



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

**Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Zoología**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES Y  
NEUROENDOCRINOS MEDIADOS POR LAS KISSPEPTINAS EN  
EL CEREBRO DE MACHOS DE LUBINA EUROPEA (*Dicentrarchus  
labrax*) Y RELACIONADOS CON LA PUBERTAD Y FERTILIDAD**

Memoria presentada por

**Felipe Espigares Puerto**

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Fdo: Felipe Espigares Puerto

Directoras:

**Dra. Silvia Zanuy Doste**

**Dra. Ana Gómez Peris**

Grupo de Fisiología de la Reproducción de Peces  
Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS)  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)



Valencia, a 30 de Julio de 2015





La **Dra. Silvia Zanuy Doste**, Profesora de Investigación del CSIC, Grupo de Fisiología de la Reproducción de Peces del Departamento de Fisiología de Peces y Biotecnología del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INFORMA:

Que D. **Felipe Espigares Puerto**, licenciado en Ciencias del Mar por la Universidad de Cádiz, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **“Caracterización de los mecanismos moleculares y neuroendocrinos mediados por las kisspeptinas en el cerebro de machos de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y relacionados con la pubertad y fertilidad”**.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

En Castellón, a 30 de Julio de 2015

Fdo: Silvia Zanuy Doste





La **Dra. Ana Gómez Peris**, Científico Titular del CSIC, Grupo de Fisiología de la Reproducción de Peces del Departamento de Fisiología de Peces y Biotecnología del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INFORMA:

Que D. **Felipe Espigares Puerto**, licenciado en Ciencias del Mar por la Universidad de Cádiz, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **“Caracterización de los mecanismos moleculares y neuroendocrinos mediados por las kisspeptinas en el cerebro de machos de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y relacionados con la pubertad y fertilidad”**.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

En Castellón, a 30 de Julio de 2015

Fdo: Ana Gómez Peris





Esta tesis doctoral se ha realizado **gracias a la Ayuda JAE PREDOC para la realización de tesis doctorales en Centros e Institutos del CSIC** concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas a Felipe Espigares Puerto durante el periodo comprendido entre junio de 2009 y julio de 2013. La estancia en la Université de Rennes 1 (Department of Neurogenesis and Oestrogens) durante 3 meses bajo la supervisión del Dr. Olivier Kah, se realizó gracias a la ayuda para estancias breves concedidas dentro de esta misma beca.

La realización de los estudios incluidos en la presente memoria ha sido posible gracias a la financiación económica recibida a través de los siguientes Proyectos:

- 1) Proyecto Colaborativo del 7º Programa Marco de la Unión Europea: “Building a biological knowledge-base on fish lifecycles for competitive, sustainable European aquaculture” (**LIFECYCLE; FP7222719**).
- 2) Proyecto de I+D para Grupos de Investigación de Excelencia de la Generalitat Valenciana: Bases moleculares, celulares y endocrinas de la pubertad y del desarrollo gonadal en lubina (*Dicentrarchus labrax*). Desarrollo de tecnologías ambientales, hormonales y de manipulación génica para su control (**PROMETEO/2010/003; REPROBASS**).
- 3) Proyecto de I+D+i del Ministerio de Ciencia e Innovación: Regulación endocrina y paracrina de la diferenciación sexual y el desarrollo gonadal en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (**AGL2011-28890; REPROSEX**).



*Cuanto más dura es la lucha,  
más glorioso es el triunfo*



## **Agradecimientos**

Pues ya está, después de una larga espera, plagada de días de desánimo y noches sin dormir, esta Tesis al fin ve la luz. A pesar de lo extremadamente duro que ha sido este proceso, si a día de hoy miro hacia atrás, debo decir que todo ello ha contribuido a forjar mi carácter y, ante todo, a mi crecimiento como persona y profesional. Durante el desarrollo de esta Tesis no he estado sólo, y es de justicia, por tanto, agradecer a todas aquellas personas que han puesto su granito de arena para que hoy pueda estar escribiendo estas líneas. Por tanto, quiero agradecer:

A mis directoras de Tesis, Silvia Zanuy y Ana Gómez, por darme la oportunidad de poder desarrollar esta Tesis, además de por contribuir de forma significativa en mi formación como científico. Todo lo aprendido me será muy útil en el futuro.

A Ana Rocha, mi “postdoc” personalizado, por enseñarme todo lo que sé de laboratorio y ayudarme en innumerables cuestiones y dudas. Tu contribución en mi carrera investigadora ha sido y será muy importante.

A Manuel Carrillo, por su inestimable ayuda en todo lo referente al control fotoperiódico de la pubertad. Aprendí mucho a tu lado de la anatomía del cerebro mientras poníamos a punto las inyecciones intracerebroventriculares.

A Alicia Felip, con quién empecé mi andadura en biología molecular, que por entonces era un campo yermo para mí. Sabes que tus consejos serán de gran ayuda para mi futuro.

A Olivier Kah, por darme la oportunidad de poder pasar 3 meses en su laboratorio. Gracias a esta estancia en Francia pude ampliar en gran medida mis conocimientos en neuroanatomía de peces. También quiero agradecer a su equipo (Arianna, Mado y Rita) el hacerme sentir como en casa.

A Sol Ibáñez, quién se merece un párrafo para ella sola, y no sólo por su gran ayuda en el laboratorio, sino también por llevar esa alegría todos los días al despacho.

A todo grupo de Fisiología de Reproducción de Peces (Rafa, Isabel, Majo, Gregorio, Olivier, Berta, Amparo) por hacerme más fácil el día a día en el Instituto.

A todos los becarios y postdocs que han pasado por los grupos de Ingesta (María Agulleiro, Elisa, Raúl Guillot), Nutrición (Gabriel, Miriam, Laura, Patricia, Azucena y Alfonso), Artemia (Marta y Estela), Patología (Itziar, María y Gregorio), Moluscos (David) por su amistad y simpatía.

Al Servicio de Histología del IATS, Pepe y Lucinda, por haberme ahorrado horas y horas cortando cerebros ;), aunque sobre todo por su amistad.

Al Servicio de Animalario del IATS, José Ramón, Conrado y Ximo, por su ayuda en los muestreos y cuidado de los peces. Especialmente a Inma por su amistad y profesionalidad.

A todo el personal del IATS. En especial, a Charo y Luis, por cuidar tan bien de todos los becarios (¿alguien dijo paella?). También a José Miguel Cerdá-Reverter, por su amistad sincera en todos estos años y por más de un buen consejo. Y por último, y muy especialmente, a Carlos Vargas, gran amigo, que hizo que no me sintiera solo los fines de semanas que fui a trabajar. A ver que hace esta temporada nuestro Real Madrid...

A Vanesa, Sebastián, Raúl Cortés, Sandra, Morena y Zehor, por ofrecerme vuestra amistad tanto fuera como dentro del IATS. Sin vosotros esto no hubiera sido igual.

A mis amigos del fútbol, sois muchos para nombraros a todos, pero gracias a todos por esos sábados de partido. En especial a Ramón, Nacho, Jordi, Javi y Mike por ofrecerme vuestra amistad. No se os olvida.

A mis amigos de la salsa (¿salsa yo? debe ser un error de imprenta), en especial a Balma, Amado, Silvia, Paula, Fuen, Valentín y Anabel, por esos momentos que me ayudaron a llevar mejor el estrés.

A mis amigos de Don Benito, en especial a Manolo, Sara, Antonio, David y Molina. Nos hemos visto poco estos años, pero se os quiere.

A mis padres, Felipe y Manoli, por apoyarme desde que empecé en esta aventura. A pesar de la distancia siempre habéis estado presente. Gracias por haber contribuido a ser quién soy y sobre todo por vuestro apoyo estos últimos años, sin duda los más duros. Os quiero. También quiero agradecer a mis hermanos, Alberto y Rocío, su apoyo y su cariño todo este tiempo. Os quiero.

A Vicky. ¿Y qué puedo decir aquí que no haya dicho antes y que ya nadie sepa? Durante estos años he compartido contigo absolutamente todo, mis sueños, mis ambiciones, mis alegrías, mis penas, mis preocupaciones y mis miedos. Me has visto marchitar y florecer por igual número de veces y tu respuesta ha sido siempre una espléndida sonrisa, que me ha ayudado a seguir adelante (Sigue nadando, sigue nadando, nadando, nadando!!). Se hace, por tanto, difícil expresar por escrito mi gratitud, pero aún así, gracias por estar siempre ahí (cómo la canción de Barón Rojo ;)). De corazón. Te quiero.

A Adara. Esta tesis te la dedico a ti. Nunca te olvidaremos.

## Listado de abreviaturas (por orden alfabético)

### *Abreviaturas generales*

Ac	Anticuerpo
ALH	Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza
AP	Fotoperiodo acelerador
BCF	Frecuencia de batido
Bmax	Cambios en la densidad de los receptores de melatonina
BSA	Albúmina de suero bovino
Bw	Peso corporal
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHG	Cerebro-hipófisis-gónada
CHO	Células de ovario de hamster chino
CRE	Elemento de respuesta a cAMP
DM	Medio de dispersión
DME	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfato
EIA	Ensayo inmunoenzimático
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FB-MB	Cerebro anterior - cerebro medio
FBS	Suero fetal bovino
FN	Fotoperiodo natural
Gths	Gonadotrofinas
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
HL	Horas de luz
HO	Horas de oscuridad

HSI	Índice hepatosomático
i.c.v.	intracerebroventricular
IHC	Inmunohistoquímica
Ir	Inmunoreactivo
LIN	Índice de linealidad
LL	Luz continua
Kd	Afinidad de los receptores de melatonina
Luc	Luciferasa de luciérnaga
Lw	Peso del hígado
MFI	Índice de grasa mesentérica
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ne	Neurosecretoras
OVX + E	Hembras ovariectomizadas con implante de estradiol
P	p-valor
PAF	Paraformaldehído
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	PBS con Triton 0,1%
PKA	Proteína quinasa A
pcDNA3	Vector de expresión con promotor citomegalovirus
PKC	Proteína quinasa C
pRL-TK	Vector indicador de luciferasa de <i>Renilla</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RB	Tampón de reacción
RLU	Unidades relativas de luz
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SE	Célula de Sertoli
SEM	Error estándar de la media
SRE	Elemento de respuesta al suero
SSC	Espermatogonia indiferenciada primordial o primaria
StcI	Espermatocitos I
StcII	Espermatocitos II
Std	Espermátidas
StgA	Espermatogonia A
StgA*	Espermatogonia A indiferenciada
StgB	Espermatogonia B
Sz	Espermatozoides
STR	Índice de rectitud
VAP	Velocidad lineal
VCL	Velocidad curvilínea
VFW	Peso de la grasa peri-visceral
VSL	Velocidad rectilínea
WOB	Índice de oscilación

*Abreviaturas de genes/proteínas*

<i>11-βhsd</i>	11-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
11-KT	11-Cetotestosterona
20β-S	17α,20β-21-trihidroxi-4 pregnen-3-ona
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
DHP	17α, 20β dihidroxi-4-pregnen-3-ona
E2	17β – estradiol
<i>efl-alpha</i>	Factor de elongación 1-alfa
FSH/Fsh	Hormona estimulante del folículo
<i>fshβ</i>	Subunidad β de la hormona estimulante del folículo

GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAP	Péptido asociado con GnRH
GH	Hormona del crecimiento
GnIH/Gnih	Hormona inhibidora de gonadotrofinas
GnRH/Gnrh	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GnRHa	Análogo de la Gnrh
GnRHR/Gnrhr	Receptor de la hormona liberadora de gonadotrofinas
GPR54/Gpr54	Receptor 54 acoplado a proteínas G (receptor de kisspeptina)
GRF	Factor liberador de la hormona de crecimiento
<i>gth<math>\alpha</math></i>	Subunidad $\alpha$ de gonadotrofinas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
hGPR54	Receptor de kisspeptina humano
KISS/Kiss	Kisspeptina
KISS1R/Kiss1r	Receptor de kisspeptina
L-DOPA	1-dihidroxifenilalanina
LH/Lh	Hormona luteinizante
<i>lh<math>\beta</math></i>	Subunidad $\beta$ de la hormona luteinizante
LHRHa	Análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante
mGpr54	Receptor de kisspeptina de ratón
MIH	Hormona inductora de la maduración
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
NKA	Neuroquinina A
NKB	Neuroquinina B
NKBR/Tac3r	Receptor de neuroquinina 3
NKF	Neuroquinina F
NPY	Neuropéptido tirosina

PACAP	Polipéptido activador de la adenilatociclasa de la pituitaria
PRL	Prolactina
T	Testosterona
TAC3/Tac2/tac3a	Preprotaquicinina-B
TK	Taquicinina
TSH	Hormona estimulante del tiroides

*Abreviaturas de núcleos cerebrales*

AH	Adenohipófisis
ARC	Núcleo arcuato del hipotálamo
ATN	Núcleo tuberal anterior
Bm	Membrana basal
CC	Crista cerebelar
CCe	Corpus del cerebelo
EN	Núcleo entopeduncular
FR	Fascículo retroflexo
GL	Capa glomerular
Hb	Habénula
Hd	Hipotálamo dorsal
Hv	Hipotálamo ventral
Hypot	Hipotálamo
IPN	Núcleo interpeduncular
LR	Receso lateral
LX	Lóbulo vagal
MO	Bulbo raquídeo/ Médula oblonga
NH	Neurohipófisis
NLTl	Parte lateral del núcleo lateral tuberal
NLTm	Parte media del núcleo lateral tuberal

NLTv	Parte ventral del núcleo lateral tuberal
NPO	Núcleo preóptico
NPOav	Parte anteroventral del núcleo preóptico parvocelular
NPOpc	Parte parvocelular del núcleo preóptico parvocelular
NSV	Núcleo de los sacos dorsales
NVT	Núcleo ventral del tegmento
OB	Bulbo olfatorio
OC	Quiasma óptico
OT	Techo óptico
OVLT	Órgano vasculoso de la lámina terminal
Pal	Palio
PD	Pars distalis
PDP	Pars distalis proximalis
PDR	Pars distalis rostral
PI	Pars intermedia
Pit	Pituitaria/Hipófisis
POA	Región preóptica
rPOA	Área preóptica rostral
SC	Médula espinal
SR	Rafe superior
Syn	Sinencéfalo
Tel	Telencéfalo
TeO	Techo óptico
TNgc	Células ganglionares de las terminaciones nerviosas
TS	Torus semicircular
Vv	Parte ventral del telencéfalo ventral
VCe	Válvula del cerebelo

## Listado de especies (por orden alfabético)

Anguila europea (*Anguilla anguilla*)

Anguila japonesa (*Anguilla japonica*)

Bacalao Atlántico (*Gadus morhua*)

Caballa (*Scomber japonicus*)

Carpín dorado (*Carassius auratus*)

Carpita cabezona (*Pimephales promelas*)

Cobia (*Rachycentron canadum*)

Dorada (*Sparus aurata*)

Dorada japonesa (*Pagrus major*)

Esturión siberiano (*Acipenser baeri*)

Falso halibut del japon o lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*)

Hucho japonés (*Hucho perryi*)

Lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

Lubina americana (*Morone saxatilis*)

Lubina blanca (*Morone chrysops*)

Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)

Medaka (*Oryzias latipes*)

Mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*)

Mújol (*Mugil cephalus*)

Pargo rosado (*Pagrus auratus*)

Pez cebra (*Danio rerio*)

Pez gato africano (*Clarias gariepinus*)

Pez gato americano (*Ictalurus punctatus*)

Pez mosquito (*Gambusia affinis*)

Rana africana de uñas (*Xenopus laevis*)

Rana toro (*Rana catesbeiana*)

Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*)

Salmón del atlántico (*Salmo salar*)

Salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*)

Salmón japonés (*Oncorhynchus masou*)

Sardina ojo dorado (*Hiodon alosoides*)

Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*)

# **ÍNDICE DE CONTENIDOS**



<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La lubina europea.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Conceptos básicos de la reproducción en peces.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1 El testículo en teleósteos. La espermatogénesis.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2 Control endocrino de la reproducción.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2.1 Función de las gonadotrofinas en la gametogénesis.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2.2 Acción de los esteroides sexuales durante la espermatogénesis.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3 Control ambiental de la reproducción. El fotoperiodo.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.4 Primera maduración sexual o pubertad.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Control neuroendocrino de la reproducción en peces.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1 La organización del sistema hipotálamo-hipófisis.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1.1 Organización de la hipófisis.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1.2 Inervación de la hipófisis.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.2 Principales factores cerebrales implicados en el control de la función gonadotropa de la hipófisis.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2.1 Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH).....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2.2 Dopamina.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2.3 Neuropeptido Y.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3.2.4 Ácido gamma-aminobutírico (GABA).....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.2.5 Hormona inhibidora de gonadotrofinas (GnIH).....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.2.6 Neuroquinina B (NKB).....</b>	<b>30</b>
<b>1.4 El sistema Kiss/Gpr54: un nuevo actor en neuroendocrinología reproductiva.....</b>	<b>31</b>

1.4.1 Papel del sistema kisspeptina en el control neuroendocrino de la reproducción.....	34
1.4.1.1 Distribución neuroanatómica del sistema Kiss1/Gpr54 en peces.....	37
1.4.1.2 Acciones fisiológicas de las kisspeptinas en peces: efecto sobre el eje Cerebro – Hipófisis – Gónada.....	40
1.4.1.3 Acciones fisiológicas de las kisspeptinas en peces: efecto directo sobre la hipófisis.....	42
1.4.1.4 Papel del sistema Kiss/Gpr54 en el inicio de la pubertad de peces.....	45
1.4.1.5 Las kisspeptinas como mediadores en el control fotoperiódico de la reproducción en peces.....	46
2. OBJETIVOS.....	49
3. METODOLOGÍA.....	53
3.1 Químicos empelados en las experiencias <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	55
3.2 Animales y obtención de muestras.....	55
3.3 Inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.).....	56
3.4 Diseños experimentales <i>in vivo</i> .....	57
3.4.1 Análisis del efecto de la administración central de Kiss1 y Kiss2 sobre el eje reproductivo.....	57
3.4.2 Estudio de la participación del sistema Kiss/Gpr54 en la pubertad de la lubina y su implicación en la señalización de la información fotoperiódica.....	58
3.5 Técnicas de biología molecular.....	61
3.5.1 Extracción de RNA.....	61

3.5.2 Transcripción reversa (RT).....	63
3.5.3 Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	64
3.5.4 Generación y aislamiento de plásmidos de expresión.....	67
3.6 Análisis bioquímicos.....	68
3.6.1 Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	68
3.6.2 Ensayos inmunohistoquímicos.....	71
3.7 Técnicas de cultivo celular.....	75
3.7.1 Cultivo de líneas celulares. Estudio de especificidad ligando-receptor.....	75
3.7.2 Cultivo primario de células de hipófisis.....	76
3.8 Análisis histológico.....	78
3.9 Análisis del esperma.....	78
3.10 Tratamiento de datos y análisis estadístico.....	79
4. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.....	81
Capítulo 4.1 Estudio de la especificidad ligando-receptor del sistema Kiss/Gpr54 en la lubina.....	83
Capítulo 4.2 Análisis del efecto de la administración central de kisspeptinas sobre el eje reproductivo de la lubina.....	86
4.2.1 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre la expresión de genes cerebrales implicados en la función reproductiva.....	86
4.2.2 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre el contenido de Gnrh1 en el hipotálamo y en la hipófisis.....	88
4.2.3 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los receptores de Gnrh en la hipófisis.....	89

4.2.4 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los niveles plasmáticos de algunas hormonas implicadas en el proceso reproductivo.....	90
4.2.5 Efectos a largo plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los niveles plasmáticos de algunas hormonas implicadas en el proceso reproductivo.....	91
4.2.6 Efectos a largo plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los parámetros de calidad del esperma.....	92
Capítulo 4.3 Estudio de la regulación directa de las kisspeptinas sobre las células gonadotropas en la lubina.....	96
4.3.1 Niveles de expresión génica del sistema Kiss/Gpr54 en células dispersas de hipófisis de lubina.....	96
4.3.2 Efecto directo de los péptidos Kiss1-15 y Kiss2-12 sobre la síntesis y secreción de las gonadotrofinas.....	97
4.3.3 Efecto de la estimulación combinada de Kiss1-15 o Kiss2-12 con el análogo LHRHa sobre la liberación de las gonadotrofinas.....	100
4.3.4 Efectos de los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotrofinas en respuesta al tratamiento con Kiss1-15 o Kiss2-12.....	101
4.3.5 Caracterización de las células Kiss2 en la hipófisis.....	102
4.3.6 Efectos del LHRHa y de los esteroides sexuales sobre los niveles de expresión de los genes <i>kiss2</i> , <i>gpr54-1b</i> y <i>gpr54-2b</i> .....	106
Capítulo 4.4 Implicación del sistema Kiss/Gpr54 y de factores endocrinos en el inicio de la pubertad de la lubina.....	109
4.4.1 Crecimiento e índices morfológicos.....	109
4.4.2 Desarrollo gonadal.....	111

4.4.3 Expresión temporal de <i>gnrh1</i> en el cerebro y contenido de Gnrh1 en la hipófisis.....	112
4.4.4 Expresión temporal del sistema kisspeptina y <i>gnrh2</i> en el FB-MB.....	114
4.4.5 Expresión temporal del sistema kisspeptina en el hipotálamo.....	116
4.4.6 Perfil temporal de gonadotrofinas en la hipófisis y en plasma.....	118
4.4.7 Perfil temporal de 11-KT en plasma.....	120
<b>Capítulo 4.5 Estudio de la participación del sistema Kiss/Gpr54 y de factores endocrinos en la señalización de la información fotoperiódica.....</b>	<b>123</b>
4.5.1 Desarrollo gonadal.....	123
4.5.2 Expresión temporal de genes <i>kiss</i> y <i>gnrh</i> en el FB-MB de peces bajo AP.....	126
4.5.3 Expresión temporal de genes <i>kiss</i> y <i>gnrh</i> en el FB-MB de peces bajo LL.....	130
4.5.4 Patrón temporal de los niveles de gonadotrofinas y Gnrh1 en la hipófisis de peces bajo AP.....	131
4.5.5 Patrón temporal de los niveles de gonadotrofinas y Gnrh1 en la hipófisis de peces bajo LL.....	133
4.5.6 Patrón temporal de los niveles de gonadotrofinas y 11-KT de peces bajo AP.....	135
4.5.7 Patrón temporal de los niveles plasmáticos de gonadotrofinas y 11-KT de peces bajo LL.....	137
<b>Capítulo 4.6 Desarrollo argumental.....</b>	<b>141</b>
4.6.1 Interacción diferencial ligando-receptor del sistema Kiss/Gpr54 en la lubina.....	141

4.6.2 En la lubina, el cerebro anterior-medio (FB-MB) actúa como una ruta de señalización endocrina del sistema Kiss2/Gnrh1 en el control de la actividad gonadotropa.....	144
4.6.3 En la lubina, el neuropéptido Kiss2 regula la función de las células gonadotropas a través de una ruta de señalización paracrina/autocrina.....	155
4.6.4 Nuevas perspectivas sobre los factores implicados en la regulación del inicio de la pubertad en la lubina.....	163
4.6.5 La señal fotoperiódica regula el control de las poblaciones neuronales de Kiss1 y Gnrh2 del FB-MB sobre el eje reproductivo.....	170
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>179</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO I</b> Listado de publicaciones	
<b>ANEXO II</b> Participaciones en Congresos	

# **1. INTRODUCCIÓN**



# 1. Introducción

---

## **Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)**

*Filo Chordata*

*Subfilo Vertebrata*

*Superclase Osteichthyes*

*Clase Actinopterygii*

*Subclase Neopterygii*

*Infraclase Teleostei*

*Superorden Acanthopterygii*

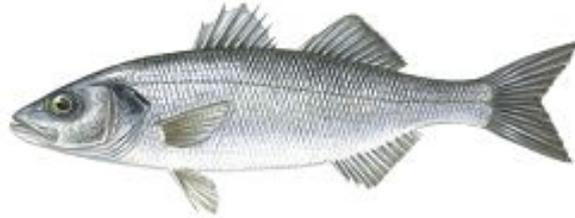
*Orden Perciformes*

*Suborden Percoidei*

*Familia Moronidae*

*Genero Dicentrarchus Gill, 1860*

*Especie Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)*



### **1.1 La lubina europea**

La lubina europea (lubina de ahora en adelante), *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), es un teleósteo marino de la familia Moronidae perteneciente al orden de los Perciformes. Es una especie esencialmente mediterránea, aunque también ha sido descrita en las costas del norte de Europa. Es un pez eurihalino y euritermo, por lo que puede vivir en ambientes con un amplio rango de salinidades (3-38‰) y temperaturas (2-32°C) (Carrillo *et al.*, 1995; Pickett y Pawson, 1994).

Como la gran mayoría de peces teleósteos, la lubina es una especie gonocórica, en la cual machos y hembras permanecen como sexos separados durante todo el ciclo vital. Sin embargo, es muy difícil distinguir el sexo de un individuo determinado dada la ausencia de caracteres sexuales externos. No obstante, el crecimiento está claramente relacionado con el sexo, de tal forma que las hembras crecen más y alcanzan mayor tamaño que los machos. En general, en el Mediterráneo y en condiciones naturales, la primera maduración sexual de los machos tiene lugar durante el segundo año de vida y

# 1. Introducción

---

un año después la de las hembras. La lubina es una especie con desarrollo ovárico de tipo sincrónico por grupos, es decir durante la época de puesta, cada hembra produce varias cohortes de oocitos. De esta forma, una hembra puede dar lugar a 4 ovulaciones en una misma época de puesta que puede durar de 1 a 2 meses. La recrudescencia gonadal y la puesta son dependientes del fotoperiodo y de la temperatura del agua, por lo que, según la latitud, tendrá lugar durante el invierno en el Mediterráneo o durante la primavera en las Islas Británicas. Los huevos son pelágicos y transparentes, con 1-2 gotas de grasa. Una vez fertilizados, el desarrollo embrionario dura en torno a 3 días a 15°C, mientras que el desarrollo larvario dura unos 40 días a 19°C. Después de la eclosión, los juveniles habitan en aguas costeras y estuarios, donde crecen y se preparan para su primera maduración sexual (Barnabé, 1991; Carrillo *et al.*, 1995; Pickett y Pawson, 1994).

## 1.2 Conceptos básicos de la reproducción en peces

### 1.2.1 El testículo en teleósteos. La espermatogénesis

En la lubina, los testículos son de tipo lobular y están compuestos por multitud de lóbulos separados entre sí por capas de tejido fibroso conectivo. En general los testículos son alargados y están unidos por la pared dorsal de la cavidad corporal presentando un espermiducto en la superficie medio dorsal posterior. El espermiducto desemboca en la papila urogenital, ubicada entre el recto y los ductos urinarios. En los peces teleósteos los testículos se organizan en dos compartimentos principales, el intersticial y el tubular. El intersticial se caracteriza por la presencia de células esteroideogénicas o de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos, macrófagos, mastocitos y tejido conectivo (Koulish *et al.*, 2002). El compartimento tubular contiene las células germinales y las células somáticas que les dan soporte, las células de Sertoli. Estas

# 1. Introducción

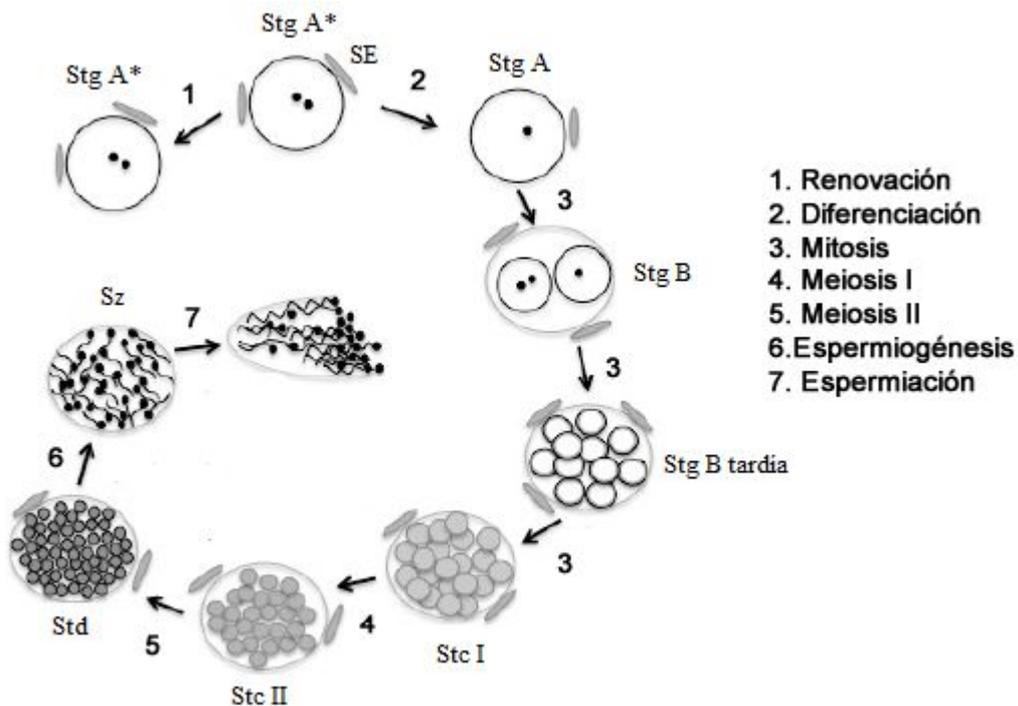
---

últimas son esenciales para las células germinales, ya que son determinantes para la capacidad espermatogénica del testículo y condicionan el tipo de espermatogénesis (Matta *et al.*, 2002). En peces, la espermatogénesis es de tipo cístico (Callard, 1996), por lo que las células de Sertoli se asocian a una espermatogonia indiferenciada a partir de la cual se genera un ciste de células germinales clónicas, todos ellas en el mismo estado de desarrollo. Además, en peces, las células de Sertoli conservan su capacidad proliferativa incluso en el estado adulto (Schulz *et al.*, 2005). Esto es debido a que durante la fase de mitosis, la cual se produce al inicio de la espermatogénesis, las células de Sertoli proliferan al igual que las células germinales que forman el ciste. Esta capacidad proliferativa de las células de Sertoli se reduce cuando las células germinales entran en meiosis, y se detiene definitivamente en los cistes postmeióticos.

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular en el que una espermatogonia indiferenciada primordial o primaria (SSC, *spermatogonial stem cell*) (De Rooij y Grootegoed, 1998) prolifera y se diferencia para, finalmente, producir espermatozoides maduros. En los peces, las SSC experimentan dos tipos de divisiones (**Fig. 1.1**). Unas destinadas a su propia renovación que garantiza la fertilidad a largo plazo, y otras que llevan a su diferenciación y están dirigidas a la formación de los espermatozoides (Miura *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2003). Este es un proceso organizado en tres fases principales: 1) proliferación mitótica de las espermatogonias; 2) divisiones meióticas para la formación de los espermatozoides primarios y secundarios; y 3) formación de espermátidas haploides que finalmente se reestructurarán en espermatozoides (Pudney, 1995; Schulz *et al.*, 2010). La espermatogénesis empieza cuando una SCC experimenta un número determinado de divisiones mitóticas. Estas divisiones dan lugar a una secuencia de espermatogonias A diferenciadas y espermatogonias B, dando lugar a una gran población de espermatogonias. Como consecuencia de las divisiones mitóticas, las

# 1. Introducción

espermatogonias van cambiando su morfología, de tal forma que a medida que progresa la espermatogénesis la heterocromatina incrementa y el tamaño celular y nuclear disminuye (Zanuy *et al.*, 2009). La última generación de espermatogonias dará lugar, en la última división mitótica, a los espermatocitos primarios en fase de preleptoteno, los cuales inician la primera división meiótica para formar los espermatocitos secundarios.



**Figura 1.1** Representación del proceso de espermatogénesis en peces teleósteos. Espermatogonia A indiferenciada (StgA\*), espermatogonia A (StgA), espermatogonia B (StgB), espermatocitos I (StcI), espermatocitos II (StcII), espermatidas (Std), espermatozoides (Sz), célula de Sertoli (SE) (adaptado de Molés, 2011).

Debido a las transformaciones morfológicas que experimentan durante la larga profase de la meiosis, los StcI adquieren los nombres de espermatocitos en leptoteno, zygoteno, paquiteno y diploteno (Cobb y Handel, 1998). Finalmente, durante la espermiogénesis, las Std experimentan una serie de transformaciones celulares. De esta forma se alargan para adoptar la forma de espermatozoide, adquieren flagelo, compactan al máximo su DNA en un pequeño núcleo localizado en la cabeza y crean el cuerpo intermedio en el que se acumularán las mitocondrias. En el momento de la espermiación, la pared del

# 1. Introducción

---

ciste se abre y se libera el esperma al lumen, lugar en el que adquiere la capacitación (Schulz *et al.*, 2010).

## 1.2.2 Control endocrino de la reproducción

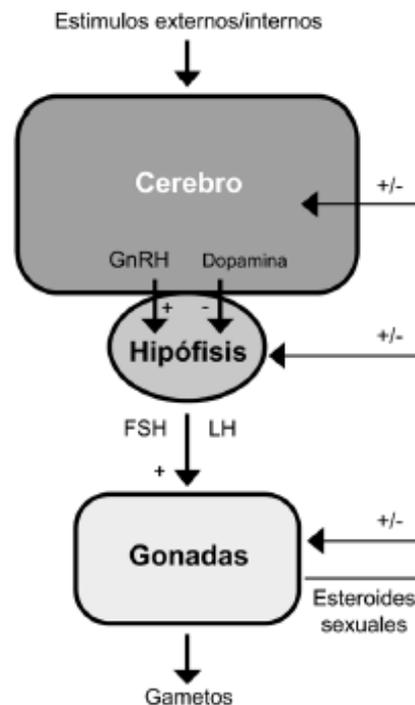
La reproducción en peces, como en otros vertebrados, está controlada por un sistema endocrino constituido por el cerebro, la hipófisis y las gónadas o eje cerebro-hipófisis-gónada (eje CHG) (Fink, 2000). Este eje es responsable de la regulación hormonal que controla el proceso reproductor. El cerebro integra los diferentes estímulos, externos e internos, y los traduce en señales neuroendocrinas (neuropéptidos) responsables de la síntesis y secreción hipofisaria de dos gonadotrofinas (Gths), la hormona folículo estimulante (Fsh) y la hormona luteinizante (Lh). Posteriormente, dichas Gths llegan a las gónadas a través del torrente sanguíneo, donde actúan sobre el desarrollo gonadal y la gametogénesis a través de la inducción de la secreción de esteroides sexuales. A su vez, los esteroides gonadales controlan la síntesis y liberación de Gths, bien sea actuando directamente sobre las células hipofisarias o indirectamente sobre ciertos núcleos hipotalámicos, mediante retroalimentación positiva o negativa, dependiendo del estado de desarrollo gonadal (Levavi-Sivan *et al.*, 2010) (**Fig. 1.2**).

### 1.2.2.1 Función de las gonadotrofinas en la gametogénesis

La hipófisis es una pequeña glándula endocrina adosada a la parte ventral del cerebro de todos los vertebrados. En ella se sintetizan importantes hormonas implicadas en la regulación de la mayoría de los procesos fisiológicos del organismo, incluidas las gonadotrofinas que, como ya se ha visto anteriormente, están implicadas en el proceso reproductor. Actualmente se sabe que, tanto en los machos como en las hembras de los peces teleósteos, la Fsh y la Lh se secretan en distintas células y en diferentes momentos del ciclo reproductivo, lo que sugiere una función diferencial de ambas Gths sobre el

# 1. Introducción

desarrollo gonadal. Sin embargo, debido a la escasez de herramientas para medir los niveles de ambas Gths en plasma, especialmente de Fsh, la información al respecto se limita a unas pocas especies de salmones (Swanson, 1991), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Gómez *et al.*, 1999), la tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Aizen *et al.*, 2007), y más recientemente la lubina (Molés *et al.*, 2012) y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Chauvigné *et al.*, 2014).



**Figura 1.2** Representación esquemática del eje CHG en peces teleósteos. El símbolo + indica estimulación mientras que – representa inhibición (tomado de Molés, 2011)

En salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Swanson, 1991) y en trucha arcoíris (Prat *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1999), los niveles de Fsh plasmática incrementan durante el inicio de la oogénesis (coincidiendo con el inicio de la vitelogénesis) y de la espermatogénesis (revisado en Swanson *et al.*, 2003). En este caso concreto, al ser una especie de puesta única, los niveles de Fsh en plasma permanecen elevados hasta el inicio de la ovulación y espermiación, disminuyendo posteriormente (Swanson, 1991).

