC	60	300 nM
		R:TCTTTACTGAGATGATGCATAACCTTTC		
		P:[6FAM]CCCTCGAGTCAAAAAATCCGGTTTGC[TAM]		
<i>mrp2a</i>	Agulleiro <i>et al.</i> , 2013	F:AGAGCCGCCACTGATGCT	60	300 nM
		R:CCACTTGGCCTCTGGAGTTG		
		P:[6FAM]CTCTCACCCATGGACGATCAGGCA[TAM]		
<i>mrp2b</i>	Agulleiro <i>et al.</i> , 2013	F:TTGGCTGTGAGCTGGAAGTG	60	300 nM
		R:TGAAAGAGGGAACGTGATTGG		
		P:[6FAM]CATTTTCTCTGCCACCGCTGCCTG[TAM]		
<i>pomca</i>	Cortés <i>et al.</i> , 2018	F:AAATGACCCATTTCCGCTGGAG	60	250 nM
		R:CCCACCTTCGTTTCTATGCATG		
<i>pomcb</i>	Cortés <i>et al.</i> , 2018	F:AAACAACGGGAAGTATCGCATG	60	250 nM
		R:TCTGTGAACTGCTGTCCATTGC		
<i>asip</i>	Guillot <i>et al.</i> , 2016	F:CTGTGGGCGAGCTGCAAGAG	60	250 nM
		R:GCAGGGCTCCATAAACAGGAT		
<i>agrp1</i>	Cortés <i>et al.</i> , 2018	F:GTGAATGTTGTGGTGATGG	60	250 nM
		R:TTCTTCTGCTGAGTTTATTTT		
<i>agrp2</i>	Cortés <i>et al.</i> , 2018	F:GCTCTTCATCTGCTTGTTCTT	55	250 nM
		R:CTCCTGATTCCACACTCCT		
<i>18s</i>	Cortés <i>et al.</i> , 2014	F:TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	60	150 nM
		R:AGTCTCGTTCGTTATCGGAATGA		

3.4.2. Localización celular de *mc4r* y *mc1r* en tejido gonadal

3.4.2.1. Síntesis de ribosondas

La clonación en el vector pGEM-T easy (Promega) del *mc1r* y *mc4r* de pez cebra, fue previamente desarrollada en el laboratorio (Aguilleiro *et al.*, 2013b). Las sondas sentido y antisentido se sintetizaron *in vitro* mediante la linearización de los plásmidos con las enzimas de restricción *Sall* y *Apal*. La transcripción *in vitro* se realizó con la RNA polimerasa T7 o SP6 (Promega). Tanto la sonda sentido como la antisentido, se marcaron con digoxigenina-11-UTP mediante el kit DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para identificar los tipos de células testiculares, se diseñaron cebadores específicos para células germinales como el polipéptido 4 del complejo DEAD (Asp-GlyAla-Asp) (*ddx4*), expresado en células germinales primordiales y la proteína tipo piwil1 (*piwil1*), un marcador de espermatogonias de tipo A y B. También, se diseñaron cebadores específicos para células somáticas como insulina tipo 3 (*insl3*), un indicador de células de Leydig y el factor de crecimiento derivado del soma gonadal (*gsdf*), gen expresado en células de Sertoli. Los cebadores contenían en su extremo 5', el promotor para la RNA polimerasa T3 o T7 (Tabla 2). Las reacciones se realizaron en volúmenes de 50 µl con 1 unidad de DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs, MA Estados Unidos), 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y 1 µl de cDNA de testículo. Las amplificaciones fueron realizadas por PCR convencional en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), según las instrucciones del fabricante. Para *gsdf* y *ddx4*, se usó un ciclo de dos pasos sin el paso de hibridación. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1%, purificados con el kit E.Z.N.A.® (Omega Bio-tek, Inc) y secuenciados por ambos extremos para verificar su identidad. La sonda sentido y antisentido, fueron sintetizadas por transcripción *in vitro* mediante la RNA polimerasa T3 o T7 (Promega) y marcadas con digoxigenina-11-UTP (kit DIG DNA Labeling Mix, Roche Diagnostics GmbH) según las instrucciones del fabricante. Todas las sondas sintetizadas fueron tratadas con RQ1-DNase-RNAase (Promega) durante 15 min a 37°C y purificadas en columnas de cromatografía Micro Bio-Spin (BioRad). Finalmente fueron cuantificadas en un

espectrofotómetro NanoDrop 2000c, almacenadas a -20°C y usadas dentro de un plazo de una semana.

Table 2: Cebadores utilizados para clonar *mc1r* y *mc4r* y generar molde de DNA para la síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina. Fw: cebador directo (forward primer) y Rv: cebador reverso (reverse primer)

Gen	Referencia	Cebador	Secuencia (5' → 3')
<i>mc1r</i>	Cortés <i>et al.</i> , 2014	Fw ^a	HindIII- ATGAACGACTCTTCGCGCCA
		Rv ^b	XhoI- TTACTCGAGACACCACGAA
<i>mc4r</i>	Aguilleiro <i>et al.</i> , 2013	Fw ^a	HindIII- ATGAACACCTCACATCATCATG
		Rv ^b	XhoI- TTATACACACAGAGATGCAAGTC
<i>insl3</i>	Good-Avila <i>et al.</i> , 2009	Fw ^c	T3Rpps- AGTGAAGATGTGCGAGTGAAGC
		Rv ^d	T7Rpps- GACTGAATCAGTTCATTCATGGTGCA
<i>gsdf</i>	Chen <i>et al.</i> , 2013	Fw ^c	T3Rpps- CTGGAGCATCTGCGGGAGTCATTGAA
		Rv ^d	T7Rpps- CCAGTGATGCTGAACTACGGCTAGTTTGTGTT
<i>ddx4</i>	Present work	Fw ^c	T3Rpps- TTTCCGTGATGGTGGTAATGAAGA
		Rv ^d	T7Rpps- CCAGCAGCCATTCTTTGAATATCTTCAG
<i>piwil1</i>	Present work	Fw ^c	T3Rpps- ACTCTCATGTTCTACACGCGCAGAAATG
		Rv ^d	T7Rpps- CCTCTTTAACCAGTTACAGGTAATACAG

^aContiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII (subrayado)
(HindIII; 5'-TATAAAGCTT-3')

^bContiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI (subrayado)
(XhoI; 5'-TTACTCGAG-3')

^cContiene la secuencia promotora de la RNA polimerasa T3 (subrayado)
(T3Rpps; 5'- GGGCGGGTGTTATTAACCCTCACTAAAGGG-3').

^dContiene la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7 (subrayado)
(T7Rpps; 5'- CCGGGGGGTGAATACGACTCACTATAGGG-3').

3.4.2.2 Hibridación *in situ* (ISH)

Los experimentos de hibridación *in situ* se llevaron a cabo como describió Cerdá-Reverter *et al.*, (2003). Peces WT adultos y saludables se anestesiaron por sobredosis de metasulfonato de tricafina (MS222, 300-400 mg/l), sacrificados por decapitación y se extrajeron cuidadosamente las gónadas. Los testículos y ovarios se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB: 0.1 M pH 7.4), durante toda la noche a 4°C. Posteriormente los tejidos se deshidrataron e incluyeron en Paraplast (Sherwood, St Louis, MO) y fueron seccionados de forsa seriada a un grosor de 5 µm con un micrótopo de rotación. Las secciones se montaron en portaobjetos tratados con 3-(Trietoxisilil)-propilamina (TESPA) y se secaron a temperatura ambiente (TA) durante toda la noche. Finalmente, las secciones se almacenaron a 4°C y usaron dentro de un plazo de un mes. Para distinguir el tipo de células germinales que muestran señal de hibridación *in situ*, secciones adyacentes de ovarios y testículos se tiñeron con hematoxilina-eosina y azul de toluidina respectivamente.

Antes de la hibridación, las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas y fijadas en PFA 4% en PB por 20 minutos. Posteriormente, se lavaron en PB 0.2M (2 x 5 min); se trataron con proteinasa-K (20 µg /ml en Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8) durante 5 min a TA; se lavaron en PB 0.2M y finalmente fueron post-fijadas en PFA 4% en PB durante 5 min. El exceso de radicales libres tras la digestión con proteinasa K fue reducido mediante baño en una solución de trietanolamina (0.1 M, pH 8) / anhídrido acético durante 15 min. Finalmente, las secciones se deshidrataron y secaron a TA.

Tras desnaturalizar la sonda durante 7 min a 75°C y diluirla en la solución de hibridación (50% formamida, 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA (pH 8), 10% de dextran sulfato, 1X de solución de Denhardt's y 0.5 µg/µL ARNt de levadura) a una concentración de 10 ng/ul, se aplicó a las diferentes secciones, en volúmenes aproximados de 100 µl, que fueron subsecuentemente incubadas, protegidas por cubreobjetos, en una cámara húmeda a 55°C durante toda la noche. Al siguiente día, los cubreobjetos fueron extraídos mediante baño en una solución salina de citrato sódico 5X (SSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7) durante 30 min a 55°C. Posteriormente,

las secciones se lavaron en SSC 2X-50% formamida durante 30 min a 65°C y tres veces en tampón NTE (NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) durante 10 min a 37°C. Posteriormente, las secciones se trataron RNasa (2 µg /mL RNasa en NTE) durante 30 min a 37°C y lavaron secuencialmente en tampón NTE durante 10 min a 37°C; SSC 2X-50% formamida durante 30 min a 65°C; SSC 2X durante 10 min a TA; SSC 0.1X (2 x 15 min) a TA y dos veces en tampón A (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM) durante 10 min a TA. Las secciones se preincubaron en una solución de bloqueo (reactivo de bloqueo (Roche Diagnostics GmbH) al 2% en tampón A) durante 30 min a TA. Posteriormente, las secciones se incubaron con una solución de anticuerpo anti-digoxigenina AP Fab fragments (1/1.000)(Roche Diagnostics GmbH, en tampón A) durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Al siguiente día, las secciones fueron lavadas dos veces en tampón B (Tris 100 mM, pH 9.5, NaCl 100 mM, 50mM MgCl₂) durante 10 min. Una tableta de NBT/BCIP (Roche Diagnostics GmbH) suplementado con levamisol (0.4mg/ml NBT; 0.19mg/ml BCIP; 1mM levamisol preparado en tampón B) se utilizó como sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina. La reacción colorimétrica se desarrolló en condiciones de oscuridad a TA durante 5 horas. La reacción de revelado fue detenida mediante lavados de 5 minutos en agua destilada estéril. Finalmente las secciones fueron montadas con medio acuoso (Bio-Optica) y fotografiadas con un microscopio binocular estereoscópico modelo Olympus BX41.

3.4.3. Efecto de las melanocortinas en la producción de esteroides

3.4.3.1. Reactivos

La hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) fue adquirida a Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Acetil-(Nle⁴,Asp⁵,D-Phe⁷,Lys¹⁰)-ciclo- α -MSH (4-10) amida acetato (MTII) y Acetil-(Nle⁴,Asp⁵,D-2-Nal⁷,Lys¹⁰)-ciclo- α -MSH (4-10) amida trifluoroacetato (SHU9119) fueron sintetizados por Bachem (Suiza). La hormona adrenocorticotrópica humana 1-24 (hACTH) y la proteína de señalización agoutí humana 87-132 (hASIP) fueron compradas a Phoenix Pharmaceuticals Inc (Estados Unidos).

3.4.3.2. Aislamiento de células testiculares y ováricas

Machos WT adultos (n=15) y hembras WT grávidas (n=50) se anestesiaron por exposición progresiva a bajas temperaturas y se sacrificaron mediante rápida decapitación. El aislamiento de células testiculares se basó en (Kurita y Sakai, 2004) introduciendo algunas modificaciones. Los testículos se extirparon cuidadosamente con fórceps bajo un microscopio de disección Olympus SZX16 (Japan). Cada testículo fue transferido a una placa de cultivo con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco enriquecida con calcio y magnesio (D-PBS+, Gibco™ Grand Island, Estados Unidos). Posteriormente, se trataron con una solución de hipoclorito sódico al 0.5% v/V en D-PBS+ durante 2 min. Después de un lavado en D-PBS+ de 2 min y con la ayuda de unas microtijeras de disección, los testículos se disgregaron en 0.5-1 ml de solución 0.15% colagenasa/0.12% dispasa en DPBS+. El tejido en suspensión se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml con 1-1.5 ml de solución colagenasa/dispasa, y se incubó durante 2 h a 28°C con agitación, pipeteando arriba y abajo la muestra cada 20 min para su mejor disgregación. Tras la incubación, se agregaron 12 ml de medio Leibovitz-15 (L-15; Gibco™) suplementado con antibióticos (1% penicilina-estreptomicina), BSA al 0.5% y HEPES 10 mM (pH 7.4). Para retirar los fragmentos no disociados, las muestras se filtraron sucesivamente en tamices estériles de 70 y 40 µm. Posteriormente, las células en suspensión se centrifugaron a 500 rpm durante 10 min a TA. El sobrenadante que contiene el esperma maduro se descartó y el pellet de la centrifugación, compuesto por células germinales, se reconstituyó en 0.5-1 ml de L-15. El número de células presentes en la suspensión celular fue computado mediante el uso de cámaras Neubauer y las células se distribuyeron en el número apropiado para su incubación experimental.

Los ovarios fueron extirpados cuidadosamente y se colocaron en una placa Petri con medio L-15 al 60% (pH 7.4) suplementado con antibióticos (1% penicilina-estreptomicina) a TA. Los folículos fueron aislados manualmente bajo un microscopio de disección Olympus SZX16 (Japan). El diámetro fue medido con un ocular micrométrico, para luego ser clasificados según su tamaño y estado vitelogénico (Wang y Ge, 2004). Solo folículos sanos en vitelogénesis temprana (EV, ~0.35 mm) y vitelogénesis media (MV,

~0.45 mm) fueron seleccionados, mezclados y distribuidos para las incubaciones experimentales.

3.4.3.3 Tratamiento *in vitro*

Las células testiculares se distribuyeron a densidad de 100.000 células / pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron a 28°C en una cámara húmeda para evitar la evaporación. Una vez asentadas las células, tras aproximadamente 24h, se inició el ensayo experimental substituyendo el medio de asentamiento por 120 µl de medio fresco.

En el caso del tejido ovárico se distribuyeron 50 folículos por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos. La incubación de los folículos se realizó a 28°C en una cámara húmeda, según Pang y Ge, 2002. Tras dos horas y una vez asentados los folículos se retiró el medio de asentamiento y se añadieron 200 µl de L-15 al 60% fresco.

Tanto las células testiculares como los folículos fueron tratados con hCG y/o MTII, hACTH, SHU9119 y hASIP, en un rango de concentraciones desde 10^{-6} a 10^{-8} M. Después de una incubación de 24 h (machos) / 12 h (hembras), el medio fue colectado y almacenado a -80°C para el análisis de esteroides. Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces con 3 réplicas cada vez.

3.4.3.4 Análisis de esteroides

Los niveles de E2 y T se determinaron mediante inmunoensayos enzimáticos (EIA, Neogen, EEUU) en muestras de medio por duplicado. El límite de detección del ensayo fue de 2 y 20 pg/ml para T y E2, respectivamente. Los niveles de esteroides fueron expresados como porcentajes del nivel basal.

3.4.3.5. Análisis estadístico

Los niveles de esteroides expresados como porcentaje de los niveles basales se representaron como media \pm SE (error estándar). Las diferencias estadísticas se analizaron

mediante ANOVA de 1 vía, seguido por el test de Tukey. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism versión 9.1.1, con un nivel de significación de $p < 0.05$.

3.5 Caracterización del sistema de melanocortinas en la hipófisis

3.5.1. Estudio de colocalización celular de *mc4r* y gonadotropos usando sondas *fshb/lhb*

3.5.1.1. Purificación de ARN total y transcripción inversa

La extracción del RNA total, la transcripción inversa así como la evaluación de la calidad del cDNA siguieron las pautas explicadas anteriormente en la sección 3.4.1.2. Para obtener una concentración suficiente de RNA total, se realizaron pools de 3 hipófisis y se utilizaron 200 ng para la síntesis de cDNA.

3.5.1.2. Síntesis de ribosondas

Para la síntesis de sondas se diseñaron cebadores específicos para la zona codificante de *fshb* y *lhb* (Tabla 3). Las reacciones se realizaron en volúmenes de 25 μ l con 1 unidad de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada cebador y 0,5 μ l de cDNA de hipófisis. Las amplificaciones fueron realizadas por PCR convencional en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1%, se purificaron en columnas de afinidad E.Z.N.A.[®] (Omega Bio-tek, Inc) y se subclonaron ligados en el vector pGEM[®]-T Easy Vector (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las construcciones se transformaron en bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5 α . Los productos de ADN plasmídico fueron secuenciados por ambos extremos para verificar su identidad. Los plásmidos fueron linearizados con las enzimas de restricción SacI y ApaI, utilizando 1.2 μ g de DNA. La transcripción *in vitro* se realizó con la RNA polimerasa T7 o SP6 (Promega). Las sondas sentido y antisentido se marcaron con fluoresceína-12-UTP mediante el kit Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH) según las instrucciones del fabricante. Para *mc4r*, las síntesis de la sonda sentido y antisentido, así como el marcaje con digoxigenina, se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 3.4.2.1. Todas las

sondas fueron tratadas con RQ1-DNAse-RNAase (Promega), purificadas en columnas de cromatografía Micro Bio-Spin (BioRad) y cuantificadas por espectrofotometría (NanoDrop 2000c). Las sondas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 3. Cebadores utilizados para clonar *fshb* y *lhb* y generar molde de DNA para la síntesis de sondas marcadas con fluoresceína. Fw: cebador directo (forward primer) y Rv: cebador reverso (reverse primer)

Gen	Referencia	Secuencia (5' → 3')	T° de hibridación	[] Cebador
<i>fshb</i>	Presente tesis	F:ATGAGGATGCGTGTGCTTGTCTGGC	65	400 nM
		R:GGCTGATAGCTCCCCAGTCTGTTGTG		
<i>lhb</i>	So <i>et al</i> , 2005	F:ATGTTATTGGCTGGAAATGG	60	400 nM
		R:CTAGTATGCGGGGAAATCC		

3.5.1.3. Hibridación *in situ* (ISH)

Los experimentos de hibridación *in situ* se llevaron a cabo como describió (Agulleiro *et al.*, 2013a). Peces adultos y saludables fueron sacrificados por sobredosis con metasulfonato de tricaína (MS222, 200-300 mg/l). Las hipófisis fueron cuidadosamente diseccionadas y fijadas en PFA al 4% en tampón PB 0.1 M (pH 7.4), durante toda la noche a 4°C. La inclusión, sección, montaje y almacén de las muestras se realizó según lo descrito en la sección 3.4.2.2, así como el tratamiento de las secciones antes, durante y después de la hibridación. A partir de la incubación con el anticuerpo, todos los procedimientos fueron realizados en oscuridad. Las secciones fueron incubadas con una dilución (en solución de bloqueo) 1/1000 de anticuerpo anti-digoxigenina (fragmentos Fab de oveja, conjugados a fosfatasa alcalina, Roche Diagnostics GmbH) y 1/100 de anticuerpo anti-fluoresceína (fragmentos Fab de oveja, conjugados a peroxidasa de rábano picante, Roche Diagnostics GmbH) durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, las secciones se lavaron dos veces durante 10 min en Triton X-100 al 0.1% en tampón A. Para la amplificación fluorescente de la actividad de la peroxidasa de rábano picante, se

utilizó el kit TSA Biotin System (Perkin Elmer) a una dilución 1:50, durante 20 min. Subsecuentemente, las secciones se lavaron en Triton X-100 0.1% en tampón B (Tris 100 mM, pH 9.5, NaCl 100 mM) durante 15 min. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con estreptavidina conjugada al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a una dilución 1:300 en solución de bloqueo, durante toda la noche a TA. Al día siguiente, las secciones se lavaron dos veces durante 5 min en Triton X-100 0.1% en PBS 1X. Para la amplificación fluorescente de la actividad de la fosfatasa alcalina, las secciones se incubaron en HNPP/Fast Red (Roche Diagnostics GmbH) durante 3 horas a TA. Posteriormente, las secciones se lavaron tres veces durante 5 min en PBS, seguido de un lavado de 5 min en Triton X-100 0.1% en PBS. Finalmente, las secciones fueron montadas con Vectashield Dapi Hard Set (Invitrogen) y fotografiadas con un microscopio binocular modelo Olympus BX41.

3.5.2 Relación del sistema de melanocortinas en la expresión de gonadotropinas en sistema *in vitro*

3.5.2.1. Reactivos

El análogo de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH, L4513) fue adquirido en Sigma-Aldrich. Acetil-(Nle4,Asp5,D-Phe7,Lys10)-ciclo- α -MSH (4-10) amida acetato (MTII) fue sintetizado por Bachem y la proteína de señalización agoutí humana 87-132 (hASIP) fue obtenida de Phoenix Pharmaceuticals Inc

3.5.2.2 Aislamiento de hipófisis

Machos (n=72) y hembras (n=72) WT adultos fueron anestesiados por exposición progresiva a bajas temperaturas y sacrificados por decapitación. Las hipófisis fueron diseccionadas cuidadosamente con fórceps bajo un estereomicroscopio Olympus SZX16 (Japan). Posteriormente, se lavaron 3 veces con solución balanceada de Hanks exenta de rojo fenol, magnesio y calcio (Sigma Aldrich).

3.5.2.3 Tratamiento *in vitro*

La incubación de las hipófisis se realizó según (Wang *et al.*, 2016), con modificaciones. Se distribuyeron cuatro hipófisis por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos con 200 μ l de medio L-15 (pH 7.4), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos (1% penicilina-estreptomicina). La pre-incubación se realizó en una cámara húmeda, durante 24 h a 28 ° C. Posteriormente, el medio fue retirado y reemplazado con medio L-15 libre de FBS, conteniendo LHRH (100 nM) y/o MTII, ASIP a una concentración 10^{-6} M durante 48 h.

3.5.2.4. Purificación de ARN total y transcripción inversa

Cuatro hipófisis por tratamiento fueron mezcladas y tratadas como una muestra para obtener suficiente RNA para la síntesis de cDNA. El ARN total fue extraído con kit Ambion® Cells-to-Signal™, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó a partir de 2 μ l de lisis, siguiendo el proceso descrito anteriormente en la sección 3.4.1.2. La calidad del cDNA fue evaluada a través de la amplificación del gen *factor de elongación (ef1a)*, ver Tabla 4) mediante PCR convencional en un Termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf). Para la reacción se utilizó 0.5 μ l de cDNA, buffer para PCR 1x, 2.5 mM de dNTP (mezcla de nucleótidos), 1.5 de mM $MgCl_2$, 0.4 μ M de cada cebador y media unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Finalmente, el cDNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

3.5.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Para determina la expresión relativa de *fshb* y *lhb*, 1 μ l de cDNA fue agregado a 7.5 μ l de SYBR® Green PCR Master Mix 2X con cebadores específicos (Tabla 4) en un volumen final de reacción de 15 μ l. Las amplificaciones se realizaron siguiendo el protocolo: 95 °C durante 15 min, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de hibridación específica, 30 seg a 72°C y 1 min a 95°C. Para confirmar la especificidad de los

productos de PCR, se finalizó con una curva de disociación a partir de 55°C a 95.5°C, aumentando 0.5°C cada 10 seg. Como control interno, se amplificó un fragmento de *factor de elongación 1a (ef1a)*, donde 1µl de cDNA y cebadores específicos fueron agregados a 7.5µl de SYBR® Green PCR Master Mix 2X. Todas las reacciones fueron realizadas en duplicado en el Sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad Laboratories USA). Los datos fueron recopilados y analizados con iCycler iQ™ software (version 3.0.6070). La expresión génica relativa se calculó con el método matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

Tabla 4. Cebadores utilizados en estudios de expresión génica por qPCR. F: cebador directo (forward primer), R: cebador reverso (reverse primer)

Gen	Referencia	Secuencia (5' → 3')	T° de hibridación	[] Cebador
<i>fshb</i>	Tsakoumis <i>et al.</i> , 2022	F:GAAGAATGTGGGAGCTGCGT	62	150 nM
		R:AGACCTTCTGGGTGTGCTGT		
<i>lhb</i>	Tsakoumis <i>et al.</i> , 2022)	F:GCTGTCCAAAATGCCTGGTG	57	250 nM
		R:CAGTCGGGCAGGTTAATGGT		
<i>ef1a</i>	Tang <i>et al.</i> , 2007	F:CTGGAGGCCAGCTCAAACAT	60	250 nM
		R:ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC		

3.5.2.6. Análisis estadístico

Los niveles de expresión se expresaron como media ± SE (error estándar). Para evaluar diferencias, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido de la prueba post-hoc Sidak. El análisis estadístico fue realizado con GraphPad Prims versión 9.1.1, con un nivel de significación de 0.05.

4. Resultados

4.1. Rol del sistema de melanocortinas en el crecimiento y pubertad

4.1.1. Crecimiento lineal

El posible efecto de la sobreexpresión de *asip1* en el crecimiento se determinó midiendo la longitud estándar en peces *asip1*-Tg y WT desde los 30 a 75 dpf (días posteriores a la fertilización). Se realizaron dos experimentos independientes. En el experimento 1, los peces WT crecieron desde 8,9 hasta 22,1 mm, mientras que los peces *asip1*-Tg crecieron desde 10,5 hasta 20,9 mm (Fig. 10A). En el transcurso del experimento 2, la longitud de los animales WT aumentó desde 6,12 hasta 22,48 mm, mientras que en los peces *asip1*-Tg osciló entre 6,5 y 22,4 mm (Fig. 10B).