## 1. Introducción

---

Lo mismo se observó en el caso de machos de lenguado senegalés, donde se encontraron niveles elevados de Fsh durante la fase de espermatogénesis temprana que disminuyeron durante la de espermiación (Chauvigné *et al.*, 2014). En el caso de la tilapia, una especie con ovarios de desarrollo asíncrono, se detectaron dos picos de Fsh entre dos puestas sucesivas. El primero se observó 2-3 días después de la primera puesta, en un estado de desarrollo que probablemente fuera la fase de vitelogénesis. El segundo se observó justo antes de la segunda puesta, en el estado de maduración de los oocitos (Aizen *et al.*, 2007). En la lubina, especie objeto de este estudio, los niveles máximos de Fsh en plasma de hembras se observan durante la vitelogénesis y la post-vitelogénesis, descendiendo posteriormente durante la maduración y ovulación (Molés *et al.*, 2011, 2012). Para los machos, los niveles de Fsh incrementan durante el desarrollo testicular y decaen justo en el momento que empieza la espermiogénesis (Molés *et al.*, 2012). Estudios de expresión de la subunidad *fsh $\beta$*  realizados con, lubina americana (*Morone saxatilis*) (Hassin *et al.*, 1998), falso halibut del Japón o lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Kajimura *et al.*, 2001), y pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (Kumar y Trant, 2004) ponen de manifiesto la dinámica de los niveles de expresión de dicha subunidad, que incrementa durante el inicio del crecimiento gonadal y disminuye durante el período de puesta. Los niveles de Lh plasmática tienen un comportamiento opuesto a los de Fsh, de tal forma que permanecen muy bajos durante las fases tempranas de la gametogénesis e incrementan durante la maduración final de los oocitos y la espermiación (referencias en Swanson *et al.*, 2003). De igual forma, los análisis de Lh en plasma de machos de lubina muestran un incremento de los niveles de esta hormona durante la espermatogénesis, que alcanzan sus valores máximos durante la fase de espermiación. En hembras, los niveles plasmáticos de Lh permanecen bajos durante la pre-vitelogénesis y vitelogénesis

# 1. Introducción

---

temprana, empiezan a aumentar durante la vitelogénesis tardía y post-vitelogénesis y alcanzan sus máximos valores durante la maduración/ovulación (Rocha *et al.*, 2009)

Para que las Gths ejerzan su función, es indispensable que en las gónadas estén presentes sus receptores específicos. Estudios llevados a cabo en diferentes especies de teleosteos muestran que hay diferencias en el patrón de expresión gonadal de los genes *fshr* y *lhr*, lo cual sugiere que dichos receptores están implicados en períodos críticos de la gametogénesis. Por ejemplo, en algunas especies de salmónidos (Campbell *et al.*, 2006; Bobe *et al.*, 2004) los niveles del receptor *fshr* aumentan en el momento de la maduración del oocito, mientras que los niveles de Fsh en plasma e hipófisis presentan perfiles elevados en las fases previas. En el caso de la lubina, la expresión ovárica de ambos genes, *fshr* y *lhr*, muestra un perfil similar (Rocha *et al.*, 2009), con un incremento mayor de *fshr* durante la vitelogénesis, aunque ambos permanecen elevados durante la maduración y la ovulación. En el caso de los machos, ambos receptores muestran un patrón similar caracterizado por un perfil bimodal con un mayor nivel de expresión durante la espermiación que en el caso del gen *lhr* coincide con los niveles más elevados de Lh plasmática.

## 1.2.2.2 Acción de los esteroides sexuales durante la espermatogénesis

Como ya se ha mencionado anteriormente, las mitosis que experimentan las SSC están dirigidas hacia su propia renovación, o hacia la diferenciación en esperma mediante meiosis. En algunas especies de peces el proceso de renovación de las SSC es debido a la acción del  $17\beta$  – estradiol (E2). Así, en anguila japonesa (*Anguilla japonica*) y hucho japonés (*Hucho perryi*), se ha demostrado, tanto *in vivo* (Miura *et al.*, 1999; Amer *et al.*, 2001) como *in vitro* (Miura *et al.*, 1999), que la presencia de E2 incrementa el número de mitosis de las SSC dirigidas hacia su propia renovación pero no hacia su

# 1. Introducción

---

diferenciación. Por el contrario, en peces hay evidencias, que demuestran que la aparición de las mitosis, encaminadas hacia la diferenciación de las SSC, se genera tras el estímulo de las GtHs. Estudios *in vitro* en peces demuestran que la acción principal de la Fsh es promover la proliferación de las espermatogonias hacia la diferenciación y formación del esperma (Ohta *et al.*, 2007) a través de su acción sobre las células de Leydig y de Sertoli. Se sabe, que la acción de la Fsh sobre las células de Leydig estimula la producción de 11-KT (Ohta *et al.*, 2007; Molés *et al.*, 2008; García-López *et al.*, 2008). Este andrógeno está considerado como el más importante en los peces y su función es esencial en la espermatogénesis, tal y como se ha demostrado en la anguila japonesa (Miura *et al.*, 1991a, 1991b; Miura *et al.*, 1996) y en el pez cebra (*Danio rerio*) (Leal *et al.*, 2009).

La siguiente fase del proceso de espermatogénesis es la entrada de las espermatogonias B en meiosis para dar lugar a los espermatocitos primarios. Este proceso también está bajo control hormonal, pero no de los andrógenos, sino de los progestágenos. La 17 $\alpha$ , 20 $\beta$  dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP), está considerada como una hormona inductora de la maduración (MIH) en los machos y en la fase final de la espermatogénesis, durante la espermiación, sus niveles plasmáticos son altos. No obstante, en varias especies de teleósteos, también se han detectado niveles plasmáticos altos de DHP en momentos relevantes de la proliferación espermatogonial (Schulz *et al.*, 2010). En este sentido, se ha confirmado, *in vitro*, que la DHP es capaz de inducir el inicio la meiosis en las espermatogonias (Miura *et al.* 2006). Además, la DHP también induce la síntesis de 11-KT, que es esencial para el avance de la espermatogénesis (Ozaki *et al.*, 2006). Dicha inducción está asociada al incremento de la expresión del gen de la enzima 11- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (*11- $\beta$ hsd*). Así, algunos trabajos han demostrado que la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Jiang *et al.*, 2003) y la Lh (Gómez *et al.*, 1999)

# 1. Introducción

---

son capaces de estimular la expresión de *11-βhsd*, lo cual es coherente con la implicación de la Lh en las etapas finales de maduración de los gametos. Por tanto, la función principal de la Lh es estimular la síntesis de esteroides implicados en la capacitación y maduración del esperma, como son la DHP y la  $17\alpha,20\beta$ -21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona ( $20\beta$ -S) que también actúa como MIH.

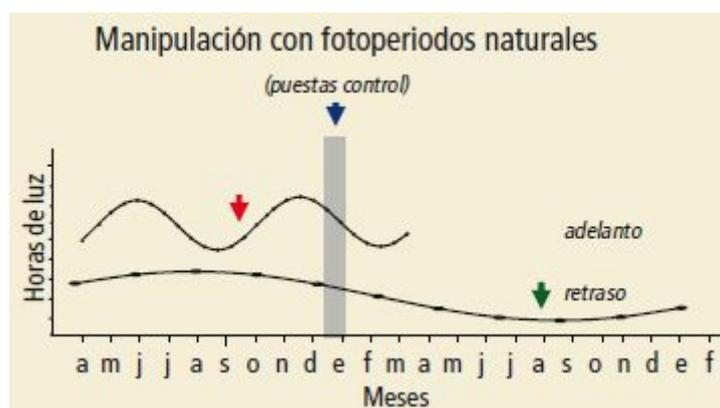
## 1.2.3 Control ambiental de la reproducción. El fotoperiodo

Los peces, al ser animales poiquiloterms, son reproductores estacionales y debido a ello restringen sus períodos de puesta a momentos muy concretos del año, estando en estrecha sincronía con las variaciones del fotoperiodo en la latitud donde se encuentran y de la temperatura del agua donde habitan. En el caso de nuestra especie, la lubina, ésta presenta un periodo de puesta restringido a los meses de invierno (en el Mediterráneo noroccidental;  $40^\circ\text{LN}$ ), con temperaturas de alrededor de  $12^\circ\text{C}$  y fotoperíodos de 9-10 horas de luz:15-14 horas de oscuridad (9-10 HL:15-14 HO). Las puestas ocurren invariablemente entre los meses de Enero-Marzo con pequeños adelantos o atrasos según las variaciones anuales térmicas del agua (Carrillo *et al.*, 1995; Prat *et al.* 1999). Esta sincronía de la función biológica de la especie con las condiciones medio-ambientales, representa una ventaja para su supervivencia debido a que ajusta una función biológica a un período del año que es el más favorable para su supervivencia. Sin embargo, esto representa un problema para el acuicultor ya que le obliga a comercializar su producto en períodos del año muy restringidos. Además, este mismo hecho no permite satisfacer las demandas de la industria acuícola que necesita un suministro continuo de huevos y larvas a lo largo de todo el año. Los peces, gracias a su flexibilidad de adaptación, son capaces de sincronizar sus ritmos biológicos con las fluctuaciones periódicas ambientales para optimizar los recursos existentes. De esta forma, una manipulación adecuada de los parámetros ambientales puede alterar sus

# 1. Introducción

ritmos biológicos y ponerlos al servicio de la industria acuícola (Bromage *et al.*, 2001; Imsland *et al.*, 2003; Begtashi *et al.*, 2004; Norberg *et al.*, 2004; Migaud *et al.*, 2006).

El control ambiental más generalizado de la reproducción de los peces de zonas templadas en cautividad, está basado en simulaciones, lo más ajustadas posible mediante el uso de relojes temporizadores, del fotoperiodo y de la temperatura a los de su hábitat natural. Sin embargo existen otros tipos de manipulación de los factores ambientales naturales, utilizados en piscicultura, para modificar el tiempo del período de las puestas del stock de reproductores, como la aplicación de ciclos de fotoperiodos comprimidos o expandidos respecto a las variaciones naturales de luz. (**Fig. 1.3**).

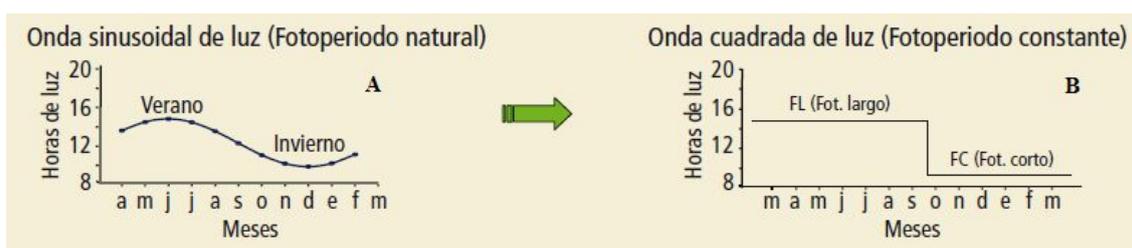


**Figura 1.3** Contracción y expansión de los ciclos naturales de luz. Las flechas verticales indican la época de puesta (tomado de Carrillo *et al.*, 2009).

Por un lado, los fotoperiodos comprimidos son ciclos estacionales de luz comprimidos a períodos de tiempo más cortos de un año. En este sentido, desde que Hoover (1937) demostró que los fotoperiodos comprimidos adelantaban la puesta de la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), se han venido utilizando ciclos comprimidos, típicamente de 6 o 9 meses, en varias especies de teleósteos (Bromage y Duston, 1986; Beacham y Murray, 1993; Poncin, 1989; Blyte *et al.*, 1994; Bon *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000a; Norberg *et al.*, 2004). En general, mientras más comprimido es el fotoperiodo más se suele adelantar la puesta. Por otro lado, los fotoperiodos expandidos son

# 1. Introducción

fotoperiodos cuyos ciclos tienen una duración más larga de un año. Típicamente, se han utilizado fotoperíodos expandidos de una duración de 18 meses por ciclo, que han provocado retrasos de 3-6 meses en varias especies de teleósteos (Bromage y Duston, 1986; Norberg *et al.*, 2004). Sin embargo, la manipulación ambiental que emplea ciclos naturales de luz desfasados, expandidos o comprimidos, a pesar de ser efectiva en alterar la época de puesta de los reproductores, necesita de una programación un tanto compleja de los relojes temporizadores para regular de forma precisa las variaciones térmicas o fotoperiodicas del medio ambiente. No obstante, esta manipulación se puede simplificar en gran medida mediante la aplicación de ciclos foto-térmicos constantes sin que por ello se pierda efectividad en la regulación de los ciclos reproductores. Así pues, se ha comprobado que los incrementos o disminuciones progresivas de luz y temperatura, pueden ser reemplazados por ciclos foto-térmicos de longitud constante o por una combinación de ellos (Bromage *et al.*, 1984, 1992; Carrillo *et al.*, 1989, 1993; Zanuy *et al.*, 1995; Amano *et al.*, 1995; Prat *et al.*, 1999; Hansen *et al.* 2001; Rodríguez *et al.*, 2004) (**Fig. 1.4**).



**Figura 1.4** Sustitución de los métodos de manipulación ambiental mediante cambios progresivos estacionales de luz por la aplicación de fotoperiodos constantes para alterar la época de puesta. **A.** Variación estacional natural del fotoperiodo (onda sinusoidal). **B.** Fotoperiodos largos y cortos constantes (onda cuadrada) (tomado de Carrillo *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que el efecto de la manipulación fotoperiódica en la alteración de las puestas está claramente limitado por la temperatura. Los estudios en salmónidos generalmente se hacían a temperatura baja constante propia de aguas de

# 1. Introducción

---

manantial (Bromage *et al.*, 1984; Takashima y Yamada, 1984). En cambio, los estudios en lubina se realizaron a temperatura ambiente siguiendo las fluctuaciones naturales del agua de mar. Esto permitió ver que existía un umbral térmico para que las puestas de la lubina tuvieran lugar de manera espontánea. Anteriormente ya se había identificado este umbral (Zanuy *et al.* 1986; Devauchelle y Coves, 1988) al constatar que las ovulaciones y las puestas sólo se producían de forma espontánea cuando el rango de temperatura era 9-17 °C. Sin embargo, es muy difícil discriminar claramente entre los efectos de la temperatura y los del fotoperíodo dado que en la naturaleza, estos dos factores casi siempre suelen ir asociados. De todas maneras, en peces, el fotoperíodo parece estar asociado al control de los ritmos endógenos o relojes involucrados en la alteración del tiempo de maduración, mientras que la temperatura, podría actuar de una manera permisiva en la entrada de estos procesos endógenos.

Como hemos visto, el fotoperíodo es la principal señal ambiental que usan la mayoría de las especies de peces, de las zonas templadas, para predecir los cambios estacionales. Ello les permite prever la época de puesta mediante la activación de las vías neuroendocrinas que, a su vez, estimulan el eje reproductivo y el crecimiento gonadal. En este sentido, el órgano pineal en peces es una estructura fotosensible capaz de captar las señales de luz procedentes del medio ambiente. Este órgano desempeña un papel clave en la transducción de estas señales en producción circadiana de melatonina. En todos los vertebrados, la melatonina producida por la glándula pineal se libera al torrente sanguíneo durante la fase oscura, proporcionando así niveles altos durante la noche y bajos durante el día. Por tanto, se puede decir que la melatonina es la hormona responsable de proporcionar información al organismo acerca de la hora del día y de la época del año (Reiter *et al.*, 1993). En lubina, los ritmos de melatonina en plasma reflejan la capacidad del órgano pineal para integrar la información estacional y por

## 1. Introducción

---

tanto, para sincronizar el proceso reproductivo anual (García-Allegue *et al.*, 2001). En este sentido, se ha demostrado que machos de lubina mantenidos bajo fotoperiodo natural exhiben variaciones diarias y anuales en los niveles de melatonina plasmática, las cuales se caracterizan por presentar elevaciones nocturnas. Dichas elevaciones desaparecen en peces bajo un régimen de luz continua (Bayarri *et al.*, 2010). En este sentido, se sabe que la exposición a luz continua, durante un periodo de tiempo largo, afecta a la afinidad de los receptores de melatonina ( $K_d$ ) y a los cambios en su densidad ( $B_{max}$ ). Así, la presencia de cambios estacionales en  $K_d$  y  $B_{max}$  en la región hipotalámica indica que este tejido está directamente implicado en el control rítmico de la reproducción y además existe una relación clara entre el estado de madurez del animal y las variaciones diarias y estacionales en los sitios de unión de la melatonina (Bayarri *et al.*, 2010). Sin embargo, la melatonina ocular en lubina presenta perfiles diarios. Así, en esta especie, se han observado niveles elevados de melatonina en la retina durante el día, y niveles bajos durante la noche (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997). A pesar de ello, en otro estudio, también en lubina, se sugiere que la melatonina ocular no contribuye directamente a la melatonina en plasma, pero que el órgano pineal requiere de la información lumínica procedente de los ojos para secretar y liberar la melatonina adecuadamente al torrente sanguíneo (Bayarri *et al.*, 2003).

Por tanto, la información de los ritmos estacionales de melatonina es utilizada por los reproductores estacionales para ajustar su ciclo reproductivo con la estación apropiada. Así, los cambios estacionales en la duración del día son transducidos en ritmos de melatonina adecuados que modulan la actividad de eje reproductivo y la regulación del desarrollo gonadal (Falcón *et al.*, 2010). No obstante, queda mucho por investigar en torno a las dianas celulares y moleculares de la acción de la melatonina.

# 1. Introducción

---

## 1.2.4 Primera maduración sexual o pubertad

En los peces, como en los otros vertebrados, se entiende como pubertad el periodo del ciclo vital durante el cual un juvenil inmaduro adquiere la capacidad de reproducirse sexualmente por primera vez, implicando para ello la activación funcional del eje reproductivo (Schulz *et al.*, 1999; Zanuy *et al.*, 2001; Okuzawa *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2002; Jalabert *et al.*, 2005). El final de la pubertad en los machos ocurre cuando tiene lugar la primera hidratación del espermatozoide y la espermiación (Okuzawa *et al.*, 2002). Sin embargo, los numerosos eventos neuroendocrinos y de desarrollo que intervienen en este proceso hacen más difícil reconocer el inicio de la pubertad. De acuerdo a los resultados obtenidos en peces se cree que la transición hacia la primera ola de proliferación espermatogonial rápida, es el punto de inicio de la pubertad gonadal en machos y ésta se regularía por la acción de la Fsh (Taranger *et al.*, 2010).

En los ecosistemas naturales hay una relación clara entre la edad, el tamaño al cual se inicia la pubertad y las condiciones ambientales, como por ejemplo la disponibilidad de alimento que delimita el crecimiento (Stearns *et al.*, 1986, 2000; Hutchings *et al.*, 2008; Piche *et al.*, 2008). En condiciones de cultivo intensivo es frecuente observar que la edad y el tamaño de los peces que alcanzan la pubertad se reducen en comparación con los que presenta la misma especie en los ecosistemas naturales (Svasand *et al.*, 1996). Por tanto, es plausible pensar que la pubertad precoz o precocidad es una respuesta fenotípica a las condiciones de crecimiento mejoradas por la mayor disponibilidad de alimento y, probablemente, asociada a unas reservas de energía más elevadas. Por el contrario, un crecimiento lento puede retrasar la edad de la pubertad con el fin de mantener la forma física, de manera que la aparición de esta se puede retrasar, en uno o más años, debido a la estacionalidad del proceso reproductor (Taranger *et al.*, 2010). Así pues parece lógico que para que haya machos precoces, estos deben superar un

## 1. Introducción

---

umbral crítico de tamaño y/o estado energético, mientras que los individuos cuyos tamaños y/o estados energéticos están por debajo de este umbral permanecen inmaduros hasta la próxima temporada reproductiva. En los cultivos intensivos de lubina hay una proporción considerable (alrededor del 20-30% o superior) de machos precoces, durante el primer año de vida (Carrillo *et al.*, 1995), que muestran un tamaño significativamente mayor al de los machos no precoces (Begtashi *et al.*, 2004). Sin embargo, durante el segundo año de vida, estos machos precoces muestran una tasa de crecimiento menor que la de los machos no precoces (Felip *et al.*, 2006). Lo más probable es que pubertad y reproducción cíclica de los peces adultos, compartan el mismo mecanismo de acción del sistema neuroendocrino implicado en la transducción de las señales ambientales. De hecho, mediante la aplicación de fotoperíodos comprimidos o días largos constantes a lubinas juveniles, se logró alterar, convenientemente, los perfiles de algunas hormonas reproductivas obteniendo un adelanto y un retraso, respectivamente, de la primera madurez sexual (Rodríguez *et al.*, 2001a, b). Por otro lado, un estudio en juveniles de bacalao Atlántico (*Gadus morhua*), demostró que la exposición a luz continua (LL) es capaz de inhibir su maduración sexual (Davie *et al.*, 2007). Al igual que ocurre en el bacalao, en los machos juveniles de lubina expuestos a LL, durante el primer ciclo anual, se reducen drásticamente las tasas de espermiación precoz, en comparación con juveniles mantenidos bajo fotoperiodo natural (Begtashi *et al.*, 2004). En este sentido, Rodríguez *et al.* (2012) identificaron un periodo fotosensible, en la lubina, que coincidía con el inicio de la pubertad. Este periodo fotosensible, que se localizó en septiembre, probablemente está relacionado con la disminución de las horas de luz que ocurre en esta misma época.

# 1. Introducción

---

## **1.3 Control neuroendocrino de la reproducción en peces.**

La reproducción sexual es uno de los procesos biológicos más fascinantes que ocurren en la naturaleza. Este proceso implica la fusión de dos gametos, lo cual permite que haya una recombinación única de genes parentales, a la vez que incrementa la diversidad genética de la descendencia. El éxito de la reproducción sexual depende, fundamentalmente, de la producción de gametos en las gónadas masculinas y femeninas. Sin embargo, la función gonadal está controlada por una serie de procesos neuroendocrinos, que transmiten los cambios en el medio ambiente y en el entorno hormonal al organismo. De esta forma, la neuroendocrinología se puede definir como el estudio de la actuación cerebral sobre el sistema endocrino y, recíprocamente, como el estudio de los efectos ejercidos por este sobre el cerebro. Estos dos mecanismos están estrechamente vinculados y contribuyen a que el organismo adapte su respuesta a los cambios que se producen en el medio externo y entorno endocrino (Kah, 2009). La neuroendocrinología, especialmente en peces, es un campo de investigación aún joven y a pesar de que se han hecho progresos considerables, todavía quedan muchas incógnitas por resolver.

### **1.3.1 La organización del sistema hipotálamo-hipófisis.**

Como en todos los vertebrados, la actividad de la hipófisis de los peces se controla, en gran medida, por una serie de neurohormonas (neuropéptidos, neurotransmisores) sintetizadas por poblaciones neuronales específicas del cerebro que posteriormente alcanzan dicho órgano diana para ejercer su acción (Kah, 2009). En general, los mecanismos fundamentales de este proceso son muy similares entre peces y tetrápodos, aunque existen diferencias significativas en la forma como estas neurohormonas

# 1. Introducción

---

alcanzan las células diana en la hipófisis. Debido a ello, es importante conocer bien la organización neuroanatómica del complejo hipotálamo-hipófisis en peces.

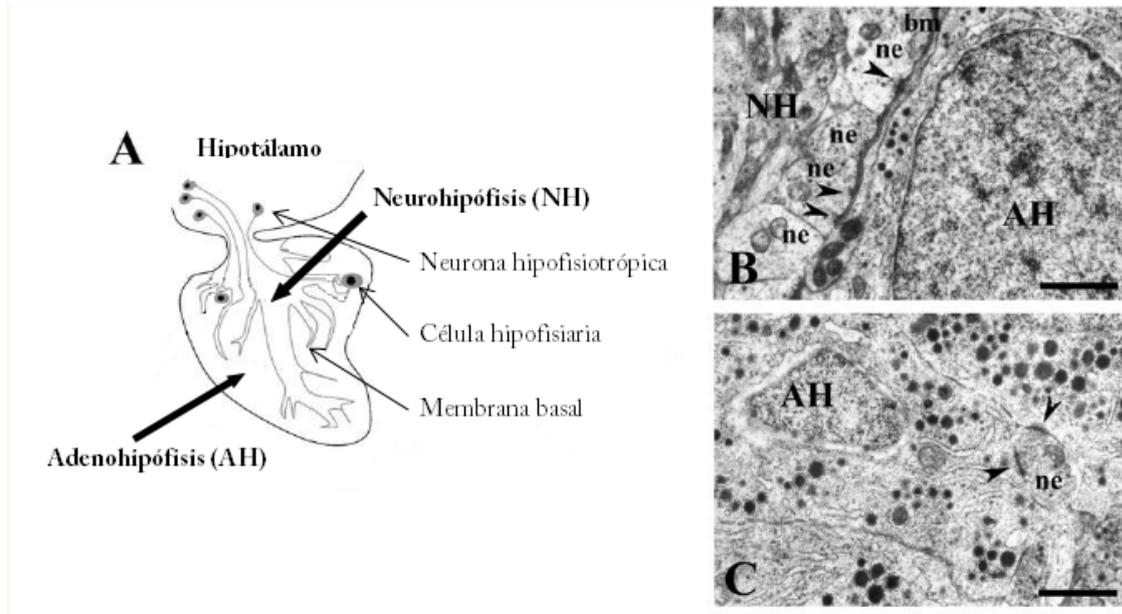
## 1.3.1.1 Organización de la hipófisis.

En todos los vertebrados la hipófisis está unida al hipotálamo por un tallo corto que, en peces, está compuesto por fibras neurosecretoras que van desde el cerebro a la hipófisis (**Fig. 1.5**). De hecho, estas fibras son axones de neuronas localizadas en distintas partes del cerebro y que envían sus proyecciones a la hipófisis. Por su parte, la hipófisis está compuesta por la adenohipófisis y por la neurohipófisis. La adenohipófisis contiene diferentes células secretoras de distintas hormonas y, por tanto, representa la parte glandular de la hipófisis. Por otro lado, la neurohipófisis consiste, principalmente, en un haz de fibras neurosecretoras que tienen su origen en diferentes partes del cerebro y son responsables de la secreción de diversos péptidos en las proximidades de las células hipofisiarias. En peces, la adenohipófisis se divide en *pars distalis* (PD; el lóbulo anterior de los vertebrados terrestres), constituida, a su vez, por la *pars distalis rostral* (PDR) y *pars distalis proximal* (PDP), y por la *pars intermedia* (PI; lóbulo intermedio de los vertebrados terrestres) (Olivereau y Ball, 1964). En todos los vertebrados, incluyendo a los peces, el lóbulo anterior contiene las células corticotropas (células de hormona adrenocorticotropa (ACTH)), las mamotropas (células de prolactina (PRL)), las somatotropas (células de hormona de crecimiento (GH)), las tirotropas (células de hormona estimulante del tiroides (TSH)) y las gonadotropas (células LH/FSH) (Olivereau y Ball, 1964).

En comparación con los vertebrados terrestres, la *pars distalis* de los teleósteos presenta dos características propias: (1) las células de un tipo celular determinado se agrupan usualmente juntas en una determinada región de la glándula, a diferencia de los

# 1. Introducción

mamíferos donde no forman masas especializadas. (2) No existe un sistema portahipofisario funcional de manera que las diferentes células de la *pars distalis* reciben inervación neurohipofisaria, que puede ser más o menos directa dependiendo de la especie.



**Figura 1.5** La inervación de la hipófisis en teleosteos. **A)** Representación esquemática de la vista lateral de la hipófisis que muestra las proyecciones de las neuronas hipofisiotrópicas terminando en la membrana basal que separa la neurohipófisis (NH) de la adenohipófisis (AH), o bien, directamente en las células adenohipofisarias. **B)** Imagen de microscopía electrónica de la hipófisis del pez mosquito (*Gambusia affinis*) donde se muestran varias fibras neurosecretoras (ne) que terminan en la membrana basal (bm). La acumulación de pequeñas vesículas a lo largo de la membrana (flechas) sugiere la liberación de material neurosecretor. Barra = 1  $\mu$ m. **C)** Imagen al microscopio electrónico de la hipófisis del pez mosquito donde se muestra una terminación nerviosa estableciendo contactos sinápticos (flechas) con dos células gonadotropas. Barra = 1  $\mu$ m (modificado de Zohar *et al.*, 2010).

La PDR contiene células ACTH, PRL y, en algunas especies de teleosteos, TSH. La PDP contiene las células gonadotropas, GH y en algunos casos TSH. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en determinados estados fisiológicos ciertas células hipofisarias pueden proliferar y por tanto existe un cierto nivel de plasticidad en la localización de un tipo determinado de acuerdo al estado fisiológico del organismo. En este sentido, cabe destacar que durante la maduración sexual, las células gonadotropas de perciformes o salmónidos tienden a invadir la periferia de la PI.

# 1. Introducción

---

## 1.3.1.2 Inervación de la hipófisis.

Como ya se ha comentado anteriormente, los peces teleósteos, al contrario que los vertebrados terrestres, carecen de un sistema porta-hipofisario. En cambio, las neurohormonas que controlan la actividad de los diferentes tipos celulares hipofisarios son liberadas directamente por las terminaciones nerviosas que se encuentra sus proximidades. En algunas especies, se han observado verdaderos contactos sinápticos neuroendocrinos y, por lo tanto, la inervación hipofisaria de los teleósteos debe ser considerada como el equivalente funcional de la inervación de la eminencia media en los vertebrados terrestres (Zohar *et al.*, 2010). En general, existe una buena correspondencia entre la distribución de las fibras nerviosas implicadas en el control de un tipo de célula determinado y su distribución dentro de la hipófisis. Por ejemplo, las fibras de la hormona liberadora de gonadotrofinas (Gnrh; ver apartado 1.3.2.1) en su mayoría están presentes en la PDR, que es donde se ubican las células gonadotropas. De esta forma, se han identificado numerosos neuropéptidos y neurotransmisores en fibras que penetran en la PD y que a su vez modulan la liberación de gonadotrofinas. Este es el caso de la Gnrh (González-Martínez *et al.*, 2002a; Lethimonier *et al.*, 2004; Oka e Ichikawa, 1990), el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Kah *et al.*, 1987), el neuropéptido Y (Batten *et al.*, 1990; Kah *et al.*, 1989b), la dopamina (Kah *et al.*, 1984, 1986), el polipéptido activador de la adenilatociclasa de la pituitaria (PACAP) (Wong *et al.*, 1998), la galanina (Anglade *et al.*, 1994; Batten *et al.*, 1990), la somatostatina, la colecistoquinina, la sustancia P, o el factor liberador de la hormona de crecimiento (GRF) (Batten *et al.*, 1990, 1999).

### **1.3.2 Principales factores cerebrales implicados en el control de la función gonadotropa de la hipófisis.**

Se ha demostrado *in vitro* que en los peces hay numerosos factores cerebrales (neuropéptidos, neurotransmisores) que estimulan la liberación de gonadotrofinas en hipófisis. Sin embargo, tan sólo un número limitado de éstos son capaces de provocar este efecto *in vivo*. Por tanto, todavía existen lagunas importantes en el conocimiento y demostración de la importancia fisiológica del control multifactorial de la actividad gonadotropa. En este apartado se pretende hacer una breve revisión de aquellos factores cerebrales para los que se ha identificado una función clara sobre la hipófisis y con acción sobre la reproducción.

#### **1.3.2.1 Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH).**

Existen distintas variantes de GnRH cuya clasificación se ha realizado en base al análisis filogenético de los genes codificantes conocidos y sus respectivos sitios de expresión (Fernald y White, 1999; White *et al*, 1995). El análisis filogenético muestra que existen tres ramificaciones principales de las GnRH. Una ramificación contiene variantes hipofisiotrópicas, expresadas principalmente en el hipotálamo de anfibios y de mamíferos, pero que también contiene una serie de variantes hipofisiotrópicas de peces. Las variantes presentes en esta ramificación se denominan GnRH1. Otro grupo de variantes, evolutivamente relacionado, contiene todas las formas de GnRH que se expresan consistentemente en el sinencéfalo/mesencéfalo de vertebrados, desde peces hasta mamíferos denominadas GnRH2. Finalmente, se observa una tercera ramificación filogenética de GnRH que incluye sólo genes de peces que se expresan principalmente en el cerebro anterior rostral. Las variantes presentes en esta ramificación se denominan GnRH3.

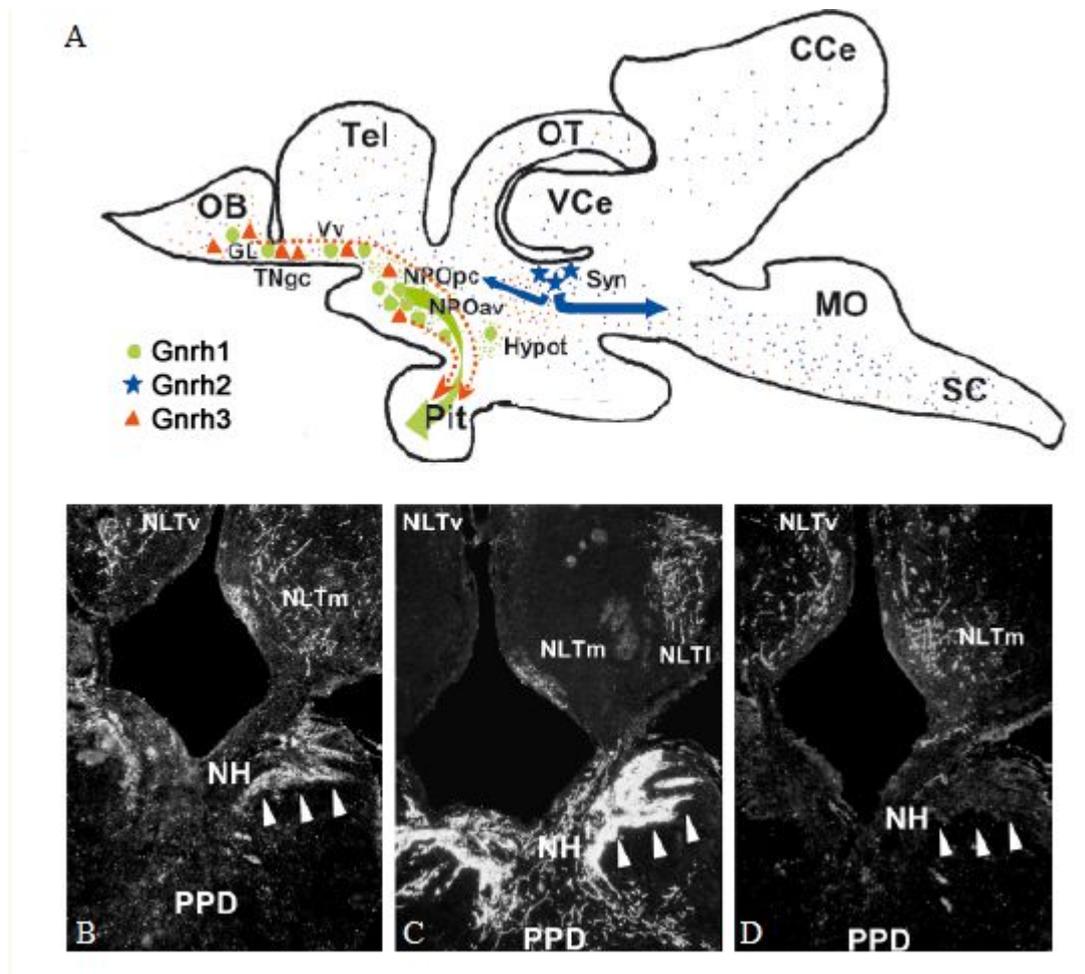
## 1. Introducción

---

Hasta la fecha se han realizado numerosos estudios sobre la identificación y localización de las neuronas productoras de Gnrh expresadas en el cerebro de peces, ya sea mediante inmunohistoquímica o, más recientemente, mediante hibridación *in situ* y transgénesis (Abraham *et al.*, 2008; Guilgur *et al.*, 2006; Kah *et al.*, 2007; Okubo y Nagahama, 2008). Gothilf *et al.* (1996) describieron por primera vez en peces, específicamente en dorada (*Sparus aurata*), la distribución de las neuronas que expresan las diferentes formas de Gnrh y posteriormente esta información se clarificó aún más en la lubina (González-Martínez *et al.*, 2001, 2002a) (**Fig. 1.6**). En este último estudio, usando ribosondas y anticuerpos específicos para las zonas GAP, se vio que las células Gnrh2 aparecen restringidas al sinencéfalo (Syn) dorsal, pero, sin embargo, la distribución de las células Gnrh1 y Gnrh3 se superponen en los bulbos olfatorios (OB), telencéfalo (Tel) ventral y núcleo preóptico (NPO) (González-Martínez *et al.*, 2001, 2002a). Las fibras Gnrh1 sólo se observaron en la superficie ventral del cerebro anterior, asociadas con el Tel ventral, NPO e hipotálamo (Hypot), mientras que las fibras Gnrh2 y Gnrh3 mostraron una distribución abundante en todo el cerebro. Además se demostró, que las neuronas Gnrh1 representan la fuente principal de inervación de Gnrh a la hipófisis (Pit), llegando a la PDP y a la frontera de la PI, donde también se encontraron células gonadotropas y los receptores de Gnrh (González-Martínez *et al.*, 2004b). Estos resultados corroboran las evidencias fisiológicas que sugieren que la Gnrh1 tiene un papel muy importante en la estimulación de la secreción de las gonadotropinas, en aquellas especies de perciformes que expresan tres formas de Gnrh. Aunque en la lubina los axones Gnrh3 también llegan a la hipófisis, esta inervación es muy reducida en comparación con las proyecciones de las neuronas Gnrh1. En contraste, no se detectaron axones de neuronas Gnrh2 en la hipófisis de la lubina, lo cual sugiere que de existir un

# 1. Introducción

papel de la *Gnrh2* en el control de la reproducción, no implicaría una acción directa de las neuronas *Gnrh2* sobre las células gonadotropas, al menos en esta especie.



**Figura 1.6** A) Esquema de una sección sagital del cerebro de lubina que resume la distribución de células *Gnrh1* (círculos verdes), *Gnrh2* (estrellas azules), *Gnrh3* (triángulos rojos) y fibras (puntos de color pequeños). B – D) Secciones transversales seriadas de la hipófisis y del hipotálamo de lubina inmunoteñidas con anticuerpos anti-salmón prepro-péptido asociado a GnRH (*Gnrh3*; B), anti-dorada prepro-péptido asociado a GnRH (*Gnrh1*, C), y anti-pollo-II prepro-péptido asociado a GnRH (*Gnrh2*; D). Campo oscuro. Cabe destacar la intensa inervación *Gnrh1* en la hipófisis (C), la presencia de algunas fibras *Gnrh3* inmunorreactivas (B), y la ausencia de inmunotinción *Gnrh2* (D) (puntas de flecha blancas). OB, bulbos olfativos; GL, capa glomerular; TNgc, células ganglionares de las terminaciones nerviosas; Vv, parte ventral del telencéfalo ventral; Tel, telencéfalo; NPOpc, parte parvocelular del núcleo preóptico parvocelular; NPOav, parte anteroventral del núcleo preóptico parvocelular; Hypot, hipotálamo; NLTl, parte lateral del núcleo lateral tuberal; NLTm, parte media del núcleo lateral tuberal; NLTv, parte ventral del núcleo lateral tuberal; Pit, pituitaria; NH, neurohipófisis; PPD, pars distalis proximal de la hipófisis; OT, techo óptico; VCe, válvula del cerebelo; Syn, sinencéfalo; CCe, corpus del cerebelo; MO, bulbo raquídeo; SC, médula espinal (modificado de González-Martínez *et al.*, 2002).

Además de la organización neuroanatómica del sistema *Gnrh* en peces (González-Martínez *et al.*, 2004b, 2002b), se han realizado estudios de los patrones de síntesis y

# 1. Introducción

---

secreción de la GnRh a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo gonadal. En la lubina americana se caracterizaron, de manera detallada, los niveles hipofisarios de las distintas formas de la GnRh durante distintos estados de desarrollo reproductivo y se observó que la GnRh1 y la GnRh2 aumentaban, durante la recrudescencia gonadal alcanzando su punto máximo durante la maduración, tanto en machos como en hembras (Holland *et al.*, 2001). Los niveles de GnRh3 fueron bajos durante todo el desarrollo gonadal y sólo se observaron picos estacionales en animales en maduración. El análisis del contenido de las tres formas de GnRh endógenas en hipófisis, durante diferentes etapas del ciclo reproductivo de la dorada, mostró niveles de GnRh1 y GnRh2 en todos los estados de desarrollo gonadal, pero los de GnRh1 fueron significativamente mayores en las hipófisis de machos y hembras maduros con respecto a peces en recrudescencia (Holland *et al.*, 2001). Curiosamente, estos niveles elevados de GnRh1 se correspondían con el contenido, también elevado, de Lh en plasma. Por último, no se detectó GnRh3 en la hipófisis en ningún estado de desarrollo gonadal. En la hipófisis de lubina se detectaron las tres formas de GnRh, pero en machos maduros sólo GnRh1 (Rodríguez *et al.*, 2000). Todos estos datos muestran que en animales maduros hay una relación muy estrecha entre la GnRh1 y la actividad reproductiva y, además, sugieren que la GnRh2 y la GnRh3 probablemente tengan un papel neuroendocrino distinto al de la función hipofisiotropa.

La implicación funcional de la GnRh en la regulación de la liberación de la Lh se ha establecido en todos los órdenes de teleósteos. Aunque los ensayos para cuantificar Fsh todavía no están disponibles para la mayoría de las especies de peces, se ha demostrado que en estos, al igual que en los mamíferos, la GnRh también estimula la secreción de Fsh, al menos en los salmónidos (Breton *et al.*, 1998; Mañanós *et al.*, 1999; Weil *et al.*, 1999; Dickey y Swanson, 1998). Por otro lado, el análisis de los niveles de expresión de

## 1. Introducción

---

determinados genes ha permitido examinar, de un modo mucho más completo, el papel de la GnRh en la regulación de la síntesis de las gonadotrofinas. Los estudios realizados hasta la fecha, indican que los efectos relativos de la GnRh sobre la transcripción de los genes de las subunidades *fsh $\beta$*  y *lh $\beta$*  dependen de la especie, del sexo y del estado reproductivo de los peces (Yaron *et al.*, 2003). Así, por ejemplo, en la lubina se demostró que había una regulación diferencial de la expresión de los genes que codifican las subunidades de gonadotrofinas. En esta especie, el tratamiento con un análogo de la GnRh (GnRHa) provocó el incremento de los niveles de mRNA de las subunidades *gth $\alpha$*  y de la *lh $\beta$* , pero no de la subunidad *fsh $\beta$*  (Mateos *et al.*, 2002). Estos datos se han corroborado *in vitro* en otras especies de peces como carpín dorado (*Carassius auratus*) (Hassin *et al.*, 1998; Khakoo *et al.*, 1994), salmón japonés (*Oncorhynchus masou*) (Ando *et al.*, 2006; Dickey y Swanson, 2000), trucha arcoíris (Mañanós *et al.*, 1999), tilapia (Gur *et al.*, 2002; Melamed *et al.*, 1996) y pez gato africano (*Clarias gariepinus*) (Bosma *et al.*, 1997; Rebers *et al.*, 2000, 2002), donde se ha observado que la GnRh afecta directamente a la síntesis y/o liberación de Fsh y Lh.

### 1.3.2.2 Dopamina.

En muchos teleósteos, aunque no en todos, se ha demostrado que la dopamina puede inhibir fuertemente la liberación de gonadotrofinas. La dopamina es un pequeño neurotransmisor que se sintetiza a partir de la tirosina. Ésta última es transportada hacia el cerebro, en particular hasta las neuronas dopaminérgicas, a través de la barrera hematoencefálica. Allí, la enzima tirosina-hidroxilasa la transforma en 1-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), y la enzima DOPA-descarboxilasa la convierte finalmente en dopamina. La dopamina se conoce por ejercer una amplia gama de efectos en el cerebro de los vertebrados y por actuar sobre varias funciones de la hipófisis, en particular sobre la secreción de prolactina en mamíferos. En peces,

## 1. Introducción

---

específicamente en el carpín dorado, se ha demostrado que la dopamina tiene un efecto doble, por un lado inhibe la liberación de gonadotrofinas por acción directa sobre las células gonadotropas, y por otro, reduce la secreción de la GnRh en las proximidades de éstas (Trudeau, 1997). Por el contrario, en muchos peces teleósteos, sobre todo en especies marinas, incluida la lubina, no se ha observado inhibición dopaminérgica de la liberación de gonadotrofinas (Copeland y Thomas, 1989; Prat *et al.*, 2001). En definitiva, es muy probable que esta inhibición dopaminérgica tenga diferentes significados fisiológicos y adaptativos en función de la especie.

### 1.3.2.3 Neuropéptido Y.

El neuropéptido tirosina o NPY es un péptido de 36 aminoácidos de la familia de péptidos pancreáticos que está estrechamente implicado en la regulación de la ingesta en peces y mamíferos. Particularmente en peces, el NPY también está implicado en la regulación de la liberación de gonadotrofinas (Breton *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1989a; Peng *et al.*, 1993b) y es uno de los factores que podría actuar como enlace entre el crecimiento, la ingesta y el eje reproductivo. En este contexto, muchas especies de peces reducen la ingesta de alimentos durante el período reproductivo. Por ejemplo, en salmónidos la expresión de NPY en el área preóptica hipofisiotrópica aumenta durante época de ayuno (Silverstein *et al.*, 1998) y los efectos estimulantes del NPY sobre la secreción de Lh a nivel hipofisario también son mayores en lubinas ayunadas (Cerdá-Reverter *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha demostrado que el NPY está directamente involucrado en la liberación de Lh a nivel hipofisario en carpín dorado y también se ha observado su implicación en la liberación de GnRh a partir de los terminales GnRh presentes en la hipófisis o en la región preóptica (Peng *et al.*, 1993a; Trudeau, 1997).

## 1. Introducción

---

### 1.3.2.4 Ácido gamma-aminobutírico (GABA).

El GABA es un neurotransmisor muy abundante en el cerebro de todos los vertebrados. En el carpín dorado, se demostró que dicho neurotransmisor estimulaba la secreción de Lh a través de varios efectos, entre los que se incluye la estimulación de la liberación de GnRh (Kah *et al.*, 1992; Sloley *et al.*, 1992) y la inhibición de la dopamina (Trudeau, 1997; Trudeau *et al.*, 2000). En la trucha arcoíris, el GABA tiene una acción general estimuladora de la secreción de Fsh y de Lh, que depende, en gran medida, del sexo y del estado reproductivo de los peces. La acción estimulante del GABA se ejerce, al menos en parte, directamente sobre las células gonadotropas, en las que se observa una importante inervación por fibras de glutamato descarboxilasa, la enzima anabólica del GABA (Mañanós *et al.*, 1999). En células hipofisarias dispersas se ha demostrado que el GABA estimula tanto la secreción basal de Lh y Fsh, como la inducida por la GnRh, dependiendo dicho efecto, en gran medida, de la acción de los esteroides (Mañanós *et al.*, 1999).

### 1.3.2.5 Hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH).

La hormona inhibidora de gonadotropinas es un dodecapéptido, identificado inicialmente en aves (Tsutsui *et al.*, 2007), perteneciente a la familia de péptidos LPXRF-amida que también está presente en anfibios, mamíferos e invertebrados (Kriegsfeld *et al.*, 2006; Tsutsui *et al.*, 2007; Tsutsui y Ukena, 2006). Este péptido se expresa principalmente en las neuronas hipotalámicas y septales del cerebro de las aves, e inhibe la síntesis y liberación de las gonadotropinas actuando directamente a nivel de la hipófisis (Tsutsui *et al.*, 2007; Tsutsui y Ukena, 2006; Yin *et al.*, 2005). La presencia de neuronas hipotalámicas GnIH parece ser una característica conservada a lo largo de la evolución de los vertebrados, ya que recientemente se ha descrito la existencia de un

## 1. Introducción

---

péptido de la familia LPXRF-amida en peces (Osugi *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 2002; Tsutsui *et al.*, 2007). En carpín dorado, estas células putativas de GnIH están presentes en el núcleo periventricular posterior del hipotálamo, así como en el área nerviosa terminal. Por su parte las fibras GnIH alcanzan el núcleo lateral tuberal, el telencéfalo ventral, el techo óptico y la hipófisis (Sawada *et al.*, 2002). Su distribución neuroanatómica se ha caracterizado recientemente en la lubina, encontrando que los cuerpos neuronales que expresan este neuropéptido se localizan en los bulbos olfatorios, el área preóptica caudal y el tegumento. Estas neuronas inervan profusamente el área preóptica, el hipotálamo, el techo óptico, el torus semicircular y el tegumento caudal, aunque también se han observado proyecciones conspicuas en los bulbos olfatorios, el telencéfalo dorsal y ventral, la habénula, el tálamo ventral, el área pretectal, el tegumento rostral, el tubérculo posterior, la formación reticular y el lóbulo vagal (Paullada-Salmerón *et al.*, 2014; 2015). Estos autores también demuestran que las acciones inhibitorias de la GnIH sobre el eje reproductivo se conservan a lo largo de la filogenia de vertebrados, de tal forma que el péptido LPXRF-amida ejerce, sobre el eje reproductivo de peces, funciones similares a las descritas en aves y en mamíferos (Paullada-Salmerón *et al.*, 2014).

### 1.3.2.6 Neuroquinina B (NKB)

La neuroquinina B (NKB) es un miembro de la familia de péptidos de la taquicinina (TK). Las TKs se caracterizan por un aminoácido común C-terminal de secuencia FXGLM-NH<sub>2</sub> (donde X es un residuo hidrofóbico). Esta familia incluye la sustancia P, la neuroquinina A (NKA) y la NKB, así como el neuropéptido K, el neuropéptido- $\gamma$  y la hemoquinina-1 (Page, 2004). La NKB es la única TK sintetizada a partir del gen preprotaquicinina-B (Page *et al.*, 2001) y en mamíferos se denomina como *TAC3*, a excepción de los roedores donde se conoce como *Tac2*. En humanos se demostró

# 1. Introducción

---

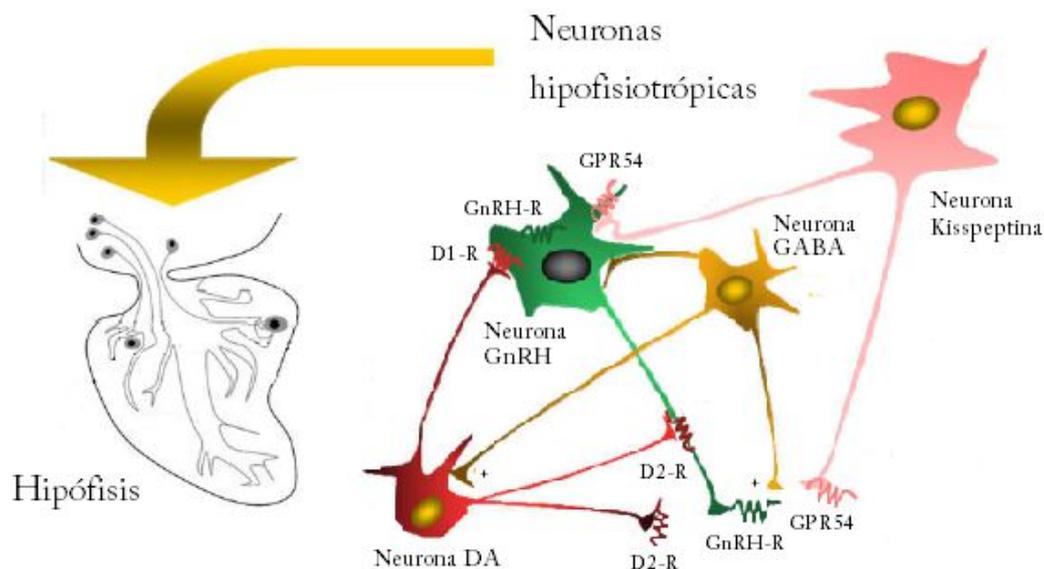
inicialmente que aquellos individuos con mutaciones con pérdida de función de los genes que codifican la neuroquinina B (NKB) o su receptor, el receptor de neuroquinina 3 (NKBR, *Tac3r*), mostraban hipogonadismo hipogonadotrópico (Topaloglu *et al.*, 2009). Este fue el primer estudio que definió la NKB como un factor esencial para la llegada de la pubertad y el control de la secreción de gonadotropinas en los mamíferos. Estos resultados, en mamíferos, están apoyados por estudios recientes que proporcionan evidencias de la existencia de un grupo de neuronas, en el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC), sensibles a la acción de los esteroides y, además, co-expresan NKB, kisspeptina, dinorfina, NKBR y el receptor de estrógeno  $\alpha$  (Rance *et al.*, 2010). Aunque el gen *TAC3* de mamíferos codifica para un péptido de taquiquinina, el ortólogo de peces codifica para dos péptidos putativos de taquiquinina. El segundo péptido putativo de peces, denominado neuroquinina F (NKF), es único, y mediante ensayos *in silico*, se ha visto que está conservado en las distintas especies de peces (Biran *et al.*, 2012). En embriones de pez cebra, el gen *tac3a* se expresa asimétricamente en la habénula, y en cambio, en los adultos, se localiza en núcleos cerebrales específicos que están involucrados en la reproducción. Además, durante las primeras semanas de vida de esta especie, los niveles de mRNA de *tac3a* aumentaron gradualmente, alcanzando su máximo en la pubescencia. Por otra parte, la inyección intraperitoneal de los péptidos NKBa y NKF en hembras maduras de pez cebra aumentó significativamente los niveles de Lh (Biran *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que el sistema NKB/NKBR también podría estar implicado en el control neuroendocrino de reproducción de los peces.

## **1.4 El sistema Kiss/Gpr54: un nuevo actor en neuroendocrinología reproductiva.**

Desde el descubrimiento del sistema GnRH en vertebrados hace más de 35 años, se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los complejos circuitos

# 1. Introducción

neuroendocrinos que controlan la reproducción tanto en mamíferos como en peces. Durante este período, la aparición de nuevas herramientas metodológicas y la aceptación creciente de los peces como un modelo válido para el estudio de la neuroendocrinología reproductiva de vertebrados, han contribuido al avance tanto en el conocimiento básico de esta área de investigación, como en su aplicabilidad en ganadería, acuicultura y medicina (Zohar *et al.*, 2010). Además de la GnRH y de la dopamina, considerados hasta hace poco como los principales moduladores de la liberación de gonadotrofinas en peces, se ha descubierto recientemente un nuevo sistema fuertemente implicado en el control de la función reproductiva, el sistema Kiss/Gpr54 (Fig 1.7).

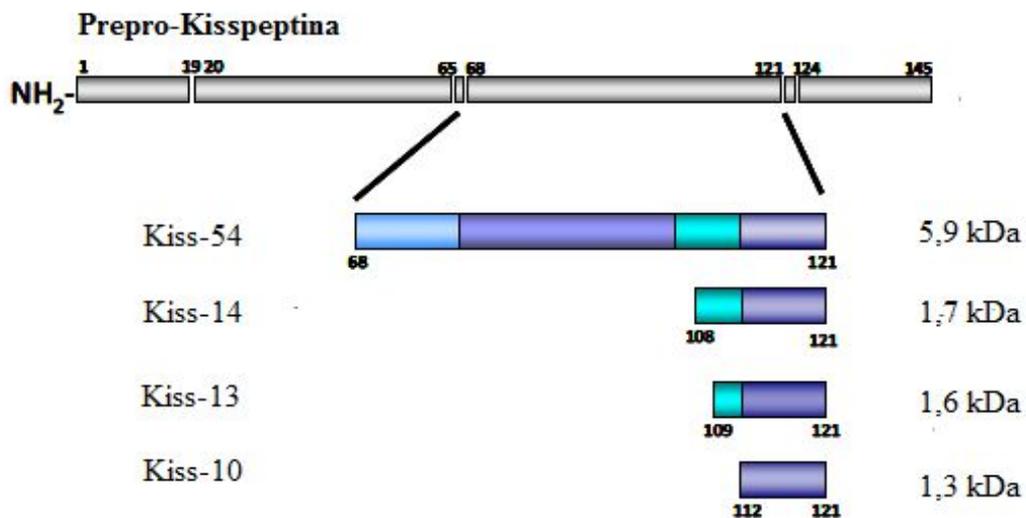


**Figura 1.7** Representación esquemática de los principales circuitos que controlan la liberación de gonadotrofinas en peces. La GnRH y la dopamina (en algunas, pero no en todas las especies) estimula e inhibe, respectivamente, la liberación de Lh/Fsh directamente desde las células gonadotropas. Estos efectos son modulados por las neuronas GABA que actúan aumentando la secreción de GnRH e inhibiendo la dopamina. La kisspeptina puede modular la actividad de las células gonadotropas directamente, o bien, de forma indirecta a través de las neuronas GnRH (modificado de Zohar *et al.*, 2010).

En 1996 se describió por primera vez el gen KISS1 en humanos, el cual se identificó como un gen que presentaba una expresión elevada en líneas celulares de melanoma con

# 1. Introducción

baja capacidad metastásica (Lee *et al.*, 1996, 1997). Poco después, en 1998, se clonó el gen *KISS1* y se llevó a cabo su localización cromosómica (West *et al.*, 1998). Las kisspeptinas, el producto peptídico del gen *KISS1*, se caracterizaron en 2001. Dichos péptidos pertenecen a una familia de proteínas originadas por el procesamiento proteolítico diferencial de una pre-proteína de 145 aminoácidos, que da lugar a la kisspeptina-54 (Kiss-54) como producto mayoritario. Además de la Kiss-54, se originan también una serie de péptidos de menor tamaño, denominados Kiss-14, Kiss-13 y Kiss-10 (Fig. 1.8). Todos ellos comparten los 10 aminoácidos pertenecientes a la región C-terminal de la pre-proteína. Dicha región C-terminal se caracteriza por presentar el motivo terminal (Arg-Phe-NH<sub>2</sub>), que es característico de la superfamilia de péptidos RF-amida. Esta región C-terminal es la región biológicamente activa responsable de la unión de las kisspeptinas al receptor y de su activación (Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001; Kotani *et al.*, 2001).



**Figura 1.8** Proteólisis del precursor de las kisspeptinas activas para generar la familia de este neuropéptido.

Por otro lado, en 1999, y sin ningún tipo de conexión con los estudios sobre *KISS1*, se identificó en rata un receptor acoplado a proteína G inicialmente huérfano, denominado

## 1. Introducción

---

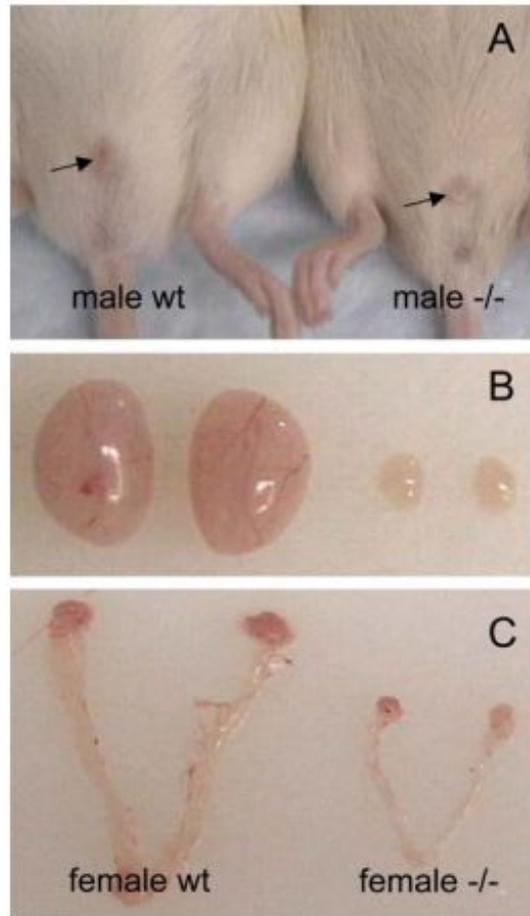
por ello GPR54. Posteriormente, se identificó su ortólogo humano, al que inicialmente se le denominó AXOR12 o hOT7T175, y que actualmente se corresponde con el GPR54 o KISS1R (Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Dos años más tarde se observó que el péptido Kiss-54 inhibía la metástasis pulmonar de células de melanoma *in vivo*, y lo hacía a través de la interacción con el GPR54 (Ohtaki *et al.*, 2001). De esta forma, se demostró por primera vez la relación entre GPR54 y sus ligandos, los productos del gen *KISS1*.

### **1.4.1 Papel del sistema kisspeptina en el control neuroendocrino de la reproducción.**

En el año 2003, de Roux *et al.* (2003) y Seminara *et al.* (2003) descubrieron, de forma independiente, la presencia de deleciones y mutaciones que inactivaban el receptor GPR54 en pacientes afectados de hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático. El papel crucial del receptor GPR54 en la fertilidad de los mamíferos se corroboró mediante la generación de ratones carentes del gen *Gpr54* (*knock-outs*). Dichos ratones presentaban un fenotipo similar a los humanos que sufrían inactivación de dicho receptor (Seminara *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2003; Kauffman *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007; Messenger *et al.*, 2005a). En concreto, los ratones *knock-out* macho mostraban caracteres sexuales secundarios poco desarrollados, como testículos de menor tamaño y bajos niveles de testosterona circulante. Por otro lado, las hembras presentaban defectos en la apertura vaginal, ovarios y útero de menor tamaño y fallos en la concepción (**Fig. 1.9**). Este descubrimiento sugería, que el sistema KISS/GPR54 podía tener un papel esencial en la regulación de la función reproductiva, y por tanto, de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias.

# 1. Introducción

---



**Figura 1.9** Anatomía de los órganos reproductores de ratones macho y hembra con genotipo silvestre/salvaje (wt) o mutante para *Gpr54* (-/-). A) Reducción del tamaño del pene de los ratones silvestres/salvajes en comparación con los ratones mutantes. B) Los testículos de los ratones mutantes son mucho más pequeños que los de los silvestres/salvajes. C) El tamaño de los ovarios y el útero de ratones mutantes es menor que el de los de ratones silvestres/salvajes (tomado de Funes *et al.* 2003).

Posteriormente se realizaron un número considerable de estudios que se centraron en el análisis del efecto de las kisspeptinas sobre la secreción de gonadotrofinas hipofisarias. Para ello, se realizaron inyecciones sistémicas o intracerebroventriculares (i.c.v.) de este péptido en distintas especies, incluyendo rata (Irwig *et al.*, 2004; Castellano *et al.*, 2006a; Matsui *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004, 2005a, 2005b, Thompson *et al.*, 2004), ratón (Gottsch *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005b), oveja (Messenger *et al.*, 2005b), primates (Plant *et al.*, 2006; Shahab *et al.*, 2005) y humanos (Dhillon *et al.*, 2005). En

# 1. Introducción

---

todos estos estudios se observó que las kisspeptinas estimulan, de forma significativa, la liberación de gonadotrofinas al torrente sanguíneo.

Otros estudios, también en mamíferos, sugirieron que la acción de las kisspeptinas sobre la liberación de gonadotrofinas estaba mediada directamente a través de las neuronas GnRH (Oakley *et al.*, 2009). Siguiendo esta hipótesis, se demostró, que las neuronas productoras de GnRH también expresaban el receptor GPR54 (Irwig *et al.*, 2004; Gottsch *et al.*, 2004) y que el péptido Kiss-54 tenía un potente efecto estimulador de la secreción de GnRH. Además, la aparición, por un lado, de neuronas kisspeptina en estrecha asociación con cuerpos neuronales o fibras de GnRH en hembras de rata (Kinoshita *et al.*, 2005), y por otro, la presencia de fibras kisspeptina adyacentes a las neuronas GnRH durante el desarrollo postnatal de poblaciones neuronales en ratón (Clarkson *et al.*, 2006), sugirieron que la kisspeptina actúa directamente sobre las neuronas GnRH. Sin embargo, otros estudios sugirieron que la kisspeptina también puede actuar sobre neuronas intermediarias (células GABAérgicas) para modular la acción de la GnRH (Pielecka-Fortuna *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

En peces el sistema Kiss/Gpr54 se reseñó por primera vez en tilapia, al identificar un gen que codificaba un receptor de kisspeptinas (*kiss1r*) (Parhar *et al.*, 2004). Desde entonces, se han publicado numerosos trabajos en relación con este sistema y la reproducción de peces teleósteos. Contrariamente a lo que ocurre en mamíferos, donde sólo existe un gen *KISS1* y un gen *GPR54* en cada especie, los peces teleósteos pueden tener dos genes distintos (*kiss1* y *kiss2*) que codifican dos kisspeptinas, así como dos genes que codifican dos receptores diferentes (*grp54-1b* y *grp54-2b*) (Tena-Sempere *et al.*, 2012). Por tanto, es de esperar que la duplicidad de este sistema en peces, es decir, dos formas de kisspeptina y dos formas de Gpr54, pudiera dar lugar a una interacción diferencial entre ligandos y receptores. Es por ello que en peces se han realizado varios

## 1. Introducción

---

estudios centrados en el análisis de la funcionalidad y especificidad de los ligandos del sistema Kiss/Gpr54 (Biran *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Actualmente se sabe que en el pez cebra ambos ligandos, Kiss1 y Kiss2, activan el receptor Gpr54-2b de forma eficiente (Biran *et al.*, 2008) mientras que en el carpín dorado sólo Kiss1 lo activa de forma preferente (Li *et al.*, 2009). Sin embargo en el pez cebra, Kiss1 activa el receptor Gpr54-1b de manera más eficiente, mientras que en el carpín dorado sólo es activado por Kiss2.

### 1.4.1.1 Distribución neuroanatómica del sistema Kiss1/Gpr54 en peces.

En peces, se han realizado varios estudios sobre la localización neuroanatómica de las neuronas que expresan los genes de las kisspeptinas y sus receptores. Parhar *et al.* (2004) mostraron en un cíclido, la tilapia, la primera evidencia de la expresión de un gen del receptor Gpr54 no mamífero en las neuronas GnRH, lo que sugirió una posible asociación anatómica de Gpr54 con el sistema de GnRH en peces. Posteriormente, un estudio de hibridación *in situ* (HIS) en medaka (*Oryzias latipes*) (Kanda *et al.*, 2008) identificó, por primera vez en peces, cuerpos celulares Kiss1 en dos núcleos hipotalámicos diferentes, el núcleo posterior periventricular y el núcleo ventral del tegmento (NVT). El número de neuronas Kiss1 del NVT era mayor en peces en época de puesta, y además eran más numerosas en machos que en hembras. A partir de estos resultados, se concluyó que el sistema Kiss1 es fundamental en la regulación de la reproducción de esta especie. Posteriormente, Kitahashi *et al.* (2009) identificaron un gen kisspeptina nuevo (*kiss2*) tanto en pez cebra como en medaka. En este estudio se identificaron transcritos *kiss1* en la habénula ventromedial y el núcleo hipotalámico periventricular, y neuronas que expresaban *kiss2* en el núcleo posterior tuberal y el núcleo hipotalámico periventricular. Casi al mismo tiempo, se aislaron los genes *kiss1* y *kiss2* en un teleosteo marino, la lubina (Felip *et al.*, 2009).

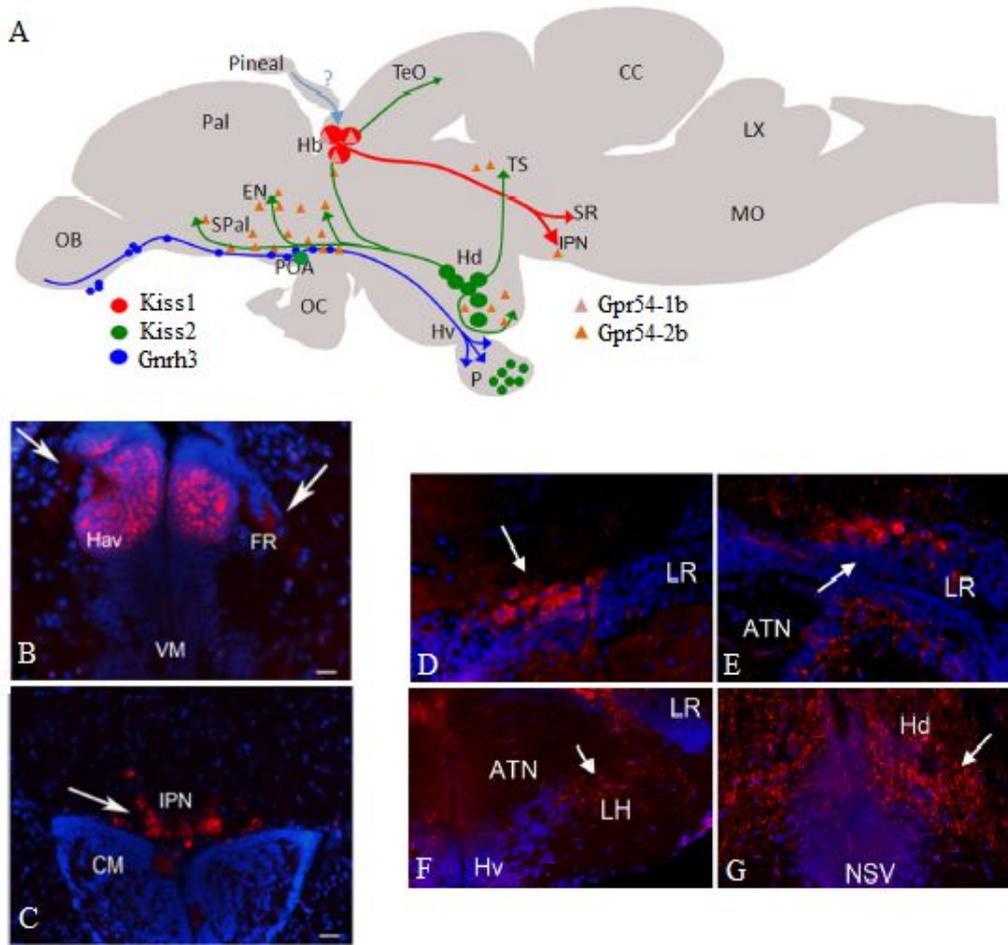
# 1. Introducción

---

La información sobre las proyecciones axonales de las neuronas Kiss1 y Kiss2 en peces es muy limitada por la dificultad en obtener anticuerpos específicos que reconozcan selectivamente Kiss1 o Kiss2. Recientemente, se ha documentado, por primera vez, la organización de los sistemas neuronales Kiss1 y Kiss2 en el pez cebra mediante el uso de anticuerpos altamente específicos, los cuales permitieron distinguir inequívocamente el preproKiss1 del preproKiss2 (**Fig. 1.10**) (Servili *et al.*, 2011). Este estudio confirmó los datos obtenidos previamente por HIS (hibridación *in situ*) y se encontraron neuronas Kiss1 en la habénula ventromedial, que sólo envían sus axones a los núcleos interpedunculares y del rafe. También se demostró que estas mismas neuronas expresan el receptor *gpr54-1b*. Por otro lado, las neuronas Kiss2 se localizaron principalmente en el hipotálamo dorsal y ventral, la cuales se proyectan ampliamente hacia el subpallium, el área preóptica, el tálamo, el hipotálamo ventral y caudal y el mesencéfalo. Todas estas regiones muestran una presencia abundante de transcritos *kiss2* (Servili *et al.*, 2011). Posteriormente, se documentó la organización de los sistemas neuronales Kiss1 y Kiss2 en la lubina. Así, por HIS, se determinó que las neuronas que expresan *kiss1* se encuentran en la habénula y en el hipotálamo mediobasal rostral de machos y hembras. Por otro lado, en ambos sexos, las neuronas que expresan *kiss2* se encuentran en el área preóptica, aunque la mayor población de neuronas Kiss2 está presente en el hipotálamo dorsal, por encima y por debajo del receso lateral (Escobar *et al.*, 2013a). En otro estudio, con esta misma especie, se encontró que la expresión del receptor *gpr54-1b* estaba limitada a la habénula y el telencéfalo ventral. Sin embargo, en contraste con la expresión discreta del receptor anterior, el cerebro de lubina muestra una expresión notable y muy generalizada del receptor *gpr54-2b* dentro del cerebro anterior, medio y posterior. En este mismo estudio, se estableció una correlación muy buena entre la

# 1. Introducción

distribución de fibras Kiss2-positivas y las neuronas que expresan el receptor *gpr54-2b* (Escobar *et al.*, 2013b).



**Figura 1.10** A) Representación esquemática de la organización de los sistemas Kiss1 y Kiss2 en el cerebro del pez cebra. Las neuronas Kiss1 se limitan a la habénula (Hb). Estas neuronas también expresan *gpr54-1b* y sólo se proyectan en el núcleo interpeduncular (IPN) y en el rafe superior (SR). Las neuronas Kiss2 se encuentran en el hipotálamo dorsal (Hd), lateral, y ventral (Hv). Estas neuronas envían extensas proyecciones hacia el subpallium, el núcleo entopeduncular (EN), la región preóptica (POA), el tálamo, el hipotálamo ventral y caudal, y el torus semicircular (TS). En todas estas regiones, también se expresa ampliamente el receptor *gpr54-2b*. Las fibras Kiss2 contactan directamente con las neuronas GnRH3, que se proyectan hacia la hipófisis. En contraste, no hay fibras Kiss en la hipófisis (P), mientras que si hay células Kiss2 en la pars intermedia. Localización de las células que expresan Kiss1 (B, C) y Kiss2 (D – G) mediante inmunohistoquímica. El anticuerpo preprokiss1 marca las células de la región habenular (Hb) (B), así como sus proyecciones a través del fascículo retroflexo (FR, flechas D) hasta el núcleo interpeduncular (IPN). Estas fibras entraron en el IPN a través de su margen ventrolateral (flecha F). La inmunohistoquímica con anticuerpo preproKiss2 indica que hay fibras Kiss2 (D, E) que dejan las células situadas dorsalmente al receso lateral (LR) y que dan la vuelta al receso, antes de arquear hacia el hipotálamo mediobasal. Las células Kiss2 situadas en el hipotálamo dorsal (F-G) (Hd), por encima del receso lateral (LR), envían sus proyecciones alrededor del núcleo tuberal anterior (ATN) hacia el hipotálamo ventromedial (Hv) y caudal, en particular por encima del núcleo de los sacos dorsales (NSV). Barra de escala, 20  $\mu$ m. CC, crista cerebelar; LX, lóbulo vagal; MO, médula oblonga; OB, bulbo olfatorio; OC, quiasma óptico; Pal, palio; TeO, techo óptico (modificado de Servili *et al.*, 2011).

## 1. Introducción

---

### 1.4.1.2 Acciones fisiológicas de las kisspeptinas en peces: efecto sobre el eje Cerebro – Hipófisis – Gónada.

Inicialmente los decapeptidos de las kisspeptinas (Kiss1-10 y Kiss2-10) se consideraron como los péptidos mínimos funcionales en peces, por homología con el decapeptido Kiss-10 de mamíferos. Sin embargo, Lee *et al.* (2009) demostraron que los precursores Kiss1 de peces tenían un aminoácido dibásico conservado seguido de una glutamina (Gln) conservada en la posición 16. Esto indicaba que el precursor Kiss1 de peces podría dar lugar a un péptido maduro de 15 aminoácidos (Kiss1-15) con un residuo de piroglutamato en N-terminal y una amidación de la tirosina (Tyr) C-terminal. También se observó la presencia de un aminoácido básico en la posición 13 de los precursores Kiss2 de los peces. Por lo tanto, éstos producirían un péptido maduro de 12 aminoácidos (Kiss2-12), donde la fenilalanina (Phe) C-terminal puede amidarse. De hecho, este péptido Kiss2-12 se pudo aislar del cerebro de la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*), confirmando así su existencia. Posteriormente, en pez cebra, se ha demostrado que estos péptidos, más largos (Kiss1-15 y Kiss2-12), activan de forma más potente a los receptores que los decapeptidos (Kiss1-10 y Kiss2-10) (Biran *et al.*, 2008).