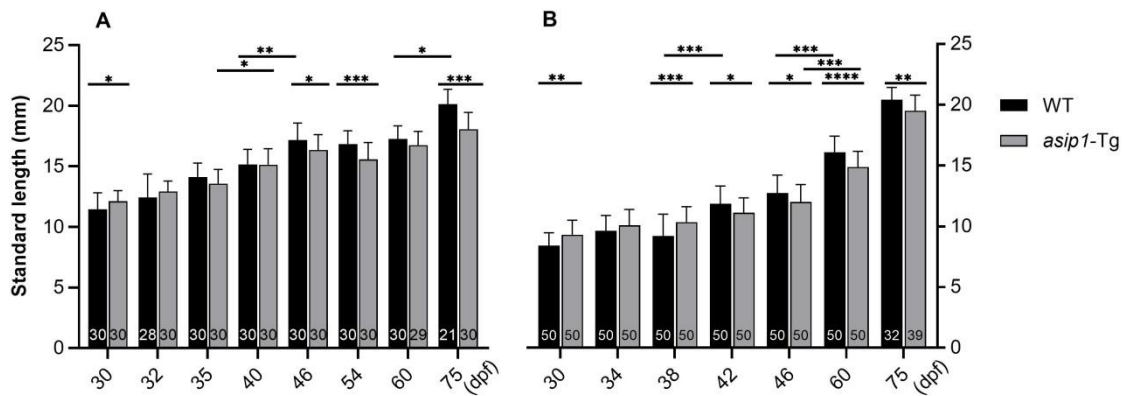


Figura 10. Variación de la longitud estándar en peces WT y *asip1*-Tg durante 2 experimentos. A) experimento 1 y B) experimento 2. Datos representados como la media \pm desviación estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas, donde *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 y ****p < 0.0001.

Al analizar el crecimiento de cada genotipo, tanto en los peces WT como en los *asip1*-Tg, no se encontraron diferencias significativas en la longitud estándar durante el período de estudio. Las excepciones incluyen el aumento de la longitud en peces WT de 40 a 46 dpf y de 60 a 75 dpf en el experimento 1 (Fig. 10A) y 38-42 dpf en el experimento

2 (Fig. 10B). El aumento de la longitud de los peces *asip1*-Tg fue significativamente diferente dentro de 35-40 dpf en el experimento 1 y 46-60 dpf en el experimento 2. En cuanto a la distribución de las tallas, son significativamente diferentes entre los genotipos. A 30 dpf, tanto en el experimento 1 como en el 2, la longitud estándar de peces WT fue significativamente menor en relación a la de los peces *asip1*-Tg. Sin embargo, a partir de 42 dpf en el experimento 2 y de 46 dpf en el experimento 1, en general la longitud estándar de peces WT fue significativamente mayor que la de los peces transgénicos (Fig. 10).

Los datos de longitud corporal se clasificaron además según el sexo. Tanto para las hembras WT como para *asip1*-Tg no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento durante el período de muestreo. Las excepciones incluyen el aumento del crecimiento en peces WT dentro de 38-42 dpf en el experimento 2. Con respecto a los machos, se encontró que el crecimiento de WT era significativamente diferente, pero solo después de que alcanzaron la etapa adulta (Fig. 12). No se encontraron diferencias en los peces machos *asip1*-Tg (Fig. 12). A 30 dpf (experimento 1) y 38 dpf (experimento 2), la longitud de las hembras WT fue significativamente menor que la de las hembras *asip1*-Tg (Fig. 11B). Sin embargo, a 42 dpf en el experimento 2 y 46 dpf en el experimento 1, este rasgo se invirtió de forma que las hembras WT mostraron una longitud estándar más alta que la de las hembras *asip1*-Tg. La longitud estándar de los machos WT fue significativamente mayor que la de los machos *asip1*-Tg desde 46 dpf hasta 75 dpf en el experimento 2. La misma tendencia se observó en el experimento 1 aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas solo a 75 dpf.

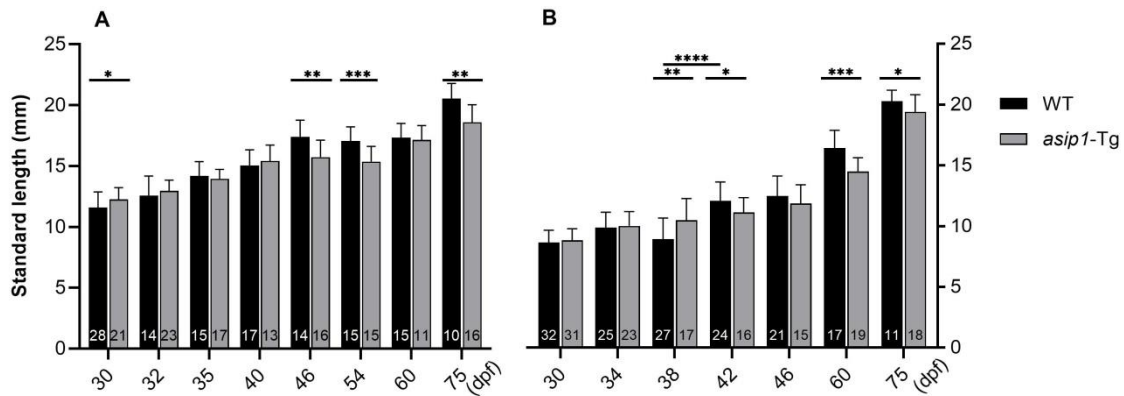


Figura 11. Variación de la longitud estándar en hembras WT y *asip1-Tg* durante 2 experimentos. A) experimento 1 y B) experimento 2. Datos representados como la media \pm desviación estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

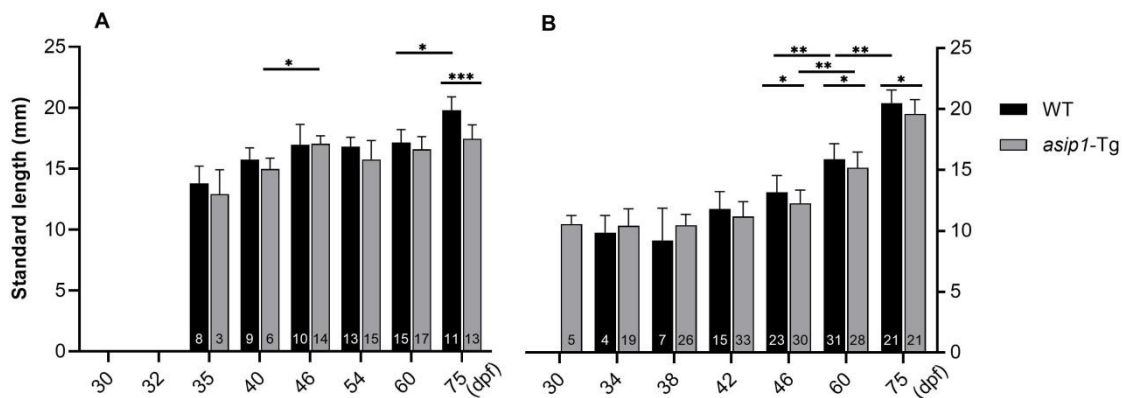


Figura 12. Variación de la longitud estándar en machos WT y *asip1-Tg* durante 2 experimentos. A) experimento 1 y B) experimento 2. Datos representados como la media \pm desviación estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

4.1.2. Diferenciación gonadal

Para investigar si la disminución de la actividad del sistema de melanocortinas inducida por la sobreexpresión de *asip1* puede tener un papel en la diferenciación sexual, monitoreamos histológicamente el desarrollo de gónadas de peces *asip1*-Tg entre 30 y 75 dpf y comparamos estos resultados con los encontrados en peces WT. En el experimento 1 (Fig. 13A), se analizaron gónadas de 226 peces WT y 237 peces *asip1*-Tg. Se observó una proporción de sexos sesgada hacia las hembras, con un 56,6% en WT y un 55,7% en los peces *asip1*-Tg identificados como hembras. A 30 dpf (Fig. 13A2), la fracción de gónadas indiferenciadas fue significativamente mayor en peces *asip1*-Tg que en los WT ($p = 0,0122$), y el 96,5% de las gónadas WT fueron identificadas como hembras ($p = 0,0122$) (Fig. 13A1). En ambas líneas de peces, los signos de diferenciación sexual (fase de transición hacia el desarrollo de los testículos) comenzaron a 32 dpf. Sin embargo, el número de gónadas en transición fue significativamente mayor en los peces WT a 32 dpf ($p = 0,0475$) y 46 dpf ($p = 0,0237$). El sexo masculino se identificó en gónadas de peces a partir de los 35 dpf.

En el experimento 2 (Fig. 13B), se analizaron 292 gónadas de peces WT y, al igual que en el experimento 1, se observó una proporción de sexos sesgada hacia las hembras representando el 53,8% de la cohorte de población. De un total de 316 peces *asip1*-Tg, el 44% eran hembras y el 51,3% fue identificado como machos. A 30 dpf, no hubo diferencia en la fracción de gónadas indiferenciadas. Sin embargo, la proporción de ovarios (Fig. 13B1) fue significativamente mayor en WT que en peces *asip1*-Tg ($p = 0,0095$) de igual modo a los 38 dpf ($p = 0,0099$). Las gónadas en la fase de transición hacia el desarrollo de los testículos se pudieron observar a partir de 30 dpf. La fracción de animales en la fase de transición fue significativamente mayor en el genotipo WT a 34 dpf ($p = 0,0136$) y 42 dpf ($p = 0,0048$). En la línea transgénica *asip1*-Tg (Fig. 13B2), los machos son identificados a partir de los 30 dpf y su proporción fue significativamente sobre-representada a 34 ($p = 0,0007$), 38 ($p = 0,0002$) y 42 dpf ($p = 0,0010$).

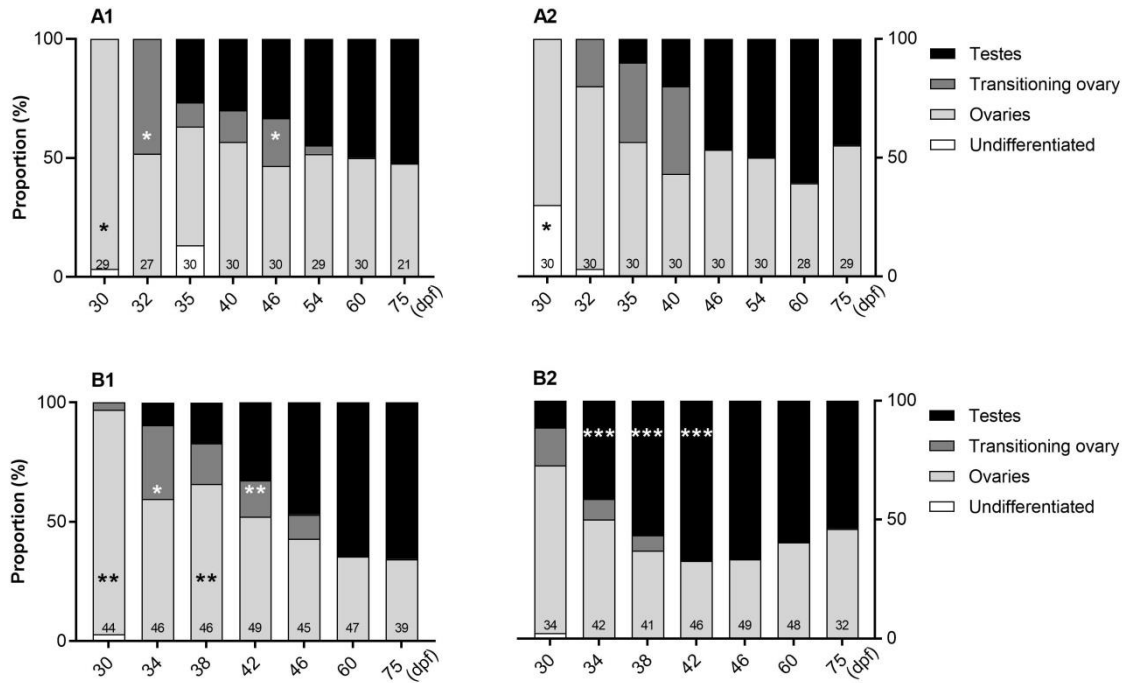


Figura 13. Diferenciación gonadal en peces WT y *asip1*-Tg durante 2 experimentos. A) experimento 1 (A1:WT; A2: *asip1*-Tg) y B) experimento 2 (B1:WT; B2: *asip1*-Tg). Datos son representados como porcentaje del total del número de peces analizados en cada línea de pez. Asterisco (*) indica diferencias significativas de acuerdo al test exacto de Fisher, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4.1.3. Maduración gonadal

En el ovario de pez cebra, la transición de crecimiento primario (etapa I) a la previtelogénesis (etapa II) se considera como el inicio de la pubertad en las hembras (Ge, 2005). De 30 a 34 (experimento 1) o 35 (experimento 2) dpf, los oocitos de todas las hembras, independientemente del genotipo y el experimento, se encontraron en la etapa de crecimiento primario (Fig. 14A, B). En ambos experimentos, hacia el final del período de muestreo, el porcentaje de folículos ováricos en etapa de crecimiento primario fue mayor en las hembras *asip1*-Tg que en las hembras WT. Los folículos previtelogénicos caracterizados por la presencia de alvéolos corticales, en el experimento 1 se vieron por primera vez a 40 dpf. Aunque inicialmente se encontraron en una proporción similar tanto en el genotipo WT como *asip1*-Tg, a 46 dpf se encontró en un porcentaje mayor en WT que en las hembras *asip1*-Tg (Fig. 14A1: 64,3%, $p = 0,0236$). En el experimento 2, los ovarios en estadio II pudieron reconocerse a 34 dpf, pero solo en hembras WT (12%) y a un nivel no significativamente diferente de las hembras *asip1*-Tg (Fig. 14B1). Después de las etapas III-V de la vitelogénesis, cuando los oocitos crecen rápidamente debido a la acumulación de vitelo en el citoplasma, los folículos de los peces WT y *asip1*-Tg entraron en la etapa de maduración (VI). En el experimento 2, a 75 dpf hubo una mayor proporción (36,4%) de hembras WT en estadio VI, aunque este valor no fue significativamente diferente al de las hembras *asip1*-Tg (5,6%). A pesar de que la finalización de la pubertad (primera puesta de huevos) no se siguió en este estudio, la línea *asip1*-Tg se puede propagar en un esquema de propagación estándar.

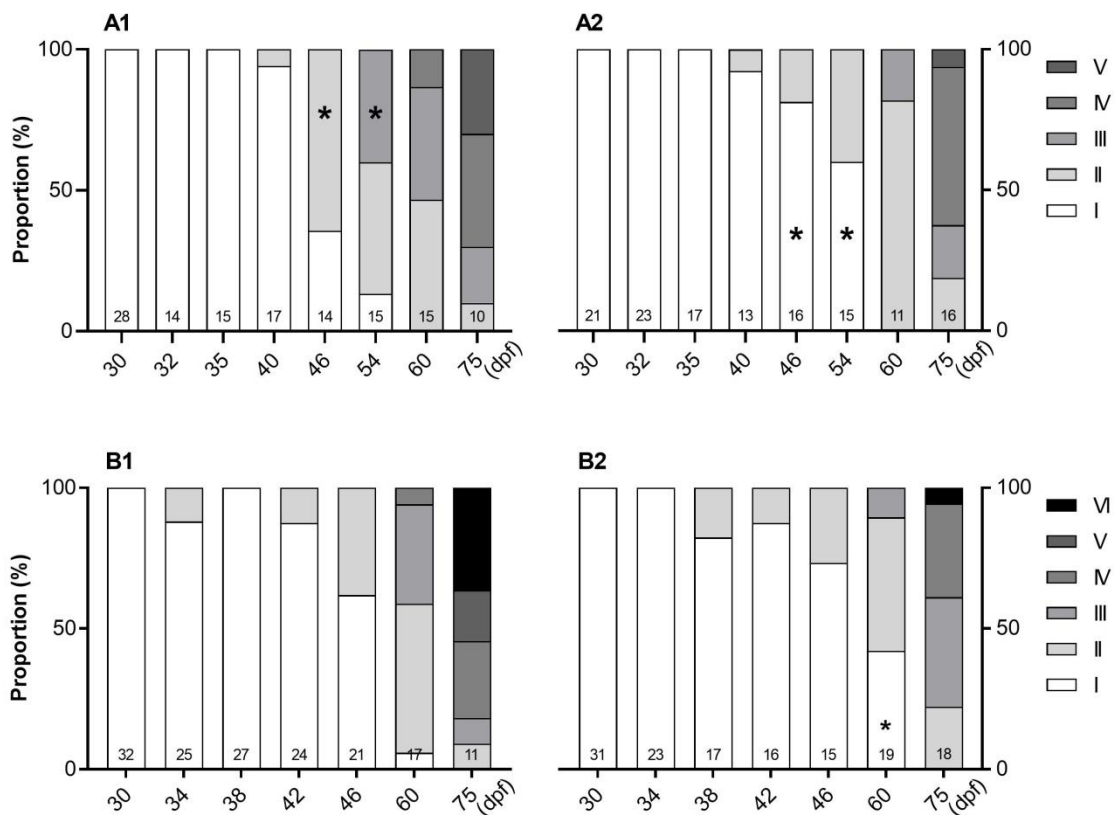


Figura 14. Desarrollo ovárico en peces WT y *asip1-Tg* durante 2 experimentos. A) experimento 1 (A1:WT; A2: *asip1-Tg*) y B) experimento 2 (B1:WT; B2: *asip1-Tg*). Datos son representados como porcentaje del total del número de peces analizados en cada línea de pez. Asterisco (*) indica diferencias significativas de acuerdo al test exacto de Fisher, donde * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

En el experimento 2, el análisis histológico de la gónada reveló la presencia de testículos inmaduros a 30 dpf en peces transgénicos *asip1-Tg* (Fig. 15B2). Por el contrario, los peces WT muestreados a esta edad todavía estaban experimentando diferenciación sexual (Fig. 15B1). En ambos experimentos 1 y 2, en el día 35 o 34, respectivamente, se registró una mayor proporción de machos en estadio 1 en la línea *asip1-Tg*, alcanzando significación estadística en el experimento 1 (Fig. 15). En los peces *asip1-Tg*, la fracción de testículos de etapa 1 disminuyó constantemente hasta 46 dpf (cuando ya no se pudo reconocer), mientras que en peces WT, la etapa 1 todavía representa un 30.4%. La etapa

más avanzada de maduración testicular, la etapa 4, pudo identificarse histológicamente en peces *asip1-Tg* a 34 dpf (20%, experimento 2) pero solo a 46 dpf (experimento 1: 42%, $p = 0.0239$) su proporción fue significativamente mayor que en los machos WT (Fig. 15A2).

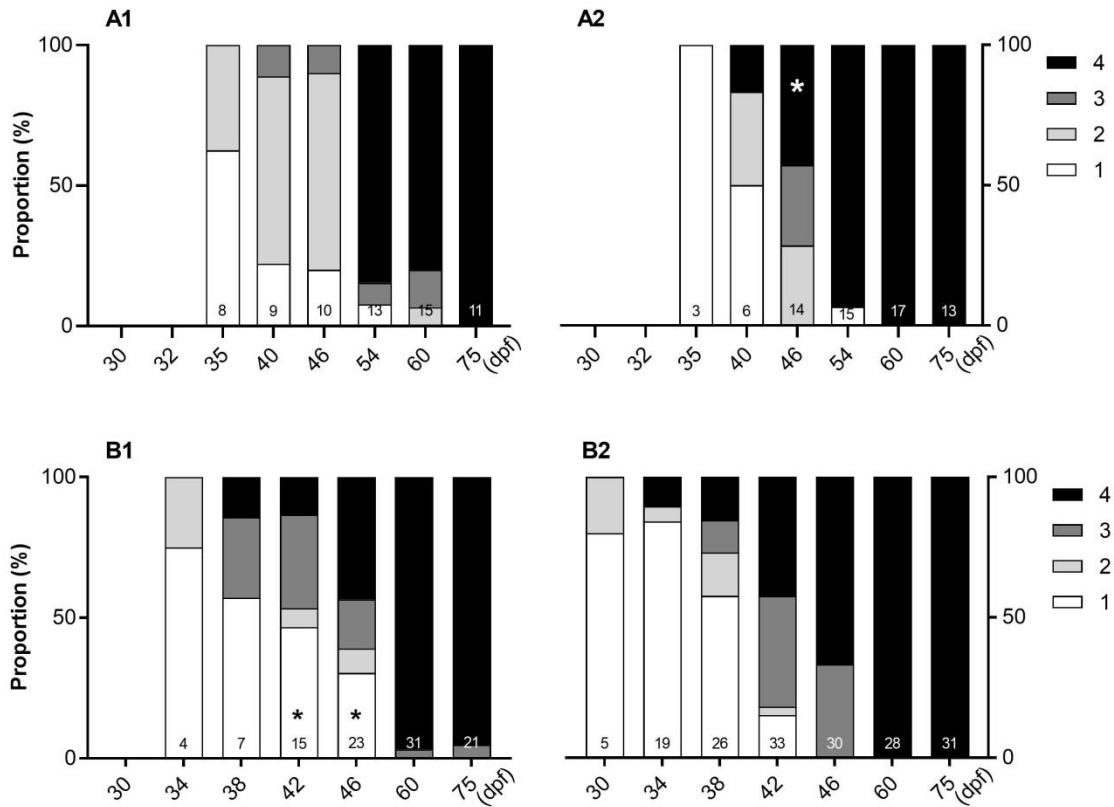


Figura 15. Desarrollo testicular en peces WT y *asip1-Tg* durante 2 experimentos. A) experimento 1 (A1:WT; A2: *asip1-Tg*) y B) experimento 2 (B1:WT; B2: *asip1-Tg*). Datos son representados como porcentaje del total del número de peces analizados en cada línea de pez. Asterisco (*) indica diferencias significativas de acuerdo al test exacto de Fisher, donde * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

4.1.4. Interacción entre el crecimiento y el desarrollo de las gónadas

La interacción entre la longitud estándar y el desarrollo de la gónada se ilustra en la Fig. 16 y 17. En los experimentos 1 y 2, se encontró una fuerte asociación positiva entre estas variables, independientemente del sexo y el genotipo.

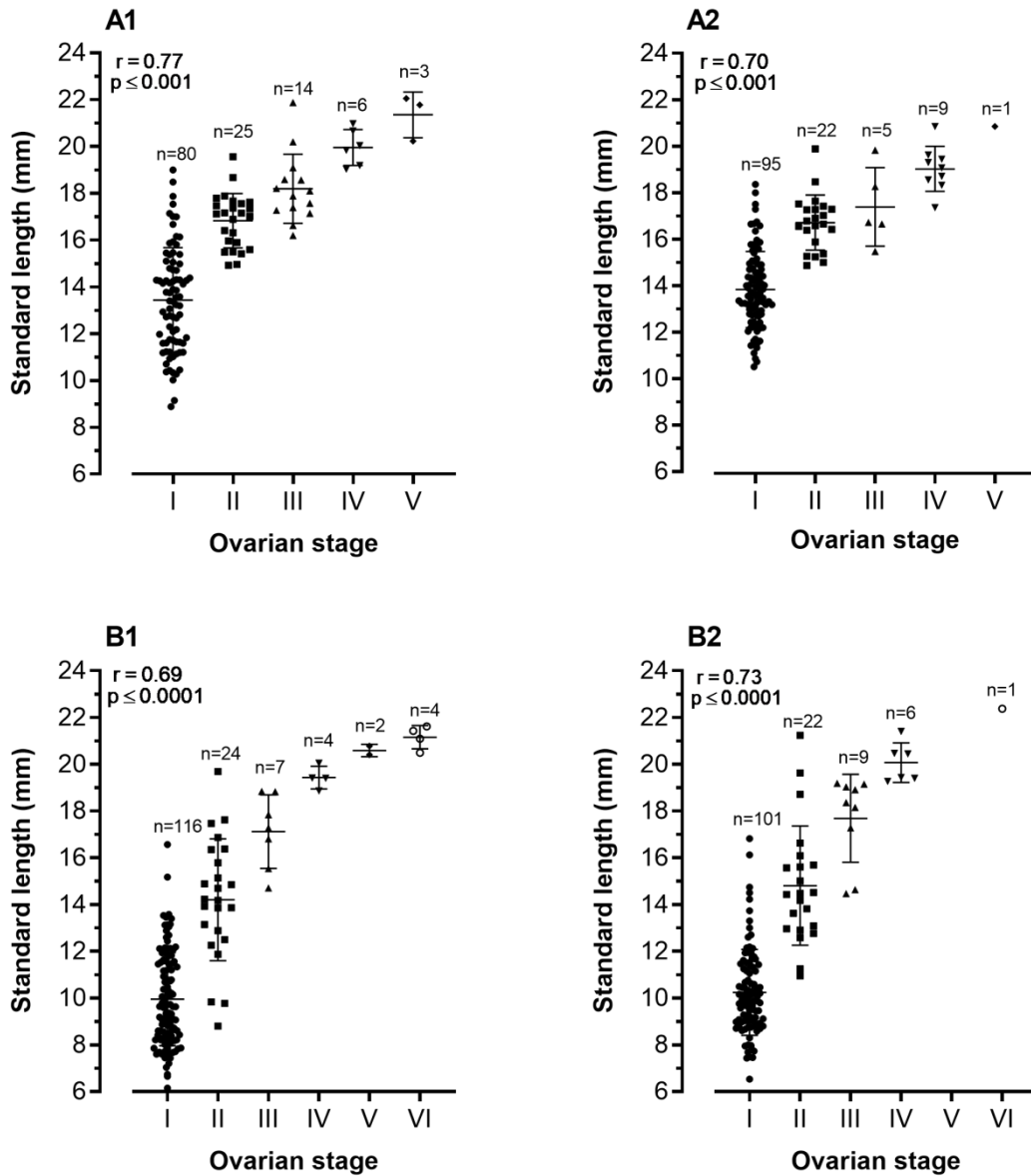


Figura 16. Correlación entre desarrollo ovárico y longitud estándar en peces WT y *asip1-Tg* durante 2 experimentos. A) experimento 1 (A1:WT; A2: *asip1-Tg*) y B) experimento 2

(B1:WT; B2: *asip1*-Tg). Las posibles relaciones fueron analizadas con el test de correlación de Spearman, con un nivel de significación de $p < 0.05$