Se ha demostrado en varios estudios con peces que la administración exógena de kisspeptinas tiene un efecto estimulador sobre las gonadotropinas, lo cual sugiere que el sistema Kiss/Gpr54 es esencial en la regulación de su función reproductiva. Los estudios *in vivo*, mediante tratamiento periférico con kisspeptinas, se han centrado principalmente en el análisis de los efectos a corto plazo sobre el cerebro y la hipófisis (Li *et al.*, 2009; Felip *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010; Filby *et al.*, 2008; Zmora *et al.*, 2012). Sin embargo, también existen estudios *in vivo* que han examinado la respuesta a la administración periférica, a nivel gonadal a corto (Selvaraj *et al.*, 2013) y largo plazo (Beck *et al.*, 2012; Nocillado *et al.*, 2013; Zmora *et al.*,

# 1. Introducción

---

2014). Así, en la carpita cabezona (*Pimephales promelas*) en pubertad temprana o media, la inyección periférica de Kiss1-10 provocó un aumento de la expresión de *gpr54-2b* y de *gnrh3* en el cerebro, aunque no de *gnrh2*. En esta especie, es muy probable que la *Gnrh3* sea la forma hipofisiotrópica (Filby *et al.*, 2008). Sin embargo, las inyecciones sistémicas de Kiss1-10 y Kiss2-10 en hembras sexualmente maduras de pez cebra no causaron ninguna variación en la expresión de *gnrh3* (forma hipofisiotrópica) ni en la de *gnrh2* (Kitahashi *et al.*, 2009). Por otro lado, en el mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*), cuyo genoma contiene sólo *kiss2*, la administración periférica del decapeptido Kiss2-10, en hembras sexualmente maduras, provocó un aumento significativo de la expresión hipotalámica de *gnrh1*, probablemente la forma hipofisiotrópica en esta especie, aunque no de *gnrh3* (Shi *et al.*, 2010). A nivel de la hipófisis, la administración sistémica de kisspeptinas indujo respuestas detectables en todos los casos, bien en la expresión génica, o en la secreción hormonal. Así, en hembras de pez cebra, la inyección sistémica de Kiss2-10 indujo un aumento de la expresión de las subunidades *fsh $\beta$*  y *lh $\beta$*  que fue significativamente más potente que el efecto de Kiss1-10 (Kitahashi *et al.*, 2009). En hembras de mero de pintas naranjas, la inyección periférica de Kiss2-10 también provocó un aumento en la expresión de *fsh $\beta$* , pero no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *lh $\beta$*  (Shi *et al.*, 2010). En lubina y carpín dorado, los efectos de la administración periférica de los decapeptidos Kiss1-10 y Kiss2-10 se analizaron evaluando los niveles de gonadotrofinas en sangre. En machos de lubina, especie objeto de estudio en esta memoria, el péptido Kiss2-10 fue más potente que Kiss1-10 en la liberación de Lh y Fsh al torrente sanguíneo (Felip *et al.*, 2009). Por el contrario, la administración periférica de Kiss1-10 en carpín dorado aumentó significativamente los niveles de Lh en

# 1. Introducción

---

sangre de manera dosis-dependiente, mientras que Kiss2-10 no tuvo efecto (Li *et al.*, 2009).

Todos los estudios mencionados se realizaron mediante administración periférica de los péptidos, que puede enmascarar la señalización real de la kisspeptina en el cerebro, ya que la kisspeptina circulante en el torrente sanguíneo podría actuar a otros niveles del eje reproductivo, como por ejemplo sobre la hipófisis o las gónadas. Además, la acción de la kisspeptina circulante podría estar limitada a áreas concretas del cerebro expuestas a las hormonas circulantes. La administración intracerebroventricular (i.c.v.), en contraposición a la administración sistémica, evita el obstáculo que significa para los péptidos atravesar la barrera hematoencefálica y además evita el efecto directo sobre otros tejidos diana. Este método de administración posibilita la entrada de altas concentraciones de droga en el compartimiento central (Cook *et al.*, 2009) y en el caso de las kisspeptinas permite estudiar la señalización real de estas en el cerebro. Hasta la fecha, tan sólo existe un estudio en peces que analice el efecto directo de kisspeptinas exógenas (ya sea Kiss1 o Kiss2) en el cerebro (Ogha *et al.*, 2014). Así pues, tanto la caracterización de los mecanismos, como la de los principales sitios de acción de las poblaciones neuronales de la kisspeptina en la regulación de aspectos clave de la recrudescencia gonadal aún están incompletas.

### **1.4.1.3 Acciones fisiológicas de las kisspeptinas en peces: efecto directo sobre la hipófisis.**

Como se ha comentado anteriormente, los numerosos estudios realizados en mamíferos demuestran que el hipotálamo es el sitio principal de acción de las kisspeptinas en cuanto a la función reproductora se refiere, y que además actúan a nivel de las neuronas GnRH. Sin embargo, los genes *KISS1* y *GPR54* no se expresan sólo en el cerebro sino

## 1. Introducción

---

también en la placenta (Muir *et al.*, 2001), páncreas (Hauge-Evans *et al.*, 2006), gónadas (Castellano *et al.*, 2006b; Anjum *et al.*, 2012) e hipófisis (Ohtaki *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2007). En este sentido, un análisis de expresión en células hipofisarias ovinas demostró que el mRNA del *GPR54* se encuentra claramente en fracciones hipofisarias enriquecidas en células gonadotropas (Smith *et al.*, 2008). Además, otro estudio de doble inmunofluorescencia, con anticuerpos específicos, analizó las células hipofisarias que expresan *Kiss1* y *Gpr54* en la rata y demostró que estos genes se expresan en las células gonadotropas, aunque no se excluía la posibilidad de que *Kiss1* también se exprese en otras células de la hipófisis (Richard *et al.*, 2008). Partiendo de estos descubrimientos se iniciaron varios estudios acerca del papel del sistema KISS/GPR54 en la regulación directa de la liberación de hormonas hipofisarias. Por una parte, se demostró que la kisspeptina tiene un efecto directo sobre la liberación de LH y GH en células de hipófisis dispersas de machos y hembras prepúberes de rata (Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2007). A su vez, también se ha observado que regula la función de las células gonadotropas y somatotropas en cultivos celulares primarios preparados a partir de hipófisis de hembras de babuinos (Luque *et al.*, 2011). También se ha visto un efecto directo de las kisspeptinas sobre la liberación de LH en células hipofisarias dispersas de cerdo, vaca y oveja (Suzuki *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008). Todos estos datos sugieren que, a pesar de que el hipotálamo es el lugar principal de acción de las kisspeptinas sobre la función reproductiva, éstas también pueden actuar a distintos niveles del eje reproductivo, en particular sobre la hipófisis. No obstante también hay estudios en los que no se ha observado este efecto directo de la kisspeptina sobre la liberación hormonal en la hipófisis. Por ejemplo, Thompson *et al.* (2004) vieron que fragmentos de adenohipófisis de ratas macho adultas no respondían al tratamiento con el decapeptido. Desafortunadamente, los estudios

## 1. Introducción

---

disponibles actualmente aún son parciales y es muy difícil comparar sus resultados dadas las diferencias existentes entre diseños experimentales.

En peces, al igual que en mamíferos, las acciones de las kisspeptinas sobre la liberación de gonadotrofinas se modulan a través de la activación de las neuronas GnRH a nivel cerebral. Sin embargo, la presencia del sistema Kiss/Gpr54 en la hipófisis de varias especies de teleósteos (Shahjahan *et al.*, 2010; Selvaraj *et al.*, 2010; Alvarado *et al.*, 2013) sugiere que este sistema puede ejercer una acción directa a nivel hipofisario. En peces teleósteos el efecto directo de la kisspeptina sobre las células de la hipófisis se ha evaluado *in vitro* mediante cultivos celulares primarios. En un primer estudio, realizado en carpín dorado, se observó que la estimulación de un cultivo primario de células hipofisarias con Kiss1-10 o Kiss2-10 no daba lugar a la liberación de Lh, sugiriendo que estos péptidos no tenían una acción directa a nivel hipofisario (Li *et al.*, 2009). Sin embargo, dos estudios posteriores, en la misma especie, mostraron que Kiss1-10 puede actuar directamente sobre la hipófisis (Yang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012) puesto que provocó la secreción de Lh en las células hipofisarias. Además se observó que, el tratamiento, a largo plazo (24h), con Kiss1-10 aumentaba significativamente los niveles de expresión de la subunidad *lhβ* (Yang *et al.*, 2010). Por otra parte, el Kiss1-10, tanto humano como de lamprea, ejerció un papel inhibitorio directo sobre la expresión de la subunidad *lhβ* en la hipófisis de anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Pasquier *et al.*, 2011). En conjunto, todos estos datos muestran que, en los peces, los resultados acerca de los efectos directos de las dos formas de kisspeptina, Kiss1 y Kiss2, sobre las células gonadotropas hipofisarias no carecen de controversia.

# 1. Introducción

---

## 1.4.1.4 Papel del sistema Kiss/Gpr54 en el inicio de la pubertad de peces.

Todavía se desconocen en gran medida las causas y los mecanismos que provocan la precocidad en peces. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, la activación completa de la hipófisis, y consecuentemente de las gónadas, está mediada por una serie de eventos neuroendocrinos. En este sentido, la GnRh desempeña un papel esencial en el control de la función reproductiva. Así, poblaciones específicas de neuronas GnRh modulan una gran diversidad de señales que regulan el control de la recrudescencia gonadal y función reproductiva en una amplia gama de especies de peces (Millar *et al.*, 2005; Zohar *et al.*, 2010). Por lo tanto, se puede considerar que el inicio de la pubertad en peces está caracterizado por la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRh) quien, a su vez, estimula la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (Lh y Fsh) a nivel de la hipófisis. Las gonadotrofinas circulantes ejercen su acción sobre las gónadas, provocando el desarrollo puberal de éstas. Dado el papel demostrado de las kisspeptinas en la pubertad de los mamíferos, se han realizado distintos estudios para intentar dilucidar cuál es la implicación de este sistema en el inicio de la pubertad de los peces. Estudios recientes sugieren que las kisspeptinas podrían estar involucradas en el inicio de la pubertad de un grupo muy diverso de peces teleósteos (Nocillado *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2007; Filby *et al.*, 2008; Biran *et al.*, 2008; Martínez-Chavez *et al.*, 2008). Así, se vio que en la etapa temprana de pubertad el mújol (*Mugil cephalus*) presenta niveles significativamente mayores de *gpr54* mRNA cerebral que en las etapas intermedias y avanzadas (Nocillado *et al.*, 2007). De forma similar, se observó un aumento de los niveles de expresión del *gpr54* durante la pubertad temprana de la cobia (*Rachycentron canadum*) (Mohamed *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía no ha sido posible completar la caracterización de los mecanismos y

## 1. Introducción

---

los principales sitios de acción de este sistema en la regulación de aspectos clave del inicio de la pubertad.

### **1.4.1.5 Las kisspeptinas como mediadores en el control fotoperiódico de la reproducción en peces.**

En un estudio reciente con lubina se ha demostrado que la melatonina, hormona que es utilizada por los reproductores estacionales para ajustar su ciclo reproductivo con la estación apropiada, inhibe la expresión de *gnrh1*, *gnrh3* y de los genes de los receptores de Gnrh, que a su vez exhiben fluctuaciones día-noche (Servili *et al.*, 2013). Además, las fibras Gnrh2, procedentes de la población de neuronas Gnrh2 del sinencéfalo, proyectan a la glándula pineal (Servili *et al.*, 2010). Estas interacciones entre los sistemas Gnrh y melatoninérgico podrían mediar los efectos del fotoperíodo en los eventos reproductivos de esta especie. El descubrimiento del sistema Kiss/Gpr54 en peces, proporciona nuevos conocimientos sobre los mecanismos implicados en la regulación de la reproducción y de la pubertad de los mismos, incluido el fotoperiódico. En mamíferos de reproducción estacional, como hámsters y ovejas se han realizado estudios relacionados con la modulación fotoperiódica del sistema kisspeptina (Revel *et al.*, 2006; Greives *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2008). En hámsters sirios, mantenidos bajo un fotoperíodo inhibitorio, se observó que la melatonina inhibía los niveles de mRNA de *Kiss1* en el núcleo arcuato (Simonneaux *et al.*, 2009). Curiosamente, la administración de *Kiss1* a estos hámsters fotoinhibidos fue capaz de reactivar la actividad sexual. A pesar de todo, aún se desconoce si la melatonina actúa directamente sobre las neuronas que expresan *Kiss1* en el núcleo arcuato, o bien, media su acción a través de interneuronas. En peces, la literatura disponible acerca del control fotoperiódico del sistema kisspeptina es relativamente escasa y, además, controvertida. Así, en tilapias mantenidas bajo luz continua, los niveles de mRNA de *gpr54*,

## 1. Introducción

---

analizados en el cerebro entero, fueron significativamente más bajos, sugiriendo que este gen podría estar directa o indirectamente influenciado por la luz (Martínez-Chavez *et al.*, 2008). Del mismo modo, otro estudio en medaka mostró que fotoperíodos permisivos para la reproducción, inducían un número mayor de neuronas Kiss1 en el NVT en comparación con fotoperíodos inhibitorios para la reproducción (Kanda *et al.*, 2008). Por el contrario, en el bacalao Atlántico, no se llegó a resultados claros respecto al papel del fotoperíodo sobre los mecanismos que regulan la expresión del sistema kisspeptina (Cowan *et al.*, 2012).

# 1. Introducción

---

## **2. OBJETIVOS**



## 2. Objetivos

---

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es ampliar el conocimiento sobre el sistema Kiss/Gpr54 y su función en la reproducción de peces teleósteos, utilizando a la lubina como modelo de estudio. Los estudios realizados en mamíferos demuestran que este sistema actúa como centinela de la función de la GnRH, integrando señales centrales y periféricas tanto en pre-púberes, como en adultos. Antes de iniciar el presente estudio, el Grupo Receptor ya había demostrado que el sistema Kiss/Gpr54 en peces está duplicado, mostrando que en la lubina existen dos genes: *kiss1*, que codifica una forma igual a la de mamíferos y *kiss2*, un gen nuevo. Los objetivos específicos del presente estudio son:

### **1. Definir la especificidad ligando-receptor del sistema Kiss/Gpr54.**

En el Grupo Receptor además de los dos genes que codifican las kisspeptinas (*kiss1* y *kiss2*) también se han aislado dos genes que codifican dos receptores Gpr54 diferentes (*gpr54-1b* y *gpr54-2b*). Para llevar a cabo la caracterización funcional de este sistema, se examinarán las interacciones ligando-receptor y su capacidad para activar vías específicas de señalización.

### **2. Analizar el efecto de la administración central de Kiss1 y Kiss2 sobre el eje reproductivo.**

Con el fin de analizar el efecto directo de las kisspeptinas de lubina, Kiss1 y Kiss2, sobre el cerebro, se realizarán inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.) de los péptidos Kiss1-15 y Kiss2-12 en machos maduros. Se analizará la expresión de determinados genes implicados en la reproducción a nivel cerebral, así como los niveles de ciertas hormonas reproductivas y la calidad del esperma tras la inyección.

## 2. Objetivos

---

### **3. Investigar la regulación directa de los gonadotropos por el sistema Kiss/Gpr54.**

El objetivo de este estudio es evidenciar el papel del sistema Kiss/Gpr54 en el eje reproductivo, a nivel de la hipófisis. Por un lado, se analizará la naturaleza de las células Kiss2 en la hipófisis y por otro el efecto directo de los péptidos Kiss1-15 y Kiss2-12 sobre la liberación *in vitro* de las gonadotrofinas, Lh y Fsh, mediante cultivo de células dispersas de la hipófisis de lubina.

### **4. Examinar la participación del sistema Kiss/Gpr54 en la pubertad de la lubina**

Se pretende estudiar los eventos moleculares, neuroendocrinos, hormonales e histofisiológicos implicados en la pubertad de la lubina, con énfasis en el papel del sistema de Kiss/Gpr54. Para ello se analizará la relación entre el tamaño de peces impúberes (grandes/pequeños) y el inicio de la primera gametogénesis.

### **5. Estudiar la relación del sistema Kiss/Gpr54 y el fotoperiodo**

En este objetivo se analizará los perfiles de expresión génica de los sistemas Kiss y Gnrh cerebrales y su relación con las hormonas reproductivas en poblaciones de lubinas macho en las que se adelantará (expuestas a un fotoperiodo que adelanta la pubertad) o inhibirá (expuestas a un fotoperiodo que inhibe la pubertad) la espermatogénesis. Se pretende determinar si el sistema kisspeptina actúa como un enlace mediador de la respuesta entre la señal lumínica ambiental y el eje reproductivo, haciendo patente la expresión diferencial de dicho sistema entre los mencionados tratamientos, al inicio de la gametogénesis.

### **3. METODOLOGÍA**



## 3. Metodología

---

### 3.1 Químicos empelados en las experiencias *in vivo* e *in vitro*

Tanto para las inyecciones i.c.v. (ver apartado 3.3 de este capítulo) como para los cultivos de hipófisis (ver apartado 3.7.2 de este capítulo) se utilizaron las formas largas de las kisspeptinas de lubina (GenScript, EE.UU. Inc.): Kiss1-15 ({pGLU}DVSSYNLNSFGLRY-CONH<sub>2</sub>; GenBank N° de acceso FJ008914) y Kiss2-12 (NH<sub>2</sub>-SKFNFNPFGLRF-CONH<sub>2</sub>; GenBank N° de acceso FJ008915). Ambos péptidos estaban amidados en C-terminal y además, Kiss1-15 contenía una piroglutamilación N-terminal. En este sentido, se ha demostrado que la piroglutamilación del residuo Gln N-terminal en el péptido Kiss1-15 es importante para la unión/activación del receptor (Lee *et al.*, 2009). Los péptidos Kiss1-15 y Kiss2-12 tenían un nivel de pureza, determinada por HPLC analítico, del 95,0% y 98,9%, respectivamente. Cada stock de péptido (1 mg) se diluyó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se alícuotó y se almacenó a -20°C hasta su uso. Debido al carácter hidrofóbico de Kiss1-15, ambos péptidos se disolvieron en un volumen reducido de DMSO (dimetil sulfóxido, 0,25 %; Sigma, St. Louis, MO) y se diluyeron con agua. Para cada experimento se usó una alícuota nueva de los péptidos. El análogo de la hormona liberadora de la hormona luteneizante, LHRHa ([D-Ala<sub>6</sub>, Pro<sub>9</sub>Net]-mGnRH), la testosterona (T) y el 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) se obtuvieron a partir del stock de productos químicos de Sigma (St. Louis, MO).

### 3.2 Animales y obtención de muestras

Los machos de lubina utilizados en esta memoria se mantuvieron en las instalaciones del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (Castellón, 40°N) bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura, exceptuando aquellos experimentos que requirieron condiciones especiales. Los peces estuvieron estabulados en tanques de fibra de vidrio

### 3. Metodología

---

provistos de aireación y flujo continuo de agua de mar y, se alimentaron con pienso comercial en relación con el tamaño del animal y la temperatura (0,5 % - 1,5 % del peso corporal).

Para la toma de muestras, en cada punto de muestreo, los animales se anestesiaron por inmersión en un baño de agua de mar que contenía 0,025% de 2-fenoxietanol (Sigma, Inc.). Los experimentos y sacrificios se realizaron de acuerdo a la legislación española (Real Decreto Ley 53/2013) y europea (2010/63EU) relativa a la protección de los animales utilizados para la experimentación. El protocolo utilizado para sacrificar a los animales fue aprobado por el Comité de Bienestar del IATS (Número de Registro 09-0201) bajo la supervisión del Ministerio de Medio Rural y Marino. En todo momento se tomaron las precauciones precisas para reducir al mínimo el sufrimiento de los animales.

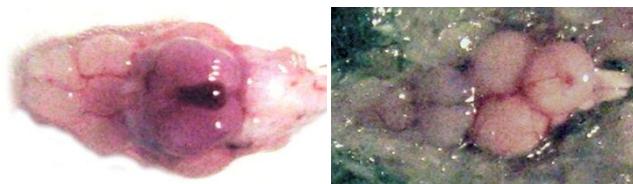
#### **3.3 Inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.)**

Los peces se inyectaron de manera intracerebroventricular de acuerdo con el procedimiento descrito por Clements y Schreck (2001) y adaptado para la lubina. Las inyecciones se realizaron usando una jeringa de vidrio de 10 µl con una aguja de 26G (Hamilton, Reno, Nevada, EE.UU.) y mediante un micrómetro estereotáctico. La posición de la inyección fue inmediatamente detrás de la ventana pineal, justo en la línea media de la cabeza y a una profundidad de 10 mm y 12 mm en los machos de 2 y 3 años de edad, respectivamente. Para prevenir fugas, las soluciones se administraron lentamente y se mantuvo la aguja en posición durante 15 seg. Para cada grupo de edad se calculó la profundidad y la posición de la inyección, después de administrar un colorante azul (azul de metileno), mediante el método descrito anteriormente (n = 10). Al analizar su distribución se observó presencia del colorante en el tercer ventrículo y

### 3. Metodología

---

difusión hacia el telencéfalo y el hipotálamo, poniendo así de manifiesto la fiabilidad y exactitud del procedimiento de administración (**Fig. 3.1**).



**Figura 3.1.** Patrón de distribución del colorante azul (azul de metileno) después de su administración intracerebroventricular.

Las dosis de péptidos fueron similares a las utilizadas en otros estudios de administración central en peces (De Pedro *et al.*, 1993; López-Patiño *et al.*, 1999; Clements *et al.*, 2002; Ojima *et al.*, 2010; Ohga *et al.*, 2014). Los grupos experimentales se inyectaron con Kiss1-15 o Kiss2-12, mientras que a los controles se les administró PBS (*phosphate buffer saline*) o tampón fosfato salino estéril. De esta forma, cada animal experimental de 2 años recibió una dosis de 2 $\mu$ g de péptido, ya sea Kiss1-15 o Kiss2-12, por 4 $\mu$ l de vehículo. En el caso de los peces de 3 años, la dosis se ajustó a 3 $\mu$ g de péptido por 5 $\mu$ l de vehículo.

#### 3.4 Diseños experimentales *in vivo*

##### 3.4.1 Análisis del efecto de la administración central de Kiss1 y Kiss2 sobre el eje reproductivo.

Se llevaron a cabo dos experimentos durante el periodo de espermiación activa: uno a corto plazo (desde el 22 de febrero hasta el 25 de febrero de 2012) y otro a largo plazo, (desde el 28 de febrero hasta el 11 de mayo de 2013) de 72h y 15 días de duración, respectivamente. En ambos experimentos, todos los peces se marcaron individualmente, mediante implantación de transpondedores pasivos integrados (*Pit tags*; Fish Eagle, Estados Unidos), en la musculatura dorsal.

### 3. Metodología

---

En el experimento a corto plazo se utilizaron 84 lubinas macho, sexualmente maduros, de 2 años de edad (talla =  $29,37 \pm 0,25$  cm; peso =  $332,01 \pm 8,32$  g; índice gonadosomático (IGS) =  $2,18 \pm 0,12$ ). Los peces se distribuyeron en tres grupos diferentes, dos experimentales (Kiss1 y Kiss2) y un control (n = 28 peces por grupo). A las 0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 48 y 72 h después de la inyección, se extrajo sangre por punción caudal (n = 7 peces por cada punto de muestreo), se centrifugó (2500 x g, 30 min, 4°C) y el plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta su análisis. Adicionalmente, a las 6, 8 y 12 h después de la inyección, se sacrificaron siete peces por grupo y se extrajo la parte correspondiente al cerebro anterior y medio (FB-MB, *forebrain-midbrain*), el hipotálamo y la hipófisis. Todos los tejidos se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

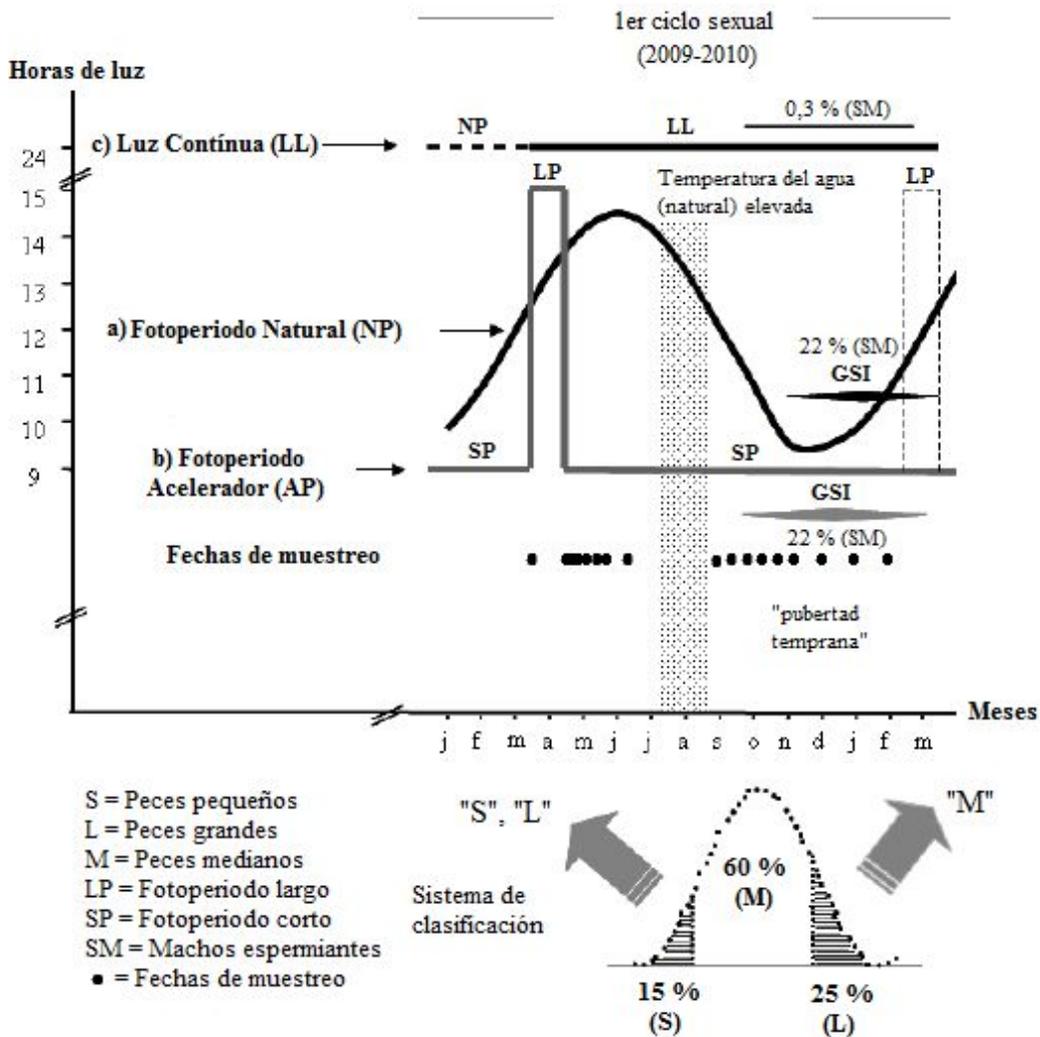
Para el experimento a largo plazo se dispuso de 48 animales sexualmente maduros de 3 años de edad (talla =  $33,66 \pm 0,32$  cm; peso =  $484,58 \pm 16,93$  g; IGS =  $0,99 \pm 0,06$ ) y se asignaron 16 peces a cada grupo. A los 0, 1, 2, 3, 7 y 14 días después de la inyección se extrajo sangre (n = 7 peces por punto de muestreo) por punción caudal. Además a los 3, 7 y 14 días después de la inyección se obtuvo esperma mediante masaje abdominal. Los análisis de volumen, densidad y motilidad espermática se realizaron inmediatamente después de la extracción del esperma (ver apartado 3.9 de este capítulo).

#### **3.4.2 Estudio de la participación del sistema Kiss/Gpr54 en la pubertad de la lubina y su implicación en la señalización de la información fotoperiódica**

Para este estudio se dispuso de peces menores de un año nacidos en 2008, del mismo origen (Gravelines, Francia) y mantenidos bajo tres regímenes diferentes de luz (**Fig. 3.2**): a) fotoperiodo natural simulado (NP), b) un régimen de fotoperiodo que adelanta el ciclo reproductor (Carrillo *et al.* 1993; Mañanós *et al.*, 1997a) y supuestamente también

### 3. Metodología

la pubertad (AP) y que combina días largos constantes (15 horas de luz:9 horas de oscuridad; 15HL:9HO) en abril, seguidos de días cortos constantes (9HL:15HO) durante el resto del año y c) un fotoperiodo inhibitor de la pubertad precoz consistente en la administración de iluminación constante (LL) durante todo el año (Begtashi *et al.*, 2004).



**Figura 3.2** Diseño experimental para el estudio de la participación del sistema Kiss/Gpr54 en la pubertad de la lubina y su implicación en la señalización de la información fotoperiódica.

El grupo LL proporciona un control negativo puesto que la luz continua inhibe la recrudescencia testicular durante el primer año. Por otro lado, el grupo AP proporciona una fuerte señal fotoperiódica que desencadena y sincroniza la actividad del sistema

### 3. Metodología

---

reproductivo. Esto debería permitir estudiar, a lo largo del eje cerebro-hipófisis gónada, los efectos del fotoperiodo en eventos implicados en la preparación para la pubertad. Durante el experimento, a intervalos determinados, se pesaron y midieron todos los peces. Para la toma de muestras, en cada uno de estos puntos, solo se sacrificaron animales comprendidos entre el 15% de los más pequeños (población de peces pequeños) y el 25% de los más grandes (población de peces grandes) de la población total. Este diseño tiene en cuenta la proporción de sexos sesgada hacia las hembras en la población de mayor tamaño. Por ello, se muestreó un número mayor de animales en la población de peces grandes ya que entre estos pueden aparecer hembras que deben ser descartadas a la hora de llevar a cabo los análisis. Las muestras se empezaron a recoger en agosto de 2009 (mes durante el cual los animales se encuentran aún en pre-gametogénesis) y los muestreos se repitieron cada dos semanas, hasta mediados de noviembre del mismo año. En los peces del grupo LL no se realizó el muestreo de mediados de octubre, para evitar posibles situaciones de estrés, puesto que algunos animales presentaban una infección bacteriana. Basándonos en datos histológicos preliminares, se realizaron dos muestreos más, uno a mediados de diciembre de 2009 y otro a finales de febrero de 2010 (meses durante los cuales los animales precoces estaban en espermiación). En cada punto de muestreo, se extrajeron el hígado y la grasa peri-visceral y se pesaron ( $\pm 0,001$  g) para poder estimar el índice hepatosomático (HSI) y el índice de grasa mesentérica (MFI). Los índices HSI y MFI se calcularon como  $100 \times Lw / Bw$  y  $100 \times VFW / Bw$ , respectivamente, donde Bw es el peso corporal (g), Lw es el peso del hígado (g), y VFW es peso de la grasa peri-visceral (g). Además, se tomaron muestras de sangre, FB-MB, hipotálamo, hipófisis y gónadas de una sub-muestra (15 peces) de la población pequeña y otra sub-muestra (25 peces) de la población grande. Todos los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se

## 3. Metodología

---

almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la extracción de RNA mensajero (mRNA). Las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la vena caudal y el plasma extraído se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en el análisis hormonal (ver apartado 3.6.1 de este capítulo). Para establecer los diferentes estados de desarrollo gonadal, se realizó un análisis histológico de los testículos (ver apartado 3.8 de este capítulo). Dado que en los primeros puntos de muestreo, las gónadas eran demasiado pequeñas para utilizarlas, a la vez, en los análisis de expresión y en el estudio histológico, las gónadas de los muestreos mencionados anteriormente se reservaron exclusivamente para estudios de expresión. Paralelamente, en cada muestreo, se sacrificaron cuatro peces pequeños y cuatro grandes y se extrajeron las gónadas que se destinaron al análisis histológico convencional según lo detallado en el apartado 3.8 de este capítulo.

### 3.5 Técnicas de biología molecular

#### 3.5.1 Extracción de RNA

Para aislar el RNA total de los tejidos analizados, se usaron 2 métodos de extracción diferentes. En el caso del FB-MB e hipotálamo, el RNA se aisló usando el kit *Maxwell 16LEV simply RNA tissue* (Promega Corp., Madison, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los tejidos se homogeneizaron previamente en la solución homogeneizadora, proporcionada por el kit, dentro de unos tubos acondicionados para tal efecto (*FastPrep Lysing Matrix Tubes*). El proceso se realizó mediante la máquina homogeneizadora FastPrep (Qbiogene Inc., Irvine, CA). Los tubos FastPrep contienen esferas cerámicas de 1,4 mm, de tal forma que el aparato homogeneizador utiliza un movimiento multidireccional optimizado para romper las células a través de golpes simultáneos de estas esferas. Una vez realizada la homogeneización, se utilizó un procesador de partículas magnéticas, el Maxwell 16 (Promega Corp.), para la extracción

### 3. Metodología

---

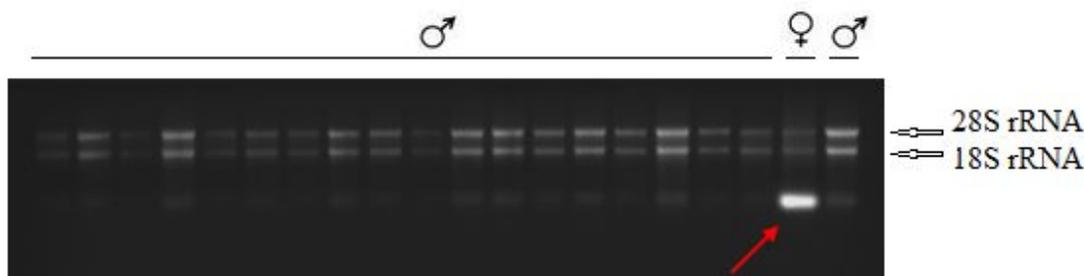
del RNA Total. El kit de extracción Maxwell incluía un tratamiento individual con DNasa I.

Para el caso de las gónadas, hipófisis y células hipofisiarias dispersas, donde la cantidad de tejido era demasiado pequeña para el kit de extracción Maxwell, la extracción se llevó a cabo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies). En este caso, se añadió una cantidad adecuada del reactivo TRIzol a las muestras congeladas que se homogeneizaron utilizando una jeringuilla de insulina de 1 ml. La adición de cloroformo, seguida de centrifugación, separa la solución en dos fases, una acuosa y otra orgánica. El RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa y se puede recuperar por precipitación con isopropanol. Finalmente, las muestras se trataron con DNasa I libre de RNasa (Ambion, Inc., Austin TX). En todos los casos, la pureza y la concentración del RNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad del RNA (bandas discretas de los RNAs ribosomales (rRNA) 28S y 18S con ausencia de degradación) se comprobó mediante electroforesis horizontal en un gel de 0,8% de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Cuando los animales eran demasiado pequeños para diferenciar *de visu* entre testículos u ovarios y además no había suficiente cantidad de muestra para histología, ya que todo el tejido era preciso para extraer RNA, se utilizó ese mismo RNA para determinar el sexo de los peces. En las hembras de lubina el RNA de bajo peso molecular, probablemente rRNA 5S, se produce y acumula masivamente en el ovario, al principio de la ovogénesis, por lo que este análisis también sirve para determinar el sexo de los peces muestreados. El RNA intacto aislado a partir de ovarios, separado en un gel de agarosa, presenta las típicas bandas de rRNAs 28S y 18S, y además, una banda de tamaño pequeño muy intensa. En la **Fig. 3.3**, la flecha apunta a una muestra de RNA aislada de un ovario, mientras que las otras muestras corresponden a testículos. Una vez

### 3. Metodología

identificado el sexo de cada individuo, se extrajo el RNA del resto de tejidos sólo en los machos.



**Figura 3.3** RNA total de gónadas de lubina pre-púberes separado en un gel de agarosa al 0,8% y teñido con bromuro de etidio. La flecha señala el RNA extraído de un ovario. El resto de las muestras de RNA corresponden a testículos.

Finalmente, cuando fue necesario, el hipotálamo y la hipófisis se homogeneizaron en 250  $\mu$ l de PBS mediante una jeringuilla de insulina. Una alícuota de dicho homogeneizado (150  $\mu$ l) se usó para la extracción del RNA mediante el reactivo TRIzol. La alícuota restante se utilizó para análisis hormonales (ver apartado 3.6).

#### 3.5.2 Transcripción reversa (RT)

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA), se desnaturalizaron 1-2  $\mu$ g de RNA tratado con DNasa I libre de RNasa a 65°C durante 5 min junto con 100 ng de hexámeros con secuencia aleatoria y 1  $\mu$ l de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato, 10 nM cada dNTP). Antes de añadir la transcriptasa inversa las muestras se enfriaron en hielo durante 1 min. La transcripción inversa se llevó a cabo por la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) a 42°C durante 50 min. Para proteger el mRNA de la acción de las ribonucleasas durante la síntesis del cDNA se usaron 40 unidades (U) de RNasaOUT (Promega Corp.). Finalmente, la reacción se bloqueó aumentando la temperatura a 70°C durante 15 min. El cDNA sintetizado se guardó a -20°C hasta su uso.

## 3. Metodología

---

### 3.5.3 Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para los ensayos de qPCR se utilizaron dos sistemas de detección, el basado en TaqMan® y en SYBR® Green. El sistema de detección TaqMan®, también conocido como ensayo fluorogénico 5' nucleasa, se basa en el uso de oligonucleótidos marcados con fluoróforos que funcionan como sondas sobre las que actúa la actividad 5' nucleasa de la Taq DNA polimerasa. Estas sondas contienen un colorante indicador fluorescente en el extremo 5' y un colorante inhibidor en el extremo 3', y su secuencia se diseña basándose en la secuencia que se amplificará entre los dos cebadores usados en la amplificación por PCR. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del colorante inhibidor reduce en gran medida la fluorescencia emitida por el colorante indicador fluorescente mediante transferencia de energía de resonancia (FRET). Si la secuencia diana está presente en el molde analizado, al amplificarse éste la sonda hibridará con el DNA sintetizado y la actividad 5' nucleasa de la Taq DNA polimerasa cortará el colorante situado en ese extremo a medida que el cebador se va extendiendo. Este corte separará el colorante indicador fluorescente del colorante inhibidor, incrementando significativamente la señal fluorescente del indicador. Posteriormente la sonda también se separará del molde, por desplazamiento de la polimerasa, a medida que se vaya extendiendo la polimerización de DNA a partir del cebador. Así, con cada ciclo, se liberarán moléculas de colorante indicador de las sondas hibridadas con el molde, resultando todo ello en un aumento de la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón producido.

Para analizar la expresión de algunos genes no se utilizó el ensayo TaqMan® si no un sistema de detección basado en el colorante SYBR® Green. Este colorante se une rápidamente a todo el DNA de doble cadena presente en una muestra. Durante la PCR, la DNA polimerasa amplifica la secuencia diana creando nuevas copias de DNA de

### 3. Metodología

---

doble cadena a las que se une este colorante. A medida que avanza la reacción de amplificación, se crean más productos de PCR y el colorante se une a todo el DNA de doble cadena existente, dando lugar a un aumento de la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto de PCR producido.

Las sondas y los cebadores usados en los ensayos de qPCR (**Tabla 3.1**) se diseñaron mediante el software Primer Express (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Todos los ensayos se realizaron por duplicado usando placas de 96 pocillos ópticos (Thermo-Fast® 96 Semi-Skirted PCR Plate, Advanced Biotechnologies Ltd, UK) en un termociclador iCycler IQ™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Por cada 25 µl de reacción de PCR, se mezcló 1 µl de cDNA (sintetizado a partir de 1-2 µg de RNA) junto con la cantidad correspondiente de cebadores y sonda (**Tabla 3.1**) y los reactivos correspondientes de acuerdo a los ensayos de detección basados en TaqMan® (ABgene's Absolute™ QPCR Mix (ABgene, Reino Unido)) o en SYBR® Green (Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Reino Unido)). Las condiciones para la reacción del ensayo TaqMan® en el termociclador fueron: 1 ciclo de 95°C, 15 min para la activación de la Taq DNA polimerasa y 40 ciclos de 95°C, 15 seg seguidos de 60°C, 1 min. Las condiciones para la reacción del ensayo SYBR® Green en el termociclador fueron: 1 ciclo de 95°C, 10 min para la activación de la Taq DNA polimerasa y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos seguidos de 60°C, 1 min. La principal limitación de este ensayo es que al unirse el SYBR® Green al total del DNA de doble cadena, presente en la muestra, éste emite una señal fluorescente tanto para productos específicos, como para los dímeros de cebadores que no deberían cuantificarse. Para subsanar a esta situación se realizó un análisis de la curva de fusión (60-95°C) de los resultados. Este análisis permite discriminar los productos no específicos de los amplicones específicos.

### 3. Metodología

**Tabla 3.1** Cebadores y sondas fluorogénicas TaqMan<sup>a</sup> (cuando fue necesario) específicos usados en el ensayo de qPCR

Gen	Método de detección	Secuencia 5' → 3'	nM <sup>b</sup>	Tamaño del amplicón; eficiencia de la PCR
<i>kiss1</i> (FJ008914) <sup>c</sup>	TaqMan®	<sup>d</sup> fw: CCTTCAGCACACCGAGGAAT	900	70 pb; 0,95
		<sup>e</sup> rv: GGTATCATCAGAGCGACAATGAGT	900	
		<sup>f</sup> pr: [6~FAM]CAGCAGGTCTGTCCACGATGCCCC[TAMRA]	50	
<i>kiss2</i> (FJ008915)	TaqMan®	fw: GGAAGCGCTACATTTACAGAAG	900	91 pb; 0,99
		rv: GCACCTCCAGTTCTCGTGAGA	300	
		pr: [6~FAM]CCCTAAAAGAGCCAGGACGAACAGGTTTC[TAMRA]	50	
<i>gpr54-1b</i> (JN202446)	TaqMan®	fw: TGGTGGCTCTGTTCCTCATCT	900	78 pb; 1,04
		rv: CGTAACTGCGTAGGCCAAAAG	900	
		pr: [6~FAM]CCCCATCCAGGTCTGCATCCTCC[TAMRA]	50	
<i>gpr54-2b</i> (JN202447)	TaqMan®	fw: CGTCACAGTCTACCCCTGAA	900	69 pb; 1,02
		rv: CAGATGCTGACAATCATGGCTACT	900	
		pr: [6~FAM]CTCTCCGCCACCGCACTCCG[TAMRA]	50	
<i>gnrh-1</i> (AF224279)	TaqMan®	fw: GCAATCAGATAGTCGGGAGCTT	300	70 pb; 0,98
		rv: GATTCCTCTGCACAACTAAAACCT	900	
		pr: [6~FAM]CCACACGTGGCGACGCC[TAMRA]	150	
<i>gnrh2</i> (AF224281)	SYBR® Green	fw : CCTGCCTCACACAGTAAATCTC rv : CTGGAGGCAAGAGGAACTG	200 200	73 pb; 0,96
<i>gnrh3</i> (AF224280)	TaqMan®	fw: CACCACTTCTCCTGTACCCATCA	300	76 pb; 1,00
		rv: ATGGCTACCAGGTGGGAAGA	900	
		pr: [6~FAM] CCTGATGGTTGCCTCTAGCTCTCCCA [TAMRA]	200	
<i>gnrhr-II-1a</i> (AJ419594)	TaqMan®	fw: CTAAAGCTGCAGGCGATGTACTC	900	77 pb; 0,97
		rv: TGAGGATGGCTGACTGCCTAT	900	
		pr: [6~FAM]CACCACGGTGACAAAGGCGCA[TAMRA]	100	
<i>gnrhr-II-1a</i> (AJ419594)	TaqMan®	fw: CTAAAGCTGCAGGCGATGTACTC	900	77 pb; 0,94
		rv: TGAGGATGGCTGACTGCCTAT	900	
		pr: [6~FAM]CACCACGGTGACAAAGGCGCA[TAMRA]	100	
<i>lhβ</i> (AF543315)	SYBR® Green	fw: AGCTCATCAACCAGACAGTG rv: TGAATGGTATCTTAATGACAGG	200 200	120 pb; 0,90
<i>fshβ</i> (AF543314)	SYBR® Green	fw: TCGATAGTACGTGTCTGTGCT	200	131 pb; 0,98
		rv: CACTTGGATGCTGATGTTGG	200	
<i>ef1α</i> (AJ866727)	TaqMan®	fw: GGAGTGAAGCAGCTCATCGTT	50	69 pb; 1,01
		rv: GCGGGCCTGGCTGTAAG	300	
		pr: [6~FAM]AGTCAACAAGATGGACTCCACTGAGCCCC[TAMRA]	200	

<sup>a</sup>Los cebadores fueron obtenidos en Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) y las sondas fluorogénicas en Operon Biotechnologies GmbH (Cologne, Germany). <sup>b</sup>Cantidad de cebador o sonda usada en la qPCR. <sup>c</sup>Número de acceso al GenBank para los genes de lubina. <sup>d</sup>fw: cebador directo o *forward primer*; <sup>e</sup>rv: cebador reverso o *reverse primer*; <sup>f</sup>pr: sonda fluorogénica o *fluorogenic probe* Taqman.

Para cuantificar los amplicones y corregir la variabilidad de la eficiencia de amplificación en muestras analizadas en distintas placas, se prepararon curvas estándar a partir de plásmidos que contenían los genes objeto del estudio o los genes de control endógenos específicos de lubina. Estos plásmidos, de concentraciones conocidas, se usaron en diluciones seriadas con un factor de dilución de 10. Todos los datos se recogieron y se analizaron mediante el software iCycler IQTM (versión 3.0.6070).

### 3. Metodología

---

Todos los coeficientes de correlación de las curvas estándar oscilaron entre 0,90 y 1,04. Las eficiencias de la PCR se muestran en la **Tabla 3.1**. Para cada muestra experimental, la cantidad de cada gen diana o de referencia se cuantificó a partir de la curva estándar apropiada.

Los ensayos de qPCR están sujetos a variabilidad causada tanto por variaciones técnicas, como por variaciones biológicas. Es esencial mantener al mínimo la variabilidad de origen técnico para optimizar las posibilidades de identificar cambios biológicamente relevantes en los niveles de mRNA. Por ello, la normalización de los datos es una parte esencial de un ensayo de qPCR. Sin embargo, hasta la fecha no existe un método para la normalizar los datos, aceptado universalmente, que considere todas las variables encontradas durante el curso de un experimento de qPCR. Se han propuesto varias estrategias para la normalización de los datos, siendo la más popular el uso de un gen endógeno de referencia con expresión constitutiva. En esta memoria, para normalizar los datos se ha utilizado el gen endógeno factor de elongación 1-alfa (*efl-alpha*) debido a su potencial como gen de referencia control en muestras de cerebro e hipófisis de lubina (Alvarado *et al.*, 2013). Así, se utilizó la expresión del gen *efl-alpha* para la normalización de los datos de expresión en FB-MB, hipotálamo e hipófisis. En ningún caso se vieron diferencias significativas de este gen de referencia endógeno entre los distintos puntos experimentales analizados en esta memoria. Para normalizar, se dividió la cantidad de expresión obtenida para el gen objeto de estudio por la cantidad del gen de referencia endógeno.

#### **3.5.4 Generación y aislamiento de plásmidos de expresión**

Los cDNAs codificantes de los receptores *gpr54-1b* y *gpr54-2b* de lubina, previamente clonados, se introdujeron en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen) bajo el control

### 3. Metodología

---

del promotor de citomegalovirus (CMV) para generar los plásmidos pcDNA-gpr54-1b y pcDNA-gpr54-2b. El DNA plasmídico para las transfecciones se obtuvo mediante el crecimiento de los clones de *E. coli* DH5 $\alpha$ , conteniendo los plásmidos citados anteriormente, en medio LB (Luria-Bertani). A continuación el DNA se purificó empleando columnas de cromatografía de intercambio aniónico (Maxipreps, Qiagen Inc., Chatswoth, CA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos de expresión de los receptores de kisspeptinas humano (pcDNA-hGpr54) y de ratón (pcDNA-mGpr54) fueron donados generosamente por el Dr. Robert Miller (*MRC Human Reproductive Science Unit*, Edimburgo) y por el Dr. Manuel Tena-Sempere (Universidad de Córdoba), respectivamente.

Para medir la activación de los receptores, se utilizó un ensayo basado en la actividad luciferasa de luciérnaga (Luc). Para ello, se usaron plásmidos que contenían el gen *Luc* regulado transcripcionalmente por un elemento de respuesta a suero (SRE, *serum responsive element*) o un elemento de respuesta a cAMP (CRE, *cAMP responsive element*) (BD Clontech, Palo Alto, CA). Los sistemas CRE-Luc y SRE-Luc hacen posible la discriminación entre las vías de señalización adenilato ciclasa/proteína quinasa A (PKA) o proteína quinasa C (PKC)/MAP quinasa respectivamente. Por último se usó el plásmido pRL-TK (Promega, Madison, WI) con el fin de controlar la eficiencia de la transfección, el cual expresa constitutivamente el gen *Luc* de *Renilla reniformis*.

#### 3.6 Análisis bioquímicos

##### 3.6.1 Ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

La medida de las gonadotropinas se realizó mediante el ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas. El ELISA es

### 3. Metodología

---

una técnica de inmunoensayo en la que un antígeno inmovilizado es reconocido específicamente por un anticuerpo primario y éste a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazada una enzima capaz de generar un producto detectable, como por ejemplo un cambio de color. La aparición del colorante permite medir indirectamente, mediante espectrofotometría, la cantidad de antígeno en la muestra.

Las cuantificaciones de Lh y Fsh de lubina se llevaron a cabo mediante ELISAs homólogos (Mateos *et al.*, 2006, Molés *et al.*, 2012) basados en el método descrito para la Lh de la lubina americana (Mañanós *et al.*, 1997b). Ambos ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, los cuales se cubrieron con la subunidad Lh $\beta$  y con el dímero de Fsh $\beta$  completo producido por baculovirus, respectivamente, ambos de lubina, y se incubaron toda la noche (16-19 h) a 4°C. Paralelamente, las muestras se incubaron en microtubos, también toda la noche (16-19h), a 4°C con anticuerpos policlonales de conejo contra las subunidades Lh $\beta$  y Fsh $\beta$  (dilución 1/120000 y 1/8000, respectivamente) de lubina. Al día siguiente las placas se lavaron y saturaron con albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*; Sigma). Posteriormente, las muestras preincubadas con el anticuerpo se repartieron por duplicado (100  $\mu$ l/pocillo para la Lh y 50  $\mu$ l/pocillo para la Fsh), en las placas cubiertas con sus revestimientos respectivos o *coating*, la subunidad de Lh $\beta$  y el dímero de Fsh $\beta$  completo, y se incubaron de nuevo (90 min a 37°C para la Lh y 48 h a 4°C para la Fsh). Posteriormente, se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario o GAR-HRP (*HRP-labelled goat anti-rabbit IgG*, dilución 1/1000; Bio-rad Laboratories, Inc.) a 37°C (100  $\mu$ l/pocillo durante 1 h para la Lh y 50  $\mu$ l/pocillo durante 45 m para la Fsh). El color (amarillo) se desarrollo tras adición de 100  $\mu$ l/pocillo de la solución TMB para sustrato peroxidasa (TMB, *peroxidase substrate solution*, Bio-Rad Laboratories, Inc). La

### 3. Metodología

---

reacción se detuvo 25 min después de haber añadido la solución de TMB mediante incorporación de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1N (100 µl/pocillo) y 5 min de incubación, lo cual viró la muestra a una coloración azulada. La densidad óptica se leyó a 450 nm mediante un lector de placas (Microplate Reader Model 3550; Bio-Rad Laboratories).

La medida de los andrógenos (T y 11-KT) y de la Gnrh1 se realizaron mediante el ensayo EIA (*Enzyme Immunoassay*) o Ensayo inmunoenzimático. El EIA también es una técnica de inmunoensayo, en la que un antígeno inmovilizado es reconocido específicamente por un anticuerpo primario. Éste a su vez es reconocido por un marcador específico (trazador) que lleva enlazado una enzima capaz de generar un producto detectable, como por ejemplo un cambio de color. De esta forma, los niveles plasmáticos de T se analizaron usando un EIA específico para la lubina desarrollado por Rodríguez *et al.* (2000a), mientras que los niveles de 11-KT en plasma se determinaron mediante un EIA desarrollado para el esturión siberiano (*Acipenser baeri*) (Cuisset *et al.*, 1994) y modificado para su uso en la lubina (Rodríguez *et al.*, 2005). El análisis de Gnrh1 en hipófisis e hipotálamo se llevó a cabo mediante un EIA homólogo desarrollado por Holland *et al.* (1998) y adaptado para lubina por Rodríguez *et al.* (2004). Los andrógenos se extrajeron de las muestras con metanol antes de su análisis (Panreac Química S.A., Spain). Una vez evaporado el solvente orgánico, el extracto seco se reconstituyó en el tampón de reacción (RB, *Reaction Buffer*; 100 ml de tampón fosfato potásico 1 M; 0,1 g NaN<sub>3</sub>; 23,4 g NaCl; 0,37 g ácido etildiaminotetraacético (EDTA); 1 g BSA; enrasar a 1 L con agua bidestilada). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos cubiertas con 200 µl por pocillo de un anticuerpo monoclonal (mouse anti-rabbit IgG, dilución 1:1800; Sigma). Cada componente del ensayo, es decir, la curva estándar, trazador (0,083 UE/ml para T y 0,1042 UE/ml para 11-KT; Spi-bio), anticuerpos específicos (dilución 1/3000000 para T y 1/200000 para 11-KT) y muestras,

### 3. Metodología

---

se añadió a la placa en un volumen de 50 µl por pocillo, de tal forma que el trazador enzimático y las moléculas de andrógenos reconocieron y se unieron al anticuerpo monoclonal. Posteriormente, las placas se incubaron toda la noche (16-19 h) a 37°C. Después de la incubación, se lavaron y se añadieron 200 µl del reactivo de Ellman a cada pocillo, de tal forma que el trazador reaccionó con dicho reactivo para dar un color amarillo. Se incubaron de nuevo en oscuridad y agitación a 20°C durante el tiempo necesario hasta la aparición del color amarillo. La densidad óptica se leyó a 405 nm mediante un lector de placas. En el caso de la Gnrh1, la homogeneización de los tejidos se realizó en 250 µl de PBS y se utilizó una alícuota de 100 µl para el ensayo hormonal. La proteína se extrajo durante 10 min a 80°C mediante la adición de 100 µl de ácido acético 2N. Posteriormente se centrifugó a 10000 x g, 30 min a 4°C y el pellet se reconstituyó en el tampón RB. El desarrollo del ensayo es el mismo que el descrito para los andrógenos. El anticuerpo específico para T (Rodríguez *et al.*, 2000a), Gnrh1 (Rodríguez *et al.*, 2000b) y 11-KT (Rodríguez *et al.*, 2001a) se usó a una dilución 1/1000000 y el trazador a una concentración de 0,5 UE/ml (Spi-bio). Los niveles totales de proteína se midieron utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific).

#### 3.6.2 Ensayos inmunohistoquímicos

La inmunohistoquímica es un procedimiento que permite identificar/localizar una proteína (antígeno) determinada en un tejido, haciendo uso para ello de un anticuerpo específico que la reconoce y que se encuentra acoplado a un método de detección colorimétrica de dicho anticuerpo. Esta técnica se suele aplicar sobre muestras de tejido, correctamente fijadas y congeladas o incluidas en parafina. Así, el complejo antígeno-anticuerpo formado se puede localizar e identificar en muestras tisulares o citológicas mediante alguna de las técnicas específicas existentes (peroxidasa antiperoxidasa,

### 3. Metodología

fluoresceína, etc.). Mediante esta técnica se pueden identificar los marcadores antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionamiento celular.

Con el fin de identificar la naturaleza de las células Kiss2 de la hipófisis de lubina, así como su relación con las células gonadotropas y las fibras GnRH1, se realizaron detecciones de inmunohistoquímica doble con anticuerpos previamente validados (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Información detallada de los anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica doble.

Proteína	Especie donante	Antígeno	Referencia	Dilución
Kiss2	Conejo	ELEVPT	Escobar <i>et al.</i> , 2013b	1: 200
Gnrh1 (GAP)	Cobaya	Gnrh1 (GAP) de lubina	González-Martínez <i>et al.</i> , 2002a	1: 500
Lhβ	Conejo	Lhβ Nativa purificada	Mateos <i>et al.</i> , 2003; 2006	1: 1000
Fshβ	Conejo	Fshβ Recombinante	Mateos <i>et al.</i> , 2003; Molés <i>et al.</i> , 2011, 2012	1: 1000

Los protocolos fueron diferentes dependiendo de si los anticuerpos utilizados se habían generado en el mismo o distintos animales. Para obtener los cerebros, los peces se anestesiaron en 2-fenoxietanol (Sigma) al 0,025% y se perfundieron transcárdialmente usando una bomba peristáltica con 50 ml de NaCl al 0,65% primero y una solución de fijación (paraformaldehído (PAF) 4%, tampón fosfato, 0,1M pH 7,4, y ácido pícrico 1%) después. Posteriormente se continuó con la fijación durante toda la noche a temperatura ambiente, se deshidrataron, se incluyeron en parafina, y se cortaron transversalmente en siete series paralelas a un espesor de 6 μm. Las secciones se montaron en portaobjetos de poli-L-lisina y se mantuvieron a 4°C bajo ambiente libre de RNasas hasta su uso.

Para las detecciones inmunológicas las secciones de hipófisis se desparafinaron en xileno y se rehidrataron mediante concentraciones decrecientes de etanol a temperatura

### 3. Metodología

---

ambiente. Posteriormente, se lavaron dos veces en PBS 0,1M y se transfirieron a otra cubeta donde se desenmascaró el antígeno (Tris-HCl 50 mM, pH 9,5; 20 min a 95°C). Los portaobjetos se dejaron enfriar durante 15 min, a temperatura ambiente, antes de lavarlos dos veces en PBST (PBS con Triton 0,1%) y se bloquearon en solución de bloqueo al 0,5% en PBS (pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Cuando se usaron dos anticuerpos generados en distintos animales (Kiss2, Gnrh1), las muestras se incubaron, durante toda la noche en una cámara húmeda, a temperatura ambiente, con los anticuerpos primarios (anti-Kiss2 diluido 1:200 y anti-Gnrh1 diluido 1:500), en solución de bloqueo al 0,5% en PBS. Las secciones se lavaron al día siguiente dos veces en PBS y se incubaron durante 2h en un cámara oscura, a temperatura ambiente, con los dos anticuerpos secundarios, *Alexa 594 labelled goat anti-rabbit* para Kiss2 y *Alexa 488 labelled goat anti-guinea pig* para Gnrh1 (Molecular Probes, Invitrogen Eugene OR, EE.UU.), ambos diluidos 1:300 en solución de bloqueo al 0,5% en PBS. Después de lavar con PBS, se llevó a cabo una tinción nuclear incubando las secciones con Hoechst (Life Technologies, diluido 1:1000). Por último, los portaobjetos se lavaron y se montaron con *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen).

En el caso de la inmunohistoquímica doble con dos anticuerpos primarios generados en el mismo animal (**Tabla 3.2**, Kiss2, Lh $\beta$ , Fsh $\beta$ ), se puso a punto un método de doble inmunofluorescencia, modificado del desarrollado por Kroeber *et al.* (1998) para anticuerpos primarios de la misma especie donante. Así, tras desparafinar y bloquear las secciones, como se ha explicado en el protocolo anterior, las muestras se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente con el primer anticuerpo primario (anti-Kiss2 diluido 1:200) en solución de bloqueo al 0,5% en PBS. En paralelo, el segundo anticuerpo primario (anti-Lh $\beta$  o anti-Fsh $\beta$  diluidos 1:1000) y el segundo anticuerpo secundario (*Alexa 594 labelled goat anti-rabbit* diluido 1:1000) se

### 3. Metodología

---

incubaron juntos en un tubo con baja capacidad de unión de proteínas (*low bind protein tube*, Eppendorf) en solución de bloqueo al 0,5% en PBS, durante toda la noche a 4°C. En un tubo aparte, se incubó el segundo anticuerpo secundario solo (*Alexa 594 labelled goat anti-rabbit* diluido 1:1000), el cual posteriormente serviría como control negativo. Al el segundo día, las secciones se lavaron y se incubaron durante 2h con el primer anticuerpo secundario (*Alexa 488 labelled goat anti-rabbit* diluido 1:300). Después, se lavaron y se preincubaron con suero preimmune de conejo al 5% (v/v), durante 1 hora a temperatura ambiente, con el fin de bloquear la unión del segundo anticuerpo primario (anti-Lh $\beta$  o anti-Fsh $\beta$ ) a los sitios de unión libres del primer anticuerpo secundario (*Alexa 488 labelled goat anti-rabbit*). Finalmente, después de una post-fijación con PAF al 4 % durante 15 min, las secciones se lavaron y se incubaron con el conjugado del segundo anticuerpo primario (anti-Lh $\beta$  o anti-Fsh $\beta$ ) y del segundo anticuerpo secundario (*Alexa 594 labelled goat anti-rabbit*), o bien, con el segundo anticuerpo secundario solo (*Alexa 594 labelled goat anti-rabbit*; control negativo) durante toda la noche a temperatura ambiente. Antes de añadir este complejo de anticuerpos a los portaobjetos con las muestras, estos se preincubaron en los tubos con suero preimmune de conejo al 5% (v/v), durante 1 hora a temperatura ambiente, para saturar los sitios de unión libres de segundo anticuerpo secundario (*Alexa 594 labelled goat anti-rabbit*). Después de lavar con PBS, se llevó a cabo una tinción nuclear incubando las secciones con Hoechst (Life Technologies, diluido 1:1000). Por último, los portaobjetos se lavaron y se montaron con *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen). Para verificar la validez de la técnica, se utilizó una serie de cada sección para la doble inmunohistoquímica y la otra para el control negativo correspondiente, en la cual sólo debe aparecer la señal Kiss2, ya que al bloquear la unión del segundo anticuerpo secundario al primer anticuerpo primario se evita la reacción cruzada de anticuerpos.

## 3. Metodología

---

### 3.7 Técnicas de cultivo celular

El cultivo celular es una metodología mediante la cual se pueden cultivar células en condiciones controladas. Este tipo de técnicas permiten un control preciso del medio que rodea a la célula de manera que se pueden controlar tanto factores físico-químicos (pH, temperatura, niveles de CO<sub>2</sub>,...), como fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular,...).

#### 3.7.1 Cultivo de líneas celulares. Estudio de especificidad ligando-receptor

En las transfecciones transitorias para estudios funcionales de los receptores Gpr54 se usó la línea de células de ovario de hámster chino, CHO. Las células CHO se mantuvieron a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub> en medio Eagle modificado de Dulbecco (DME) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Seis horas antes de la transfección, las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos (confluencia del 80% - 90%) y posteriormente se transfectaron de manera transitoria con el reactivo Lipofectamina (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CHO se co-transfectaron con las siguientes proporciones de plásmidos, pSRE-Luc o pCRE-Luc reportero (1 µg), pcDNA3 (transfección control) o pcDNA-gpr54-1b o pcDNA-gpr54-2b o pcDNA-hGpr54 o pcDNA-mGpr54 (160 ng), y pRL-TK (320 ng). Dos días después de la transfección, se repartieron en placas de 96 pocillos y se estimularon durante 6 h con concentraciones crecientes (de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-10</sup>M) de los decapeptidos (Kiss1-10 ó Kiss2-10) de lubina, así como con las formas más largas (Kiss1-15 ó Kiss2-12), ambos diluidos en medio OPTI-MEM (Invitrogen). En el caso de las transfecciones que contenían el plásmido SRE-Luc, las células se mantuvieron sin suero 2h antes del inicio del experimento para evitar

### 3. Metodología

---

la estimulación de este sistema de señalización por el suero. Se realizaron dos experimentos independientes de transfección y cada uno de ellos se hizo por duplicado.

Tras la estimulación, las actividades luciferasa, tanto de luciérnaga como de *Renilla*, se determinaron utilizando el sistema de ensayo de luciferasa *Dual-Glo* (Promega, Madison, WI). Para ello, a cada placa de 96 pocillos se añadieron en igual volumen el Reactivo Dual-Glo® y el medio de cultivo usado para la transfección. Después de 10 min, se midió la actividad luciferasa de luciérnaga en un lector de microplacas ULTRA Evolution multi-detección (Tecan), y se expresó como unidades relativas de luz (RLU). Posteriormente, se añadió a los pocillos volúmenes iguales de Reactivo Dual-Glo® Stop & Glo® y medio de cultivo original usado para la transfección. Finalmente, después de 10 min, se midió la actividad luciferasa de *Renilla* en un lector de microplacas y se expresó como RLU. Los datos se representaron como la actividad relativa de la luciferasa de luciérnaga respecto a la actividad luciferasa de *Renilla*.

#### 3.7.2 Cultivo primario de células de hipófisis

Se extrajeron las hipófisis de machos adultos de lubina y se colocaron rápidamente en medio de dispersión, DM (L-15 con sales de *Hanks*, Hepes 25 mM, BSA 0,5 %, penicilina - estreptomicina al 1 %, pH = 7,4), enfriado en hielo. Todas las hipófisis (n = 7-10) se lavaron bajo campana de flujo laminar con DM a temperatura ambiente y se cortaron en fragmentos de 1 mm<sup>3</sup>. Los fragmentos lavados y cortados se transfirieron a un tubo de 15 ml para su dispersión.

La dispersión de las células hipofisarias se basó en el método de digestión desarrollado para la lubina por Cerdá-Reverter *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Así, las células se dispersaron enzimáticamente usando un método de digestión de tripsina/DNasa II. Para ello los fragmentos se expusieron, en primer lugar, a una

### 3. Metodología

---

solución de tripsina al 0,33% en medio de dispersión durante 40 min a temperatura ambiente. Después de la tripsinización, se centrifugaron a 500 x g durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. Seguidamente, se inhibió la actividad de la tripsina con FBS al 10%. Se volvió centrifugar a 500 x g durante 15 min y se eliminó de nuevo el sobrenadante. Por último, las células hipofisarias se trataron con DNasa II (0,1 mg/10 ml) durante 10 min y se realizó una última centrifugación a 500 x g durante 15 min. Después de eliminar el sobrenadante, se dispersaron mecánicamente mediante pipeteo enérgico en DM fresco y a temperatura ambiente. A continuación, las células ya dispersas se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro de 100 µm, eliminando así los fragmentos que quedaron sin dispersar. Las células filtradas se centrifugaron a 500 x g durante 10 min y se resuspendieron en 5 ml de medio L-15 libre de suero (L-15 con Hepes 25 mM, BSA al 0,1 %, penicilina-estreptomicina al 1 %, pH = 7,4). Después de estimar el número de células viables con azul de tripano ( $\geq 98$  % de viabilidad), las células hipofisarias dispersas se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon, Becton Dickinson, NJ) a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo/ml y se dejaron preincubando toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se reemplazó el medio antiguo por medio nuevo L-15 con FBS al 10%. Después de 3 días de incubación, para permitir la recuperación de los receptores de membrana, se reemplazó el medio antiguo con medio de cultivo nuevo, libre de suero (0,5 ml/pocillo), conteniendo los tratamientos correspondientes. Después de la incubación con los distintos tratamientos, el medio se recogió y se guardó a -20°C hasta los análisis de Lh y Fsh. Paralelamente, las células se homogeneizaron en 250 µl de TRIzol y se guardaron a -80°C hasta la extracción de RNA. Todos los tratamientos se realizaron por cuadruplicado y los experimentos se repitieron dos veces.

### 3. Metodología

---

Para los tratamientos se usaron dosis únicas de Kiss1-15 o Kiss2-12 ( $10^{-6}$ M) durante 2, 4, 6, 8 y 12h, y distintas dosis de Kiss1-15 o Kiss2-12 (de  $10^{-8}$ M a  $10^{-5}$ M) durante 4 y 8h. Adicionalmente, se analizó la interacción de ambos péptidos con un análogo de la GnRH (LHRHa) durante 4 y 8h de incubación. La dosis elegida de LHRHa ( $10^{-10}$ M) se seleccionó de acuerdo con un estudio previo en lubina (Forniés *et al.*, 2003). Para estudiar el efecto de los esteroides sexuales (E2 y T) sobre la acción de Kiss1-15 o Kiss2-12 en la liberación de gonadotropinas, el día antes del experimento, las células se preincubaron con medio que contenía E2 (50 nM) o T (50 nM). Después de esta preincubación, se sustituyó el medio antiguo por medio fresco que contenía E2 o T (50 nM) con o sin Kiss1-15 o Kiss2-12 ( $10^{-6}$ M) y se incubó durante 4 y 8h adicionales.

#### 3.8 Análisis histológico

Las gónadas se extrajeron y se fijaron por inmersión en formaldehído 4%: glutaraldehído 1% (McDowell y Trump, 1976), se embebieron en polímero de resina de metacrilato 2 - hidroxietil (Technovit 7100, Heraeus Kultzer, Alemania), se cortaron (3  $\mu$ m) y se tiñeron de acuerdo a Bennett *et al.* (1976). Los estados del desarrollo testicular se clasificaron por microscopía convencional, siguiendo criterios previamente establecidos (Begtashi *et al.*, 2004): Estado I (fase inmadura), Estado II (fase de proliferación), Estado III (fase meiótica), Estado IV (fase de diferenciación), Estado V (fase espermiogénica) y Estado VI (fase de post-puesta).

#### 3.9 Análisis del esperma

Para la extracción y estudio del esperma, los peces se anestesiaron en 2-fenoxietanol y una vez limpia el área genital con agua destilada y secada, se extrajo el esperma por masaje abdominal y se recolectó en un tubo cónico graduado, para medir el volumen total del esperma extraído. Se evitó cuidadosamente que las muestras recogidas para

### 3. Metodología

---

análisis estuvieran contaminadas con heces, orina y/o agua. Una vez extraído el esperma, se midió el volumen y las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis, que se realizó inmediatamente después a la extracción.

Previamente al análisis del esperma, las muestras se diluyeron 1:100 en un medio no activador (0,350 NaCl; 0,011 g KCl; 0,26265 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,05165 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,168 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,008 g glucosa, 1 g BSA; enrasar hasta 100 ml con agua bidestilada y ajustar el pH a 7,70) comúnmente usado para el esperma de lubina (Fauvel *et al.* 1998). El esperma diluido se activó con agua de mar (dilución final 1:1000) y se añadieron 2 µl de esta mezcla a un portaobjetos Neubauer. El esperma ya activado se observó en un microscopio Nikon Eclipse E400. La motilidad del esperma se grabó con una cámara de video Sony CCD-IRIS conectada a un analizador de movilidad computarizada (Integrated Semen Analysis System, PRO-ISER I + D). Los espermatozoides se clasificaron en cuatro categorías, en función de su velocidad: inmóviles, lentos (velocidad < 10 µm/s), moderados (velocidad = 10 - 45 µm/s) y rápidos (velocidad > 45 µm/s). Como indicadores de calidad del esperma se analizaron varios parámetros de velocidad: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad lineal (VAP); y varios parámetros de motilidad: índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido (BCF).

#### **3.10 Tratamiento de datos y análisis estadístico**

Todos los datos se presentan como la media ± el error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas de los distintos niveles hormonales y de expresión génica, entre los diferentes puntos de muestreo, se analizaron por un ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey de diferencias múltiples. En el caso de existir dos

### 3. Metodología

---

variables, por ejemplo tamaño y fecha de muestreo, o tratamiento fotoperiódico y fecha de muestreo, las diferencias significativas se analizaron por un ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey de diferencias múltiples. Antes del análisis, se comprobó si los datos presentaban una distribución normal y en aquellos casos que lo requerían se aplicó aquella transformación que permitía tanto la normalización como la uniformización de las varianzas. Cuando esto no fue posible se utilizó el test de estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis por rangos. Las diferencias entre los distintos estados de desarrollo gonadal se analizaron mediante el test exacto de Fisher para dos muestras independientes. Las diferencias encontradas se consideraron significativas cuando  $P < 0,05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo con la versión 3.5 del programa SigmaStat (Systat Software Inc., Richmond, CA).