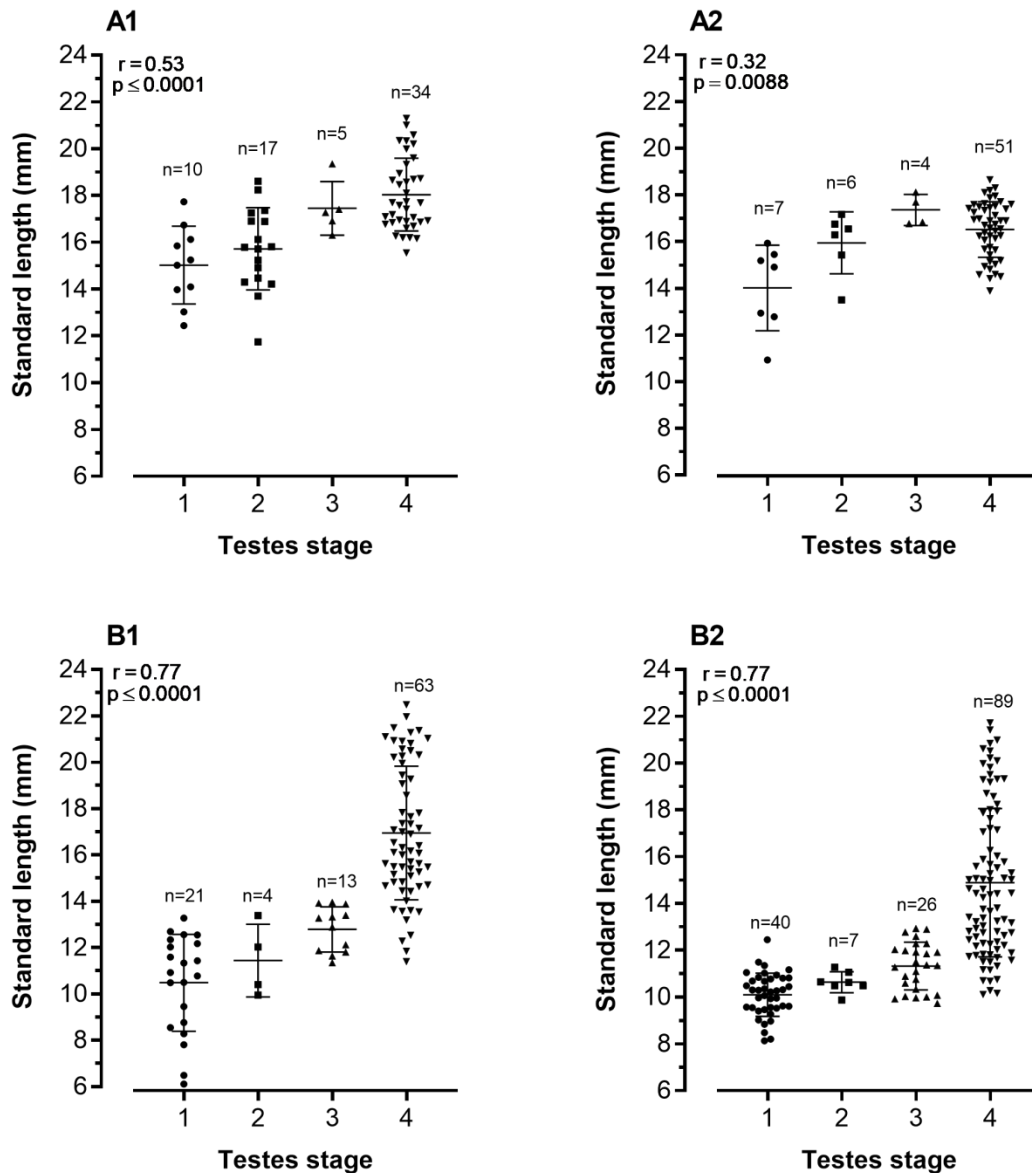


Figura 17. Correlación entre desarrollo testicular y longitud estándar en peces WT y *asip1*-Tg durante 2 experimentos. A) experimento 1 (A1:WT; A2: *asip1*-Tg) y B) experimento 2 (B1:WT; B2: *asip1*-Tg). Las posibles relaciones fueron analizadas con el test de correlación de Spearman, con un nivel de significación de $p < 0.05$

4.1.5. Longitud y edad en la madurez

La longitud corporal de las hembras varía de manera similar en ambos genotipos (experimento 1: WT = 14,9 y 22 mm; *asip1*-Tg = 14,8 y 20,9 mm y experimento 2: WT = 8,8 y 21,6 mm; *asip1*-Tg = 10,9 y 22,4 mm). La función logística muestra que la longitud corporal de 15 mm en el experimento 1 y 12,5 mm en el experimento 2 parece ser el umbral para alcanzar la madurez (Fig. 18). Tanto en las hembras WT como las *asip1*-Tg, una vez que el cuerpo supera estas longitudes y hasta un tamaño de 20 mm, aparecen los alvéolos corticales y tienden a acumularse en los oocitos como signo de transición de la etapa de crecimiento primario a previtelogénico. En ambos experimentos, todas las hembras habían alcanzado la etapa de madurez alrededor de los 22,5 mm. En el experimento 1, la ojiva de madurez estimó que la talla media de madurez sexual (L_{50}) en las líneas WT y *asip1*-Tg fue de 18 y 17,4 mm, respectivamente (Fig. 18A). En el experimento 2, la L_{50} se estimó en 16,2 mm para las hembras WT y 16,7 mm para las hembras *asip1*-Tg (Fig. 18B). Como se observó en las hembras, la longitud corporal en los machos varió de manera similar en ambos genotipos (experimento 1: WT = 11,7 y 21,3 mm; *asip1*-Tg = 13,5 y 18,9 mm y experimento 2: WT = 9,9 y 22,5 mm; *asip1*-Tg = 9,9 y 21,7 mm). La función logística para los datos en el experimento 1, muestra que los machos comienzan a madurar a una longitud menor que las hembras. Entre 20 y 22,5 mm, el porcentaje de machos maduros alcanza el 89 y el 100%, respectivamente (Fig. 19A). Por otro lado, los datos obtenidos en los machos *asip1*-Tg, indican que el 74 y el 100% de los machos maduros, tienen una longitud corporal entre 17,5 y 20 mm. En el experimento 2, los machos maduros de ambos genotipos se pudieron observar tan pronto como alcanzan los 10 mm de longitud corporal (Fig. 19B). A continuación, se observó un aumento en la proporción de testículos que presentaban las características de maduración. El 44% de los machos *asip1*-Tg alcanzaron la madurez con una longitud corporal de 12,5 mm, mientras que el 41% de los machos WT estaban maduros con una longitud corporal de 15 mm. Todos los machos de 22,5 mm se clasificaron como maduros. En el experimento 1, la ojiva de madurez estimó que la L_{50} para los machos de los genotipos WT y *asip1*-Tg fue de 17,3

y 16,6 mm, respectivamente (Fig. 19A). En el experimento 2, la L_{50} se estimó en 16,5 mm para los machos WT y 14,4 mm para los machos *asip1*-Tg (Fig. 19B).

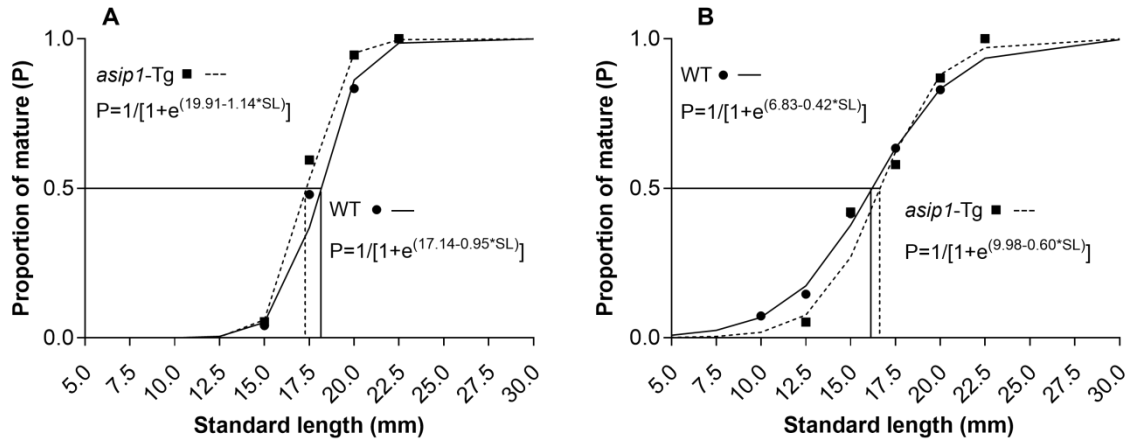


Figura 18. Ojiva de talla de primera madurez sexual basada en el análisis histológico de hembras WT y *asip1*-Tg durante 2 experimentos. A) experimento 1 y B) experimento 2 (● datos observados de hembras WT; — datos estimados de hembras WT; ■ datos observados de hembras *asip1*-Tg; -- datos estimados de hembras *asip1*-Tg)

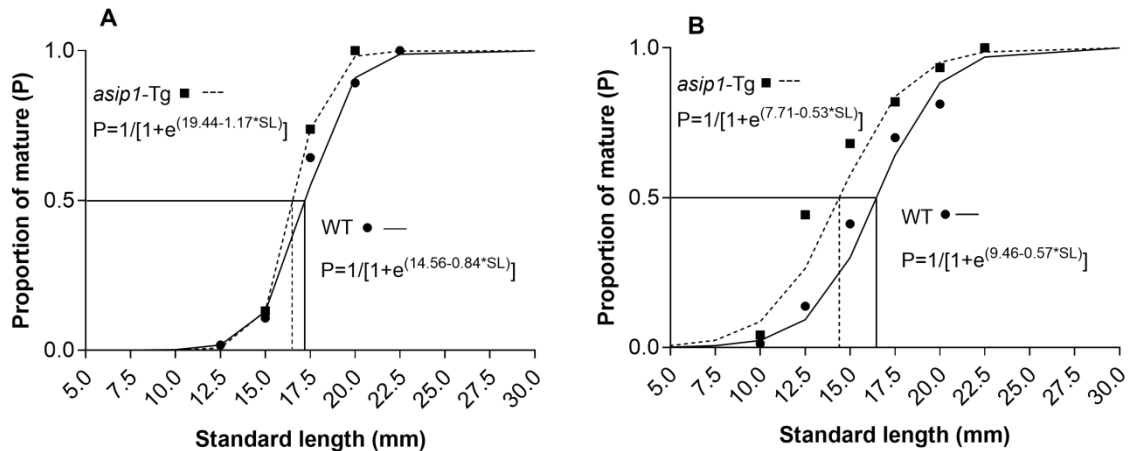


Figura 19. Ojiva de talla de primera madurez sexual basada en el análisis histológico de machos WT y *asip1*-Tg durante 2 experimentos. A) experimento 1 y B) experimento 2 (● datos observados de machos WT; — datos estimados de machos WT; ■ datos observados de machos *asip1*-Tg; -- datos estimados de machos *asip1*-Tg)

datos observados de machos WT; – datos estimados de machos WT; ■ datos observados de machos *asip1*-Tg; -- datos estimados de machos *asip1*-Tg)

En el experimento 1, la edad de las hembras maduras varió de 40 a 75 dpf. En el experimento 2 se observó que las hembras WT maduran a una edad más temprana que las hembras *asip1*-Tg (34 y 38 dpf, respectivamente). La función logística indica que por debajo de 46 dpf (experimento 1, Fig. 20A) y 42 dpf (experimento 2, Fig. 20B), la proporción de hembras maduras disminuye. A partir de 60 dpf en adelante, más de la mitad de las hembras estaban maduras (experimento 1: WT = 79%; *asip1*-Tg = 56% y experimento 2: WT = 73%; *asip1*-Tg = 53%), llegando al 100% de madurez a 75 dpf. Los resultados de madurez de los experimentos 1 y 2 estimaron que la edad media de madurez (E_{50}) para las hembras de la línea WT fue de 53-54 dpf y para el genotipo *asip1*-Tg fue de 58-59 dpf (Fig. 20A).

En cuanto a los machos, la edad de los peces maduros WT fue similar tanto en el experimento 1 como en el 2, oscilando entre 34 y 75 dpf. Por el contrario, se encontró que los machos *asip1*-Tg durante el experimento 1, mostraron madurez sexual de 40 a 75 dpf, mientras que en el experimento 2, los peces maduros ya pudieron identificarse a 30 dpf. La función logística indica que por debajo de 40 dpf (experimento 1, Fig. 21A) y 38 dpf (experimento 2, Fig. 21B), la proporción de machos maduros disminuye y al igual que las hembras, la mayoría de los machos alcanzaron la madurez a partir de 60 dpf, alcanzando el 100% de la madurez a 75 dpf. La ojiva de madurez de los experimentos 1 y 2 estimó que la E_{50} para los machos de la línea WT fue de 52-53 dpf y para el genotipo *asip1*-Tg, 53 dpf en el experimento 1 y 49 dpf en el experimento 2 (Fig. 21A, B).

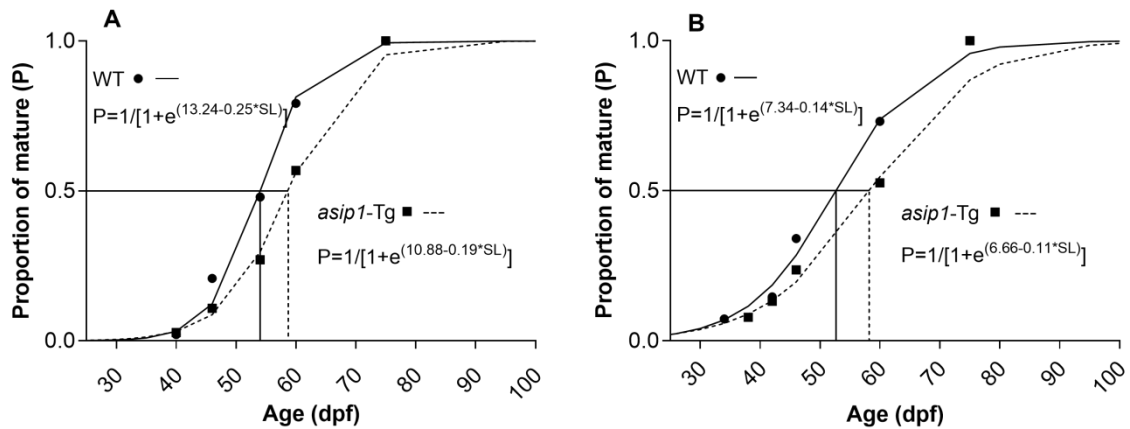


Figura 20. Ojiva de edad de primera madurez sexual basada en el análisis histológico de hembras WT y *asip1-Tg* durante 2 experimentos. A) experimento 1 y B) experimento 2 (● datos observados de hembras WT; — datos estimados de hembras WT; ■ datos observados de hembras *asip1-Tg*; -- datos estimados de hembras *asip1-Tg*)

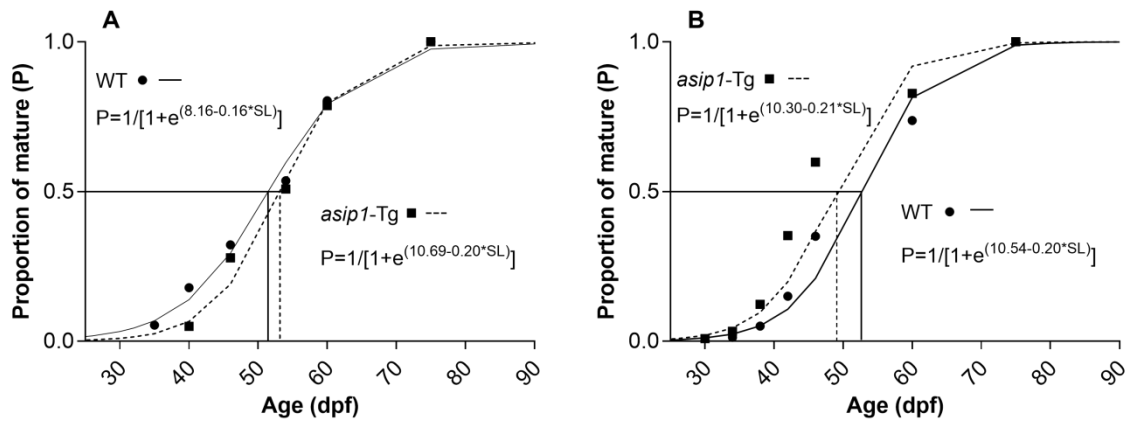


Figura 21. Ojiva de edad de primera madurez sexual basada en el análisis histológico de hembras WT y *asip1-Tg* durante 2 experimentos. A) experimento 1 y B) experimento 2 (● datos observados de hembras WT; — datos estimados de hembras WT; ■ datos observados de hembras *asip1-Tg*; -- datos estimados de hembras *asip1-Tg*)

4.2. Eficiencia reproductiva

La tasa de éxito del desove (es decir, el desove resultante de 1 o más huevos) fue del 97,14% para WT y del 77,14% para *asip1*-Tg (Fig. 22A). El número total de huevos por hembra fue significativamente mayor para *asip1*-Tg ($493,6 \pm 45,24$ huevos) que para la línea WT ($357,8 \pm 23,73$ huevos; Fig. 22B). El número absoluto de huevos contabilizados para todas las parejas reproductoras *asip1*-Tg fue de 13.327 y 12.166 para WT. Del mismo modo, el número de huevos fertilizados fue significativamente mayor para *asip1*-Tg ($463,4 \pm 48,37$ huevos) que para los peces WT ($287,5 \pm 27,13$ huevos; Fig. 22C). Sin embargo, *asip1*-Tg tuvo una mortalidad significativamente mayor ($55,5 \pm 3,78\%$) a 24 hpf en comparación con los peces WT ($36,19 \pm 4,3\%$; Fig. 22D). Sin embargo, a 48 hpf, encontramos diferencias significativas en la proporción de embriones eclosionados entre los peces WT ($61,93 \pm 4,95\%$) y *asip1*-Tg ($44,62 \pm 5,29\%$, Fig. 22E). Lo mismo se observó a 72 hpf, donde el genotipo WT tiene una mayor proporción de larvas eclosionadas ($92,27 \pm 1,94\%$) que los peces *asip1*-Tg ($80,96 \pm 3,75\%$; Figura 22F).

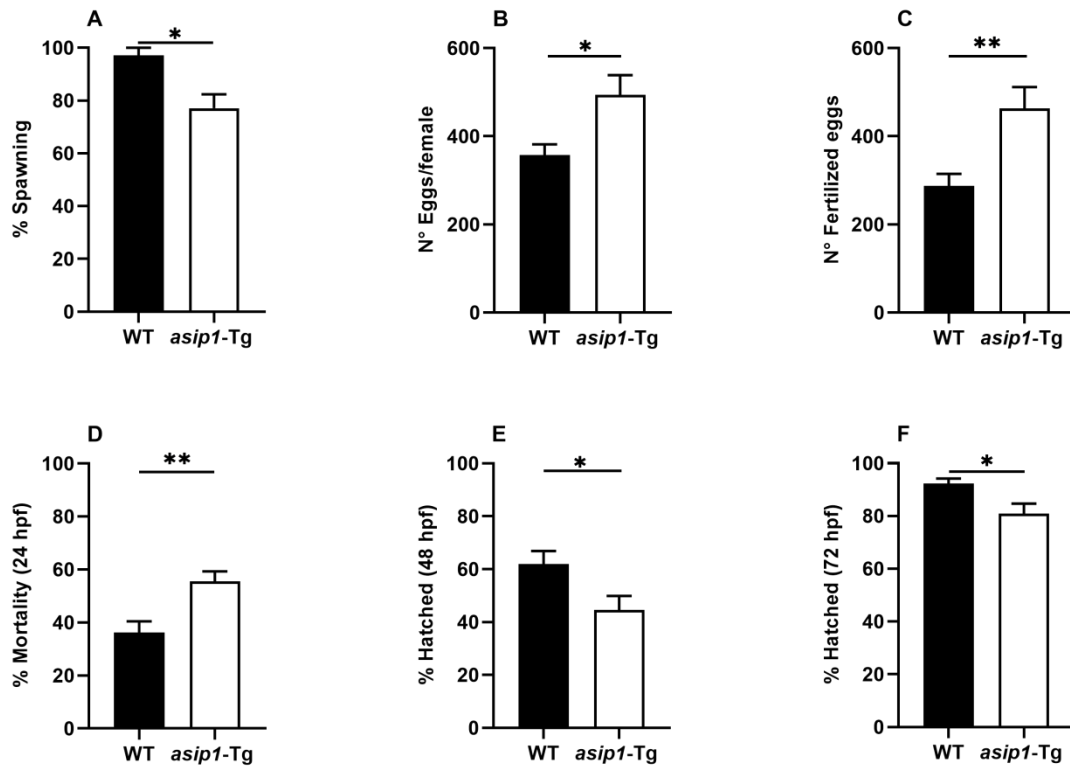


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de *asip1* en la función reproductiva del pez cebra adulto y la viabilidad de la descendencia. Promedio de ocurrencia de desove (A), número de huevos por hembra (B), número de huevos fertilizados (C), mortalidad de huevos a las 24 hpf (D), eclosión a las 48 hpf (E) y eclosión a las 72 hpf (F). Todos los datos representan la media \pm SEM. La significación estadística se indica con asteriscos (*), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Los huevos de peces WT fueron significativamente más grandes (1.294 ± 0.0038 mm) que los huevos de la línea *asip1*-Tg ($1,164 \pm 0,0031$ mm; Fig. 23A). De igual forma, los huevos de peces WT mostraron un diámetro de vitelo significativamente mayor (0.6623 ± 0.0027 mm) que *asip1*-Tg ($0,6028 \pm 0,0021$; Fig. 23B). También se observaron diferencias significativas en el volumen del saco vitelino, donde los huevos WT presentaron un volumen mayor ($0,0667 \pm 0,0026$ mm³) en comparación con los huevos de la línea *asip1*-Tg ($0,0459 \pm 0,0012$ mm³; Fig. 23C). Por otro lado, la longitud estándar de las larvas de

asip1-Tg recién eclosionadas (4 dpf) fue significativamente mayor (3.135 ± 0.0090 mm) que larvas WT (3.015 ± 0.0074 mm; Fig.23 D).

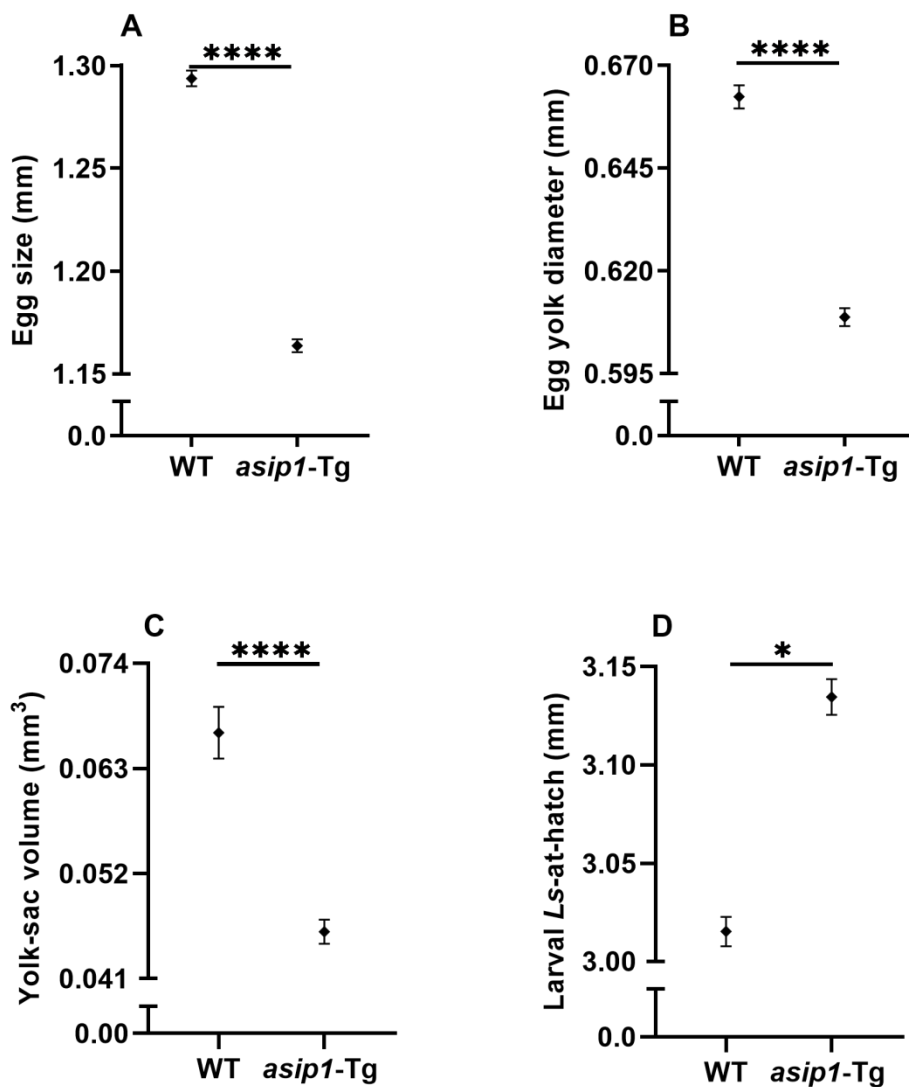


Figura 23. Evaluación morfológica de la descendencia. Promedio del tamaño del huevo (A), diámetro del vitelo (B), volumen del saco vitelino de la larva (C) y longitud estándar de la larva (Ls) al nacer (D). Todos los datos representan la media \pm SEM. La significación estadística se indica con asteriscos (*), * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

4.3. Rol del sistema de melanocortinas en la esteroidogénesis gonadal

4.3.1. Expresión del sistema de melanocortinas en gónadas de pez cebra

Los receptores de melanocortinas, sus proteínas accesorias y antagonistas se expresan tanto en ovario como en testículos de peces WT y *asip1*-Tg. En ovarios *asip1*-Tg (Fig.24A) *mc5ra* fue el receptor que mostró mayor incremento de expresión (~10 veces más), seguido por *mc1r*, *mc5rb*, *mc3r* y *pomcb*. El resto de los genes fueron detectados pero no mostraron diferencias significativas aparentes entre peces WT y *asip1*-Tg. En los testículos (Fig.24B), todos los genes fueron detectados pero solo *mc5ra* mostró una expresión relativa mayor en peces WT, aproximadamente 8 veces superior que la observada en peces *asip1*-Tg.

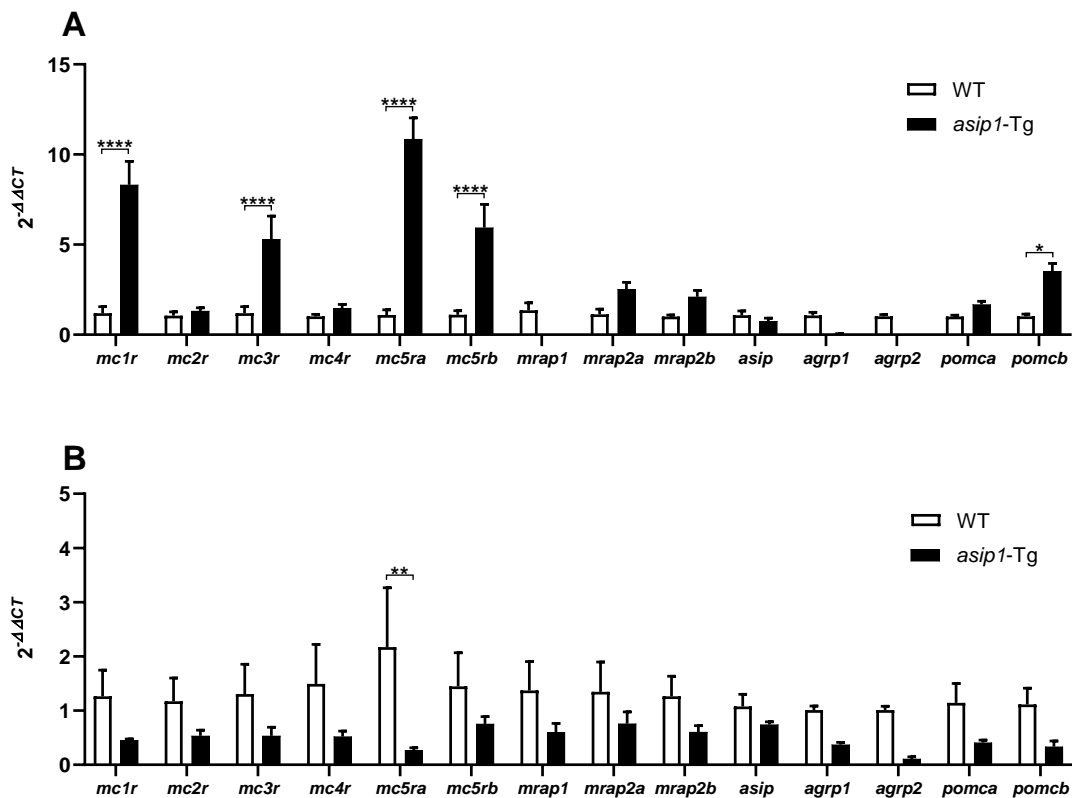


Figura 24. Expresión relativa de los componentes del sistema de melanocortinas en A) ovarios y B) testículos de peces WT y *asip1*-Tg. La expresión del gen *18s* se utilizó como

gen de referencia. Datos representados como la media \pm error estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

4.3.2. Expresión relativa de *mc4r* en folículos ováricos

La expresión de *mc4r* fue determinada por qPCR en folículos ováricos (Fig.25), los transcritos de este gen fueron detectados en los diferentes estadios foliculares desde PG a FG, tanto en peces WT como los *asip1*-Tg. Sin embargo, la expresión relativa de *mc4r* en folículos FG de peces *asip1*-Tg aumentó de forma significativa siendo aproximadamente 5 veces superior que los peces WT.

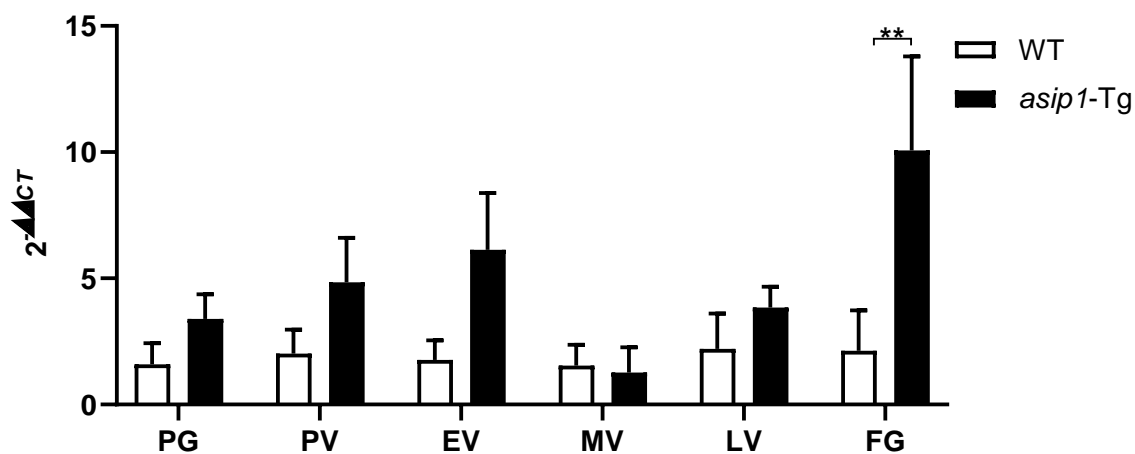


Figura 25. Expresión relativa del *mc4r* en los diferentes estadios foliculares. La expresión del gen *18s* se utilizó como gen de referencia. Datos representados como la media + error estándar. Asterisco (*) indica diferencias significativas, donde ** $p < 0.01$

4.3.3. Localización celular del RNAm de *mc1r* y de *mc4r* en ovarios y testículos

Para establecer la localización celular y la expresión dependiente de la etapa de maduración, los experimentos de ISH mostraron que tanto el RNAm de *mc1r* como el de *mc4r*, fueron localizados en los ovarios (Fig.26) y testículos (Fig.27). En ovarios, se identificó una señal fuerte y específica de *mc1r* (Fig.26A) y *mc4r* (Fig.26B) en células foliculares, además de encontrarse en el citoplasma de folículos previtelogénicos y vitelogénicos (Fig.26C-26D). No se observa señal en el compartimento intersticial. En los testículos, el citoplasma de células germinales parece estar fuertemente marcado (Fig.27A-27B). La señal de *mc1r* (Fig.27D) y de *mc4r* (Fig.27E) claramente sugiere una similitud con la expresión de *ddx4*, gen marcador de células germinales primordiales (Fig.27F) y con *piwil1*, indicador de espermatogonias de tipo A (Fig.27G). Sin embargo, las células de Leydig (*insl3*) y de células de Sertoli (*gsdf*), no se tiñeron (Fig.27H-27I), al igual que las células germinales en etapa de espermatidas y espermatozoides en el área intratubular (Fig.27C). No se observó señal con la sonda de cRNA sentido para *mc1r* y *mc4r* (datos no mostrados), lo que indica la especificidad de las sondas antisentido generadas contra la secuencia de mRNA de *mc1r* y *mc4r*.

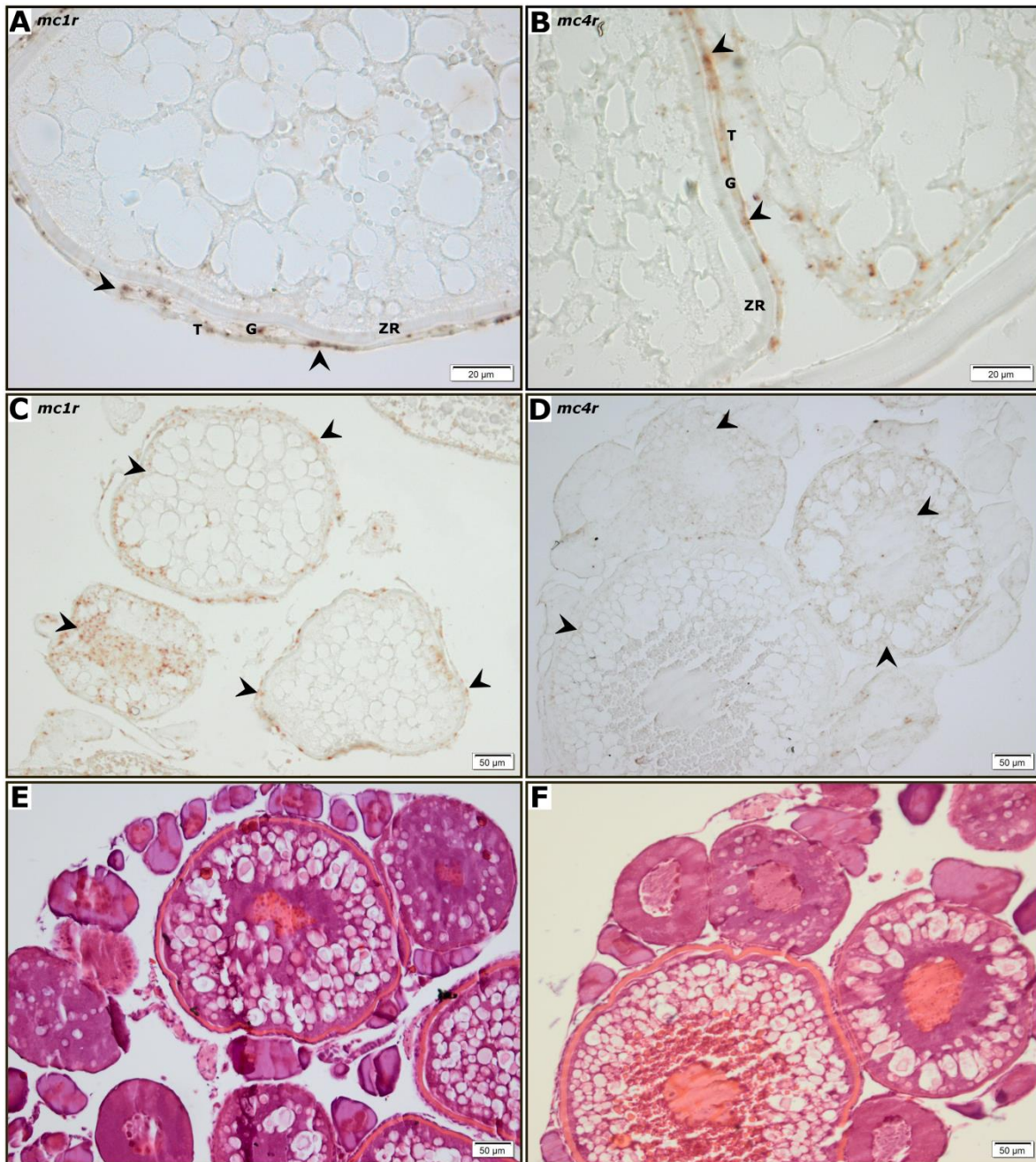


Figura 26. Localización de la expresión de transcritos de *mc1r* y *mc4r* en el ovario de pez cebra por hibridación *in situ*. A y B evidencian la señal positiva de *mc1r* y *mc4r* en células foliculares. C y D muestran una vista general de la expresión de *mc1r* y *mc4r* en folículos previtelogénicos y vitelogénicos. E y F son secciones consecutivas de C y D teñidas con hematoxilina-eosina. El área intersticial no mostró señal. T: teca, G: granulosa y ZR: zona radiata

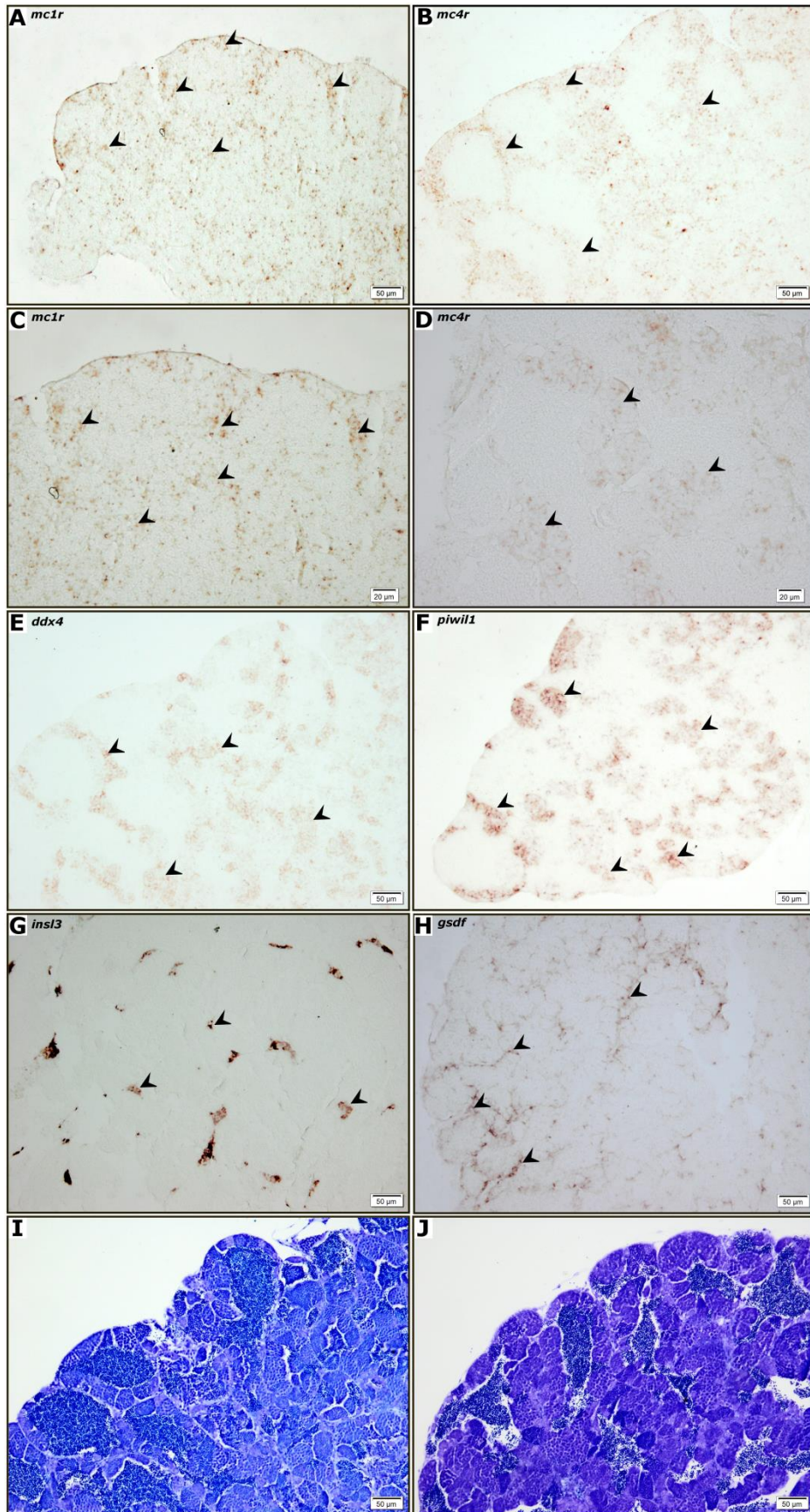


Figura 27. Localización de la expresión de transcritos de *mc1r* y *mc4r* en testículos de pez cebra mediante hibridación *in situ*. A y B muestran la expresión de *mc1r* y *mc4r* en células germinales, respectivamente. C y D muestran una vista detallada de A y B, lo que sugiere una similitud de la señal de expresión con E (*ddx4*, indicador de células germinales primordiales) y F (*piwil1*, indicador de espermatogonias tipo A), mientras que con G (*insl3*, indicador de células de Leydig) y H (*gsdf*, indicador de células de Sertoli) no muestran una similitud. I y J son secciones consecutivas de A y B teñidas con azul de toluidina

4.3.4. Efecto de las melanocortinas sobre la secreción basal de esteroides e inducida por hCG en gónadas de pez cebra

Los fármacos utilizados en los experimentos *in vitro* fueron utilizados previamente en células de riñón embrionario humano 293 que expresan transitoriamente receptores de melanocortinas de pez cebra (Guillot *et al.*, 2016). MTII es un potente agonista universal de los receptores de melanocortinas. Puede activar todos los receptores de melanocortina del pez cebra y compite con la proteína relacionada agutí humana (83-132)-NH₂, por unirse al receptor cuando ambos fármacos están presentes. SHU9119 es un potente antagonista sintético de Mc3r y Mc4r.

4.3.4.1. Secreción de estradiol por folículos ováricos

La adición de 10 UI/ml de hCG al medio de cultivo, causó un aumento de ~ 2 veces la liberación de E2 en comparación al grupo control (Fig.28). No se detectaron diferencias significativas en la secreción de E2 inducida por ACTH (1–24) o MTII. La adición de ACTH (1-24) tuvo un impacto en la producción de E2 inducida por hCG, donde la dosis más baja (10⁻⁸ M) redujo significativamente su secreción (~ 70%), mientras que a una dosis más alta (10⁻⁶ M) disminuyó la liberación de E2 aproximadamente un 115%. El tratamiento con MTII tuvo un efecto similar al de ACTH, pero con una mayor potencia, donde la dosis más alta (10⁻⁶ M) redujo en ~170% la producción de E2. También se estudió el efecto de los antagonistas. Tanto ASIP como SHU9119 inducen la liberación de E2 (sin hCG). ASIP

estimuló significativamente ($\sim 150\%$) a dosis de 10^{-8} y 10^{-7} M, mientras que SHU9119 indujo un aumento en todas sus dosis ($\sim 180\%$). Sin embargo, ASIP no tuvo un efecto significativo sobre la secreción de E2 inducida por HCG, mientras que la concentración más baja de SHU9119 (10^{-8} M) estimuló significativamente la producción de E2 ($\sim 77\%$).

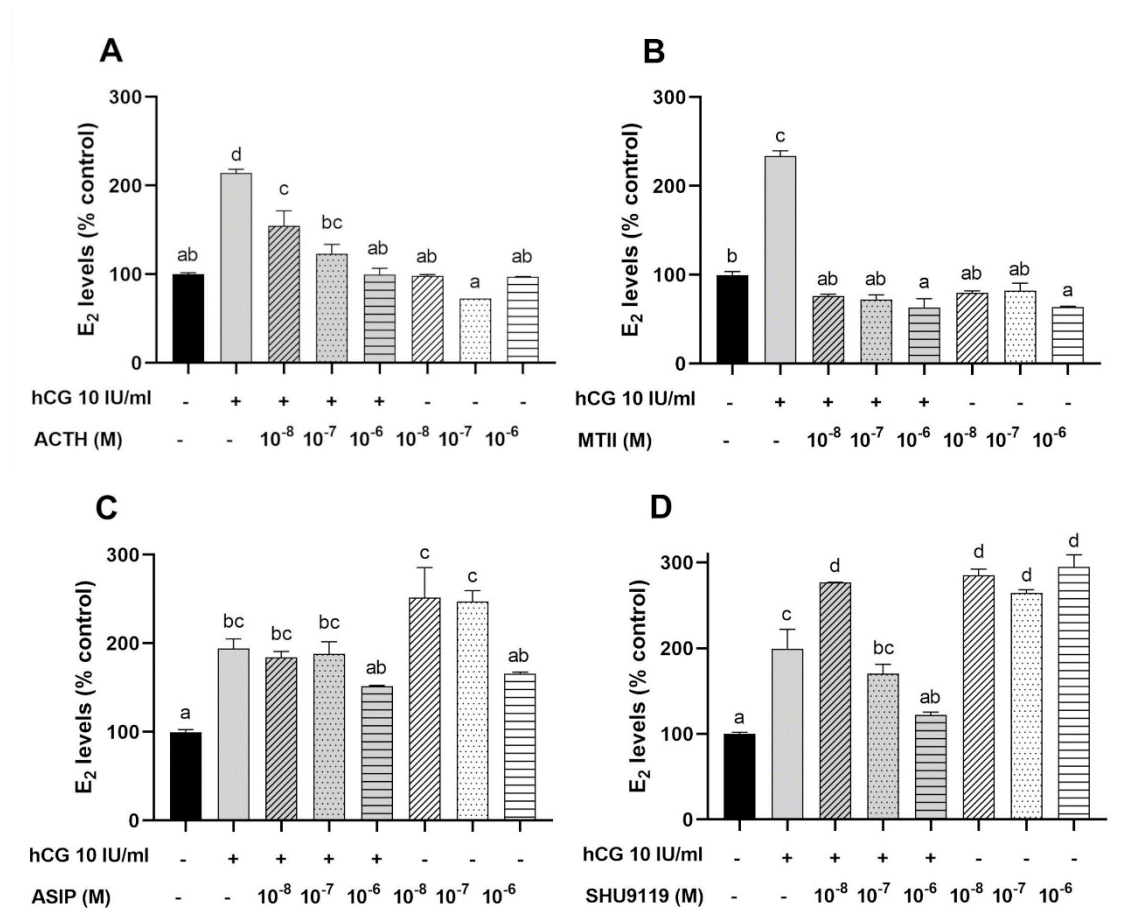


Figura 28. Efectos de los péptidos de melanocortina sobre la secreción basal de estradiol (E2) e inducida por la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) en folículos ováricos previtelogénicos y vitelogénicos de pez cebra. A) Efectos de la ACTH, B) análogos químicos de MSH (MTII), C) ASIP humano y D) antagonista químico (SHU9119). Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos tres veces. Los datos se expresan como un porcentaje del control (media \pm SEM). Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0.05$.

4.3.4.2. Secreción de testosterona por células testiculares

Como se esperaba, la incubación de células testiculares con 50 UI/ml de hCG estimuló significativamente la producción de T entre un 30% y 160% (Fig.29). Cuando se añadió 50 UI/ml de hCG junto a ACTH, MTII o SHU9119, no observamos diferencias significativas en los niveles de T, en relación al grupo control. Sin embargo, ASIP tuvo un efecto relacionado con la dosis, donde a una mayor concentración (10^{-6} M) potenció significativamente la secreción de T inducida por HCG (~170%). ACTH estimuló significativamente en dosis de 10^{-8} y 10^{-7} M la liberación de T (~145%) mientras que MTII, SHU9119 y ASIP por sí solos no inducen cambios significativos en relación a los niveles basales.

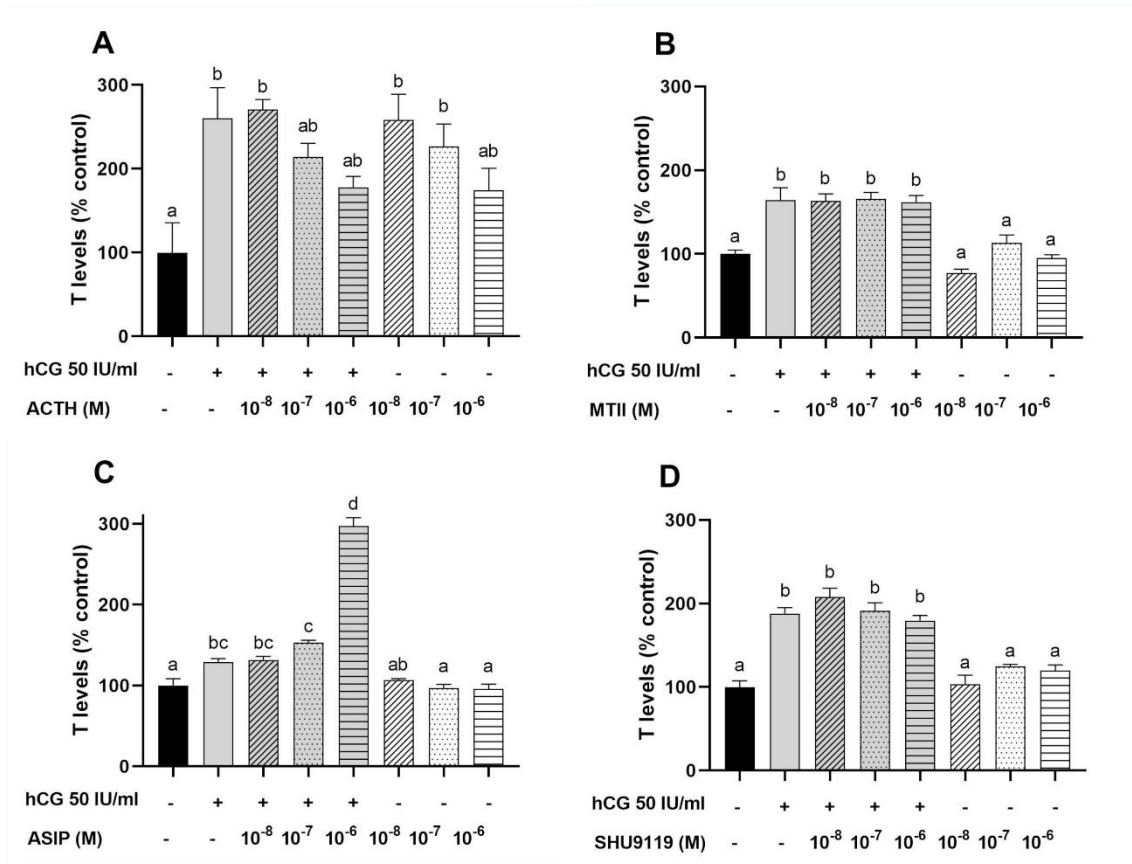


Figura 29 Efecto de los péptidos de melanocortina sobre la secreción basal de testosterona (T) e inducida por la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) en cultivos de células testiculares dispersas de pez cebra. A) Efectos de la ACTH, B) análogos

químicos de MSH (MTII), C) ASIP humano y D) antagonista químico (SHU9119). Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos tres veces. Los datos se expresan como un porcentaje del control (media \pm SEM). Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0.05$.