## **4. RESULTADOS Y DESARROLLO**

### **ARGUMENTAL**



## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

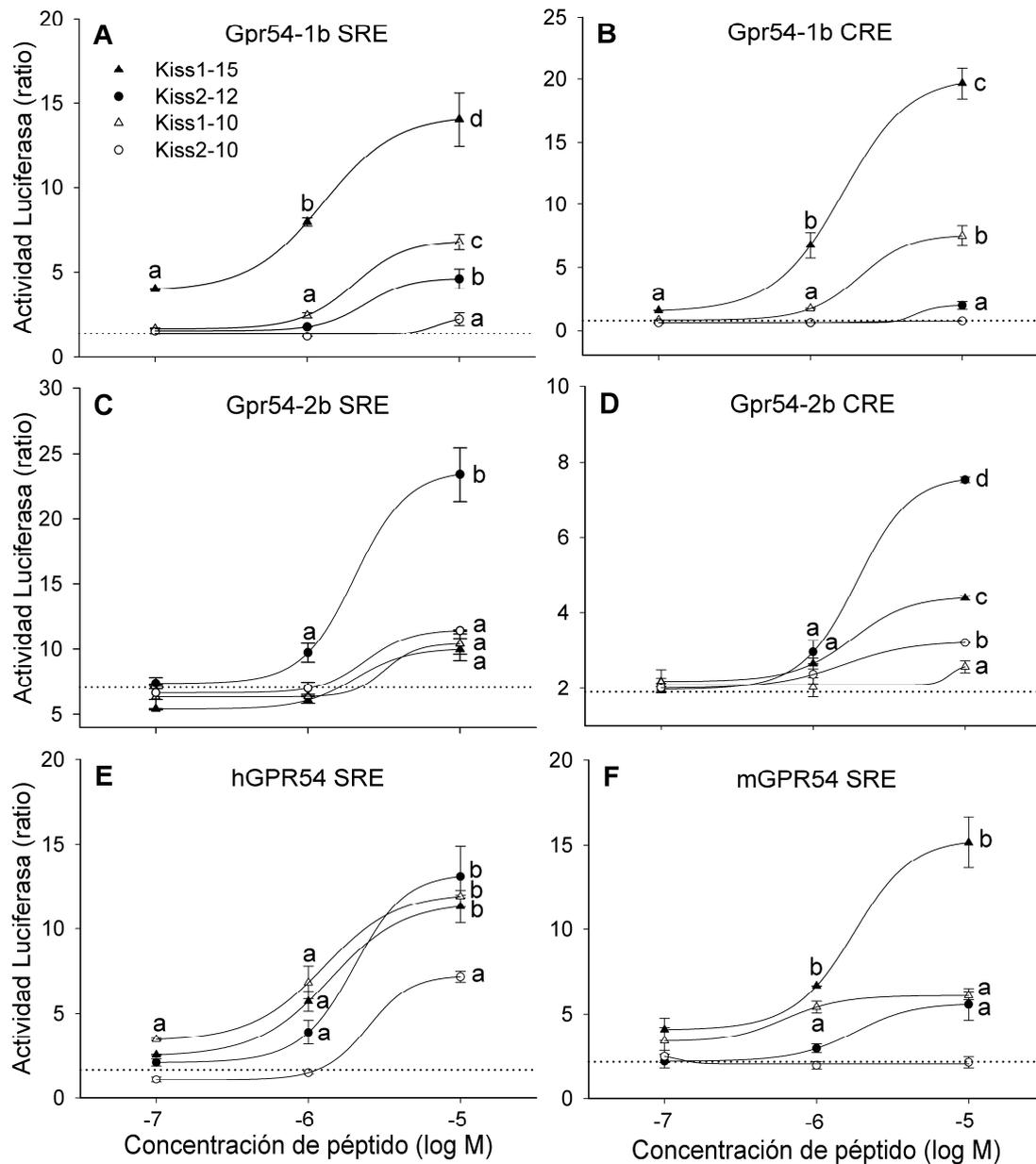
### Capítulo 4.1 Estudio de la especificidad ligando-receptor del sistema Kiss/Gpr54 en la lubina

Con el objetivo de definir las interacciones ligando-receptor del sistema kisspeptina en la lubina, se analizó la capacidad de los receptores para activar vías de señalización específicas, tras su estimulación con los distintos ligandos. Para ello se utilizó la transactivación del gen de la luciferasa de luciérnaga, bajo el control de dos promotores distintos, el SRE que indica la activación de la vía de señalización de la PKC y el CRE como indicador de la ruta de la PKA. En las células control transfectadas sólo con el vector pcDNA3 vacío y estimuladas con los péptidos Kiss1-10 o Kiss2-10, no se observó inducción de la actividad luciferasa por ninguna de las dos vías, PKC o PKA (datos no mostrados), lo que indica que las células CHO utilizadas para el ensayo no expresan receptores de kisspeptina endógenos.

El estudio farmacológico de los receptores de kisspeptina de lubina muestra que Gpr54-1b y Gpr54-2b, pueden actuar a través de las dos rutas, PKC y PKA, mostrando, a su vez, una respuesta diferencial en la selectividad de los ligandos ensayados. Así, el uso del sistema SRE puso de manifiesto que el péptido Kiss1-15 era el más potente en la activación del receptor Gpr54-1b al aumentar en 10,0 veces la actividad luciferasa respecto a los niveles basales del receptor sin activar, mientras que Kiss1-10 provocó un aumento de 4,8 veces. Por el contrario, Kiss2-10 y Kiss2-12 tan solo incrementaron la activación del receptor en 1,6 y 3,3 veces, respectivamente (**Fig. 4.1A**). Con el sistema CRE se observó de nuevo que el péptido Kiss1-15 era el más potente activando el receptor Gpr54-1b al generar un aumento de la actividad luciferasa de 24,7 veces respecto a los niveles basales, mientras que el aumento provocado por Kiss1-10 fue de 9,4 veces. Por otro lado, el péptido Kiss2-12 aumentó en 2,5 veces la actividad

## 4. Resultados y desarrollo argumental

luciferasa, en comparación con Kiss2-10 que no mostró ningún efecto en las células CHO transfectadas con el receptor Gpr54-1b (**Fig. 4.1B**).



**Figura 4.1** Selectividad de diferentes kisspeptinas por sus receptores en la lubina. Variaciones de actividad luciferasa controlada por elementos SRE (**A**, **C**) o CRE (**B**, **D**) en células CHO transfectadas con *gpr54-1b* (**A**, **B**) o *gpr54-2b* (**C**, **D**) y estimuladas con distintas dosis de Kiss1-15, Kiss1-10, Kiss2-12 o Kiss2-10. Variaciones de actividad luciferasa controlada por elementos SRE en células CHO transfectadas con el receptor GPR54 humano (*hGPR54*) (**E**) y de ratón GPR54 (*mGPR54*) (**F**) y estimuladas con Kiss1-15, Kiss1-10, Kiss2-12 o Kiss2-10. Los resultados se representan como los valores medios  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes, realizados cada uno por duplicado y se expresan como la relación de la actividad luciferasa de luciérnaga frente a la luciferasa de *Renilla*. La línea horizontal de puntos en cada gráfica corresponde al nivel basal de actividad luciferasa en ausencia de kisspeptinas. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto a los niveles basales para cada concentración de péptido.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

En el caso del receptor Gpr54-2b, se observó una interacción distinta con los ligandos a la observada con el receptor Gpr54-1b. Con el sistema SRE el péptido Kiss2-12 fue el más potente activando el receptor Gpr54-2b con un aumento de actividad luciferasa de 3,3 veces respecto a los niveles basales, mientras que Kiss1-15, Kiss2-10 y Kiss1-10 provocaron aumentos de tan solo 1,4, 1,6 y 1,46 veces, respectivamente (**Fig. 4.1C**). Por otro lado, el uso del sistema CRE también mostró que el péptido Kiss2-12 generaba la mayor activación del receptor Gpr54-2b con un aumento actividad luciferasa de 3,9 veces respecto a los niveles basales, mientras que Kiss1-15 indujo un aumento de 2,3 veces. En contraste, Kiss2-10 y Kiss1-10 exhibieron incrementos de tan sólo 1,7 y 1,3 veces, respectivamente (**Fig. 4.1D**).

Adicionalmente, se examinó si los decapeptidos de kisspeptinas de lubina o sus formas más largas, Kiss1-15 y Kiss2-12, activaban diferencialmente los receptores de kisspeptina humano y de ratón. Para ello se utilizó la transactivación del promotor reportero SRE que representa la activación de la vía de señalización más común para los receptores de kisspeptina en mamíferos. Se observó que los péptidos derivados de Kiss1 de lubina eran capaces de activar eficientemente el GPR54 humano, mostrando una potencia similar, mientras que Kiss2-12 activó al receptor de manera similar a la de los péptidos Kiss1. El péptido Kiss2-10 de lubina mostró una capacidad de activación baja (**Fig. 4.1E**). Cuando se analizó la activación del receptor de kisspeptina de ratón, el péptido Kiss1-15 fue el más potente de entre todos los péptidos examinados, mientras que Kiss1-10 y Kiss2-12 apenas activaron al receptor, y Kiss2-10 no mostró ningún efecto (**Fig. 4.1F**).

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

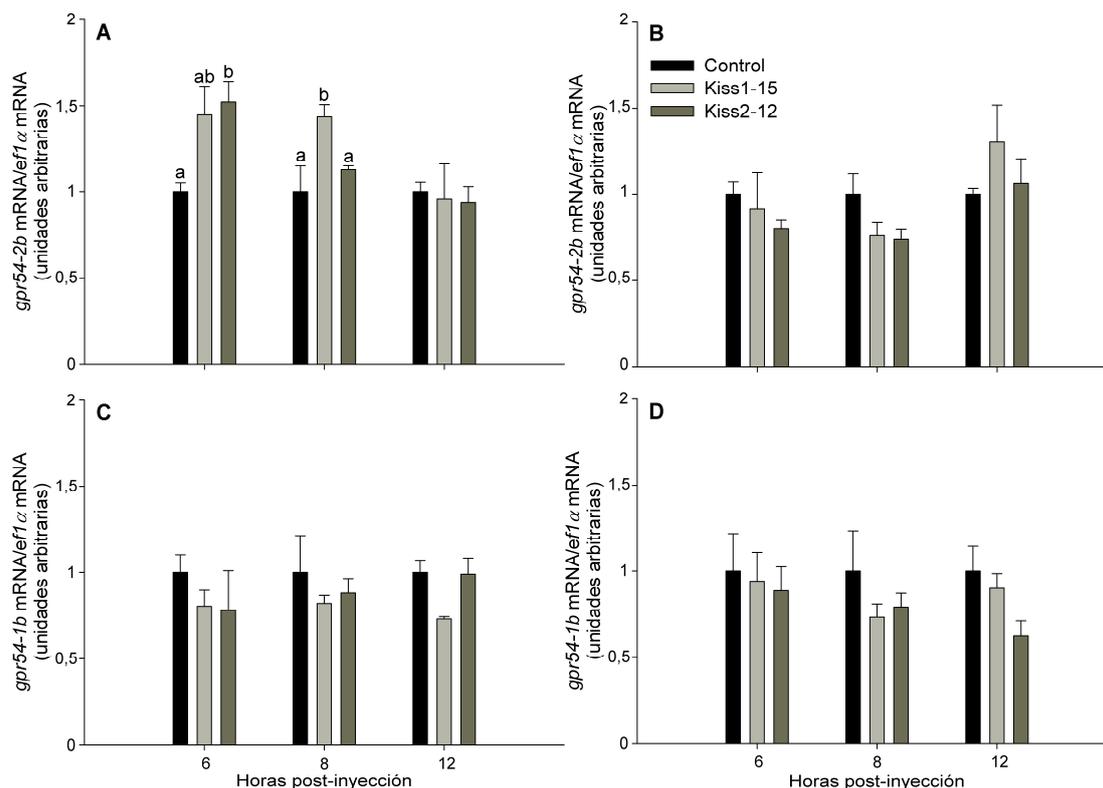
### Capítulo 4.2 Análisis del efecto de la administración central de kisspeptinas sobre el eje reproductivo de la lubina

#### 4.2.1 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre la expresión de genes cerebrales implicados en la función reproductiva

Para establecer el mecanismo endocrino implicado en la acción directa de Kiss1-15 y Kiss2-12 a nivel cerebral, se analizó la expresión de los dos receptores de kisspeptina (*gpr54-1b* y *gpr54-2b*) y de las tres formas de Gnrh (*gnrh1*, *gnrh2* y *gnrh3*) presentes en el cerebro de la lubina. De acuerdo con la distribución cerebral de los receptores de kisspeptina, previamente establecida en la lubina (Escobar *et al.*, 2013b), se determinaron los niveles de expresión de los receptores *gpr54-1b* y *gpr54-2b* en el FB-MB y en el hipotálamo. Así, la administración central de Kiss2-12 dio lugar a un aumento significativo de la expresión de *gpr54-2b* en el FB-MB 6h después de la inyección (**Fig. 4.2A**). Además, la acción de Kiss1-15 también aumentó significativamente la expresión de este receptor, en la misma área, 8h después de la inyección. Sin embargo, ninguno de estos péptidos tuvo un efecto significativo sobre la expresión de dicho gen en el hipotálamo (**Fig. 4.2B**). Por otro lado, después del tratamiento con Kiss1-15 y Kiss2-12, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del receptor *gpr54-1b* ni en el FB-MB (**Fig. 4.2C**) ni en el hipotálamo (**Fig. 4.2D**).

Con el fin de evaluar el efecto directo de ambos neuropéptidos sobre la expresión del sistema Gnrh en el cerebro, también se determinaron los niveles de mRNA de *gnrh1*, *gnrh2* y *gnrh3* en el FB-MB, donde se expresan estos 3 genes, y los de *gnrh1* en el hipotálamo.

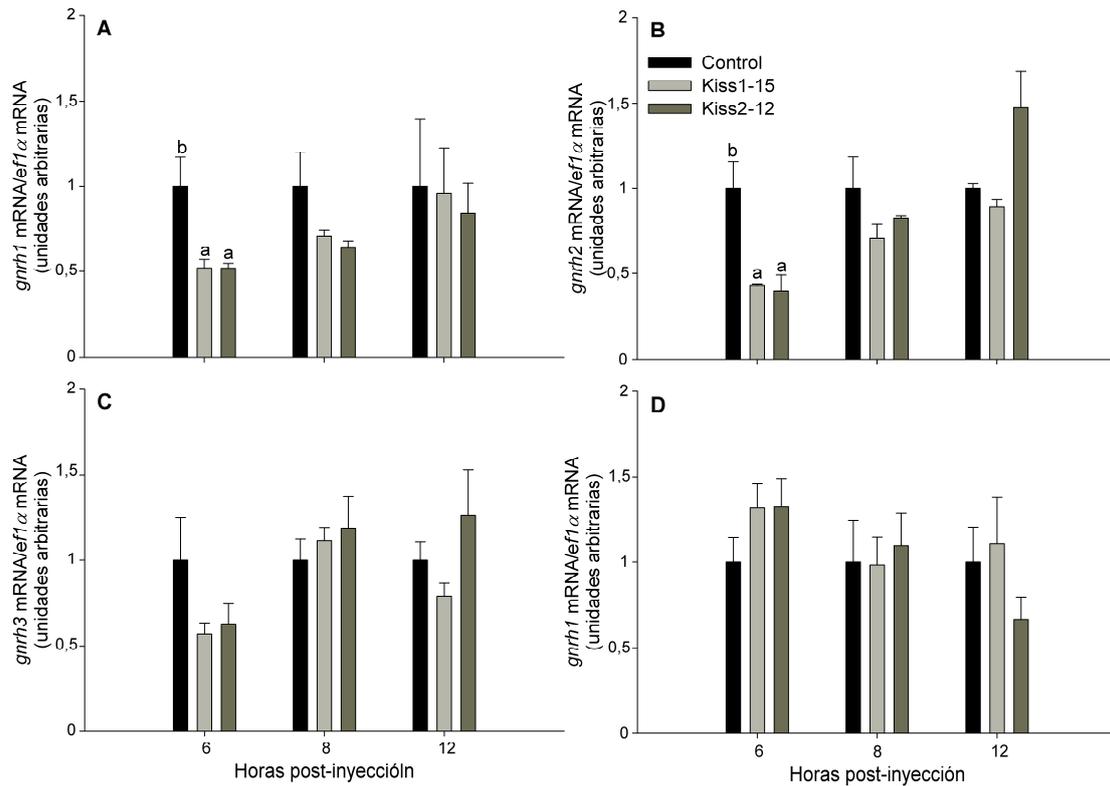
## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.2** Expresión génica relativa de *gpr54-2b* y *gpr54-1b* en el cerebro anterior y medio (FB-MB) (A, C) y en el hipotálamo (B, D) de los peces control (barras negras), peces tratados con Kiss1-15 (barras de color gris claro) y peces tratados con Kiss2-12 (barras grises oscuras) en el experimento a corto plazo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos en el mismo punto de muestreo.

En el FB-MB, los niveles de expresión de *gnrh1* y *gnrh2*, de los peces tratados con los neuropéptidos Kiss1-15 o Kiss2-12, fueron significativamente menores que los de los peces control, 6h después de la inyección (Figs. 4.3A y 4.3B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de *gnrh3* (Fig. 4.3C). Por último, el tratamiento con Kiss1-15 o Kiss2-12 no dio lugar a diferencias significativas en la expresión de *gnrh1* en el hipotálamo (Fig. 4.3D).

## 4. Resultados y desarrollo argumental

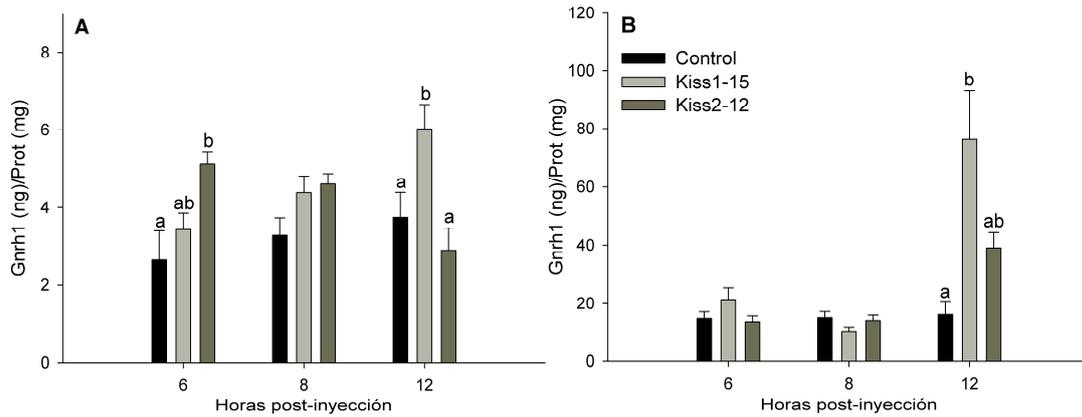


**Figura 4.3** Expresión génica relativa de *gnrh1*, *gnrh2* y *gnrh3* en el cerebro anterior y medio (FB-MB) (A, B, C) y de *gnrh1* en el hipotálamo (D) de los peces control (barras negras), peces tratados con Kiss1-15 (barras de color gris claro) y peces tratados con Kiss2-12 (barras grises oscuras) en el experimento a corto plazo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos en el mismo punto de muestreo.

### 4.2.2 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre el contenido de Gnrh1 en el hipotálamo y en la hipófisis

En los peces tratados con Kiss1-15 el contenido hipotalámico de Gnrh1 aumentó significativamente 12h después de la inyección, mientras que en los tratados con Kiss2-12, este aumento se observó a 6h post-inyección (Fig. 4.4A). Por otro lado, en los peces tratados con Kiss1-15 el contenido hipofisario de Gnrh1 aumentó significativamente 12h después de la inyección, pero el tratamiento con Kiss2-12 no tuvo efecto en ningún punto de muestreo (Fig. 4.4B).

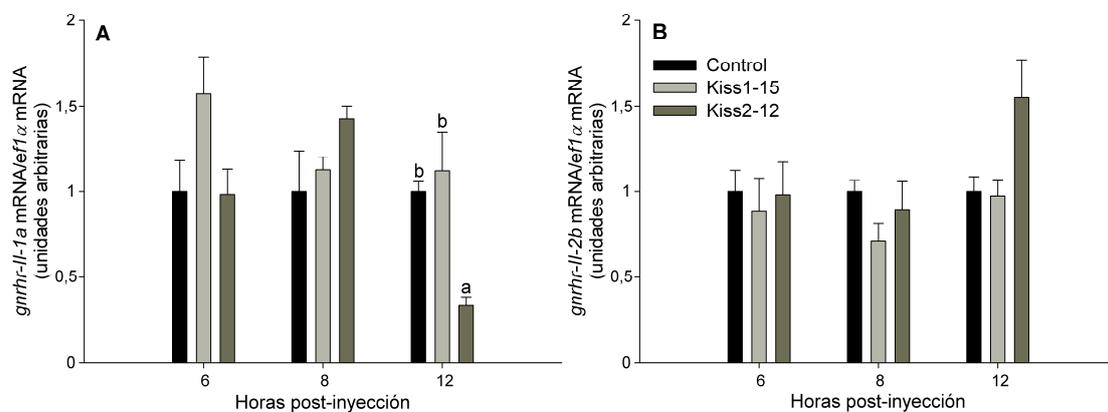
## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.4** Niveles del contenido de Gnrh1 en el hipotálamo (A) y en la hipófisis (B) de peces control (barras negras) y tratados con Kiss1-15 (barras de color gris claro) y Kiss2-12 (barras grises oscuras) en el experimento a corto plazo. Los valores se expresan como la media ± SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (P<0,05) entre tratamientos en el mismo punto de muestreo.

### 4.2.3 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los receptores de Gnrh en la hipófisis

La **Figura 4.5** muestra el efecto de la administración central de Kiss1-15 y Kiss2-12 sobre los niveles de expresión de los receptores de Gnrh, *gnrhr-II-1a* y *gnrhr-II-2b*, en la hipófisis. La inyección de Kiss2-12, pero no de Kiss1-15, dio lugar a una disminución significativa de los niveles de mRNA del receptor *gnrhr-II-1a* en la hipófisis 12h después del tratamiento (**Fig. 4.5A**).



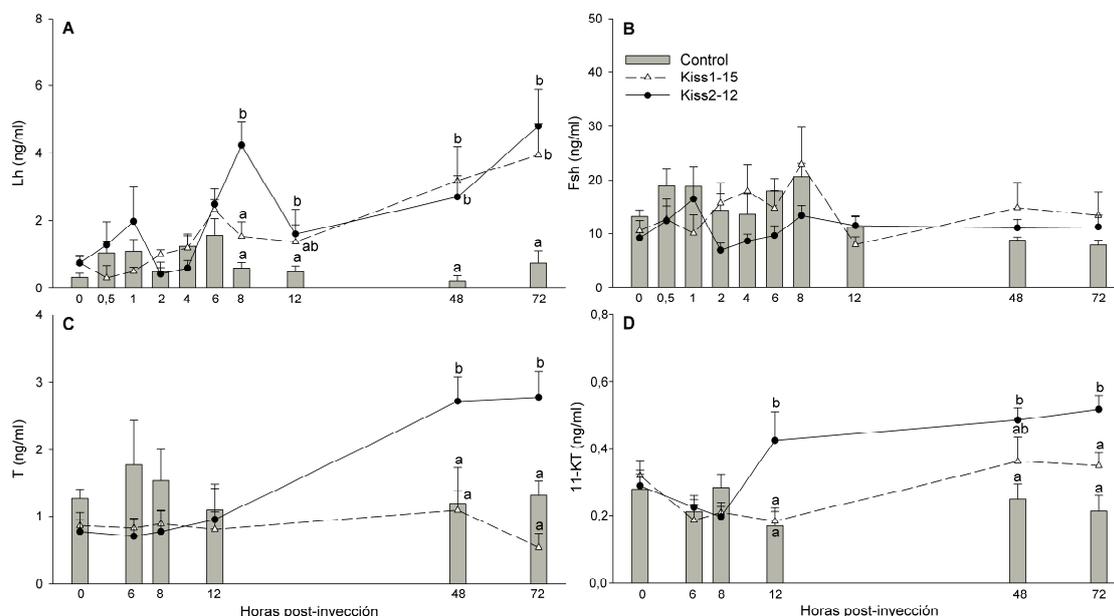
**Figura 4.5** Expresión génica relativa de *gnrhr-II-1a* (A) y *gnrhr-II-2b* (B) en la hipófisis de los peces control (barras negras) y los tratados con Kiss1-15 (barras de color gris claro) y Kiss2-12 (barras grises oscuras) en el experimento a corto plazo. Los valores se expresan como la media ± SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (P<0,05) entre tratamientos en el mismo punto de muestreo.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

El tratamiento con Kiss1-15 o Kiss2-12, no tuvo efecto sobre la expresión del receptor *gnrhr-II-2b* en la hipófisis en ningún punto de muestreo (**Fig. 4.5B**).

### 4.2.4 Efectos a corto plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los niveles plasmáticos de algunas hormonas implicadas en el proceso reproductivo

A lo largo del experimento los peces tratados con Kiss1-15 o con Kiss2-12, mostraron diferencias importantes en los niveles plasmáticos de Lh respecto al grupo control. En los tratados con Kiss1-15 se observó un aumento significativo de los niveles de esta hormona en plasma a las 48 y 72 horas después de la inyección (**Fig. 4.6A**).



**Figura 4.6** Niveles de Lh (**A**), Fsh (**B**), T (**C**) y 11-KT (**D**) en plasma de los peces control (barras grises), y los tratados con Kiss1-15 (triángulos blancos hacia arriba) y Kiss2-12 (círculos negros) en el experimento a corto plazo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos en el mismo punto de muestreo.

Los peces tratados con Kiss2-12 mostraron niveles, significativamente elevados, de Lh en plasma desde las 8h después del tratamiento hasta el final del experimento. Es decir, en los peces tratados con Kiss2-12 los niveles de Lh aumentaron antes y permanecieron altos durante más tiempo que en los tratados con Kiss1-15. El efecto de la

## 4. Resultados y desarrollo argumental

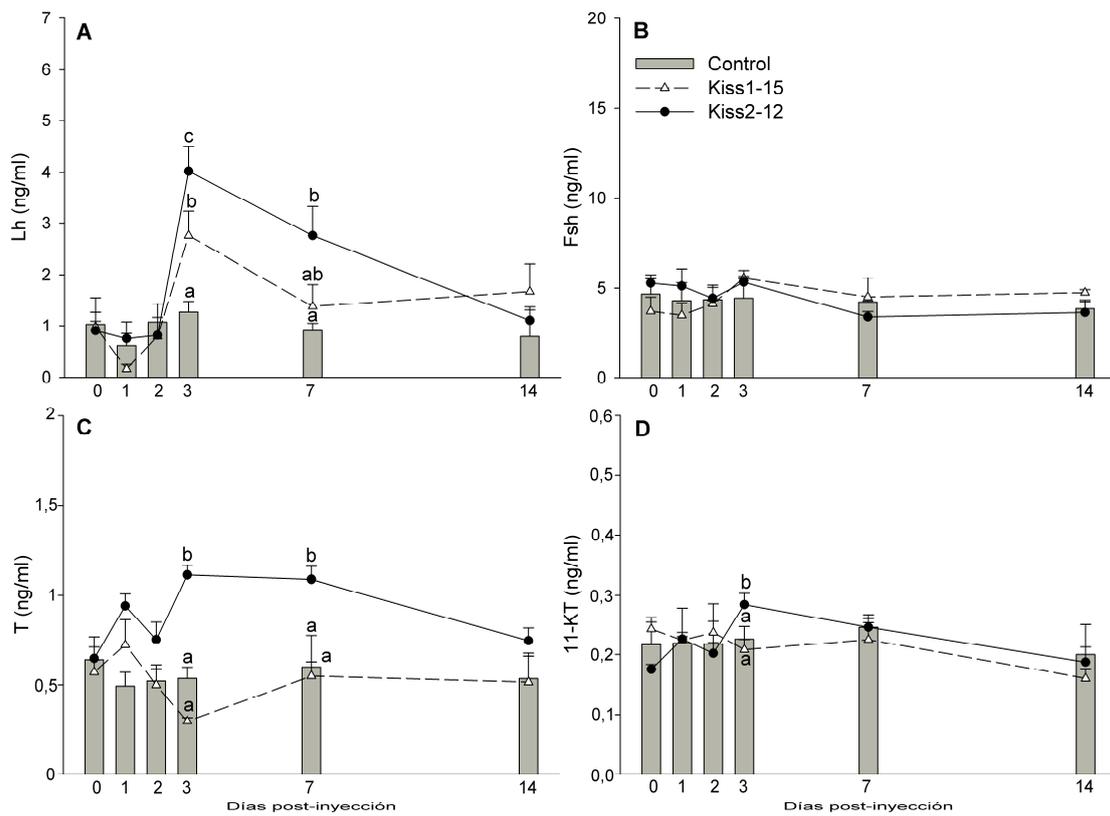
---

administración i.c.v. de estos péptidos, sobre la liberación de gonadotrofinas, sólo afectó a la Lh. No se observaron cambios en los niveles plasmáticos de Fsh a lo largo del experimento (**Fig. 4.6B**). Por otro lado, sólo los peces tratados con Kiss2-12 mostraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de andrógenos sexuales, concretamente de T (**Fig. 4.6C**) y 11-KT (**Fig. 4.6D**) que aumentaron a partir de 48 y 12 horas después de la inyección, respectivamente, permaneciendo elevados hasta el final del experimento.

### **4.2.5 Efectos a largo plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los niveles plasmáticos de algunas hormonas implicadas en el proceso reproductivo**

Tres días después de la inyección i.c.v., los peces tratados con Kiss1-15 mostraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de Lh, que regresaron a niveles basales 7 días después de la inyección, manteniéndose así hasta el final del experimento (**Fig. 4.7A**). Por otra parte, los tratamientos con Kiss2-12 indujeron un aumento significativo de los niveles de Lh en plasma entre 3 y 7 días después de la inyección, volviendo a sus niveles basales a los 14 días (**Fig. 4.7A**). De nuevo, Kiss2-12 estimuló una liberación de Lh mayor y más duradera en el tiempo que Kiss1-15. Los niveles plasmáticos de Fsh de los peces tratados, bien con Kiss1-15 o Kiss2-12, no mostraron ningún cambio a lo largo del experimento (**Fig. 4.7B**). Finalmente, al igual que se observó en el experimento a corto plazo, la administración central de Kiss1-15 no tuvo ningún efecto sobre la liberación de andrógenos sexuales. Sin embargo, en los peces tratados con Kiss2-12, se observó un aumento significativo de T en plasma entre 3 y 7 días después de la inyección (**Fig. 4.7C**). Por último, tan sólo los peces tratados con Kiss2-12 mostraron un ligero incremento significativo de 11-KT en plasma 3 días después de la inyección (**Fig. 4.7D**).

## 4. Resultados y desarrollo argumental



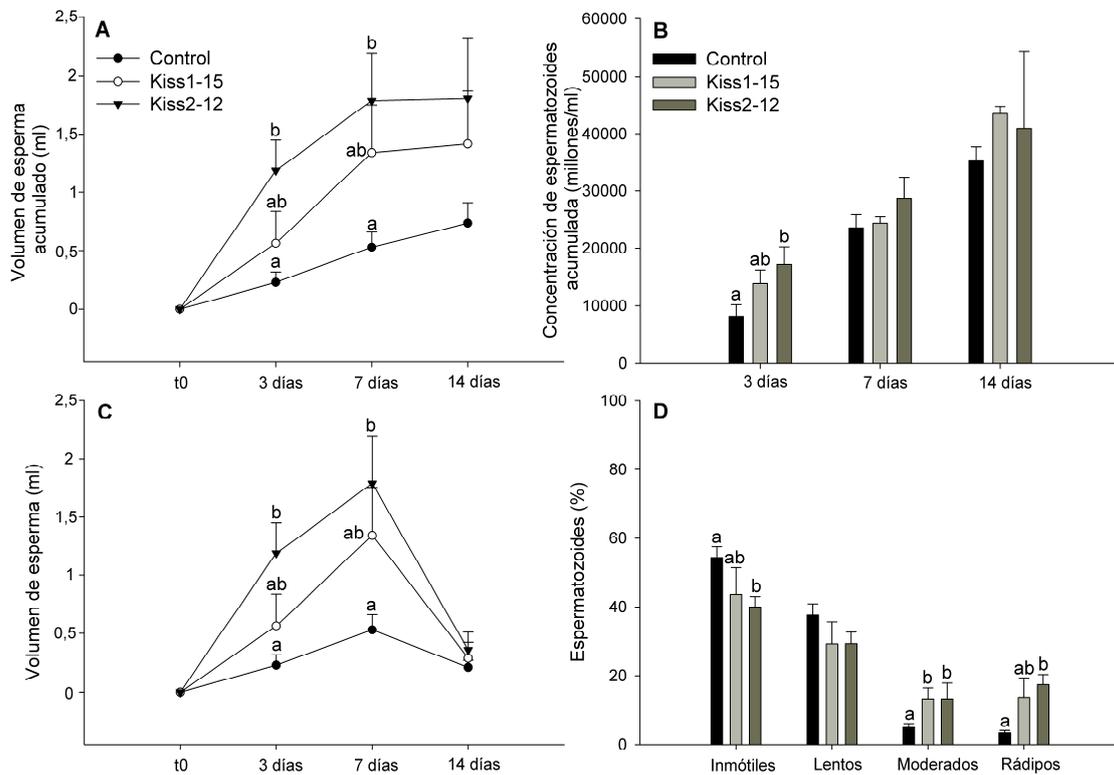
**Figura 4.7** Niveles de Lh (A), Fsh (B), T (C) y 11-KT (D) en el plasma de los peces control (barras grises) y los tratados con Kiss1-15 (triángulos blancos hacia arriba) y Kiss2-12 (círculos negros) en el experimento a largo plazo. Los valores se expresan como la media ± SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas (P<0,05) entre tratamientos en el mismo punto de muestreo.

### 4.2.6 Efectos a largo plazo de la administración central de kisspeptinas sobre los parámetros de calidad del esperma

El tratamiento con Kiss2-12 indujo un aumento significativo del volumen de esperma acumulado entre los 3 y 7 días después de la inyección (Fig. 4.8A) y además, 3 días después de la inyección, provocó un ligero aumento significativo de la densidad espermática, con respecto al grupo control (Fig. 4.8B). Posteriormente, entre los días 7 y 14 post-tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y Kiss2-12. Además, el tratamiento con Kiss2-12 provocó un aumento significativo, respecto a los controles, del volumen de esperma recogido a los 3 y 7 días después del tratamiento (Fig. 4.8C), que volvió a los niveles basales a los 14 días.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

Como se puede observar en la **Figura 4.8C**, 7 días después de la inyección los peces tratados con Kiss2-12 mostraron el mayor volumen de esperma recogido. Por ello, este punto de muestreo se seleccionó como el más apropiado para comparar, entre los distintos grupos, otros parámetros de calidad y velocidad del esperma.



**Figura 4.8** Volumen de esperma acumulado (**A**) y concentración de esperma acumulado (**B**) en cada punto de muestreo. Volumen de esperma recolectado (**C**) y clasificación del tipo de espermatozoides de acuerdo a la velocidad (**D**) 7 días después de la inyección de los peces control (círculo negro o barras negras) y los tratados con Kiss1-15 (círculo blanco o barras de color gris claro) y Kiss2-12 (triángulo negro abajo o barras grises oscuras) en el experimento a largo plazo. Los valores se expresan como la media ± SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos.

La **Fig. 4.8D** muestra el tipo de espermatozoides, de acuerdo a su velocidad (tipo de motilidad), encontrados en el día 7. No se observaron diferencias significativas entre los peces tratados con Kiss1-15 y los controles. Sin embargo, los peces tratados con Kiss2-12 mostraron un porcentaje de espermatozoides rápidos significativamente más alto (5,2 veces) que el grupo control, mientras que el porcentaje de espermatozoides inmóviles

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

fue significativamente más bajo (1,3 veces). El porcentaje de espermatozoides de velocidad moderada fue significativamente mayor en los peces tratados con Kiss1-15 y Kiss2-12 que en el grupo control.

Tras 7 días de tratamiento con Kiss2-12 la densidad del esperma disminuyó significativamente con respecto al grupo control, mientras que el volumen de esperma recogido fue significativamente más alto en los peces tratados con Kiss2-12 que en el grupo control (**Tabla 4.1, parte 1**). En este punto de muestreo, los espermatozoides rápidos de los peces tratados con Kiss2-12 mostraron valores más altos de VCL, VSL y VAP que el grupo control, con unos niveles promedio de  $184,5 \pm 9,5 \mu\text{m/s}$ ,  $95,3 \pm 11,1 \mu\text{m/s}$  y  $145,7 \pm 8,9 \mu\text{m/s}$ , respectivamente (**Tabla 4.1, parte 2**). El tratamiento con Kiss1-15 aumentó significativamente el valor de VSL ( $17,1 \pm 1,4 \mu\text{m/s}$ ) de los espermatozoides lentos. Además, los parámetros de motilidad LIN, STR y WOB mostraron un aumento significativo en los espermatozoides rápidos de los peces tratados con Kiss2-12, presentando valores medios de  $52,5 \pm 6,5$ ,  $61,6 \pm 5,9$  y  $81,6 \pm 3,8$ , respectivamente (**Tabla 4.1, parte 2**). Por último, la motilidad en ALH y BCF de los espermatozoides progresivos moderados fue significativamente mayor en los peces tratados con Kiss2-12 que en el grupo control (**Tabla 4.1, parte 3**). En los espermatozoides del grupo tratado con Kiss2-12 esta motilidad en ALH y BCF, en promedio, fue de 3,3 y 3,4 veces mayor, respectivamente.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

**Tabla 4.1** Comparación de los parámetros de calidad del esperma a los 7 días después de la inyección entre peces control y los tratados con Kiss1-15 y Kiss2-12 en el experimento a largo plazo. Volumen de esperma, concentración de espermatozoides y trayectorias circulares (**Parte 1**). Los parámetros de velocidad incluyen la velocidad curvilínea, velocidad rectilínea, velocidad lineal, índice de linealidad, índice de rectitud, índice de oscilación (**Parte 2**), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia de batido (**Parte 3**).