4.4. Rol del sistema de melanocortinas en la hipófisis

4.4.1. Colocalización celular de *mc4r* y gonadotropos usando sondas *fshb/lhb*

La colocalización de la expresión de *mc4r/lhb* y *mc4r/fshb* mostró la expresión de *mc4r* en gonadotropos de pez cebra adulto de forma cualitativa.

La señal de expresión de *fshb* fue alta en la mayoría de las células (Fig.30B), lo que llevó al enmascaramiento de la señal de expresión de *mc4r* dentro de las mismas células, aunque alguna expresión de *mc4r* puede ser detectada en gonadotropos que tiene una señal de expresión de *fshb* más baja (Fig.30C). También, el *mc4r* se detectó en algunas de las células de la hipófisis anterior que no expresaban *fshb* (Fig. 30A)

La señal de expresión de *lhb*, también era de una intensidad alta que enmascaraba la expresión de *mc4r* (Fig.31B). No obstante, *mc4r* parece expresarse en las mismas células que expresan *lhb*, los gonadotropos (Fig.31C). Algunas células de la hipófisis no expresan *lhb*, pero expresan *mc4r* (Fig.31A)

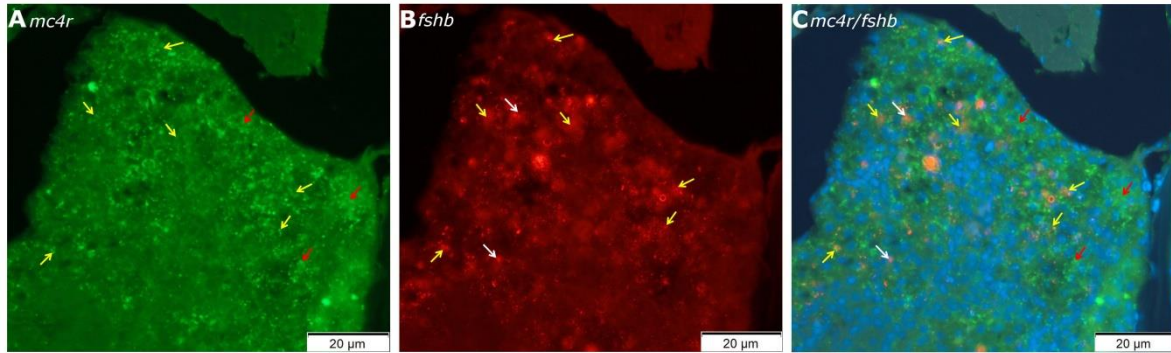


Figura 30. Expresión de transcritos de *mc4r* y *fshb* en hipófisis de pez cebra, donde A) flechas rojas indican expresión de *mc4r* y B) flechas blancas indican expresión de *fshb*. Flechas amarillas indican colocalización de *mc4r/fshb*

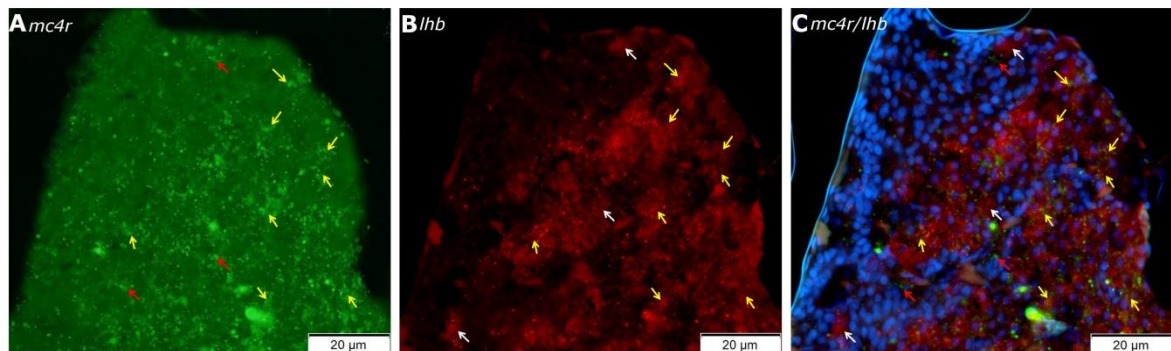


Figura 31. Expresión de transcritos de *mc4r* y *lhb* en hipófisis de pez cebra, donde A) flechas rojas indican expresión de *mc4r* y B) flechas blancas indican expresión de *lhb*. Flechas amarillas indican colocalización de *mc4r/lhb*

4.4.2. Efecto de las melanocortinas en la expresión *in vitro* de gonadotropinas

En la hipófisis de hembras, la incubación con LHRH causó un aumento de la expresión de *fshb* en comparación al grupo control. MTII, un agonista no selectivo de los MCRs (excepto para el Mc2r) reguló significativamente al alza la expresión de *fshb* pero sin diferencias significativas con la expresión inducida por LHRH. El tratamiento con ASIP, un antagonista selectivo para Mc1r y Mc4r, no tiene efecto en la expresión de *fshb* (Fig. 32A). Como se esperaba, en la hipófisis de machos LHRH reguló significativamente al alza la expresión de *fshb*. MTII no tuvo efecto por sí mismo ni tampoco potenció la expresión inducida por LHRH. Es más, parece inhibir la estimulación inducida por LHRH. Esta tendencia se aprecia también en el grupo LHRH+ASIP, sin embargo, ASIP por si solo indujo la expresión de *fshb*, pero con menor efecto que el de LHRH (Fig. 32B).

En cuanto a la expresión de *lhb* en la hipófisis de hembras, LHRH aumentó significativamente su expresión (~5 veces) (Fig. 32C), mientras que en machos la inducción fue sensiblemente menor (~4 veces) (Fig. 32D). Los tratamientos con MTII y ASIP no tienen un efecto *per se*, ni potencian el efecto de LHRH sobre la expresión de *lhb*.

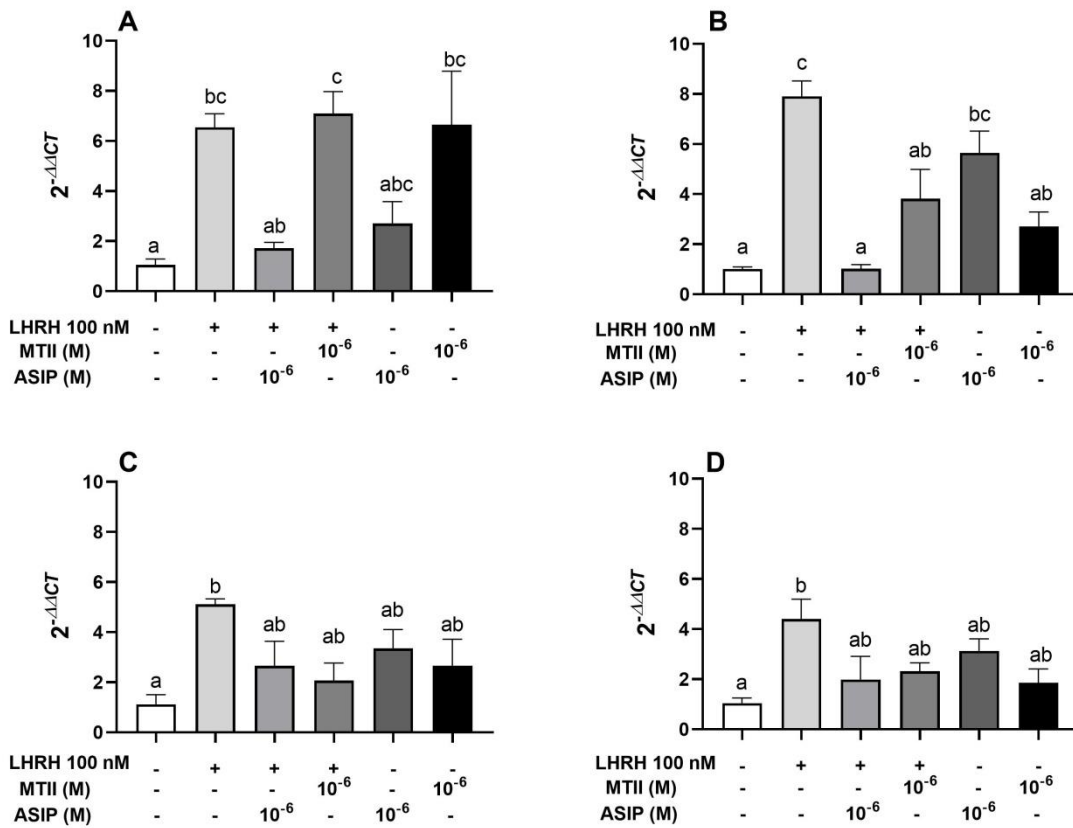


Figura 32. Efectos de las melanocortinas en la expresión *ex vivo* del ARNm de *fshb* (A-B) y *lhb* (C-D) en la hipófisis de hembras (A-C) y machos (B-D). Los datos se expresan como la media \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0.05$.

5. Discusión

5.1. Rol del sistema de melanocortinas en el crecimiento y pubertad

5.1.1. Análisis del crecimiento

Resultados previos han demostrado que la sobreexpresión de *asip1* en el pez cebra mejoró el crecimiento lineal (Guillot *et al.*, 2016) pero independientemente de la edad, las primeras diferencias se detectaron solo después de un tamaño crítico cercano a los 20 mm (Godino-Gimeno *et al.*, 2020). Nuestros datos muestran consistentemente que tanto machos como hembras *asip1*-Tg son significativamente más pequeños que los peces WT a 75 dpf, justo cuando los peces *asip1*-Tg están por debajo de 20 mm. Sin embargo, justo tras la eclosión los peces *asip1*-Tg exhiben un tamaño mayor a pesar de su diámetro de huevo y vitelo más pequeño y, por extensión, menor volumen. En consecuencia, la eliminación de *agrp1* por técnicas de morfolino o ablación química de las neuronas *agrp1* en el pez cebra da como resultado animales más cortos en comparación con su contrapartida salvaje a 8 dpf (Löhr *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2012). Nuestros datos confirman que los efectos positivos de la sobreexpresión de *asip1*, y por extensión de la señalización reducida del sistema de melanocortinas, sobre el crecimiento del pez cebra requiere un umbral de longitud cercano a los 20 mm, justo cuando se alcanza el desarrollo gonadal completo. Por lo tanto, los peces *asip1*-Tg eclosionaran más grandes y exhibieran un crecimiento reducido hasta completar el desarrollo gonadal. A partir desde este momento, los peces *asip1*-Tg crecerán más rápido que los WT, con diferencias de longitud que alcanzarán el 15% (Godino-Gimeno *et al.*, 2020; Guillot *et al.*, 2016).

Si bien se han investigado los mecanismos endocrinos y moleculares que promueven el crecimiento bajo la actividad reducida de las melanocortinas, aún están lejos de ser entendidos. En larvas de pez cebra, el crecimiento somático estándar requiere la señalización de *agrp1* a través de *mc4r* (Godino-Gimeno *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2012). Por lo tanto, el knockdown de *agrp1* por la técnica de morfolino resultó en una disminución de la expresión de la hormona del crecimiento (*gh*), relacionado con el aumento de la hormona liberadora de *gh* (*ghrh*) y la disminución de la expresión de

somatostatina I y II (*sstI* y *sstII*) (Zhang *et al.*, 2012). Recientemente, se propuso un mecanismo que involucra el sistema de melanocortinas en el crecimiento inducido por la alimentación en larvas de pez cebra. La sobrealimentación causa resistencia a la leptina y niveles hipotalámicos reducidos de *pomc*, lo que lleva a una actividad reducida de las neuronas *sst* que expresan *Mc4r* y, en consecuencia, a una expresión elevada de *gh* y crecimiento somático (Löhr *et al.*, 2018). Por lo tanto, es posible que la sobreexpresión de *agrp1* o *asip1* en el pez cebra promueva el crecimiento somático a través de las neuronas *sst* y su efecto sobre la secreción de Gh

5.1.2. Adquisición de la pubertad

El desarrollo gonadal en el pez cebra se puede dividir en tres procesos fundamentales: determinación del sexo, diferenciación y mantenimiento. Si bien es clara la dirección en la que ocurren estos procesos, el tiempo puede ser muy variable. Se sabe que el sexo del pez cebra, en la naturaleza, está determinado por factores genéticos sobre una base poligénica (Anderson *et al.*, 2012; Bradley *et al.*, 2011; Liew *et al.*, 2012; Liew y Orbán, 2014). Sin embargo, las proporciones de sexos en las líneas criadas en condiciones de laboratorio pueden estar muy influenciadas por factores ambientales como la temperatura, la nutrición y la densidad de población (Lawrence *et al.*, 2008; Liew *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2017a; Ribas *et al.*, 2017b). En el experimento 1 de nuestro estudio, observamos una proporción de sexos sesgada en favor de las hembras WT y *asip1*-Tg que también se encontró en la población WT en el experimento 2. El aumento de la incidencia de hembras en las líneas WT y *asip1*-Tg, indica que se aplicaron iguales condiciones de cría a ambas poblaciones de peces, en particular durante el período de determinación del sexo, y que estas han favorecido una proporción de sexos sesgada hacia las hembras. La diferenciación sexual se observó por primera vez a 32 dpf (experimento 1) y 30 dpf (experimento 2) en ambas líneas de peces, pero el porcentaje de animales diferenciados fue mayor en la línea WT que en la línea *asip1*-Tg de acuerdo con el retraso en el crecimiento de la línea *asip1*-Tg.

En el pez cebra, el inicio de la pubertad depende del crecimiento somático más que de la edad (Chen y Ge, 2013; Hu *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2017). En consecuencia, encontramos una fuerte asociación positiva entre el crecimiento y el desarrollo gonadal en las líneas WT y *asip1*-Tg. En hembras, la transición del estado de crecimiento primario a previtelogénico en la primera cohorte de folículos en desarrollo define el inicio de la pubertad (Ge, 2005; Taranger *et al.*, 2010). La función logística aplicada a los datos de maduración en hembras muestra que la longitud corporal de 15 mm en el experimento 1 y 12,5 mm en el experimento 2 puede ser un umbral para alcanzar la madurez tanto en las líneas WT como en *asip1*-Tg. Estas longitudes corporales difieren de las publicadas anteriormente para hembras de las líneas de pez cebra *Albino* (Chen y Ge, 2012, 2013) y Casper (White *et al.*, 2008), que comienzan la maduración sexual a una longitud corporal crítica de 18 mm (Chen y Ge, 2013; Lessman y Brantley, 2020). El acervo genético Tubingen (TU) de nuestras líneas WT y transgénica podría explicar estas diferencias observadas, ya que se sabe que un fuerte componente genético afecta el tamaño al cual se alcanza la pubertad. La L_{50} (longitud a la que el 50% de los individuos alcanzan la primera madurez sexual) se utiliza generalmente como un índice para comparar los patrones de maduración entre diferentes grupos de peces. Utilizando nuestro modelo logístico, calculamos un L_{50} global de 17 mm (valor medio de los experimentos 1 y 2) para las líneas WT y *asip1*-Tg. Aunque la longitud corporal en la pubertad no se altera en las hembras *asip1*-Tg, las estimaciones de A_{50} (edad en la que el 50% de los individuos alcanzaron la madurez) difirió entre los genotipos ya que los peces WT maduraron a edad más temprana que los peces transgénicos. Sin embargo, la diferencia fue de solo 5 días. Como era esperable, los machos comenzaron a madurar a una longitud menor que las hembras, pero en un momento parejo. La función logística aplicada a los datos de maduración para machos muestra que la longitud corporal de 12,5 mm en el experimento 1 y 10 mm en el experimento 2 parecen ser el umbral de talla para alcanzar la madurez tanto en las líneas WT como en *asip1*-Tg. Una vez más, estos valores difieren de los publicados para los machos de la línea de pez cebra Casper, que comienzan la maduración sexual a una longitud corporal crítica de 17 mm (Lessman y Brantley, 2020). Sin embargo,

estas diferencias podrían ser atribuidas al acervo genético de la línea TU. Según nuestras ojivas de madurez, el tamaño de madurez de los machos *asip1*-Tg es ligeramente menor que el de WT, pero las diferencias son mínimas (0,7 mm en el experimento 1 y 1,4 mm en el experimento 2). Las estimaciones de A_{50} difieren entre genotipos donde los peces *asip1*-Tg maduraron 4 días antes que los machos WT, pero solo en el experimento 2. En general, los datos del presente estudio indican que el sistema de melanocortinas no es crucial en la pubertad en el pez cebra, ya que la sobreexpresión de *asip1* no tuvo efecto fenotípico sobre la pubertad. Nuestros resultados, junto con estudios previos realizados en knockouts de *mc4r* en medaka (Liu *et al.*, 2019a) y en peces *X. hellerii* que portan solo alelos funcionales de *Mc4r* (Liu *et al.*, 2020a), sugieren que la regulación del inicio de la pubertad por la señalización de *Mc4r* en especies del género *Xiphophorus* puede ser una adaptación evolutiva que solo se conserva por completo en este linaje.

5.1.3. Eficiencia reproductiva

Los estudios sobre las vías controladas por el MC4R que regulan el potencial reproductivo, se han centrado principalmente en ratones (Sandrock *et al.*, 2009) y pollos (Aggag y El-Sabrou, 2018). Sin embargo, en teleósteos pocos estudios han enfocado este aspecto. En *Xiphophorus*, el locus *P* también controla la fecundidad de las hembras. El genotipo P^1P^1 madura antes y produce más huevos que las hembras P^5P^5 de maduración tardía. A pesar de su mayor tamaño, las hembras P^5P^5 constantemente generan menos huevos que las hembras de cualquier otro genotipo (Kallman y Borkoski, 1978). A diferencia de *Xiphophorus*, hemos demostrado que las hembras *asip1*-Tg producen más huevos que las hembras WT pero desovan con menos frecuencia. El número de huevos fertilizados en hembras *asip1*-Tg también es mayor pero la tasa de eclosión a las 48 y 72 h es menor. El aumento en la fecundidad de las hembras *asip1*-Tg se asocia con una disminución del diámetro de los oocitos. Las hembras de vertebrados ovíparos tienen un equilibrio entre el tamaño y número de huevos, por lo que si el tamaño aumenta, el número de huevos disminuye y viceversa (Forbes *et al.*, 2010). El menor tamaño de los huevos también está relacionado con una reducción en el diámetro y volumen del vitelo. Los huevos de buena calidad a menudo muestran bajos niveles de mortalidad en la

fertilización, etapa de ova con ojo, eclosión y la primera alimentación (Bromage *et al.*, 1992). Si bien, no hay acuerdo sobre qué niveles de mortalidad constituyen un huevo de buena calidad, la mortalidad embrionaria de *asip1*-Tg a las 24 h fue más alta que la de WT, lo que sugiere que los huevos de *asip1*-Tg tienen una calidad inferior.

El vitelo es el principal componente de los huevos recién fertilizados y se asocia a los nutrientes almacenados para el desarrollo embrionario (Kamler, 2007). Los huevos producidos por los peces WT tenían un diámetro de vitelo mayor que los huevos *asip1*-Tg, lo que implica un mayor recurso energético para los embriones en desarrollo. Sin embargo, la longitud estándar de las larvas de *asip1*-Tg eclosionadas fue significativamente mayor que la de las larvas de WT. Se sabe que el tamaño corporal de las larvas resulta no solo de la tasa de crecimiento de los embriones y el volumen del saco vitelino, sino también de la eficiencia en la utilización de la energía por parte de las larvas para el crecimiento y del contenido de energía del vitelo (Kamler, 2007). Las diferencias en el contenido de energía del vitelo dependen, a su vez, del tamaño y de su valor calórico (Kamler, 2007). Debido a que el volumen del saco vitelino difirió significativamente entre ambos genotipos, el aumento de la longitud estándar en la eclosión de los animales *asip1*-Tg puede sugerir un mejor uso de la energía del vitelo por esta línea, promoviendo mayores tasas de crecimiento. También observamos que el tiempo de eclosión de las larvas de *asip1*-Tg se retrasó en comparación con las larvas WT. Un retraso en el tiempo de eclosión también se ha observado en medakas (*Oryzias latipes*) defectivos para el gen *mc4r* ("knockouts"). Sin embargo, los autores concluyeron que, contrariamente a nuestros resultados en el peces *asip1*-Tg, este retraso se debe a una disminución en la tasa de crecimiento, en lugar de un aumento en la longitud del cuerpo (Liu *et al.*, 2019a). El engrosamiento de la capa externa del corion dificulta la liberación del embrión y se ha propuesto que es responsable de los retrasos en la eclosión (Uusi-Heikkilä *et al.*, 2010). Desafortunadamente, no medimos el grosor del corion en embriones *asip1*-Tg. En general, nuestros hallazgos sugieren que los peces *asip1*-Tg tienen un menor rendimiento reproductivo en comparación con los peces WT, lo que se refleja en una menor calidad del huevo y el diámetro del vitelo, un retraso en el tiempo de eclosión y el crecimiento

larvario. Sin embargo, se necesitan más estudios para investigar los mecanismos detrás de las diferencias observadas en la tasa de crecimiento larvario, así como el contenido de vitelo entre ambos genotipos.

5.2. Rol del sistema de melanocortinas en la esteroidogénesis gonadal

5.2.1. Expresión del sistema de melanocortinas en tejido gonadal

Para establecer la relación entre los componentes del sistema de melanocortinas, se determinaron sus niveles de expresión relativos conjuntamente en un solo estudio. Los 14 genes conocidos implicados en la actividad del sistema de melanocortinas se detectaron en las gónadas de peces adultos WT y *asip1*-Tg. No se detectaron diferencias genotípicas en los machos (excepto *mc5ra*), sin embargo, las hembras *asip1*-Tg sobreexpresaron varios receptores de melanocortinas (*mc1r*, *mc3r*, *mc5ra* y *mc5rb*) junto con *pomcb*, lo que sugiere que *asip1* podría regular al alza la expresión del receptor, aumentando así la sensibilidad ovárica al agonista de melanocortina.

En mamíferos, la expresión del *mc1r* ha sido reportada en células de Leydig y cuerpo lúteo (Thörnwall *et al.*, 1997), cuya función está relacionada con la síntesis de esteroides en machos y hembras, respectivamente. En platy (*Xiphophorus maculatus*), medaka (*Oryzias latipes*) y mero de manchas naranjas (*Epinephelus coioides*), se detectaron transcritos de *mc1r* en órganos adultos, incluidos los testículos y el ovario, mientras que en el pez cebra solo se detectó en los testículos (Cortés *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2020; Selz *et al.*, 2007). En este estudio, se detectó el *mc1r* en ovarios y testículos, pero su expresión fue significativamente mayor en hembras *asip1*-Tg, lo que sugiere que, a nivel del ovario, la sobreexpresión del antagonista natural de Mc1r, *asip1*, podría aumentar la expresión del receptor.

El riñón anterior es el sitio principal para la expresión del *mc2r*. Sin embargo, como se publicó con anterioridad (Aguilleiro *et al.*, 2010; Alsop *et al.*, 2009), nuestros estudios muestran que *mc2r* se expresa tanto en las gónadas femeninas como masculinas. La

distribución es similar a la publicada en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Aluru y Vijayan, 2008) y carpa (*Cyprinus carpio*) (Metz *et al.*, 2005), mientras que en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el *mc2r* solo se detectó en testículos (Agulleiro *et al.*, 2013b). Además, no se observaron diferencias significativas entre los peces WT y los transgénicos.

En humanos, *mc3r* se expresa en tejidos periféricos como el intestino, la placenta, los riñones, el corazón, las células inmunitarias, los ovarios y los testículos (Chhajlani, 1996). En ratones, transcritos del *mc3r* se detectaron en testículos fetales (O'Shaughnessy *et al.*, 2003) y en todos los tejidos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada de ratones adultos, incluido el testículo, aunque en niveles más bajos (Dowejko, 2014). En vacas, su expresión se encontró en las células de la granulosa y del cuerpo lúteo (Amweg *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran la presencia de RNAm del *mc3r* en las gónadas, similar a los resultados obtenidos en el pez de las cavernas (*Onychostoma macrolepis*) (Wu *et al.*, 2021), la trucha arcoíris (Yu *et al.*, 2022) y el culter de boca alta (*Culter alburnus*) (Ji *et al.*, 2021) pero con una mayor expresión significativa en hembras *asip1-Tg*. Los transcritos del *mc4r* están presentes principalmente en el sistema nervioso central (Gantz y Fong, 2003). Sin embargo, este gen también se ha detectado en numerosos tejidos periféricos, incluyendo las gónadas de varios organismos, entre ellos el pez cebra (Agulleiro *et al.*, 2013a; Agulleiro *et al.*, 2013b; Ringholm *et al.*, 2002). Aunque en este estudio observamos que la expresión de *mc4r* es baja, en los teleósteos ya se ha identificado un posible rol de Mc4r en la regulación del desarrollo gonadal (Zhang *et al.*, 2020) y la reproducción (Lampert *et al.*, 2010). El *mc5r* se expresa en una variedad de tejidos como el músculo esquelético y el cerebro, con niveles detectables, también, en los testículos de ratones adultos (Fathi *et al.*, 1995). En ratones fetales, se detectó en espermatogonias y algunas células mesenquimales (Nimura *et al.*, 2006). En aves, se encontró en los ovarios y testículos (Takeuchi y Takahashi, 1998), mientras que en la trucha arcoíris se detectó en el riñón anterior o cefálico y en el ovario (Haitina *et al.*, 2004). En el pez cebra, *mc5ra* y *mc5rb* se expresan en gran medida en el ovario, el cerebro y el tracto gastrointestinal (Ringholm *et al.*, 2002). En el presente estudio se detectaron ambas copias en ovarios y

testículos. Sin embargo, *mc5ra* tenía una mayor expresión en los ovarios *asip1*-Tg y los testículos WT.

En humanos, las isoformas de *mrp1* exhiben diferentes niveles de expresión en múltiples tejidos, incluidos los ovarios y los testículos (Metherell *et al.*, 2005). En medaka (Liu *et al.*, 2019a), el pez cabeza de serpiente (*Channa argus*) (Wen *et al.*, 2021), mero de manchas naranjas (Rao *et al.*, 2019) y carpa de hierba (*Culter alburnus*) (Tao *et al.*, 2020) *mrp2* también se distribuyó ampliamente en varios tejidos, con una expresión relativamente alta en las gónadas. En el pez cebra, *mrp1* se expresa principalmente en el tejido adiposo y el riñón anterior, mientras que *mrp2* se detecta en una variedad de tejidos, así como en testículos y ovarios (Aguilleiro *et al.*, 2010). Nuestros resultados muestran que todas las isoformas de Mrp se expresan en las gónadas. *mrp2a* y *mrp2b* se expresan principalmente en los ovarios, mientras que *mrp1* se encuentra en niveles residuales. En los testículos se detectan todas las isoformas de Mrp pero sus niveles de expresión en peces *asip1*-Tg son reducidos. Este patrón de expresión sugiere un papel diferencial de cada isoforma de Mrp en la modulación de la señalización de Mcr en las gónadas, pero se requieren más estudios para dilucidar una relación con el sexo y la sobreexpresión de *asip1*.

En cuanto a los antagonistas de las melanocortinas, *asip1* se encontró en niveles detectables en ovarios y testículos tanto en peces WT como *asip1*-Tg y aunque se detectó expresión de *agrp1* y *agrp2* en los testículos de ambas líneas, en las hembras *asip1*-Tg su presencia fue residual. En el pez dorado (*Carassius auratus*) y medaka, *agrp* se expresa en una variedad de tejidos, incluidos los testículos y los ovarios (Cerdá-Reverter y Peter, 2003; Liu *et al.*, 2019b), mientras que en humanos y roedores se expresa en los testículos. (Shutter *et al.*, 1997) y ovarios (Ollmann *et al.*, 1997). Por lo tanto, los presentes resultados implican que las melanocortinas no solo tienen diversas funciones, sino que los antagonistas endógenos pueden desempeñar un papel en la regulación de Mcr en tejidos periféricos (Takeuchi *et al.*, 1999).

El *pomc* se ha detectado en ovarios y testículos de varias especies de vertebrados, incluidos los peces, lo que respalda un papel conservado de Pomc en la regulación de la reproducción (Endo y Park, 2004). La presencia de *pomc* en las líneas celulares Leydig TM3 y 110A sugiere un sitio de síntesis y efectos paracrinos en el testículo (Chen *et al.*, 1984). En este estudio, ambas copias se detectaron con mayor expresión en ovarios *asip1-Tg* y testículos WT. Aunque no fue posible analizar la presencia de péptidos derivados de *pomc*, se sabe que en el ovario, el contenido cambia según el momento del ciclo reproductivo, lo que sugiere un papel de estos péptidos en la modulación directa de la actividad ovárica (Facchinetti *et al.*, 1993; Facchinetti *et al.*, 1988; Mosconi *et al.*, 1994; Polzonetti-Magni *et al.*, 1994).

Los peces cebra adultos tienen ovarios asincrónicos que contienen folículos en todas las etapas de desarrollo (Niimi y LaHam, 1974). Por lo tanto, la interpretación de los datos transcripcionales a nivel de órgano puede verse desafiada por la complejidad celular del ovario. Al eliminar la heterogeneidad como factor de confusión, a través de la clasificación y separación de los folículos, se puede estudiar mejor la biología del ovario. Se detectaron transcritos de *mc4r* en todas las etapas del desarrollo del ovario en peces WT, sin cambios significativos. Sorprendentemente, los niveles de *mc4r* en folículos completamente desarrollados de *asip1-Tg* fueron ≈ 5 veces más altos que en animales WT. La energía se almacena, en enormes cantidades, en los oocitos en crecimiento y maduración. Esta energía se acumula en forma de vitelo en los alvéolos corticales, que contienen una mezcla altamente compleja de proteínas, lípidos y las proteínas derivadas de las vitelogeninas (Hara *et al.*, 2016). Los estudios de hibridación *in situ* en ovarios mostraron que el *mc1r* y *mc4r* se expresan en las células foliculares y en el ooplasma de oocitos previtelogénicos y vitelogénicos. En peces, la α -MSH se localizó en las células foliculares de oocitos previtelogénicos, vitelogénicos y en maduración, y también en el citoplasma de las oogonias (Facchinetti *et al.*, 1993; Masini *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1994). Por lo tanto, según nuestros resultados, parece probable que las melanocortinas participen directa o indirectamente en el control endocrino de la vitelogénesis, a través de la modulación de la síntesis de E2, y en el metabolismo de los lípidos por vía autocrina o

paracrina en el ovario del pez cebra. En consecuencia, los huevos producidos por peces WT tienen un diámetro de vitelo mayor que los huevos *asip1-Tg* (Navarro *et al.*, 2021), lo que sugiere diferencias en la absorción y el procesamiento de vitelogenina en proteínas de vitelo entre ambas líneas.

Nuestros resultados también demuestran que la expresión de *mc4r* y *mc1r* aparece en las células germinales testiculares. Sin embargo, no se observó señal en las células somáticas (Sertoli y Leydig). El patrón de distribución obtenido es similar al del gen *ddx4* que codifica para Vasa, considerado como un gen marcador universal de células germinales (Kim *et al.*, 2015). También se asemeja a la distribución de *piwil1*, un marcador de espermatogonias tipo A y B (Chen *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2009) y espermatocitos primarios, aunque a un nivel más bajo. En conjunto, esta evidencia es consistente con el papel de la melanocortina en la espermatogénesis del pez cebra. Las melanocortinas podrían actuar sobre las células germinales que expresan *mc4r* y *mc1r*, donde los efectos mediados por el receptor de melanocortina más notables estarían en las espermatogonias.

5.2.2. Efecto *in vitro* de las melanocortinas sobre la secreción basal e inducida de esteroides en ovarios y testículos

Los resultados del presente trabajo muestran que los péptidos de melanocortina pueden modular la síntesis de E2 a partir de cultivos celulares *in vitro* de folículos ováricos de pez cebra adulto. Sus acciones pueden conducir tanto a una disminución (agonistas) como a un aumento (antagonistas) en las concentraciones de E2, lo que agrega una complejidad adicional. Estudios previos han demostrado que la ACTH suprime la secreción de E2 estimulada por hCG en los folículos del pez cebra (Alsop *et al.*, 2009). Nuestros resultados apoyan estos hallazgos. La ACTH inhibió la producción de E2 estimulada por hCG de los folículos ováricos de pez cebra de manera dependiente de la dosis. La mayor inhibición se observó con la dosis más alta (10^{-6} M), concentración que se encuentra en el rango de otros estudios que evocaron efectos fisiológicos (Alsop *et al.*, 2009; Sousa *et al.*,

2015). La ACTH también puede inducir daños en el ADN en los estadios I y II del folículo ovárico y la vacuolización de los oocitos sin afectar su viabilidad (Sousa *et al.*, 2015).

Por lo tanto, nuestros resultados confirman la fuerte evidencia descrita anteriormente, de un papel de la ACTH en los efectos mediados por el estrés en la gametogénesis femenina. No encontramos diferencias en la concentración de E2 en los medios de cultivo de folículos vitelogénicos tempranos y medios expuestos a MTII en comparación con el control. Desafortunadamente, en nuestro estudio no medimos los esteroides considerados precursores de la vía esteroidogénica de la síntesis de E2, como 17 α -hidroxipregnenolona, 17 α -hidroxiprogesterona y T. Tampoco investigamos una posible regulación transcripcional de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de estrógenos. En el ovario de pez roca negro (*Sebastes schlegelii*), se descubrió que la estimulación con β -MSH induce la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis gonadal (Zhang *et al.*, 2020). Estos incluyen la proteína reguladora aguda esteroidogénica (*star*), la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450 $_{sc}$ o *cyp11a1*), 3beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (*hsd3b1*), el gen de la aromatasa. (*cyp19a1a*) (Zhang *et al.*, 2020). Contrariamente, el tratamiento de explantes de ovario de pez roca negro con α -MSH no afectó la expresión génica de *cyp11a1* o *hsd3b1*, pero aumentó significativamente la expresión de *star* y *cyp19a1a* (Zhang *et al.*, 2020). La interpretación de estos resultados, en particular el aumento de la expresión de *cyp19a1a*, implicaría un aumento de E2 en los medios de cultivo de los folículos ováricos de pez cebra tratados con MTII. Sin embargo, esto no se observó en este estudio. El pez roca negro tiene un patrón reproductivo ovovivíparo y almacenamiento de esperma a largo plazo (Shi *et al.*, 2011). La foliculogénesis también es diferente de las especies ovíparas (Xu *et al.*, 2022), lo que desafía la comparación entre especies y probablemente sea la causa principal de estas diferencias.

A excepción de la ACTH, el tratamiento de células testiculares de pez cebra *in vitro* no tuvo efecto sobre la liberación de T a los medios de cultivo. En ratones, la ACTH estimula la producción de esteroides sexuales en los testículos fetales y neonatales de forma dependiente de la dosis (O'Shaughnessy *et al.*, 2003), pero no tiene efecto en los

testículos de animales adultos. Por el contrario, nuestros resultados demuestran por primera vez que los testículos de pez cebra adultos son sensibles a dosis bajas de ACTH, lo que provoca la producción de T e indica un papel potencial de este péptido como regulador paracrino de la función testicular. El efecto observado está a un nivel similar del efecto provocado por la hCG. En este contexto, cabe mencionar que el cortisol, cuya síntesis y liberación es estimulada por la ACTH, estimula directamente la replicación del ADN y la proliferación de espermatogonias en fragmentos testiculares de anguila japonesa inmadura, *Anguilla japonica* (Ozaki *et al.*, 2006). Además, se encontró que una alta concentración de cortisol (100 ng/mL) estimula la producción testicular de 11-KT *in vitro*, lo que sugiere que la proliferación de espermatogonias inducida por cortisol podría estar mediada por andrógenos en la anguila japonesa (Ozaki *et al.*, 2006). Resultados similares se han publicado también en pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), donde el tratamiento con cortisol (0.1 y 1 ng/mL) también aumentó la liberación de 11-KT en explantes testiculares (Fernandino *et al.*, 2012). En cambio, el tratamiento con diferentes concentraciones fisiológicas de cortisol (0.1, 1, 10 ng/mL) en el pez cebra no tuvo efecto sobre la liberación de 11-KT desde los testículos. Además, los niveles de transcripción de enzimas esteroideogénicas, aunque a una concentración suprafisiológica de cortisol (1000 ng/mL) estimuló la expresión de *cyp17a1*. Sin embargo, el cortisol estimuló la proliferación y diferenciación de las espermatogonias y promovió la meiosis y la espermiogénesis al aumentar la cantidad de espermatozoides en los testículos (Tovo-Neto *et al.*, 2020). La ACTH señala a través del complejo Mc2r/Mrap1 (Agulleiro *et al.*, 2010) o Mc4r/Mrap2a (Agulleiro *et al.*, 2013b). Por tanto, es plausible que la ACTH pueda inducir un efecto similar mediado por Mc2r/Mrap1 y/o MC4R/Mrap2a en el testículo independientemente del cortisol. Nuestros estudios previos también demostraron el efecto de ACTH independiente del cortisol mediado por MC4R en la regulación de la ingesta de alimentos (Agulleiro *et al.*, 2013b).

Finalmente, demostramos que el antagonista endógeno de melanocortinas (Asip1) no tiene efecto sobre la secreción de E2 estimulada por hCG del tejido ovárico *in vitro*, pero el antagonista químico (SHU9119) potenció o inhibió los efectos de hCG en dosis

bajas y altas, respectivamente. En los machos, el antagonista endógeno potenció los efectos de la hCG sobre la secreción de T, pero el agonista químico no tuvo ningún efecto sobre la secreción de T tanto basal como estimulada por la hCG. La interpretación de estos resultados es compleja, pero nuevamente respalda sólidamente un efecto del sistema de melanocortina en la esteroidogénesis gonadal del pez cebra que podría inducir cambios en la fisiología reproductiva de los animales. La diferente respuesta *in vitro* a ambos antagonistas sugiere que los efectos de la melanocortina están mediados por más de un receptor. En el pez cebra, ASIP puede funcionar como un antagonista competitivo en todos los receptores de melanocortina, excepto para Mc2r (Guillot *et al.*, 2016), pero el perfil farmacológico original de SHU9119 no se ha estudiado en los receptores de pez cebra. Sin embargo, ambos antagonistas tenían efectos dependientes del sexo. Por lo tanto, Asip1 y SHU9119 estimulan la liberación de E2 en las hembras, pero no tuvieron ningún efecto sobre la liberación de T de los testículos, lo que respalda la dependencia sexual y el efecto antagónico en la secreción de esteroides.

5.3. Caracterización del sistema de melanocortinas en la hipófisis

5.3.1. Estudio de co-localización celular de *mc4r* y gonadotropos usando sondas *fshb/lhb*

El control sobre la reproducción y el desarrollo de las gónadas está muy conservado en todos los vertebrados. Diversos estudios sugieren que el MC4R participa en la modulación de la función reproductiva (Tao, 2010). Sin embargo, son escasos los estudios enfocados en vertebrados no mamíferos. En este estudio, identificamos a través de ISH, la localización del *mc4r* en la hipófisis y determinamos el efecto *in vitro* de agonistas y antagonistas en la expresión de las gonadotropinas

Anatómicamente la hipófisis consiste en 2 partes, una posterior o neurohipófisis que deriva desde el diencéfalo ventral y una anterior o adenohipófisis, que tiene un origen ectodérmico. En teleósteos la adenohipófisis puede ser dividida en 2 compartimentos, la par *distalis* (PD), situada en la parte anterior y la *pars intermedia* (PI), situada en la parte posterior. Además, la PD se divide en *pars distalis rostralis* (PDR) y en *pars distalis proximalis* (PDP) (Weltzien *et al.*, 2004). Se ha planteado que las diferentes células de la

adenohipófisis se comunican entre sí a través de vías autocrinas, paracrinas y endocrinas. Sin embargo, estudios en rata revelan una comunicación paracrina directa entre las diferentes células productoras de hormonas. Entre las vías moleculares que modulan las interacciones entre las células gonadotropas y otros tipos celulares, se encuentran los ligandos de los receptores de melanocortinas. Estudios de co-localización, han detectado al MC3R en células que expresan *lhb* (Berruien, 2019). En ratones macho, la ablación del MC3R resultó en una reducción significativa en el contenido hipofisiario de LH, FSH, GH y prolactina, mientras que en hembras la disminución resultó significativa solo para GH (Dowejko, 2014). Ratones hembras MC4R KO muestran una disminución en la secreción total y pulsátil de LH, involucrando una acción directa del MC4R sobre el eje HHG (Chen *et al.*, 2017). En el hipotálamo, aproximadamente el 70% de las neuronas GnRH son activadas por α -MSH, por tanto la secreción de LH podría ocurrir por la activación postsináptica directa del MC4R (Roa y Herbison, 2012). En la hipófisis, de forma paracrina, la α -MSH producida en el lóbulo intermedio podría activar el MC4R localizado en las células de la adenohipófisis, modulando así la secreción de LH (Berruien, 2019)

Aunque el sistema α -MSH/MC4R es conocido por su papel en la reproducción de mamíferos, la información disponible es limitada. El patrón de expresión del MC4R en teleosteos es mucho más amplio en comparación con los mamíferos (Yi *et al.*, 2018). En adición a la expresión central, el *mc4r* se expresa en tejidos periféricos como la hipófisis (Jangprai *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016a; Rao *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2020). Este estudio muestra por primera vez la expresión del *mc4r* en los gonadotropos de pez cebra, indicando un posible rol paracrino en la síntesis y liberación de gonadotropinas desde la adenohipófisis. Estudios previos en esta especie, evidenciaron la proyección de las neuronas hipotalámicas α -MSH hacia la PDP (Zhang *et al.*, 2012), región donde se sintetizan muchas hormonas incluidas las gonadotropinas (FSH y LH). La hipófisis es el sitio de mayor expresión de POMC, donde se procesa posteriormente hacia ACTH y α -MSH (Kalananthan *et al.*, 2020). En medaka, el *pomc* se expresa significativamente en la hipófisis de machos adultos, donde algunas células expresan conjuntamente *fshb* y *pomca* (Royan *et al.*, 2021). Además, la expresión diferencial de

pomc entre peces sexualmente inactivos y activos de trucha arcoiris, sugiere que algunos de los productos derivados de su procesamiento están involucrados en la reproducción (Salbert *et al.*, 1992).

Si bien el efecto directo de células lactotropas (productoras de prolactina (PRL)) y somatotropas (secretoras de la hormona del crecimiento (GH)) sobre células gonadotropas (sintetizadoras de gonadotropinas, FSH y LH) es sujeto de investigación, se ha demostrado que existe una estrecha proximidad anatómica entre células gonadotropas y corticotropas (productoras de ACTH) (Mollard *et al.*, 2012). En adición a esta asociación anatómica, en condiciones de estrés las células corticotropas pueden contribuir a la regulación de las funciones reproductivas a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA). Una vez que los corticotropos sintetizan ACTH, se activa la producción de glucocorticoides suprarrenales a través del MC2R. En la hipófisis, los glucocorticoides a través de su receptor, tienen un efecto directo sobre los gonadotropos ya que reducen la expresión de *lhb* inducida por GnRH (Breen *et al.*, 2012). Estos hallazgos respaldan la implicación del sistema de melanocortinas en la síntesis y liberación de las gonadotropinas desde la hipófisis.

5.3.2. Relación del sistema de melanocortinas en la expresión de gonadotropinas en sistema *in vitro*

A diferencia de los mamíferos, los teleósteos carecen de un sistema portal hipotálamo-hipofisiario que transporte los reguladores neurohormonales desde el hipotálamo a la hipófisis. En cambio, poseen un sistema en el que los axones hipotalámicos, como los de las neuronas GnRH, inervan directamente las células endocrinas en la hipófisis, a través de la neurohipófisis (*pars nervosa*, PN)(Ball y Baker, 1969). La unión de la GnRH a los receptores de GnRH en las células gonadotropas, estimula la síntesis y liberación de LH y FSH. Una vez transportadas a las gónadas por el torrente sanguíneo, desencadenan la esteroidogénesis gonadal y gametogénesis (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Medir el contenido de estas hormonas en la sangre, es poco práctico en una especie pequeña. Sin embargo, estimar la síntesis de mRNA en la hipófisis nos permite

estudiar la actividad de las gonadotropinas en especies relativamente pequeñas (Shao, 2012)

Previamente se ha demostrado que los ligandos sintéticos del MC4R, tienen propiedades farmacológicas similares en mamíferos y en peces (Cerdá-Reverter *et al.*, 2003; Ringholm *et al.*, 2002; Ringholm *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2009). Los fármacos utilizados en los estudios *in vitro*, fueron testados previamente en células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) que expresan transitoriamente MCRs de pez cebra (Guillot *et al.*, 2016). Para entender de mejor manera el efecto de los péptidos de melanocortinas, consideramos el sexo de los animales de experimentación. De acuerdo a nuestros resultados, existen diferencias en la regulación de la expresión del tipo de gonadotropina, dependencia del sexo y del péptido melanocortina (si es agonista o antagonista) utilizado. El agonista químico MTII reguló al alza la expresión de *fshb* en hembras mientras que en machos parece reducir la expresión de *fshb* inducida por LHRH. El antagonista ASIP, reguló la expresión de *fshb* en machos pero no tuvo efectos aparentes en hembras. Sin embargo, tanto el agonista como el antagonista no tuvieron efecto en la expresión de *lhb*. Estudios *in vivo* e *in vitro* en el pez pingo manchado (*Scatophagus argus*) muestran que la activación de *mc4r* aumenta la expresión de *gnrh* (en el hipotálamo) y de *fshb* y *lhb* (en la hipófisis) (Jiang *et al.*, 2017). Cabe señalar que el estudio con peces pingo manchado fue realizado con ejemplares adultos pero no se especifica el sexo. De acuerdo a nuestros resultados, el sexo es una variable a considerar en el diseño experimental, ya que existen diferencias por sexo en la expresión de gonadotropinas.

Estudios previos sugieren que la activación de los receptores de melanocortina estimula la secreción de gonadotropina en humanos (Reid *et al.*, 1981) y ratas (Watanobe *et al.*, 1999). Por contra, otros estudios muestran que dicha activación suprime la secreción de LH (Khorram *et al.*, 1984b; Scimonelli y Celis, 1990) en ratas. Estudios *in vitro* muestran que el MC3R y el MC4R se expresan en la línea celular clonal GnRH, GT-7 (Khong *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 2003). Esto sugiere que ambos receptores pueden estar involucrados en la regulación del eje hipotálamo hipófisis gonadal. El antagonista AGRP aumenta significativamente los niveles de gonadotropinas y estimula la liberación de

GnRH desde explantes hipotalámicos (Stanley *et al.*, 1999). Sin embargo, el bloqueo crónico de MC4R no afecta la liberación de LH en ratas macho (Raposinho *et al.*, 2000). Además, los ratones “knockout” para POMC (Yaswen *et al.*, 1999), MC3R (Chen *et al.*, 2000a), MC4R (Huszar *et al.*, 1997) y MC5R (Chen *et al.*, 1997) son todos fértiles, lo que sugiere que el sistema de melanocortinas no tiene efecto adverso sobre el eje gonadotrópico. Se ha planteado que la falta de un tipo de receptor podría ser parcialmente compensada por la función de sus parálogos, lo que resulta en un fenotipo más leve (Roa, 2013). En consecuencia, el bloqueo funcional de las vías de señalización para MC3R y MC4R, por sobreexpresión del antagonista endógeno, el péptido relacionado con agutí (AgRP), causa infertilidad en ratones (Granhholm *et al.*, 1986). Estos controvertidos resultados pueden atribuirse a diferentes condiciones experimentales como el tipo de cultivo (*in vitro/ in vivo*), el uso de diferentes animales modelo, el sexo y los tipos de péptidos (selectivos/no selectivos). De este modo, el papel de los MCRs en la regulación de la secreción de gonadotropinas sigue siendo controvertida. Sin embargo, la expresión de MC4R en los gonadotropos y el efecto de los péptidos de melanocortinas en la expresión de las gonadotropinas, ayuda a entender como el sistema de melanocortinas participa en la regulación de la reproducción en peces y proporciona información sobre la función del MC4R en vertebrados.

6. Conclusiones

- 1 La disminución de la actividad del sistema de melanocortinas inducida por la sobreexpresión de *asip1* retrasa significativamente el crecimiento temprano de los animales transgénicos
- 2 Los peces *asip1*-Tg eclosionan más grandes que su contrapartida WT, pero exhiben un crecimiento reducido hasta completar el desarrollo gonadal.
- 3 Los efectos sobre el crecimiento de la sobreexpresión de *asip1* se observan exclusivamente a partir de los 20mm lo que sugiere la existencia de un umbral de talla en los efectos sobre el crecimiento.
- 4 El sistema de melanocortinas no es crucial para la determinación de la aparición de la pubertad en el pez cebra.
- 5 Peces *asip1*-Tg tienen una menor eficiencia reproductiva en comparación con los peces WT, lo que se refleja en una menor calidad del huevo y diámetro del vitelo, un retraso en el tiempo de eclosión y el crecimiento larvario.
- 6 Receptores de melanocortinas, proteínas accesorias, agonistas y antagonistas se expresan tanto en ovario como en testículo, respaldando el papel del sistema de melanocortinas en la fisiología gonadal.
- 7 La expresión de *mc1r* y *mc4r* en oocitos previtelogénicos y vitelogénicos y en células germinales masculinas, evidencia que las melanocortinas pueden participar directa o indirectamente en el control de la vitelogénesis y espermatogénesis.

- 8 Los péptidos melanocortina pueden modular la síntesis de esteroides gonadales *in vitro*.

- 9 La expresión de *mc4r* en gonadotropos y la modulación de la síntesis de gonadotropinas por los péptidos melanocortina sugiere un posible rol paracrino en la síntesis y liberación de hormonas reproductivas desde la adenohipófisis.

7. Bibliografía

- Abdel-Malek, Z.A., 2001. Melanocortin receptors: their functions *and* regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci* 58, 434-441.
- Aggag, S., El-Sabrou, K., 2018. Polymorphism of the melanocortin receptor gene and its association with egg production traits in Lohmann Brown chickens. *Genetika* 50, 317-323.
- Agulleiro, M., Cortés, R., Fernández-Durán, B., Navarro, S., Guillot, R., Meimaridou, E., Clark, A.J., Cerdá-Reverter, J.M., 2013a. Melanocortin 4 receptor becomes an ACTH receptor by coexpression of melanocortin receptor accessory protein 2. *Mol Endocrinol* 27, 1934-1945.
- Agulleiro, M.J., Roy, S., Sánchez, E., Puchol, S., Gallo-Payet, N., Cerdá-Reverter, J.M., 2010. Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2. *Mol Cell Endocrinol* 320, 145-152.
- Agulleiro, M.J., Sánchez, E., Leal, E., Cortés, R., Fernández-Durán, B., Guillot, R., Davis, P., Dores, R.M., Gallo-Payet, N., Cerdá-Reverter, J.M., 2013b. Molecular characterization and functional regulation of melanocortin 2 receptor (MC2R) in the sea bass. A putative role in the adaptation to stress. *PLoS One* 8, e65450.
- Alde, S., Celis, M.E., 1980. Influence of alpha-melanotropin on LH release in the rat. *Neuroendocrinology* 31, 116-120.
- Alsop, D., Ings, J.S., Vijayan, M.M., 2009. Adrenocorticotrophic hormone suppresses gonadotropin-stimulated estradiol release from zebrafish ovarian follicles. *PLoS One* 4, e6463.
- Aluru, N., Vijayan, M.M., 2008. Molecular characterization, tissue-specific expression, and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology* 149, 4577-4588.
- Amweg, A.N., Paredes, A., Salvetti, N.R., Lara, H.E., Ortega, H.H., 2011. Expression of melanocortin receptors mRNA, and direct effects of ACTH on steroid secretion in the bovine ovary. *Theriogenology* 75, 628-637.
- Anderson, J.L., Mari, A.R., Braasch, I., Amores, A., Hohenlohe, P., Batzel, P., Postlethwait, J.H., 2012. Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebrafish revealed by RAD mapping and population genomics. *PLoS ONE* 7, e40701.