<b>Parte 1</b>	<b>Control</b>	<b>Kiss1-15</b>	<b>Kiss2-12</b>
<b>Volumen de esperma (ml)</b>	0,5±0,1 (a)	1,3±0,4 (ab)	1,7±0,4 (b)
<b>Concentración de esperma (millones/ml)</b>	15173,3±1216,4 (a)	11860,4±1988,7 (ab)	9938,9±641,3 (b)
<b>Trayectorias circulares (%)</b>	9,7±1,5 (a)	19,7±4,9 (ab)	20,4±3,8 (b)
<b>Parte 2</b>	<b>Control</b>	<b>Kiss1-15</b>	<b>Kiss2-12</b>
<b>Velocidad curvilínea (VCL) (µm/s)</b>			
Total	36,4±3,4 (a)	63,5±13,9 (ab)	81,2±8,7 (b)
Lentos	19,8±1,7	23,7±1,6	22,8±2,2
Moderados	68,3±3,3	71,6±2,4	66,4±2,9
Rápidos	122,6±15,4 (a)	139,3±15,4 (a)	184,5±9,5 (b)
<b>Velocidad rectilínea (VSL) (µm/s)</b>			
Total	18,5±2,1 (a)	24,3±2,2 (a)	44,3±6,2 (b)
Lentos	10,9±0,4 (a)	17,1±1,4 (b)	13,8±1,7 (ab)
Moderados	24,5±3,6	33,5±5,7	36,6±4,9
Rápidos	51,3±8,4 (a)	47,2±2,2 (a)	95,3±11,0 (b)
<b>Velocidad lineal (VAP) (µm/s)</b>			
Total	35,3±7,7 (a)	36,9±5,4 (a)	65,2±7,8 (b)
Lentos	16,0±1,4	20,5±1,4	17,0±1,8
Moderados	42,8±4,7	44,0±5,1	47,2±4,4
Rápidos	100,0±18,7 (a)	102,0±17,3 (a)	145,6±8,9 (b)
<b>Índice de linealidad (LIN)</b>			
Total	51,9±2,6	54,4±6,2	55,0±4,7
Lentos	57,3±3,5	67,9±5,1	64,7±4,4
Moderados	32,9±4,3	48,1±8,1	49,7±7,8
Rápidos	29,4±5,7 (a)	31,1±7,8 (ab)	52,5±6,5 (b)
<b>Índice de rectitud (STR)</b>			
Total	65,6±2,8	69,8±4,7	67,5±4,1
Lentos	76,1±3,4	81,0±3,2	80,8±2,6
Moderados	49,7±3,9	66,6±6,4	64,2±7,7
Rápidos	33,5±5,3 (a)	40,9±7,1 (ab)	61,6±5,9 (b)
<b>Índice de oscilación (WOB)</b>			
Total	78,3±1,7	75,2±4,7	79,6±2,9
Lentos	80,9±1,4	86,3±3,0	79,3±3,0
Moderados	63,7±6,3	62,9±7,0	69,3±6,2
Rápidos	59,9±8,8 (a)	53,8±9,5 (a)	81,6±3,8 (b)
<b>Parte 3</b>	<b>Control</b>	<b>Kiss1-15</b>	<b>Kiss2-12</b>
<b>Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (µm)</b>			
Total	0,93±0,32	1,48±0,33	1,51±0,25
Moderados Progresivos	0,40±0,22 (a)	1,16±0,25 (ab)	1,34±0,29 (b)
Rápidos Progresivos	0,73±0,31	0,65±0,33	1,20±0,31
<b>Frecuencia de batido (BCF) (Hz)</b>			
Total	2,43±0,98	4,49±1,03	5,13±0,79
Moderados Progresivos	1,29±0,72 (a)	3,50±0,78 (ab)	4,43±0,91 (b)
Rápidos Progresivos	1,28±0,73	1,88±1,11	4,02±1,01

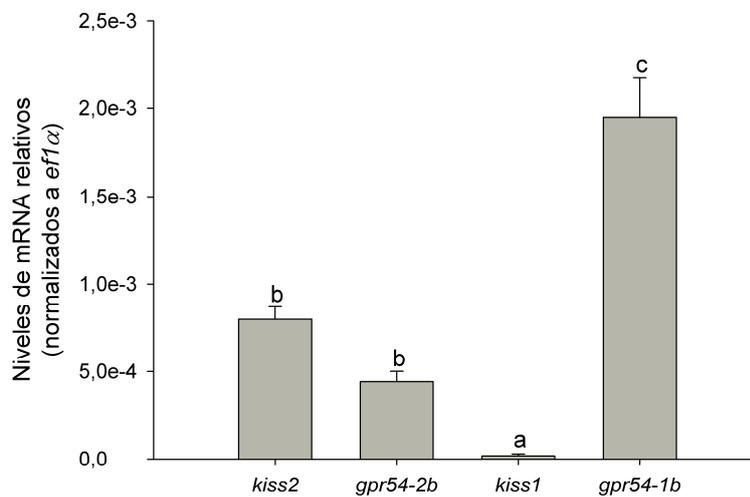
Los valores se expresan como la media ± SEM. Las letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas (P<0,05) entre tratamientos.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

### Capítulo 4.3 Estudio de la regulación directa de las kisspeptinas sobre las células gonadotropas en la lubina

#### 4.3.1 Niveles de expresión génica del sistema Kiss/Gpr54 en células dispersas de hipófisis de lubina

Para cuantificar los niveles de expresión hipofisaria de los genes que forman parte del sistema kisspeptina en lubina, se utilizó qPCR y se analizaron cultivos de células dispersas de hipófisis de machos de esta especie. El transcrito del gen *gpr54-1b* fue el más abundante entre los analizados (**Fig. 4.9**), mostrando niveles de expresión significativamente mayores que el resto de los genes del sistema. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de *kiss2* y *gpr54-2b*, aunque ambos genes presentaron niveles significativamente más elevados que los de *kiss1* que estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo.



**Figura 4.9** Niveles de expresión de *kiss2*, *gpr54-2b*, *kiss1* y *gpr54-1b* en células dispersas de hipófisis de machos de lubina. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los distintos niveles de expresión están representadas por letras minúsculas diferentes.

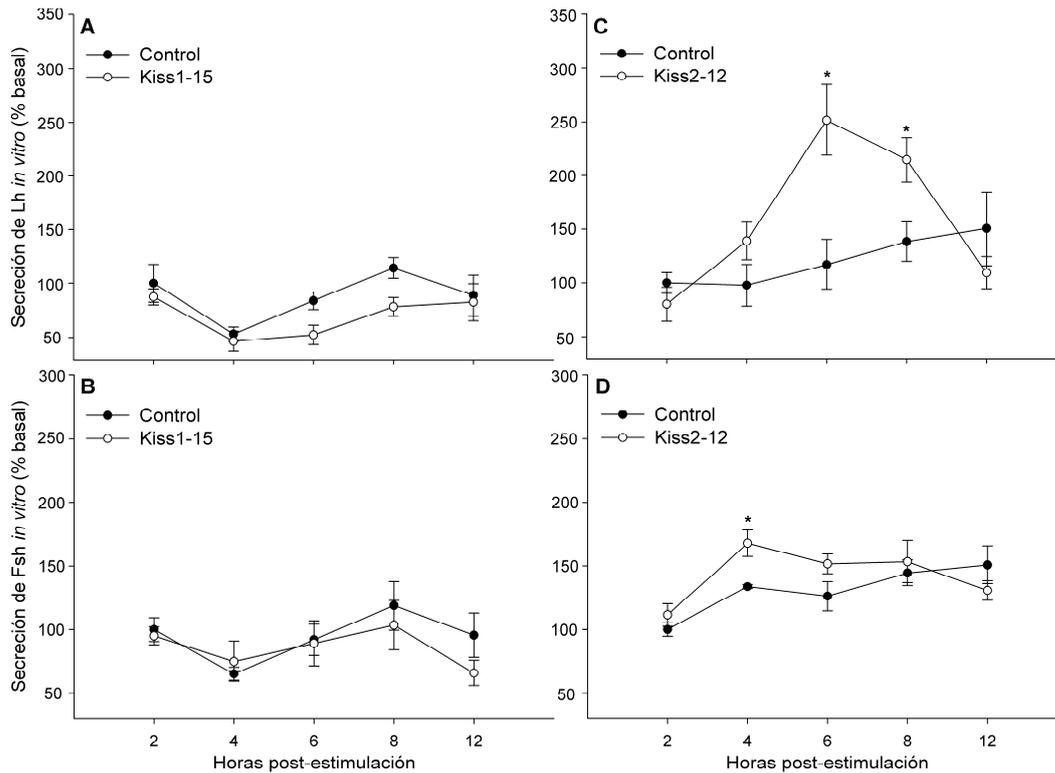
## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

### 4.3.2 Efecto directo de los péptidos Kiss1-15 y Kiss2-12 sobre la síntesis y secreción de las gonadotrofinas

Los cultivos de células hipofisarias se estimularon con los péptidos de kisspeptina Kiss1-15 y Kiss2-12 con el fin de determinar si alguno de ellos ejercía un efecto directo sobre la liberación de las gonadotrofinas. Inicialmente las células se trataron con una dosis fija ( $10^{-6}$ M) de Kiss1-15 o Kiss2-12 y su respuesta se analizó a lo largo del tiempo (2, 4, 6, 8 y 12 horas). Los resultados muestran que el tratamiento con Kiss1-15 no tuvo efecto sobre la liberación de Lh (**Fig. 4.10A**) o Fsh (**Fig. 4.10B**) en ninguno de los tiempos considerados. Sin embargo, el tratamiento con Kiss2-12 dio lugar a una respuesta diferencial en la secreción de ambas gonadotrofinas. De manera que, en presencia de Kiss2-12 se observó un efecto estimulador significativo de la secreción de Lh (2,39 veces la del control) tras 6 y 8 horas de incubación, volviendo a los niveles basales a las 12h (**Fig. 4.10C**). Al considerar el contenido de Lh en las células hipofisarias, justo antes del tratamiento con los péptidos, como el valor máximo (100%) que éstas pueden secretar potencialmente (datos no presentados), se observó que a las 8h post-estimulación el porcentaje de Lh liberada al medio por el control fue de 8,49%, mientras que en el grupo tratado con Kiss2-12 era de 22,99%. Por otro lado, la misma concentración de este péptido ( $10^{-6}$ M) indujo una liberación leve, pero significativa, de Fsh tras 4h de estimulación, para regresar a los niveles basales a las 6h (**Fig. 4.10D**). En este caso, el porcentaje de Fsh secretada al medio, por parte del grupo control 8h después de la estimulación (datos no presentados), fue de 1,60%, mientras que en el grupo tratado con Kiss2-12 fue de 2,22%.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

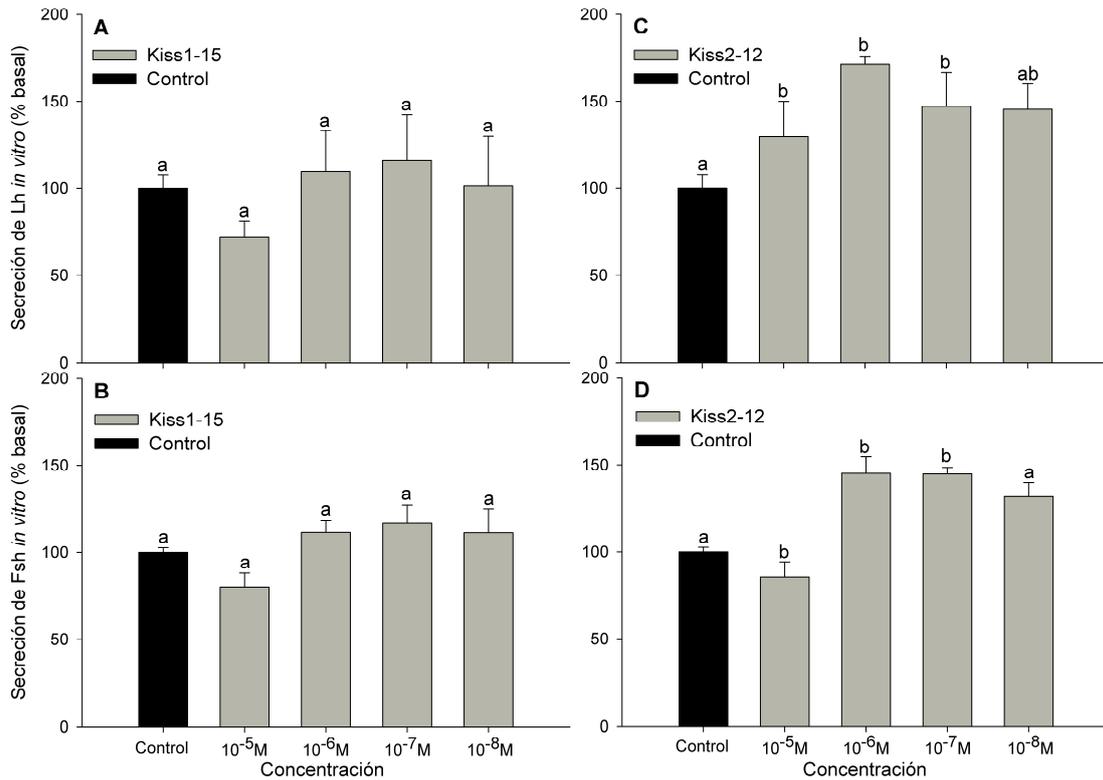


**Figura 4.10** Secreción temporal de Lh *in vitro* después del tratamiento con Kiss1-15 ( $10^{-6}$ M) (A) o Kiss2-12 ( $10^{-6}$ M) (C). Secreción temporal de Fsh *in vitro* después del tratamiento con Kiss1-15 ( $10^{-6}$ M) (B) o Kiss2-12 ( $10^{-6}$ M) (D). Los resultados se expresan como el porcentaje del incremento sobre la secreción basal del grupo control a las 2h (ajustado al 100%). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos están representadas por un asterisco en el punto de muestreo considerado.

Para analizar si los péptidos Kiss tenían un efecto sobre la expresión génica de las subunidades *lh $\beta$*  y *fsh $\beta$* , en este experimento de respuesta temporal, también se midieron los niveles de expresión de dichos genes. Bajo estas condiciones experimentales, no se observó ningún aumento significativo de los niveles de expresión de *lh $\beta$*  y *fsh $\beta$*  (datos no presentados).

Por otro lado, se estudió el efecto de distintas dosis (desde  $10^{-5}$ M de  $10^{-8}$ M) de Kiss1-15 y Kiss2-12 sobre la secreción de Fsh y Lh, tras 4 y 8 horas de incubación, respectivamente. Kiss1-15 no tuvo efecto significativo sobre la liberación de Lh o Fsh a ninguna de las concentraciones consideradas (Figs. 4.11A y 4.11B).

## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.11** Secreción de Lh *in vitro* tras 8h de incubación con distintas dosis de Kiss1-15 (A) o Kiss2-12 (C). Liberación de Fsh *in vitro* tras 4h de incubación con distintas dosis de Kiss1-15 (B) o Kiss2-12 (D). Los resultados se expresan como el porcentaje del incremento sobre la secreción basal del grupo control (ajustado al 100%). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos están representadas por letras minúsculas diferentes.

La estimulación con Kiss2-12 a concentraciones de 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-6</sup>M y 10<sup>-7</sup>M aumentó significativamente los niveles de Lh secretada a las 8h de tratamiento (Fig. 4.11C). La presencia de Kiss2-12 a una concentración de 10<sup>-8</sup>M no tuvo efecto sobre la liberación de Lh. Por otra parte, la incubación con Kiss2-12 a concentraciones de 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-6</sup>M y 10<sup>-7</sup>M incrementó significativamente la secreción de Fsh tras 4h (Fig. 4.11D). La presencia de Kiss2-12 a una concentración de 10<sup>-8</sup>M no tuvo efecto sobre la liberación de Fsh.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

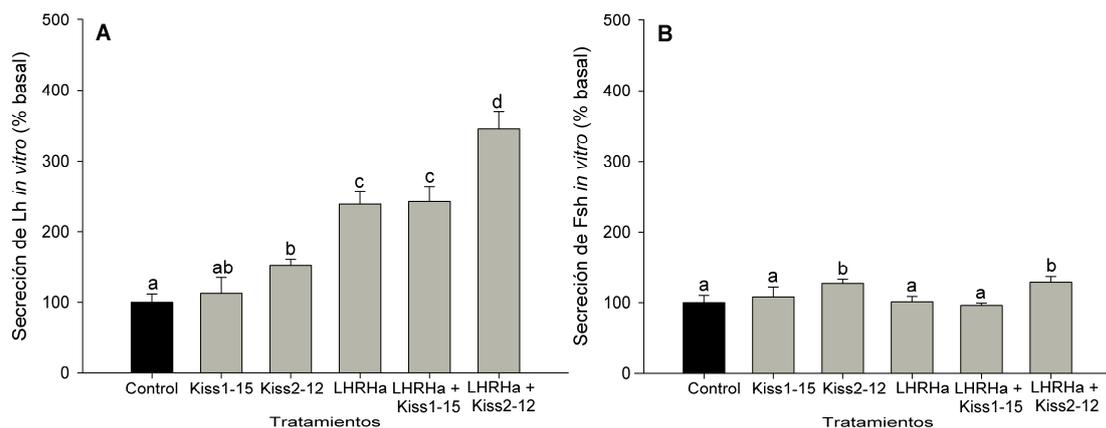
---

### 4.3.3 Efecto de la estimulación combinada de Kiss1-15 o Kiss2-12 con el análogo LHRHa sobre la liberación de las gonadotrofinas.

Para determinar las interacciones potenciales entre los sistemas kisspeptina y GnRH sobre la liberación de gonadotrofinas a nivel hipofisiario, se estudió el efecto del tratamiento con Kiss1-15 o Kiss2-12, solos ( $10^{-6}$ M) o en combinación con una dosis efectiva de LHRHa ( $10^{-10}$ M) ensayada previamente (Forniés *et al.*, 2003). El efecto sobre la liberación de Lh se analizó a las 8h de incubación (**Fig. 4.12A**), y de acuerdo a lo ya descrito anteriormente, se observó que la presencia de Kiss2-12 estimulaba de manera significativa la liberación de Lh, pero el tratamiento con Kiss1-15 no tuvo efecto alguno. Por otra parte, la acción del análogo LHRHa aumentó significativamente la liberación de Lh (2,39 veces la del control) con un efecto estimulador más potente que el del Kiss2-12 (1,52 veces la del control). Es interesante señalar que la administración combinada de Kiss2-12 y LHRHa tuvo un efecto estimulador aditivo sobre la liberación de Lh (3,45 veces la del control), significativamente superior al provocado por la administración de Kiss2-12 o LHRHa por separado. La administración de Kiss1-15 en combinación con LHRHa no generó dicho efecto aditivo sobre la liberación de Lh (**Fig. 4.12A**).

El efecto sobre la liberación de Fsh se analizó tras 4h de incubación (**Fig. 4.12B**). En este caso, el tratamiento con LHRHa no tuvo efecto significativo sobre la secreción de Fsh y la administración combinada con Kiss1-15 o Kiss2-12 tampoco dio lugar a un efecto aditivo sobre la secreción de dicha gonadotrofina. Sólo la administración de Kiss2-12 provocó un leve pero significativo aumento de la secreción de Fsh (1,27 veces sobre el control).

## 4. Resultados y desarrollo argumental



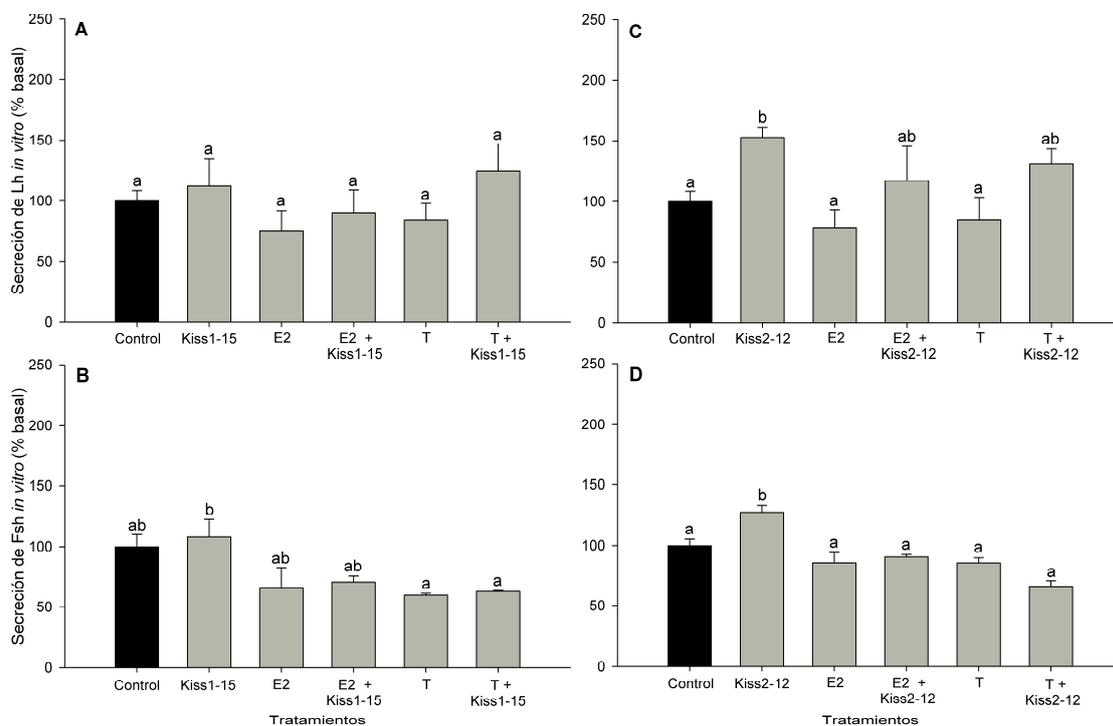
**Figura 4.12** Efectos de Kiss1-15, Kiss2-12 y LHRHa, solos o en combinación, sobre la secreción de Lh tras 8h de tratamiento (A) y sobre la secreción de Fsh 4h después de la estimulación (B). Los resultados se expresan como el porcentaje del incremento sobre la secreción basal del grupo control (ajustado al 100%). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos están representadas por letras minúsculas diferentes.

### 4.3.4 Efectos de los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotrofinas en respuesta al tratamiento con Kiss1-15 o Kiss2-12

Se sabe que los esteroides gonadales regulan la síntesis y secreción de Lh y Fsh, de tal forma que existen mecanismos de retroalimentación positiva o negativa que actúan directamente a nivel hipofisario (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Por ello, se estudió el efecto del tratamiento con Kiss1-15 o Kiss2-12 ( $10^{-6}$ M) sobre la liberación de gonadotrofinas en células hipofisarias dispersas pre-tratadas o no con esteroides sexuales. En primer lugar se evaluó la influencia de los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotrofinas. La preincubación (16-20 horas) con esteroides sexuales, E2 o T, a 50 nM no alteró la secreción espontánea de las gonadotrofinas, por parte de las células dispersas de hipófisis (**Fig. 4.13**). Del mismo modo, el tratamiento con Kiss1-15 no tuvo efecto significativo sobre la liberación de Lh (**Fig. 4.13A**) o Fsh (**Fig. 4.13B**) en células tratadas con esteroides sexuales. Sin embargo, la preincubación con

## 4. Resultados y desarrollo argumental

esteroides, seguida del tratamiento con Kiss2-12 redujo, aunque no de forma significativa, el efecto estimulador del Kiss2-12 sobre la secreción de Lh (**Fig. 4.13C**).



**Figura 4.13** Efectos de Kiss1-15 (A) o Kiss2-12 (B), en presencia o ausencia de E2 o T, sobre la secreción de Lh tras 8h de incubación. Efectos de Kiss1-15 (C) o Kiss2-12 (D), en presencia o ausencia de E2 o T, sobre la secreción de Fsh 4h después de la estimulación. Los resultados se expresan como el porcentaje del incremento sobre la secreción basal del grupo control (ajustado al 100%). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos están representadas por letras minúsculas diferentes.

Por otro lado, el tratamiento con Kiss2-12 incrementó el nivel de Fsh secretada respecto al del grupo control y al de los generados por el tratamiento con Kiss2-12 en presencia de los esteroides sexuales (**Fig. 4.13D**). De esta forma, en presencia de ambos esteroides sexuales, el leve efecto estimulador del Kiss2-12 sobre la secreción de Fsh se inhibió completamente.

### 4.3.5 Caracterización de las células Kiss2 en la hipófisis

Puesto que Kiss2-12 fue la única kisspeptina que tuvo efecto sobre la secreción de gonadotropinas, sólo se estudió la naturaleza de las células hipofisarias que expresan

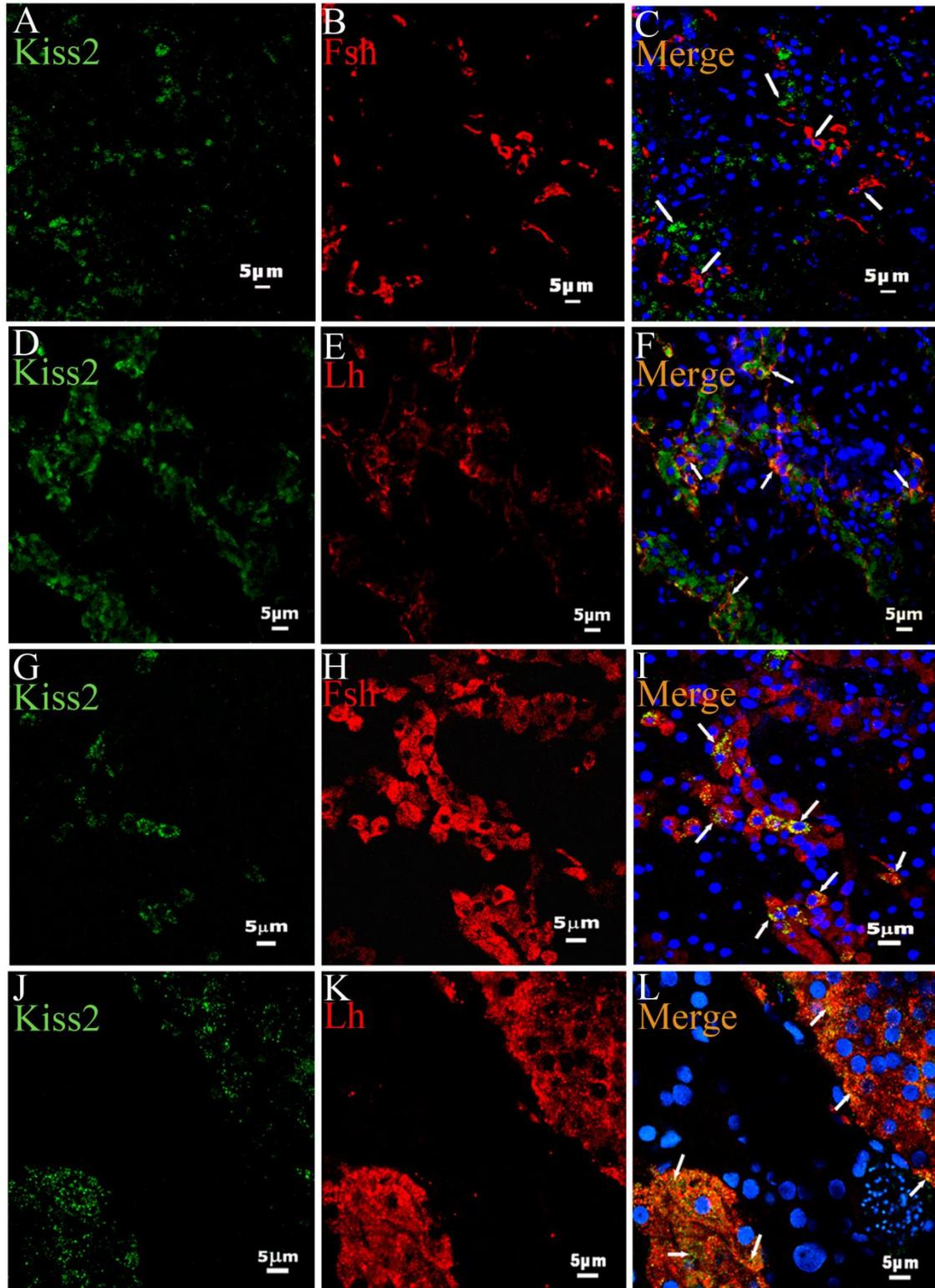
## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Kiss2. Para ello se llevo a cabo un estudio inmunohistoquímico (IHC) de la hipófisis de machos de lubina utilizando un anticuerpo anti-Kiss2. Este reveló la presencia de un número muy elevado de células Kiss2 en la *pars distalis proximal* (PPD). Para identificar la naturaleza de estas células Kiss2 en relación a los gonadotropos, se realizó una IHC doble utilizando el anticuerpo anti-Kiss2 en combinación con anticuerpos homólogos validados contra Lh $\beta$  y Fsh $\beta$  de lubina. En la PPD de la hipófisis de machos, en reposo gonadal (inmaduros, Agosto), se observaron células inmunoreactivas a la Fsh $\beta$  (Fsh $\beta$ -ir), pero nunca en co-localización con Kiss2 (**Figs. 4.14A, B y C**). Sin embargo, en este mismo estado de desarrollo testicular se observó que Kiss2 se expresa, principalmente, en las células Lh $\beta$ -inmunoreactivas (Lh $\beta$ -ir). Además, algunas células Kiss2-inmunoreactivas (Kiss2-ir) no son reactivas al anti-Lh $\beta$ , mientras que la mayoría de las células Lh $\beta$ -ir son células Kiss2-ir (**Figs. 4.14D, E y F**). En la PPD de la hipófisis de machos maduros (estado de espermiación plena, Febrero) algunas células mostraron co-localización de Fsh $\beta$  y Kiss2, aunque también se observaron muchas células Fsh $\beta$ -ir que no fueron inmunoreactivas a Kiss2 (**Figs. 4.14G, H y I**). Las células Lh-ir fueron muy abundantes y co-expresaban el neuropéptido Kiss2 (**Figs. 4.14J, K y L**).

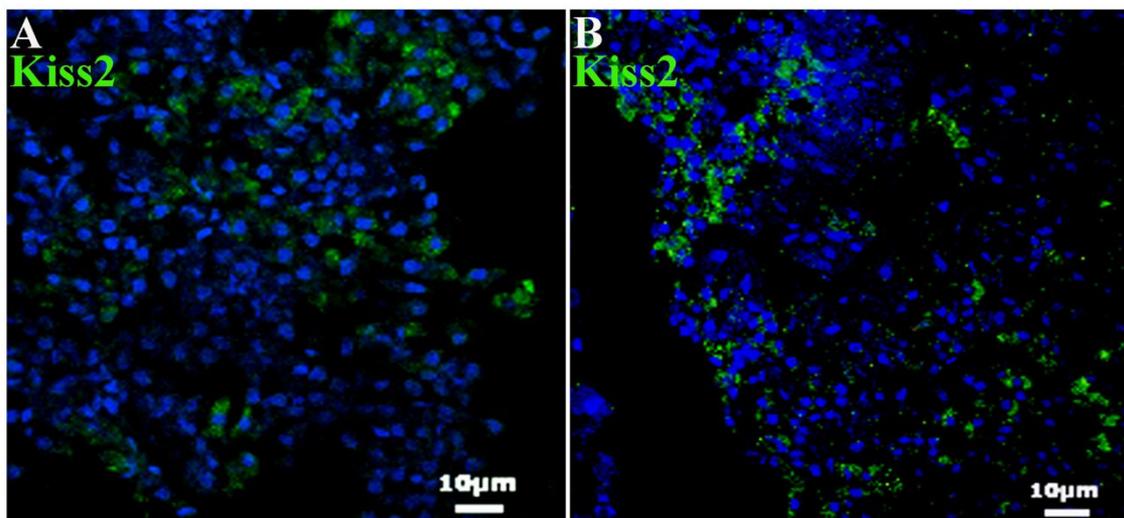
Los controles negativos de la IHC doble, se corresponden con secciones paralelas donde se omitió el segundo anticuerpo primario (anti-Lh $\beta$  o anti-Fsh $\beta$ ) en la incubación. En estas secciones los resultados fueron siempre negativos, es decir, no se observó la señal correspondiente a las gonadotropinas (**Figs. 4.15A y B**). Esto demuestra que los complejos primer anticuerpo primario - primer anticuerpo secundario y segundo anticuerpo primario - segundo anticuerpo secundario detectan selectivamente su antígeno específico, y por tanto, no hay reacción cruzada entre el segundo anticuerpo secundario y el complejo primer anticuerpo primario - primer anticuerpo secundario.

## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.14** Doble IHC con anti-Kiss2 y anti-Lh $\beta$  o -Fsh $\beta$  en hipófisis de machos de lubina. En machos inmaduros Kiss2 (verde) no se superpone con las células Fsh $\beta$ -ir (rojo) (A, B, C); en animales inmaduros Kiss2 (verde) se localiza en las células Lh $\beta$ -ir (rojo) (D, E, F); en machos en plena espermiación sólo algunas células Fsh-ir (rojo) se tiñeron levemente con el anticuerpo Kiss2 (G, H, I); en animales en plena espermiación Kiss2 (verde) se superpone casi perfectamente con las células Lh $\beta$ -ir (rojo) (J, K, L). Las flechas blancas señalan células Fsh $\beta$ , Lh $\beta$  y Kiss2 inmunopositivas.

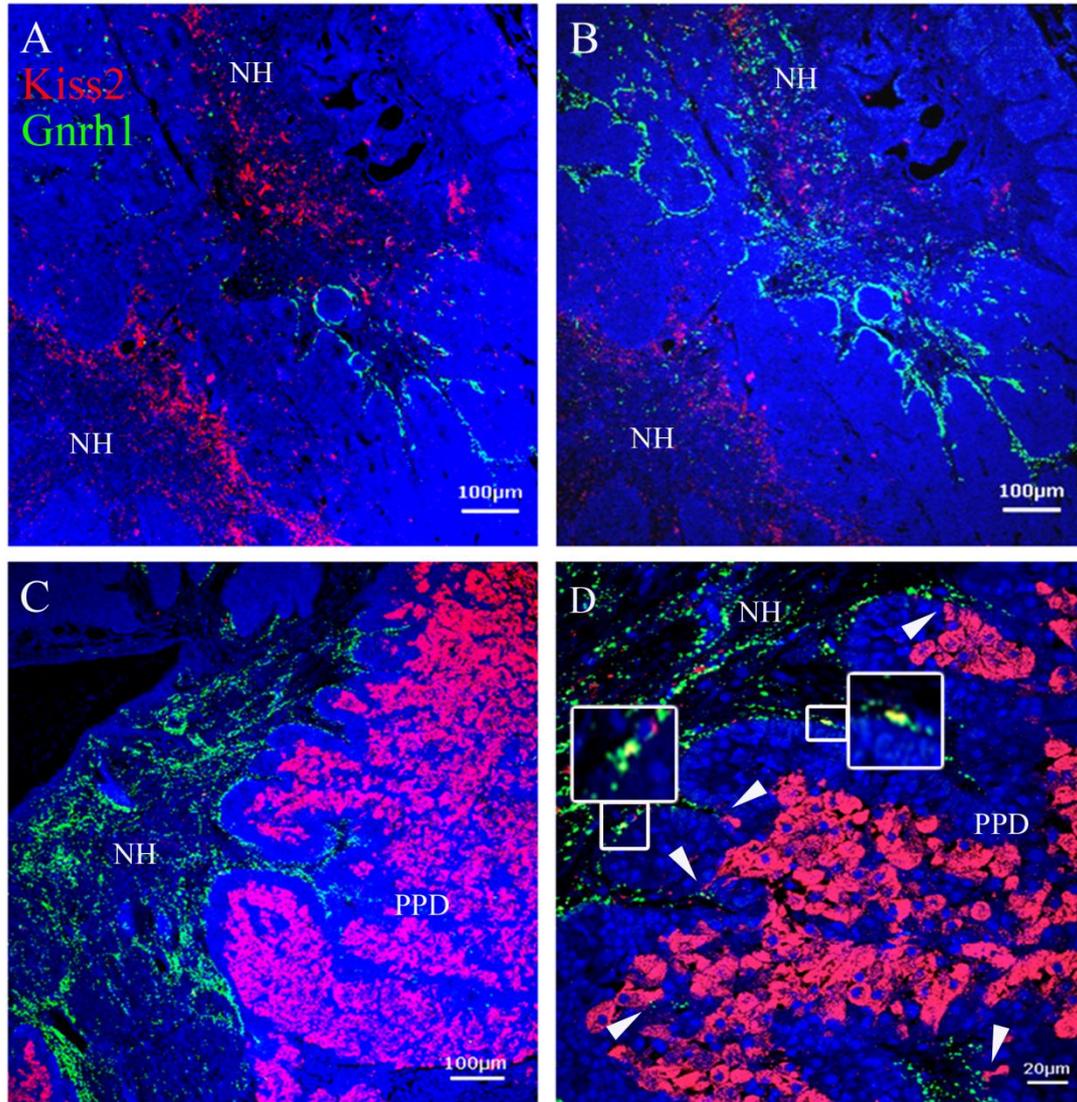
## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.15** Los controles negativos demuestran que no hubo reacción cruzada entre el segundo anticuerpo secundario y el complejo primer anticuerpo primario (anti-Kiss2) - primer anticuerpo secundario en la ausencia de anti-Lhb (A) o -Fshb (B).

También se estudiaron las fibras Kiss2-ir y Gnrh1GAP-inmunoreactivas (Gnrh1GAP-ir) que inervan fuertemente la hipófisis de la lubina. Se observó que las proyecciones axonales de Kiss2 penetran en la neurohipófisis (NH) (**Fig. 4.16A**). Sin embargo, en general, se localizan en áreas de la NH diferentes a las de distribución de las fibras Gnrh1GAP-ir (**Fig. 4.16B**), aunque también se las ha visto coincidiendo en las mismas zonas de la NH. Por otro lado, se puede observar la clara propagación de los axones terminales Gnrh1, en la PPD de la adenohipófisis (**Fig. 4.16C**), inervando directamente las células Kiss2 localizadas en dicha área (**Fig. 4.16D**). Además algunas de las proyecciones de Kiss2 acompañan a las proyecciones de la Gnrh1 en la PPD (inserción **Fig. 4.16D**).