- Arukwe, A., 2008. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side-chain cleavage (P450_{scc})-regulated steroidogenesis as an organ-specific molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. *Cell Biol Toxicol* 24, 527-540.
- Asai, M., Ramachandrappa, S., Joachim, M., Shen, Y., Zhang, R., Nuthalapati, N., Ramanathan, V., Strohlic, D.E., Ferket, P., Linhart, K., Ho, C., Novoselova, T.V., Garg, S., Ridderstråle, M., Marcus, C., Hirschhorn, J.N., Keogh, J.M., O'Rahilly, S., Chan, L.F., Clark, A.J., Farooqi, I.S., Majzoub, J.A., 2013. Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. *Science* 341, 275-278.
- Ball, J., Baker, B., 1969. The Pituitary Gland: Anatomy and Histophysiology, in: Hoar, W., Randall, D. (Eds.), *Fish Physiol*. Academic Press, New York, pp. 1-110.
- Begtashi, I., Rodríguez, L., Moles, G., Zanuy, S., Carrillo, M., 2004. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* 241, 539-559.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chrétien, M., Seidah, N.G., 1991. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3564-3568.
- Berruén, N., 2019. Effect of age and pregnancy on the murine melanocortin system in the female reproductive system. University of Westminster Life Sciences, p. 282.
- Beuschlein, F., Fassnacht, M., Klink, A., Allolio, B., Reincke, M., 2001. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol* 144, 199-206.
- Bicknell, A.B., 2008. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol* 20, 692-699.
- Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Dev* 26, 877-920.
- Biran, J., Palevitch, O., Ben-Dor, S., Levavi-Sivan, B., 2012. Neurokinin Bs and neurokinin B receptors in zebrafish-potential role in controlling fish reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10269-10274.
- Bradley, K.M., Breyer, J.P., Melville, D.B., Broman, K.W., Knapik, E.W., Smith, J.R., 2011. An SNP-based linkage map for zebrafish reveals sex determination loci. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1, 3-9.
- Breen, K.M., Thackray, V.G., Hsu, T., Mak-McCully, R.A., Coss, D., Mellon, P.L., 2012. Stress levels of glucocorticoids inhibit LH β -subunit gene expression in gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 26, 1716-1731.

- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100, 141-166.
- Bultman, S.J., Michaud, E.J., Woychik, R.P., 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71, 1195-1204.
- Butler, A.A., Kesterson, R.A., Khong, K., Cullen, M.J., Pelleymounter, M.A., Dekoning, J., Baetscher, M., Cone, R.D., 2000. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141, 3518-3521.
- Catania, A., Gatti, S., Colombo, G., Lipton, J.M., 2004. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 56, 1-29.
- Ceinos, R.M., Guillot, R., Kelsh, R.N., Cerdá-Reverter, J.M., Rotllant, J., 2015. Pigment patterns in adult fish result from superimposition of two largely independent pigmentation mechanisms. *Pigment cell & melanoma research* 28, 196-209.
- Cerdá-Reverter, J.M., Canosa, L.F., 2009. Chapter 1 Neuroendocrine Systems of the Fish Brain. *Fish Physiol* 28, 3-74.
- Cerdá-Reverter, J.M., Haitina, T., Schiöth, H.B., Peter, R.E., 2005. Gene structure of the goldfish agouti-signaling protein: a putative role in the dorsal-ventral pigment pattern of fish. *Endocrinology* 146, 1597-1610.
- Cerdá-Reverter, J.M., Peter, R.E., 2003. Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene. *Endocrinology* 144, 4552-4561.
- Cerdá-Reverter, J.M., Ringholm, A., Schiöth, H.B., Peter, R.E., 2003. Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: involvement in the control of food intake. *Endocrinology* 144, 2336-2349.
- Chambers, R., Leggett, W., Brown, J., 1989. Egg size, female effects, and the correlation between early life history traits of caplin *Mallotus villosus*: an appraisal at the individual level. *Fish. Bull. US* 87: 515-523.
- Chan, L.F., Webb, T.R., Chung, T.T., Meimaridou, E., Cooray, S.N., Guasti, L., Chapple, J.P., Egertová, M., Elphick, M.R., Cheetham, M.E., Metherell, L.A., Clark, A.J., 2009. MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6146-6151.
- Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X.M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., Metzger, J.M., Strack, A.M., Camacho, R.E., Mellin, T.N., Nunes, C.N., Min, W., Fisher, J., Gopal-Truter, S., MacIntyre, D.E.,

- Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H., 2000a. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 26, 97-102.
- Chen, A.S., Metzger, J.M., Trumbauer, M.E., Guan, X.M., Yu, H., Frazier, E.G., Marsh, D.J., Forrest, M.J., Gopal-Truter, S., Fisher, J., Camacho, R.E., Strack, A.M., Mellin, T.N., MacIntyre, D.E., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H., 2000b. Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res* 9, 145-154.
 - Chen, C.L., Mather, J.P., Morris, P.L., Bardin, C.W., 1984. Expression of pro-opiomelanocortin-like gene in the testis and epididymis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5672-5675.
 - Chen, S.X., Bogerd, J., Schoonen, N.E., Martijn, J., de Waal, P.P., Schulz, R.W., 2013. A progestin (17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 185, 1-9.
 - Chen, W., 2000. The Melanocortin-5 Receptor, in: Cone, R.D. (Ed.), *The Melanocortin Receptors*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 449-472.
 - Chen, W., Ge, W., 2012. Ontogenic Expression Profiles of Gonadotropins (fshb and lhb) and Growth Hormone (gh) During Sexual Differentiation and Puberty Onset in Female Zebrafish¹. *Biol Reprod* 86.
 - Chen, W., Ge, W., 2013. Gonad differentiation and puberty onset in the zebrafish: Evidence for the dependence of puberty onset on body growth but not age in females. *Mol Reprod Dev* 80, 384-392.
 - Chen, W., Kelly, M.A., Opitz-Araya, X., Thomas, R.E., Low, M.J., Cone, R.D., 1997. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 91, 789-798.
 - Chen, X., Huang, L., Tan, H.Y., Li, H., Wan, Y., Cowley, M., Veldhuis, J.D., Chen, C., 2017. Deficient melanocortin-4 receptor causes abnormal reproductive neuroendocrine profile in female mice. *Reproduction* 153, 267-276.
 - Chhajlani, V., 1996. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int* 38, 73-80.
 - Chhajlani, V., Wikberg, J.E., 1992. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309, 417-420.
 - Clark, A.J., McLoughlin, L., Grossman, A., 1993. Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet* 341, 461-462.
 - Cooper, A., Robinson, S.J., Pickard, C., Jackson, C.L., Friedmann, P.S., Healy, E., 2005. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-induced

lymphocyte proliferation in humans independently of melanocortin 1 receptor gene status. *J Immunol* 175, 4806-4813.

- Cooray, S.N., Almiro Do Vale, I., Leung, K.Y., Webb, T.R., Chapple, J.P., Egertová, M., Cheetham, M.E., Elphick, M.R., Clark, A.J., 2008. The melanocortin 2 receptor accessory protein exists as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse γ 1 cell line. *Endocrinology* 149, 1935-1941.
- Cortés, R., Agulleiro, M.J., Navarro, S., Guillot, R., Sánchez, E., Cerdá-Reverter, J.M., 2014. Melanocortin receptor accessory protein 2 (MRAP2) interplays with the zebrafish melanocortin 1 receptor (MC1R) but has no effect on its pharmacological profile. *Gen Comp Endocrinol* 201, 30-36.
- Cortés, R., Teles, M., Oliveira, M., Fierro-Castro, C., Tort, L., Cerdá-Reverter, J.M., 2018. Effects of acute handling stress on short-term central expression of orexigenic/anorexigenic genes in zebrafish. *Fish Physiol Biochem* 44, 257-272.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J., 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484.
- Dores, R.M., 2013. Observations on the evolution of the melanocortin receptor gene family: distinctive features of the melanocortin-2 receptor. *Front Neurosci* 7, 28.
- Dores, R.M., Liang, L., 2014. Analyzing the activation of the melanocortin-2 receptor of tetrapods. *Gen Comp Endocrinol* 203, 3-9.
- Dowejko, M., 2014. Characterization of MC3 and the other melanocortin receptors (MC) in the hypothalamo-pituitary-gonadal system of the mouse (Doctoral thesis). University of Westminster, London, England., 262.
- Endo, D., Park, M.K., 2004. Molecular characterization of the leopard gecko POMC gene and expressional change in the testis by acclimation to low temperature and with a short photoperiod. *Gen Comp Endocrinol* 138, 70-77.
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21-40.
- Facchinetti, F., Polzonetti-Magni, A., Neri, I., Gallinelli, A., Alessandrini, G., Vallarino, M., 1993. Ovarian melanotropic peptides in two teleostean fishes. *Ann N Y Acad Sci* 680, 502-504.
- Facchinetti, F., Storchi, A.R., Petraglia, F., Volpe, A., Genazzani, A.R., 1988. Expression of proopiomelanocortin-related peptides in human follicular fluid. *Peptides* 9, 1089-1092.
- Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S., Lank, E.J., Cheetham, T., O'Rahilly, S., 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 348, 1085-1095.

- Farooqi, I.S., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Aminian, S., Jebb, S.A., Butler, G., Cheetham, T., O'Rahilly, S., 2000. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106, 271-279.
- Fathi, Z., Iben, L.G., Parker, E.M., 1995. Cloning, expression, and tissue distribution of a fifth melanocortin receptor subtype. *Neurochem Res* 20, 107-113.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kishii, A., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2012. The cortisol and androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology* 153, 6003-6011.
- Fiddes, J.C., Talmadge, K., 1984. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res* 40, 43-78.
- Forbes, E.L., Preston, C.D., Lokman, P.M., 2010. Zebrafish (*Danio rerio*) and the egg size versus egg number trade off: effects of ration size on fecundity are not mediated by orthologues of the *Fec* gene. *Reprod Fertil Dev* 22, 1015-1021.
- Gantz, I., Fong, T.M., 2003. The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E468-474.
- Gantz, I., Konda, Y., Tashiro, T., Shimoto, Y., Miwa, H., Munzert, G., Watson, S.J., DelValle, J., Yamada, T., 1993. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268, 8246-8250.
- Gantz, I., Shimoto, Y., Konda, Y., Miwa, H., Dickinson, C.J., Yamada, T., 1994. Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 1214-1220.
- Garcia Dávila, S., Garcia-Gil, M., Resino-Talaván, P., Campo, J., 2015. Asociación entre polimorfismo en el gen receptor 1 de melanocitos (MC1R) y el locus E pra el color del plumaje en gallinas.
- Gardiner, K., Slavov, D., Bechtel, L., Davisson, M., 2002. Annotation of human chromosome 21 for relevance to Down syndrome: gene structure and expression analysis. *Genomics* 79, 833-843.
- Ge, W., 2005. Intrafollicular paracrine communication in the zebrafish ovary: the state of the art of an emerging model for the study of vertebrate folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 237, 1-10.
- Getting, S.J., Di Filippo, C., Christian, H.C., Lam, C.W., Rossi, F., D'Amico, M., Perretti, M., 2004. MC-3 receptor and the inflammatory mechanisms activated in acute myocardial infarct. *J Leukoc Biol* 76, 845-853.
- Getting, S.J., Gibbs, L., Clark, A.J., Flower, R.J., Perretti, M., 1999. POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. *J Immunol* 162, 7446-7453.

- Godino-Gimeno, A., Sánchez, E., Guillot, R., Rocha, A., Angotzi, A.R., Leal, E., Rotllant, J., Cerdá-Reverter, J.M., 2020. Growth Performance After Agouti-Signaling Protein 1 (Asip1) Overexpression in Transgenic Zebrafish. *Zebrafish*.
- Gomez-Chang, E., Larrea, F., Martínez-Montes, F., 2012. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* 15, 24-36.
- Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., Le Gac, F., 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 113, 413-428.
- Good-Avila, S.V., Yegorov, S., Harron, S., Bogerd, J., Glen, P., Ozon, J., Wilson, B.C., 2009. Relaxin gene family in teleosts: phylogeny, syntenic mapping, selective constraint, and expression analysis. *BMC Evol Biol* 9, 293.
- Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I., Stark, K.L., 1997. Overexpression of *Agprt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 17, 273-274.
- Granholm, N.H., Jeppesen, K.W., Japs, R.A., 1986. Progressive infertility in female lethal yellow mice (*Ay/a*; strain C57BL/6J). *J Reprod Fertil* 76, 279-287.
- Grunwald, D., Eisen, J., 2002. Grunwald DJ & Eisen JS. Headwaters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* 3: 717–724. *Nature reviews. Genetics* 3, 717-724.
- Guillot, R., Cortés, R., Navarro, S., Mischitelli, M., García-Herranz, V., Sánchez, E., Cal, L., Navarro, J.C., Míguez, J.M., Afanasyev, S., 2016. Behind melanocortin antagonist overexpression in the zebrafish brain: a behavioral and transcriptomic approach. *Horm Behav* 82, 87-100.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 1998. Coexpression of *Agpr* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1, 271-272.
- Haitina, T., Klovin, J., Andersson, J., Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Larhammar, D., Larson, E.T., Schiöth, H.B., 2004. Cloning, tissue distribution, pharmacology and three-dimensional modelling of melanocortin receptors 4 and 5 in rainbow trout suggest close evolutionary relationship of these subtypes. *Biochem J* 380, 475-486.
- Hara, A., Hiramatsu, N., Fujita, T., 2016. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science* 82, 187-202.
- Harno, E., Gali Ramamoorthy, T., Coll, A.P., White, A., 2018. POMC: The Physiological Power of Hormone Processing. *Physiol Rev* 98, 2381-2430.
- Hearing, V.J., Tsukamoto, K., 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *Faseb j* 5, 2902-2909.

- Hinfray, N., Nóbrega, R.H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Maréchal, E., Chadili, E., Palluel, O., Porcher, J.M., Schulz, R., Brion, F., 2013. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *J Endocrinol* 216, 375-388.
- Hisaoka, K.K., Firlit, C.F., 1962. Ovarian Cycle and Egg Production in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Copeia* 1962, 788.
- Honji, R., Vaz-dos-Santos, A., Rossi-Wongtschowsk, C., 2006. Identification of the stages of ovarian maturation of the Argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotropical Ichthyology - NEOTROP ICHTHYOL* 4.
- Hu, Z., Ai, N., Chen, W., Wong, Q.W.-L., Ge, W., 2019. Loss of growth hormone gene (*gh1*) in zebrafish arrests folliculogenesis in females and delays spermatogenesis in males. *Endocrinology* 160, 568-586.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., Lee, F., 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.
- Israel, D.D., Sheffer-Babila, S., de Luca, C., Jo, Y.H., Liu, S.M., Xia, Q., Spergel, D.J., Dun, S.L., Dun, N.J., Chua, S.C., Jr., 2012. Effects of leptin and melanocortin signaling interactions on pubertal development and reproduction. *Endocrinology* 153, 2408-2419.
- Jangprai, A., Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G., 2011. Characterization of melanocortin 4 receptor in Snakeskin Gourami and its expression in relation to daily feed intake and short-term fasting. *Gen Comp Endocrinol* 173, 27-37.
- Ji, L.Q., Rao, Y.Z., Zhang, Y., Chen, R., Tao, Y.X., 2020. Regulation of melanocortin-1 receptor pharmacology by melanocortin receptor accessory protein 2 in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen Comp Endocrinol* 285, 113291.
- Ji, R.L., Huang, L., Wang, Y., Liu, T., Fan, S.Y., Tao, M., Tao, Y.X., 2021. Topmouth culter melanocortin-3 receptor: regulation by two isoforms of melanocortin-2 receptor accessory protein 2. *Endocr Connect* 10, 1489-1501.
- Jiang, D.N., Li, J.T., Tao, Y.X., Chen, H.P., Deng, S.P., Zhu, C.H., Li, G.L., 2017. Effects of melanocortin-4 receptor agonists and antagonists on expression of genes related to reproduction in spotted scat, *Scatophagus argus*. *J Comp Physiol B* 187, 603-612.
- Kalanathan, T., Lai, F., Gomes, A.S., Murashita, K., Handeland, S., Rønnestad, I., 2020. The Melanocortin System in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) and Its Role in Appetite Control. *Front Neuroanat* 14, 48.

- Kallman, K.D., Borkoski, V., 1978. A Sex-Linked Gene Controlling the Onset of Sexual Maturity in Female and Male Platyfish (XIPHOPHORUS MACULATUS), Fecundity in Females and Adult Size in Males. *Genetics* 89, 79-119.
- Kallman, K.D., Schreibman, M.P., 1973. A sex-linked gene controlling gonadotrop differentiation and its significance in determining the age of sexual maturation and size of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Gen Comp Endocrinol* 21, 287-304.
- Kamler, E., 2007. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Rev Fish Biol Fish* 18, 143.
- Khong, K., Kurtz, S.E., Sykes, R.L., Cone, R.D., 2001. Expression of functional melanocortin-4 receptor in the hypothalamic GT1-1 cell line. *Neuroendocrinology* 74, 193-201.
- Khorram, O., Bedran de Castro, J.C., McCann, S.M., 1984a. Physiological role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in modulating the secretion of prolactin and luteinizing hormone in the female rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 8004-8008.
- Khorram, O., DePalatis, L.R., McCann, S.M., 1984b. The effect and possible mode of action of alpha-melanocyte-stimulating hormone on gonadotropin release in the ovariectomized rat: an in vivo and in vitro analysis. *Endocrinology* 114, 227-233.
- Kim, J.Y., Jung, H.J., Yoon, M.J., 2015. VASA (DDX4) is a Putative Marker for Spermatogonia, Spermatocytes and Round Spermatids in Stallions. *Reprod Domest Anim* 50, 1032-1038.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.
- Kobayashi, Y., Tsuchiya, K., Yamanome, T., Schiöth, H.B., Kawauchi, H., Takahashi, A., 2008. Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri*. *Gen Comp Endocrinol* 155, 280-287.
- Konda, Y., Gantz, I., DelValle, J., Shimoto, Y., Miwa, H., Yamada, T., 1994. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J Biol Chem* 269, 13162-13166.
- Kurita, K., Sakai, N., 2004. Functionally distinctive testicular cell lines of zebrafish to support male germ cell development. *Mol Reprod Dev* 67, 430-438.
- Lampert, K.P., Schmidt, C., Fischer, P., Volff, J.-N., Hoffmann, C., Muck, J., Lohse, M.J., Ryan, M.J., Schartl, M., 2010. Determination of onset of sexual maturation and mating behavior by melanocortin receptor 4 polymorphisms. *Curr Biol* 20, 1729-1734.
- Lawrence, C., Ebersole, J.P., Kesseli, R.V., 2008. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Biol Fishes* 81, 239-246.
- Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W., 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio*

erio) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol Reprod* 81, 177-187.

- Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.M., Chin, M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N.R., Desaki, A.L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T.A., Donelan, M.J., Dong, H.W., Dougherty, J.G., Duncan, B.J., Ebbert, A.J., Eichele, G., Estin, L.K., Faber, C., Facer, B.A., Fields, R., Fischer, S.R., Fliss, T.P., Frensley, C., Gates, S.N., Glattfelder, K.J., Halverson, K.R., Hart, M.R., Hohmann, J.G., Howell, M.P., Jeung, D.P., Johnson, R.A., Karr, P.T., Kawal, R., Kidney, J.M., Knapik, R.H., Kuan, C.L., Lake, J.H., Laramée, A.R., Larsen, K.D., Lau, C., Lemon, T.A., Liang, A.J., Liu, Y., Luong, L.T., Michaels, J., Morgan, J.J., Morgan, R.J., Mortrud, M.T., Mosqueda, N.F., Ng, L.L., Ng, R., Orta, G.J., Overly, C.C., Pak, T.H., Parry, S.E., Pathak, S.D., Pearson, O.C., Puchalski, R.B., Riley, Z.L., Rockett, H.R., Rowland, S.A., Royall, J.J., Ruiz, M.J., Sarno, N.R., Schaffnit, K., Shapovalova, N.V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Smith, K.A., Smith, B.I., Sodt, A.J., Stewart, N.N., Stumpf, K.R., Sunkin, S.M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.D., Thaller, C., Thompson, C.L., Varnam, L.R., Visel, A., Whitlock, R.M., Wohnoutka, P.E., Wolkey, C.K., Wong, V.Y., Wood, M., Yaylaoglu, M.B., Young, R.C., Youngstrom, B.L., Yuan, X.F., Zhang, B., Zwingman, T.A., Jones, A.R., 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176.
- Leranth, C., MacLusky, N.J., Shanabrough, M., Naftolin, F., 1988. Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro-opiomelanocortin-immunoreactive axons and LH-RH neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res* 449, 167-176.
- Lessman, C.A., Brantley, N.A., 2020. Puberty visualized: sexual maturation in the transparent Casper zebrafish. *Zygote* 28, 322-332.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., Lareyre, J.J., 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen Comp Endocrinol* 165, 412-437.
- Li, J.-T., Yang, Z., Chen, H.-P., Zhu, C.-H., Deng, S.-P., Li, G.-L., Tao, Y.-X., 2016a. Molecular cloning, tissue distribution, and pharmacological characterization of melanocortin-4 receptor in spotted scat, *Scatophagus argus*. *Gen Comp Endocrinol* 230-231, 143-152.
- Li, J., Ge, W., 2020. Zebrafish as a model for studying ovarian development: Recent advances from targeted gene knockout studies. *Mol Cell Endocrinol* 507, 110778.
- Li, J.T., Yang, Z., Chen, H.P., Zhu, C.H., Deng, S.P., Li, G.L., Tao, Y.X., 2016b. Molecular cloning, tissue distribution, and pharmacological characterization of

melanocortin-4 receptor in spotted scat, *Scatophagus argus*. *Gen Comp Endocrinol* 230-231, 143-152.

- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8, 353-367.
- Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., Orban, L., 2012. Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS ONE* 7, e34397.
- Liew, W.C., Orbán, L., 2014. Zebrafish sex: a complicated affair. *Briefings in functional genomics* 13, 172-187.
- Limone, P., Calvelli, P., Altare, F., Ajmone-Catt, P., Lima, T., Molinatti, G.M., 1997. Evidence for an interaction between alpha-MSH and opioids in the regulation of gonadotropin secretion in man. *J Endocrinol Invest* 20, 207-210.
- Limone, P., Scipioni, T., Calvelli, P., Scaglione, E., Barberis, A.M., Dentelli, P., Isaia, G.C., Molinatti, G.M., 1994. Alpha-melanocyte-stimulating hormone antagonizes the inhibitory effect of corticotropin-releasing hormone on luteinizing hormone secretion during the luteal phase in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 571-575.
- Liu, R., Du, K., Ormanns, J., Adolphi, M.C., Scharl, M., 2020a. Melanocortin 4 receptor signaling and puberty onset regulation in *Xiphophorus swordtails*. *Gen Comp Endocrinol*, 113521.
- Liu, R., Kinoshita, M., Adolphi, M.C., Scharl, M., 2019a. Analysis of the Role of the Mc4r System in Development, Growth, and Puberty of Medaka. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 213.
- Liu, R., Kinoshita, M., Adolphi, M.C., Scharl, M., 2019b. Analysis of the role of the Mc4r system in development, growth, and puberty of medaka. *Frontiers in endocrinology* 10, 213.
- Liu, T., Deng, Y., Zhang, Z., Cao, B., Li, J., Sun, C., Hu, Z., Zhang, J., Li, J., Wang, Y., 2020b. Melanocortin Receptor 4 (MC4R) Signaling System in Nile Tilapia. *Int J Mol Sci* 21.
- Löhr, H., Hess, S., Pereira, M.M.A., Reinhoß, P., Leibold, S., Schenkel, C., Wunderlich, C.M., Kloppenburg, P., Brüning, J.C., Hammerschmidt, M., 2018. Diet-Induced Growth Is Regulated via Acquired Leptin Resistance and Engages a Pomc-Somatostatin-Growth Hormone Circuit. *Cell Reports* 23, 1728-1741.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., Wilkison, W.O., et al., 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371, 799-802.
- Maack, G., Segner, H., 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. *J Fish Biol* 62, 895-906.

- Marsh, D.J., Hollopeter, G., Huszar, D., Laufer, R., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Burn, P., Palmiter, R.D., 1999. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 21, 119-122.
- Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2011. Social regulation of gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Physiology (Bethesda)* 26, 412-423.
- Masini, M.A., Sturla, M., Pestarino, M., Gallinelli, A., Facchinetti, F., Uva, B.M., 1997. Pro-opiomelanocortin (POMC) expression and immunolocalization of POMC-related peptides in the ovary of *Protopterus annectens*, an African lungfish. *Peptides* 18, 1411-1414.
- McGonnell, I.M., Fowkes, R.C., 2006. Fishing for gene function--endocrine modelling in the zebrafish. *J Endocrinol* 189, 425-439.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1761-1766.
- Metherell, L.A., Chapple, J.P., Cooray, S., David, A., Becker, C., Rüschenhoff, F., Naville, D., Begeot, M., Khoo, B., Nürnberg, P., Huebner, A., Cheetham, M.E., Clark, A.J., 2005. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* 37, 166-170.
- Metz, J.R., Geven, E.J., van den Burg, E.H., Flik, G., 2005. ACTH, alpha-MSH, and control of cortisol release: cloning, sequencing, and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R814-826.
- Miranda, L.A., Chalde, T., Elisio, M., Strüssmann, C.A., 2013. Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Gen Comp Endocrinol* 192, 45-54.
- Mitchell, K., Zhang, W.S., Lu, C., Tao, B., Chen, L., Hu, W., Trudeau, V.L., 2020. Targeted mutation of secretogranin-2 disrupts sexual behavior and reproduction in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 12772-12783.
- Molés, G., 2011. Caracterización biológica de las gonadotrofinas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de herramientas biotecnológicas e inmunológicas para su estudio, Departamento de Ciencia Animal. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA, Valencia, p. 265.
- Mollard, P., Hodson, D.J., Lafont, C., Rizzoti, K., Drouin, J., 2012. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab* 23, 261-269.
- Morgan, C., Cone, R.D., 2006. Melanocortin-5 receptor deficiency in mice blocks a novel pathway influencing pheromone-induced aggression. *Behav Genet* 36, 291-300.

- Morgan, C., Thomas, R.E., Cone, R.D., 2004a. Melanocortin-5 receptor deficiency promotes defensive behavior in male mice. *Horm Behav* 45, 58-63.
- Morgan, C., Thomas, R.E., Ma, W., Novotny, M.V., Cone, R.D., 2004b. Melanocortin-5 receptor deficiency reduces a pheromonal signal for aggression in male mice. *Chem Senses* 29, 111-115.
- Mosconi, G., Carnevali, O., Facchinetti, F., Radi, D., Pestarino, M., Vallarino, M., Polzonetti-Magni, A.M., 1994. Ovarian melanotropic peptides and adaptation in two teleostean species: *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Peptides* 15, 927-931.
- Mountjoy, K.G., Jenny Wu, C.S., Dumont, L.M., Wild, J.M., 2003. Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems. *Endocrinology* 144, 5488-5496.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., Cone, R.D., 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8, 1298-1308.
- Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T., Cone, R.D., 1992. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257, 1248-1251.
- Muñoz-Cueto, J.A., 2009. Cerebro y reproducción en peces: bases neurales y neuroendocrinas, in: Carrillo, M. (Ed.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones*. Observatorio Español de Acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación., pp. 27-96.
- Muñoz-Cueto, J.A., Paullada-Salmerón, J.A., Aliaga-Guerrero, M., Cowan, M.E., Parhar, I.S., Ubuka, T., 2017. A Journey through the Gonadotropin-Inhibitory Hormone System of Fish. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 285.
- Myers, M.G., Jr., Olson, D.P., 2012. Central nervous system control of metabolism. *Nature* 491, 357-363.
- Naftolin, F., Leranth, C., Horvath, T.L., Garcia-Segura, L.M., 1996. Potential neuronal mechanisms of estrogen actions in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 16, 213-223.
- Nagahama, Y., 1983. 6 The Functional Morphology of Teleost Gonads. *Fish Physiol* 9, 223-275.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 1989. Mechanisms of synthesis and action of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost maturation-inducing substance. *Fish Physiol Biochem* 7, 193-200.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., Katsu, Y., 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Curr Top Dev Biol* 30, 103-145.

- Nasiadka, A., Clark, M.D., 2012. Zebrafish breeding in the laboratory environment. *Illar j* 53, 161-168.
- Navarro, S., Guillot, R., Crespo, D., Schulz, R.W., Ge, W., Rotllant, J., Cerdá-Reverter, J.M., Rocha, A., 2021. Enhanced growth without accelerated puberty in fish: A role for the melanocortin system. *Aquaculture* 540, 736721.
- Ni, X.P., Pearce, D., Butler, A.A., Cone, R.D., Humphreys, M.H., 2003. Genetic disruption of gamma-melanocyte-stimulating hormone signaling leads to salt-sensitive hypertension in the mouse. *J Clin Invest* 111, 1251-1258.
- Niimi, A.J., LaHam, Q.N., 1974. Influence of breeding time interval on egg number, mortality, and hatching of the zebra fish *Brachydanio rerio*. *Can J Zool* 52, 515-517.
- Nijenhuis, W.A., Oosterom, J., Adan, R.A., 2001. AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol* 15, 164-171.
- Nimura, M., Udagawa, J., Hatta, T., Hashimoto, R., Otani, H., 2006. Spatial and temporal patterns of expression of melanocortin type 2 and 5 receptors in the fetal mouse tissues and organs. *Anat Embryol (Berl)* 211, 109-117.
- Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., França, L.R., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem* 35, 197-206.
- Noon, L.A., Franklin, J.M., King, P.J., Goulding, N.J., Hunyady, L., Clark, A.J., 2002. Failed export of the adrenocorticotrophin receptor from the endoplasmic reticulum in non-adrenal cells: evidence in support of a requirement for a specific adrenal accessory factor. *J Endocrinol* 174, 17-25.
- Novoselova, T.V., Jackson, D., Campbell, D.C., Clark, A.J., Chan, L.F., 2013. Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J Endocrinol* 217, R1-11.
- O'Brien, L., Burnett, J., Mayo, R.K., 1993. Maturation of nineteen species of finfish off the northeast coast of the United States, 1985-1990.
- O'Shaughnessy, P.J., Fleming, L.M., Jackson, G., Hochgeschwender, U., Reed, P., Baker, P.J., 2003. Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis. *Endocrinology* 144, 3279-3284.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G.S., 1997. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.
- Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., Miura, T., 2006. Roles of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology* 147, 5139-5146.

- Pang, Y., Ge, W., 2002. Epidermal growth factor and TGF α promote zebrafish oocyte maturation in vitro: potential role of the ovarian activin regulatory system. *Endocrinology* 143, 47-54.
- Parhar, I.S., Ogawa, S., Sakuma, Y., 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145, 3613-3618.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pierce, J.G., Parsons, T.F., 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50, 465-495.
- Piferrer, F., 2009. Determinación y diferenciación sexual de los peces., in: Carrillo, M. (Ed.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones*. Observatorio Español de Acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, pp. 249-336.
- Polzonetti-Magni, A., Facchinetti, F., Carnevali, O., Mosconi, G., Pestarino, M., Vallarino, M., Ciarcia, G., 1994. Presence and steroidogenic activity of beta-endorphin in the ovary of the lizard, *Podarcis s. sicula* raf. *Biol Reprod* 50, 1059-1065.
- Prat, F., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 54, 1375-1382.
- Rao, Y.Z., Chen, R., Zhang, Y., Tao, Y.X., 2019. Orange-spotted grouper melanocortin-4 receptor: Modulation of signaling by MRAP2. *Gen Comp Endocrinol* 284, 113234.
- Raposinho, P.D., Castillo, E., d'Alleva, V., Broqua, P., Pralong, F.P., Aubert, M.L., 2000. Chronic blockade of the melanocortin 4 receptor subtype leads to obesity independently of neuropeptide Y action, with no adverse effects on the gonadotropic and somatotrophic axes. *Endocrinology* 141, 4419-4427.
- Reid, R.L., Ling, N., Yen, S.S., 1981. Alpha-melanocyte stimulating hormone induces gonadotropin release. *J Clin Endocrinol Metab* 52, 159-161.
- Ribas, L., Liew, W.C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., Piferrer, F., 2017a. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E941-E950.

- Ribas, L., Valdivieso, A., Díaz, N., Piferrer, F., 2017b. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. *J Exp Biol* 220, 1056-1064.
- Ringholm, A., Fredriksson, R., Poliakova, N., Yan, Y.L., Postlethwait, J.H., Larhammar, D., Schiöth, H.B., 2002. One melanocortin 4 and two melanocortin 5 receptors from zebrafish show remarkable conservation in structure and pharmacology. *J Neurochem* 82, 6-18.
- Ringholm, A., Klovins, J., Fredriksson, R., Poliakova, N., Larson, E.T., Kukkonen, J.P., Larhammar, D., Schiöth, H.B., 2003. Presence of melanocortin (MC4) receptor in spiny dogfish suggests an ancient vertebrate origin of central melanocortin system. *Eur J Biochem* 270, 213-221.
- Roa, J., 2013. Role of GnRH Neurons and Their Neuronal Afferents as Key Integrators between Food Intake Regulatory Signals and the Control of Reproduction. *International journal of endocrinology* 2013, 518046.
- Roa, J., Herbison, A.E., 2012. Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology* 153, 5587-5599.
- Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G., Cone, R.D., 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-834.
- Rodrigues, A.R., Sousa, D., Almeida, H., Gouveia, A.M., 2013. Structural determinants regulating cell surface targeting of melanocortin receptors. *J Mol Endocrinol* 51, R23-32.
- Roselli-Rehfuss, L., Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T., Low, M.J., Tatro, J.B., Entwistle, M.L., Simerly, R.B., Cone, R.D., 1993. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8856-8860.
- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G., Kobilka, B.K., 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356-363.
- Roy, S., Rached, M., Gallo-Payet, N., 2007. Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor [melanocortin-2 receptor (MC2R)] by human MC2R accessory protein isoforms alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol* 21, 1656-1669.
- Royan, M.R., Siddique, K., Csucs, G., Puchades, M.A., Nourizadeh-Lillabadi, R., Bjaalie, J.G., Henkel, C.V., Weltzien, F.A., Fontaine, R., 2021. 3D Atlas of the Pituitary Gland of the Model Fish Medaka (*Oryzias latipes*). *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 719843.

- Saborido-Rey, F., 2008. Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en las poblaciones de peces marinos.
- Safian, D., Bogerd, J., Schulz, R.W., 2019. Regulation of spermatogonial development by Fsh: The complementary roles of locally produced Igf and Wnt signaling molecules in adult zebrafish testis. *Gen Comp Endocrinol* 284, 113244.
- Salbert, G., Chauveau, I., Bonnec, G., Valotaire, Y., Jego, P., 1992. One of the two trout proopiomelanocortin messenger RNAs potentially encodes new peptides. *Mol Endocrinol* 6, 1605-1613.
- Sánchez, E., Rubio, V.C., Thompson, D., Metz, J., Flik, G., Millhauser, G.L., Cerdá-Reverter, J.M., 2009. Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1293-1306.
- Sandrock, M., Schulz, A., Merkwitz, C., Schöneberg, T., Spanel-Borowski, K., Ricken, A., 2009. Reduction in corpora lutea number in obese melanocortin-4-receptor-deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol* 7, 24.
- Santos, J.L., 2014. Receptor-4 de melanocortina: relevancia en la conducta de alimentación y en la acumulación de grasa corporal.
- Schiöth, H.B., 2001. The physiological role of melanocortin receptors. *Vitam Horm* 63, 195-232.
- Schiöth, H.B., Kakizaki, Y., Kohsaka, A., Suda, T., Watanobe, H., 2001. Agouti-related peptide prevents steroid-induced luteinizing hormone and prolactin surges in female rats. *Neuroreport* 12, 687-690.
- Schiöth, H.B., Muceniece, R., Wikberg, J.E., 1996. Characterisation of the melanocortin 4 receptor by radioligand binding. *Pharmacol Toxicol* 79, 161-165.
- Schiöth, H.B., Muceniece, R., Wikberg, J.E., Chhajlani, V., 1995. Characterisation of melanocortin receptor subtypes by radioligand binding analysis. *Eur J Pharmacol* 288, 311-317.
- Schulz, R., França, L., Lareyre, J.-J., Le Gac, F., Legac, F., Chiarini-Garcia, H., Nóbrega, R., Miura, T., 2009. Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology* 165, 390-411.
- Schulz, R., Miura, T., 2002. Spermatogenesis and its endocrinology. *Fish Physiol Biochem* 26, 43-56.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 165, 390-411.
- Scimonelli, T., Celis, M.E., 1990. A central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone on serum levels of LH and prolactin in rats. *J Endocrinol* 124, 127-132.
- Sebag, J.A., Hinkle, P.M., 2007. Melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20244-20249.

- Sebag, J.A., Hinkle, P.M., 2009. Opposite effects of the melanocortin-2 (MC2) receptor accessory protein MRAP on MC2 and MC5 receptor dimerization and trafficking. *J Biol Chem* 284, 22641-22648.
- Sebag, J.A., Hinkle, P.M., 2010. Regulation of G protein-coupled receptor signaling: specific dominant-negative effects of melanocortin 2 receptor accessory protein 2. *Sci Signal* 3, ra28.
- Sebag, J.A., Zhang, C., Hinkle, P.M., Bradshaw, A.M., Cone, R.D., 2013. Developmental control of the melanocortin-4 receptor by MRAP2 proteins in zebrafish. *Science* 341, 278-281.
- Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Morphol* 218, 203-224.
- Selz, Y., Braasch, I., Hoffmann, C., Schmidt, C., Schultheis, C., Schartl, M., Volff, J.N., 2007. Evolution of melanocortin receptors in teleost fish: the melanocortin type 1 receptor. *Gene* 401, 114-122.
- Shao, Y., 2012. The brain-pituitary-gonadal axis of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* Department of Zoology, . Stockholm University, Sweden.
- Shi, D., Wen, H.S., He, F., Li, J.F., Yang, Y.P., Chen, C.F., Zhang, J.R., Chen, X.Y., Jin, G.X., Shi, B., Qi, B.X., Li, N., 2011. The physiology functions of estrogen receptor α (ER α) in reproduction cycle of ovoviviparous black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf. *Steroids* 76, 1597-1608.
- Shutter, J.R., Graham, M., Kinsey, A.C., Scully, S., Lüthy, R., Stark, K.L., 1997. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11, 593-602.
- Silva, A.C.G., Almeida, D.V., Nornberg, B.F., Pereira, J.R., Pires, D.M., Corcini, C.D., Junior, A.S.V., Marins, L.F., 2017. Reproductive parameters of double transgenic zebrafish (*Danio rerio*) males overexpressing both the growth hormone (GH) and its receptor (GHR). *Transgenic research* 26, 123-134.
- Sousa, M.L., Figueiredo, F., Pinheiro, C., Silva, A., Malhão, F., Rocha, M.J., Rocha, E., Urbatzka, R., 2015. Morphological and molecular effects of cortisol and ACTH on zebrafish stage I and II follicles. *Reproduction* 150, 429-436.
- Stanley, S.A., Davies, S., Small, C.J., Gardiner, J.V., Ghatei, M.A., Smith, D.M., Bloom, S.R., 2003. gamma-MSH increases intracellular cAMP accumulation and GnRH release in vitro and LH release in vivo. *FEBS Lett* 543, 66-70.
- Stanley, S.A., Small, C.J., Kim, M.S., Heath, M.M., Seal, L.J., Russell, S.H., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1999. Agouti related peptide (Agrp) stimulates the hypothalamo pituitary gonadal axis in vivo & in vitro in male rats. *Endocrinology* 140, 5459-5462.
- Swanson, P., Dickey, J.T., Campbell, B., 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 53-59.

- Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W.W., 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod* 44, 29-38.
- Takashima, F., Hibiya, T., 1995. Gonads, in: Takashima, F., Hibiya, T. (Eds.), *An atlas of fish histology: Normal and Pathological Features*, 2nd ed, Kodansha Ltd., Tokyo, Japan, pp. 128-153.
- Takeuchi, S., 2016. Chapter 8 - Agouti Family, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K. (Eds.), *Handbook of Hormones*. Academic Press, San Diego, pp. 66-67.
- Takeuchi, S., Takahashi, S., 1998. Melanocortin receptor genes in the chicken--tissue distributions. *Gen Comp Endocrinol* 112, 220-231.
- Takeuchi, S., Teshigawara, K., Takahashi, S., 1999. Molecular cloning and characterization of the chicken pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Biochim Biophys Acta* 1450, 452-459.
- Tanaka, S., Zmora, N., Levavi-Sivan, B., Zohar, Y., 2022. Vasoactive Intestinal Peptide Indirectly Elicits Pituitary LH Secretion Independent of GnRH in Female Zebrafish. *Endocrinology* 163.
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., Love, D.R., 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39, 384-390.
- Tao, M., Ji, R.L., Huang, L., Fan, S.Y., Liu, T., Liu, S.J., Tao, Y.X., 2020. Regulation of Melanocortin-4 Receptor Pharmacology by Two Isoforms of Melanocortin Receptor Accessory Protein 2 in Topmouth Culter (*Culter alburnus*). *Front Endocrinol (Lausanne)* 11, 538.
- Tao, Y.X., 2010. The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 31, 506-543.
- Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.-A., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen Comp Endocrinol* 165, 483-515.
- Thörnwall, M., Dimitriou, A., Xu, X., Larsson, E., Chhajlani, V., 1997. Immunohistochemical detection of the melanocortin 1 receptor in human testis, ovary and placenta using specific monoclonal antibody. *Horm Res* 48, 215-218.
- Tokarz, J., Möller, G., Hrabě de Angelis, M., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids* 103, 123-144.
- Tovo-Neto, A., Martinez, E.R.M., Melo, A.G., Doretto, L.B., Butzge, A.J., Rodrigues, M.S., Nakajima, R.T., Habibi, H.R., Nóbrega, R.H., 2020. Cortisol Directly Stimulates Spermatogonial Differentiation, Meiosis, and Spermiogenesis in Zebrafish (*Danio rerio*) Testicular Explants. *Biomolecules* 10.

- Tsakoumis, E., Ahi, E.P., Schmitz, M., 2022. Impaired leptin signaling causes subfertility in female zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 546, 111595.
- Tsigos, C., Arai, K., Hung, W., Chrousos, G.P., 1993. Hereditary isolated glucocorticoid deficiency is associated with abnormalities of the adrenocorticotropin receptor gene. *J Clin Invest* 92, 2458-2461.
- Urbatzka, R., Rocha, M.J., Rocha, E., 2011. Chapter 4 - Regulation of Ovarian Development and Function in Teleosts, in: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Academic Press, London, pp. 65-82.
- Uusi-Heikkilä, S., Wolter, C., Meinelt, T., Arlinghaus, R., 2010. Size-dependent reproductive success of wild zebrafish *Danio rerio* in the laboratory. *J Fish Biol* 77, 552-569.
- Valdebenito, I., Paiva, L., Berland, M., 2011. Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. *Archivos de medicina veterinaria* 43, 11-25.
- Van der Ploeg, L.H., Martin, W.J., Howard, A.D., Nargund, R.P., Austin, C.P., Guan, X., Drisko, J., Cashen, D., Sebat, I., Patchett, A.A., Figueroa, D.J., DiLella, A.G., Connolly, B.M., Weinberg, D.H., Tan, C.P., Palyha, O.C., Pong, S.S., MacNeil, T., Rosenblum, C., Vongs, A., Tang, R., Yu, H., Sailer, A.W., Fong, T.M., Huang, C., Tota, M.R., Chang, R.S., Stearns, R., Tamvakopoulos, C., Christ, G., Drazen, D.L., Spar, B.D., Nelson, R.J., MacIntyre, D.E., 2002. A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11381-11386.
- Vazzoler, A., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem 169.
- Voisey, J., Carroll, L., van Daal, A., 2003. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Curr Drug Targets* 4, 586-597.
- Volff, J.N., Selz, Y., Hoffmann, C., Froschauer, A., Schultheis, C., Schmidt, C., Zhou, Q., Bernhardt, W., Hanel, R., Böhne, A., Brunet, F., Ségurens, B., Couloux, A., Bernard-Samain, S., Barbe, V., Ozouf-Costaz, C., Galiana, D., Lohse, M.J., Schartl, M., 2013. Gene amplification and functional diversification of melanocortin 4 receptor at an extremely polymorphic locus controlling sexual maturation in the platyfish. *Genetics* 195, 1337-1352.
- Vrieling, H., Duhl, D.M., Millar, S.E., Miller, K.A., Barsh, G.S., 1994. Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5667-5671.
- Vulliémoz, N.R., Xiao, E., Xia-Zhang, L., Wardlaw, S.L., Ferin, M., 2005. Central infusion of agouti-related peptide suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 146, 784-789.

- Wachira, S.J., Hughes-Darden, C.A., Taylor, C.V., Ochillo, R., Robinson, T.J., 2003. Evidence for the interaction of protein kinase C and melanocortin 3-receptor signaling pathways. *Neuropeptides* 37, 201-210.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1980. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* II. The transition from vitellogenesis into maturation. *Gen Comp Endocrinol* 42, 345-354.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am Zool* 21, 325-343.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Microscop Tech* 16, 175-201.
- Wang, C., Liu, D., Chen, W., Ge, W., Hong, W., Zhu, Y., Chen, S.X., 2016. Progesterone increases the expression of gonadotropins in pituitaries of male zebrafish. *J Endocrinol* 230, 143-156.
- Wang, Y., Ge, W., 2004. Developmental profiles of activin β A, β B, and follistatin expression in the zebrafish ovary: evidence for their differential roles during sexual maturation and ovulatory cycle. *Biol Reprod* 71, 2056-2064.
- Watanobe, H., Schiöth, H.B., Wikberg, J.E., Suda, T., 1999. The melanocortin 4 receptor mediates leptin stimulation of luteinizing hormone and prolactin surges in steroid-primed ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 860-864.
- Watanobe, H., Yoneda, M., Kakizaki, Y., Kohsaka, A., Suda, T., Schiöth, H.B., 2001. Further evidence for a significant participation of the melanocortin 4 receptor in the preovulatory prolactin surge in the rat. *Brain Res Bull* 54, 521-525.
- Webb, T.R., Clark, A.J., 2010. Minireview: the melanocortin 2 receptor accessory proteins. *Mol Endocrinol* 24, 475-484.
- Weber, A., Clark, A.J., Perry, L.A., Honour, J.W., Savage, M.O., 1997. Diminished adrenal androgen secretion in familial glucocorticoid deficiency implicates a significant role for ACTH in the induction of adrenarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46, 431-437.
- Wei, R., Yuan, D., Zhou, C., Wang, T., Lin, F., Chen, H., Wu, H., Xin, Z., Yang, S., Chen, D., Wang, Y., Liu, J., Gao, Y., Li, Z., 2013a. Cloning, distribution and effects of fasting status of melanocortin 4 receptor (MC4R) in *Schizothorax prenanti*. *Gene* 532, 100-107.
- Wei, R., Yuan, D., Zhou, C., Wang, T., Lin, F., Chen, H., Wu, H., Xin, Z., Yang, S., Chen, D., Wang, Y., Liu, J., Gao, Y., Li, Z., 2013b. Cloning, distribution and effects of fasting status of melanocortin 4 receptor (MC4R) in *Schizothorax prenanti*. *Gene* 532, 100-107.
- Weltzien, F.A., Andersson, E., Andersen, Ø., Shalchian-Tabrizi, K., Norberg, B., 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on

flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 137, 447-477.

- Wen, Z.Y., Liu, T., Qin, C.J., Zou, Y.C., Wang, J., Li, R., Tao, Y.X., 2021. MRAP2 Interaction with Melanocortin-4 Receptor in SnakeHead (*Channa argus*). *Biomolecules* 11.
- White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E., Zon, L.I., 2008. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell* 2, 183-189.
- Wilson, B.D., Ollmann, M.M., Kang, L., Stoffel, M., Bell, G.I., Barsh, G.S., 1995. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet* 4, 223-230.
- Wolf Horrell, E.M., Boulanger, M.C., D'Orazio, J.A., 2016. Melanocortin 1 Receptor: Structure, Function, and Regulation. *Front Genet* 7, 95.
- Wu, L., Yu, H., Mo, H., Lan, X., Pan, C., Wang, L., Zhao, H., Zhou, J., Li, Y., 2021. Functional Characterization of Melanocortin-3 Receptor in a Hibernating Cavefish *Onychostoma macrolepis*. *Animals (Basel)* 12.
- Xu, A., Choi, K.L., Wang, Y., Permana, P.A., Xu, L.Y., Bogardus, C., Cooper, G.J., 2002. Identification of novel putative membrane proteins selectively expressed during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1161-1167.
- Yang, Y.K., Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Dickinson, C., Yamada, T., Barsh, G.S., Gantz, I., 1997. Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action. *Mol Endocrinol* 11, 274-280.
- Yang, Y.K., Thompson, D.A., Dickinson, C.J., Wilken, J., Barsh, G.S., Kent, S.B., Gantz, I., 1999. Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Mol Endocrinol* 13, 148-155.
- Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B., 2003. Regulation of fish gonadotropins. *Int Rev Cytol* 225, 131-185.
- Yaron, Z., Sivan, B., 2006. Reproduction, in: D.H., E.y., Claibourne, J.B. (Eds.), *Physiology of Fishes*, 3rd ed, CRC Press, New York (USA), pp. 345-388.
- Yaron, Z., Sivan, B., 2011. Hormonal control of reproduction and growth | Endocrine Regulation of Fish Reproduction. *Encyclopedia of Fish Physiology* 1, 1500-1508.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U., 1999. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5, 1066-1070.

- Yen, T.T., Gill, A.M., Frigeri, L.G., Barsh, G.S., Wolff, G.L., 1994. Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow *A(vy)/-* mice: ectopic expression of the agouti gene. *Faseb j* 8, 479-488.
- Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Challis, B.G., Jackson, R.S., O'Rahilly, S., 2000. The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models. *Qjm* 93, 7-14.
- Yi, T.L., Yang, L.K., Ruan, G.L., Yang, D.Q., Tao, Y.X., 2018. Melanocortin-4 receptor in swamp eel (*Monopterus albus*): Cloning, tissue distribution, and pharmacology. *Gene* 678, 79-89.
- Yu, H.X., Li, Y., Song, W.J., Wang, H., Mo, H.L., Liu, Q., Zhang, X.M., Jiang, Z.B., Wang, L.X., 2022. Functional characterization of melanocortin-3 receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 48, 241-252.
- Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., Molés, G., 2009. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos, pp. 99-172.
- Zhang, C., Forlano, P.M., Cone, R.D., 2012. AgRP and POMC neurons are hypophysiotropic and coordinately regulate multiple endocrine axes in a larval teleost. *Cell Metab* 15, 256-264.
- Zhang, Y., Wen, H.S., Li, Y., Lyu, L.K., Zhang, Z.X., Wang, X.J., Li, J.S., Tao, Y.X., Qi, X., 2020. Melanocortin-4 receptor regulation of reproductive function in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Gene* 741, 144541.