## 4. Resultados y desarrollo argumental



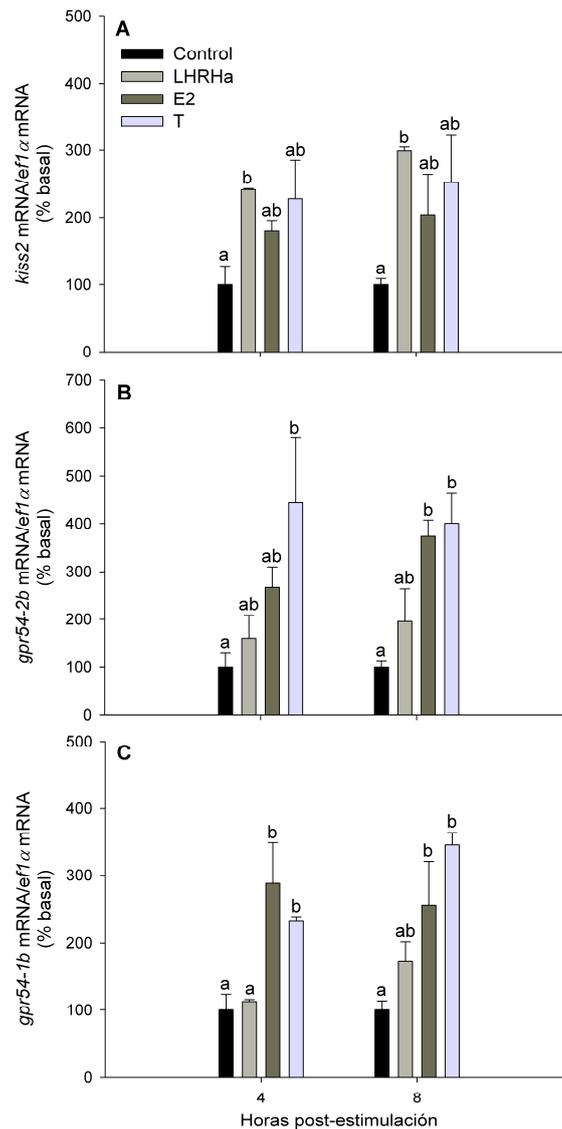
**Figura 4.16** Doble IHC de anti-Kiss2 y anti-Gnrh1GAP en la hipófisis de machos de lubina. Las proyecciones axonales de Kiss2 (rojo) penetran en la neurohipófisis (NH) (A). Generalmente dichas proyecciones están ubicadas en zonas diferentes de la NH en comparación con la distribución de las fibras Gnrh1GAP-ir (verde) (B), aunque a veces acompañan a estas últimas en las cercanías de la PPD (D, inserciones). Los axones terminales Kiss2 están claramente repartidos en la PPD de la adenohipófisis (C) intervando las células Kiss2 (ver las puntas de flecha) presentes en este área (D).

### 4.3.6 Efectos del LHRHa y de los esteroides sexuales sobre los niveles de expresión de los genes *kiss2*, *gpr54-1b* y *gpr54-2b*

En las células hipofisarias dispersas de lubina incubadas con LHRHa, E2 o T se determinaron, mediante qPCR, los niveles de expresión génica del sistema kisspeptina,

## 4. Resultados y desarrollo argumental

para analizar si el medio hormonal afectaba a la expresión génica de este sistema. Los resultados muestran que el LHRHa estimuló, de manera significativa, los niveles de expresión de *kiss2*, a las 4 y 8 horas de incubación (**Fig. 4.17A**) con un incremento del 24,2 y 29,9 %, respectivamente, en comparación con los controles. No se observó efecto de los esteroides sexuales sobre los niveles de los transcritos de *kiss2*.



**Figura 4.17** Efecto de LHRHa, E2 o T sobre los niveles de expresión de *kiss2* (A), *gpr54-1b* (B) y *gpr54-2b* (C) tras 4 y 8 horas de estimulación. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento sobre la expresión basal del grupo control (ajustado a 100%). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos están representadas por letras minúsculas diferentes.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Por otro lado, tras la estimulación con E2 y T, se observó un aumento significativo de los niveles de expresión de los receptores *gpr54-1b* y *gpr54-2b*. En el caso del receptor *gpr54-2b*, la presencia del E2 estimuló su expresión sólo después de 8h de incubación (**Fig. 4.17B**), mientras que la T indujo un aumento significativo después de 4 y 8 horas de incubación. Por último, se detectó un importante efecto estimulador del E2 y la T sobre los niveles de expresión del receptor *gpr54-1b* tras 4 y 8 horas de incubación (**Fig. 4.17C**).

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

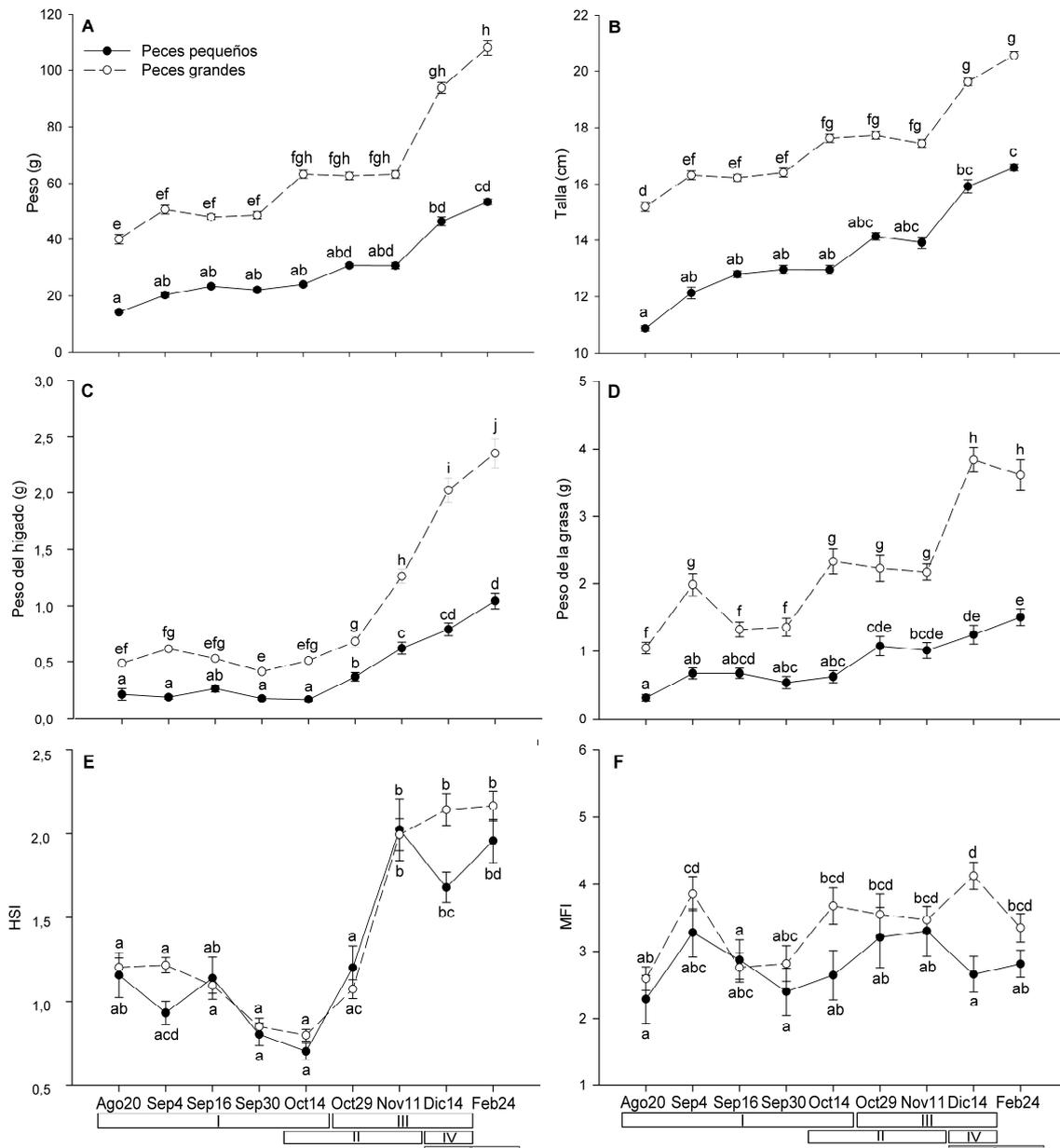
### Capítulo 4.4 Implicación del sistema Kiss/Gpr54 y de factores endocrinos en el inicio de la pubertad de la lubina

#### 4.4.1 Crecimiento e índices morfológicos

La selección de grupos de animales pequeños (entre el 15% de menor tamaño) y grandes (entre el 25% de mayor tamaño) en los distintos grupos experimentales dio lugar, como era de esperar, a diferencias significativas en todos los caracteres merísticos de los individuos pequeños y grandes, sin importar el grupo o la fecha de muestreo (**Fig. 4.18**). El peso medio de los peces pequeños aumentó gradualmente desde  $14,13 \pm 0,37$  g el 20 de agosto hasta  $53,34 \pm 1,02$  g el 24 de febrero, mientras que para el mismo período de tiempo, el peso medio de los peces grandes incrementó desde  $40,05 \pm 1,67$  g a  $108,11 \pm 2,66$  g (**Fig. 4.18A**). De igual forma, desde el 20 de agosto al 24 de febrero la longitud media aumentó de  $10,86 \pm 0,10$  y  $15,20 \pm 0,16$  cm a  $16,60 \pm 0,12$  y  $20,56 \pm 0,14$  cm en los peces pequeños y grandes, respectivamente (**Fig. 4.18B**). En este mismo intervalo de tiempo, los peces grandes pesaron de media 2,11 veces más que los pequeños, pero en cambio, ambos grupos mostraron un valor parecido en el incremento de longitud (alrededor de 4cm). En el peso del hígado y en el de la grasa visceral se observó un patrón de variación similar, de tal forma que la diferencia de la media entre peces pequeños y grandes fue de 4,85 y 2,87 veces mayor el 24 febrero que el 20 de agosto, respectivamente (**Figs. 4.18C y 4.18D**). Las diferencias observadas entre los caracteres merísticos de peces pequeños y grandes desaparecieron prácticamente por completo cuando los valores se expresaron como índices somáticos, tales como el HSI y el MFI (**Figs. 4.18E y 4.18F**), excepto durante la fase meiótica tardía/espermiogénica temprana (mediados de diciembre) donde los peces grandes mostraron valores mayores de MFI que los peces pequeños. La **Tabla 4.2** muestra la relación entre los estados

## 4. Resultados y desarrollo argumental

testiculares y las fases de gametogénesis testicular de los peces grandes para mayor claridad de los resultados.



**Figura 4.18** Cambios temporales de peso (A), talla (B), peso del hígado (C), peso de la grasa (D), índice hepatosomático (HSI) (E) e índice de grasa mesentérica (MFI) (F) de los peces pequeños (puntos negros) y grandes (puntos blancos). Los datos de peso y talla se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.2**.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

**Tabla 4.2** Sucesión de las diferentes fases de gametogénesis testicular, observadas en los peces grandes durante su primer ciclo reproductivo (**Parte 1**). Las letras en negrita indican el estado de desarrollo testicular dominante en cada punto de muestreo. Sumario de los tipos celulares germinales más característicos de cada estado testicular<sup>a</sup> (**Parte 2**).

<b>Parte 1</b>						
Fecha	Estado testicular			Fase testicular		
Ago20	<b>I</b>			Inmadura		
Sep04	<b>I</b>			Inmadura		
Sep16	<b>I, II</b>			Proliferativa temprana		
Sep30	<b>I</b>			Proliferativa temprana		
Oct14	<b>I,II</b>			Proliferativa tardía		
Oct29	<b>II, III</b>			Meiótica temprana		
Nov11	<b>II, III</b>			Meiótica media		
Dic14	<b>II, III, IV, V</b>			Meiótica tardía/Espermiogénica temprana		
Feb24	<b>II, III, V</b>			Espermiogénica		
<b>Parte 2</b>						
Estado/Tipo celular <sup>b</sup>	StgA	StgB	Stc1	Stc2	Std	Sz
Estado I	+++ <sup>c</sup>					
Estado II	++	++	(+)			
Estado III	+	+	++	++	+	
Estado IV	(+)	(+)	++	++	++	++
Estado V	+			+	+	+++

<sup>a</sup> Adaptado de Begtashi *et al.* 2004.

<sup>b</sup> StgA, espermatogonias A; StgB, espermatogonias B; StcI, espermatocitos primarios; StcII, espermatocitos secundarios; Std, espermatidas; Sz, espermatozoides.

<sup>c</sup> La abundancia de cada tipo celular se indica con signos +; (+) indica presencia residual

### 4.4.2 Desarrollo gonadal

En los peces grandes se observó la mayor incidencia de estado V (espermiogénesis plena), llegando a niveles de un 16,66% en diciembre y un 75% en febrero. Por el contrario, los peces pequeños no llegaron al estado V en ningún momento del experimento (**Tabla 4.2** y **Tabla 4.3**). En febrero, los peces pequeños mostraron una inhibición clara de la maduración gonadal, de tal forma que nunca llegaron a un estado de espermiación plena (estado V), y solo un 14,3% de ellos alcanzaron el estado IV (espermiación parcial).

## 4. Resultados y desarrollo argumental

**Tabla 4.3** Porcentaje de estados de desarrollo testicular durante el primer ciclo sexual de la lubina. El área gris compartida indica etapas de desarrollo gonadal con espermatozoides. Las letras minúscula diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las dos poblaciones de peces en cada punto de muestreo y para un estado testicular determinado.

Fecha/Estado	Peces pequeños					Peces grandes				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Ago20	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Sep04	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Sep16	100	0	0	0	0	87,5	12,5	0	0	0
Sep30	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Oct14	85,71	14,28	0	0	0	50	50	0	0	0
Oct29	85,71(a)	14,28	0	0	0	0(b)	80	20	0	0
Nov11	66,66(a)	33,33	0	0	0	0(b)	57,14	42	0	0
Dic14	50	16,66	16,66	16,66	0	0	16,66	50	16,66	16,66
Feb24	14,28	28,57	42,85	14,28	0(a)	0	12,5	12,5	0	75(b)

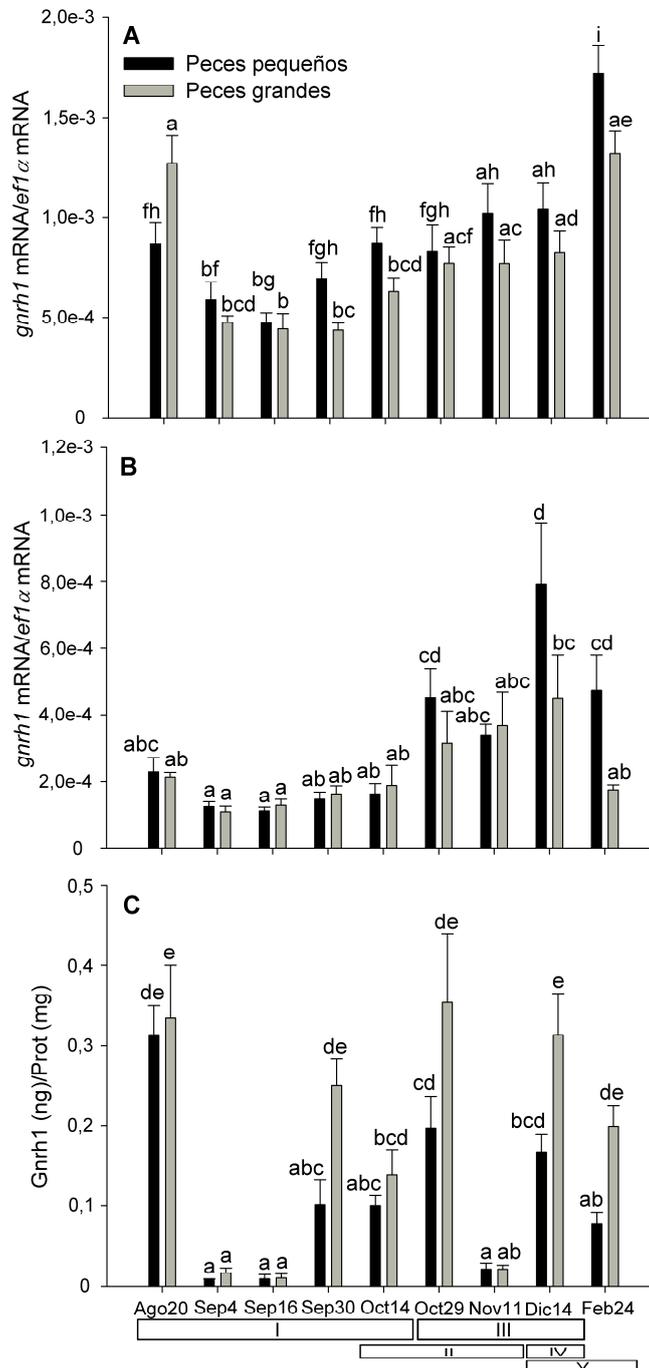
### 4.4.3 Expresión temporal de *gnrh1* en el cerebro y contenido de *Gnrh1* en la hipófisis

Los niveles de mRNA de *gnrh1* en el FB-MB de los peces grandes mostraron un primer pico significativo en agosto (fase inmadura) y un segundo pico también significativo en febrero (fase espermiogénica) (**Fig. 4.19A**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los grandes, pero en agosto (fase inmadura) los niveles de expresión de este gen fueron bajos. Además, durante las fases proliferativa temprana y tardía (entre finales de septiembre y mediados de octubre) y la fase espermiogénica (febrero) los peces pequeños tuvieron niveles de transcritos de *gnrh1* significativamente más altos que los de los peces grandes.

Los niveles de mRNA de *gnrh1* en el hipotálamo de los peces grandes mostraron un pico significativo en diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica temprana) y los valores mínimos se observaron a principios de septiembre (fase inmadura) (**Fig. 4.19B**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los grandes aunque los pequeños alcanzaron el nivel máximo de expresión dos meses antes que los grandes. Además durante las fases meiótica tardía/espermiogénica temprana (diciembre) y

## 4. Resultados y desarrollo argumental

espermiogénica (febrero), los peces pequeños mostraron niveles de expresión de *gnrh1* significativamente más altos que los grandes.



**Figura 4.19** Perfiles de expresión de *gnrh1* en el FB-MB (A) e hipotálamo (B) y contenido de Gnrh1 en la hipófisis (C) de los peces pequeños (barras negras) y de los peces grandes (barras grises), mantenidos bajo fotoperiodo natural. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.2**.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

El perfil del contenido de *Gnrh1* en la hipófisis fue similar en ambos grupos (peces grandes y pequeños) con niveles significativamente más altos en agosto (fase inmadura), finales de octubre y diciembre (fase meiótica temprana y meiótica tardía/espermiogénica temprana, respectivamente) (**Fig. 4.19C**). Sin embargo, durante la fase proliferativa temprana (finales de septiembre) y desde la fase meiótica tardía/espermiogénica temprana hasta la fase espermiogénica (desde diciembre hasta febrero), los niveles de *Gnrh1* hipofisaria de los peces grandes fueron significativamente mayores que los de los peces pequeños, mostrando una tendencia opuesta a la de los transcritos de *gnrh1* en el FB-MB e hipotálamo.

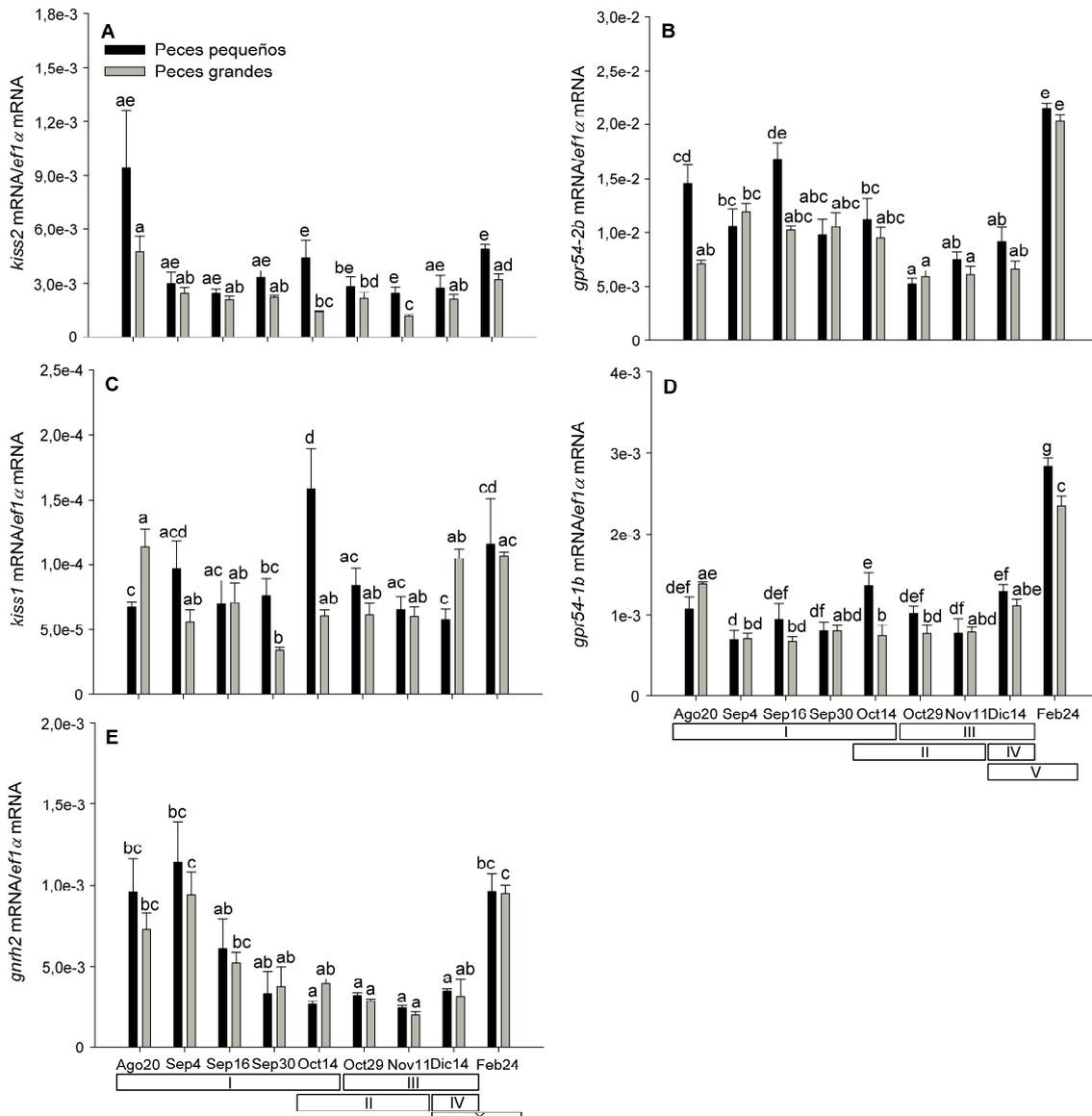
### 4.4.4 Expresión temporal del sistema kisspeptina y *gnrh2* en el FB-MB

En los peces grandes, los transcritos de *kiss2* alcanzaron su punto máximo en agosto (fase inmadura) y en octubre regresaron a los niveles basales (fase proliferativa tardía) (**Fig. 4.20A**). Además en febrero, se observó un segundo pico menor, aunque significativo, (fase espermiogénica). Por el contrario, los peces pequeños no mostraron variación significativa alguna a lo largo del ciclo reproductivo. Curiosamente, durante las fases proliferativa tardía (mediados de octubre), meiótica media (noviembre) y espermiogénica (febrero), los niveles de *kiss2* de los peces pequeños fueron significativamente más elevados que los de los peces grandes.

En contraste con el perfil de los niveles de expresión de *kiss2* de los peces grandes, los de su receptor, el *gpr54-2b*, fueron significativamente más altos desde septiembre (fase inmadura) hasta mediados de octubre (fase proliferativa tardía) con una gran elevación en febrero (fase espermiogénica) (**Fig. 4.20B**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los peces grandes, pero con niveles de expresión de *gpr54-2b*

## 4. Resultados y desarrollo argumental

significativamente más elevados durante las fases inmadura (agosto) y proliferativa temprana (mediados de septiembre).



**Figura 4.20** Perfiles de expresión de *kiss2* (A), *gpr54-2b* (B), *kiss1* (C), *gpr54-1b* (D) y *gnrh2* (E) en el FB-MB de los peces pequeños (barras negras) y de los peces grandes (barras grises). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables, en animales púberes, durante el periodo experimental se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.2**.

Los niveles de mRNA de *kiss1* en el FB-MB de los peces grandes tuvieron un patrón bimodal caracterizado por niveles de transcritos significativamente elevados en agosto

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

(fase inmadura), diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica temprana) y febrero (fase espermiogénica) y mínimos a finales de septiembre (fase proliferativa temprana) (**Fig. 4.20C**). Los niveles de mRNA de *kiss1* en los peces pequeños fueron significativamente más altos que en los peces grandes a mediados de octubre, es decir, en la fase proliferativa tardía. Los niveles de expresión de *gpr54-1b* presentaron un patrón similar al de *kiss1* (**Fig. 4.20D**). Así, los peces grandes, mostraron un primer pico de expresión a finales de agosto (fase inmadura) y un segundo pico significativo mayor a finales de febrero (fase espermiogénica). En los peces pequeños se observaron dos picos significativos, uno a mediados de octubre (fase proliferativa tardía) y otro a finales de febrero (fase espermiogénica), con valores significativamente más altos que los de los peces grandes en las fechas consideradas, es decir, durante las fases proliferativa tardía y espermiogénica.

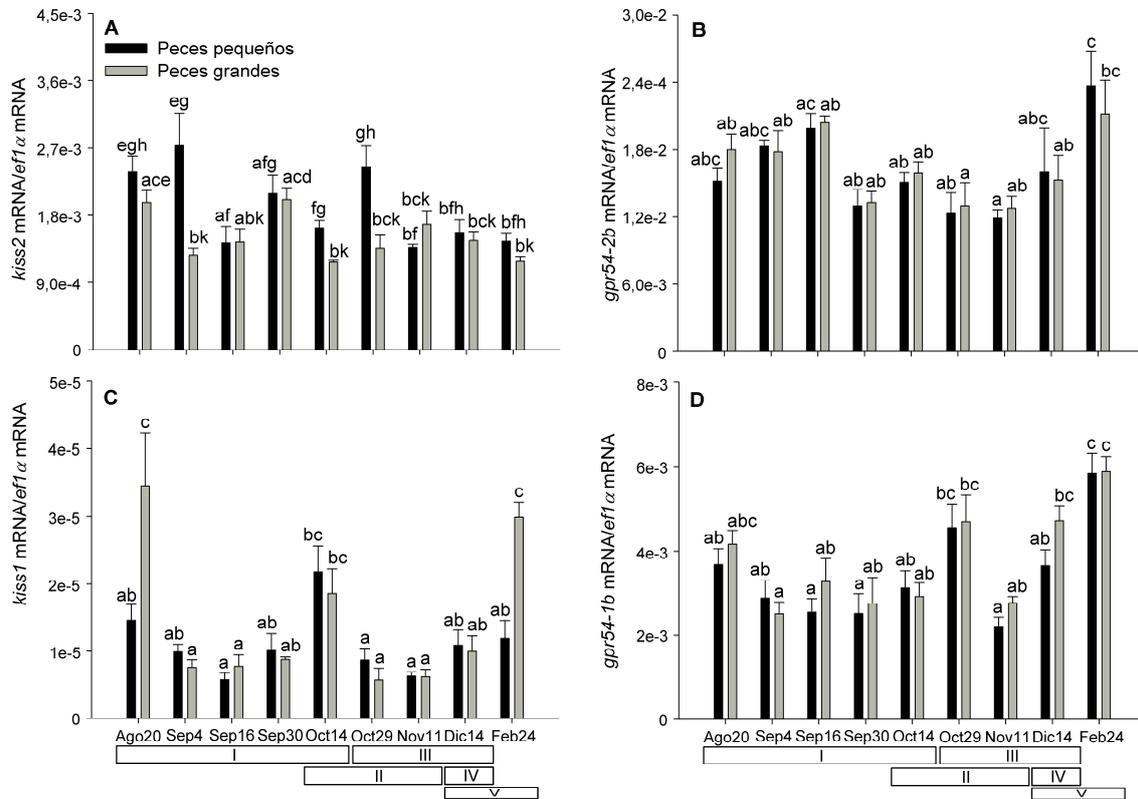
Por último, los niveles de mRNA de *gnrh2* en los peces grandes también mostraron un patrón bimodal (**Fig. 4.20E**) con niveles altos significativos en agosto (fase inmadura), principios de septiembre (fase inmadura) y febrero (fase espermiogénica). Los peces pequeños tuvieron un patrón similar al de los peces grandes y no se observaron diferencias significativas, entre los dos grupos, en ningún punto de muestreo.

### 4.4.5 Expresión temporal del sistema kisspeptina en el hipotálamo

En los peces grandes la expresión hipotalámica de *kiss2* fue bimodal con un pico significativo en agosto (fase inmadura) y otro a finales de septiembre (fase proliferativa temprana) (**Fig. 4.21A**). Los peces pequeños también mostraron un patrón bimodal, pero con aumentos significativos a principios de septiembre (fase inmadura) y a finales de octubre (fase meiótica temprana). Este grupo de animales presentó niveles de *kiss2*

## 4. Resultados y desarrollo argumental

más altos que los de los peces grandes en las fases inmadura (principios de septiembre), proliferativa tardía (mediados de octubre) y meiótica temprana (finales de octubre).



**Figura 4.21** Perfiles de expresión de *kiss2* (A), *gpr54-2b* (B), *kiss1* (C) y *gpr54-1b* (D) en el hipotálamo de peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.2**.

Durante todo el periodo experimental, los peces grandes y pequeños presentaron un patrón de expresión de *gpr54-2b* similar, con niveles significativamente más altos en febrero (fase espermiogénica), pero sin diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (**Fig. 4.21B**).

En los peces grandes la expresión hipotalámica de *kiss1* mostró sus niveles más altos en agosto (fase inmadura) y febrero (fase espermiogénica) (**Fig. 4.21C**). Además también se observó un tercer pico más pequeño, pero significativo, a mediados de octubre (fase

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

proliferativa tardía) coincidente con el único pico de los niveles de mRNA de *kiss1* presente en los peces pequeños. A diferencia de lo observado en los niveles hipotalámicos de transcritos de *kiss2*, los niveles de expresión de *kiss1* de los peces pequeños no fueron mayores que los de los grandes. Por el contrario, estos últimos mostraron niveles de expresión más elevados que los de los pequeños en agosto (fase inmadura) y en febrero (fase espermiogénica).

En el hipotálamo de los peces grandes, los niveles de expresión de *gpr54-1b* incrementaron significativamente a finales de octubre (fase meiótica temprana), y aumentaron gradualmente desde noviembre (fase meiótica tardía) en adelante hasta alcanzar su punto máximo en febrero (fase espermiogénica) (**Fig. 4.21D**). Los peces pequeños presentaron el mismo patrón de variación. No se vieron diferencias significativas entre los niveles de expresión de *gpr54-1b* de los peces pequeños y grandes.

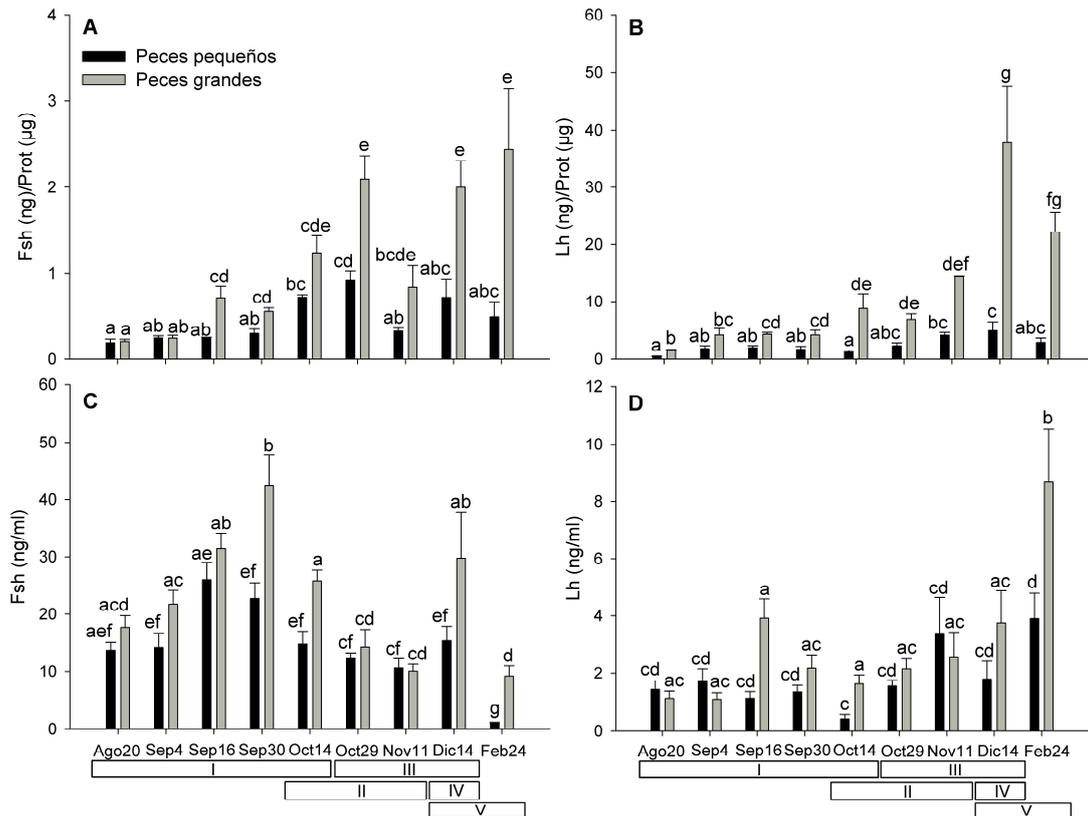
### 4.4.6 Perfil temporal de gonadotrofinas en la hipófisis y en plasma

El contenido de Fsh en la hipófisis de los peces grandes mostró un aumento sostenido desde mediados de septiembre (fase proliferativa temprana) hasta alcanzar su valor máximo a finales de octubre (fase proliferativa tardía), mientras que en los meses siguientes los niveles se mantuvieron elevados (**Fig. 4.22A**). Los peces pequeños sólo presentaron un pico significativo a finales de octubre (fase meiótica temprana) y además mostraron niveles significativamente más bajos que los de los peces grandes durante prácticamente todo el ciclo reproductivo.

Los valores mínimos del contenido de Lh en la hipófisis de los peces grandes se observaron en agosto (fase inmadura), permanecieron bajos durante septiembre (fases inmadura y proliferativa temprana) y aumentaron progresivamente en los siguientes

## 4. Resultados y desarrollo argumental

meses para alcanzar su máximo nivel significativo a mediados de diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica temprana) (**Fig. 4.22B**). Los peces pequeños mostraron un pico significativo a mediados de diciembre, presentando cierto paralelismo con el perfil de Lh hipofisaria de los peces grandes, pero con niveles significativamente menores a los de éstos, prácticamente en todos los puntos de muestreo.



**Figura 4.22** Perfiles de Fsh y Lh en hipófisis (A, B) y en plasma (C, D) de peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.2**.

Los niveles plasmáticos de Fsh mostraron un perfil bimodal caracterizado por un primer pico mayor a finales de septiembre (fase proliferativa temprana) y un segundo pico menor en diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica temprana) (**Fig. 4.22C**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los peces grandes, pero con niveles

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

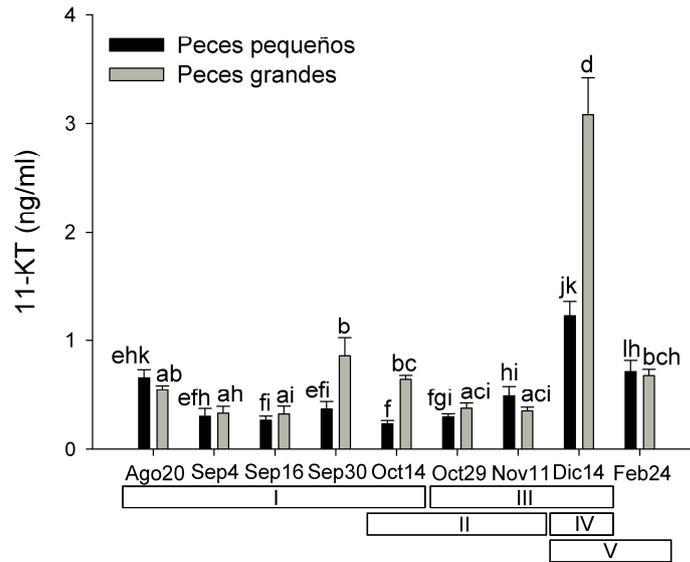
menores que estos. En comparación con los animales grandes, los valores de Fsh plásmatica en el grupo de peces pequeños fueron significativamente más bajos a finales de septiembre, mediados de octubre y diciembre, es decir desde la fase proliferativa temprana hasta la fase proliferativa tardía y durante la fase meiótica tardía/espermiogénica temprana.

Los niveles plasmáticos de Lh de los peces grandes mostraron un patrón de variación bimodal caracterizado por un primer pico menor, pero significativo, a mitad de septiembre (fase proliferativa temprana) y un segundo pico más elevado a finales de febrero (fase espermiogénica) (**Fig. 4.22D**). Los peces pequeños mostraron un pico significativo en febrero (fase espermiogénica). Comparando los niveles de Lh plasmática de los animales pequeños y grandes, éstos últimos presentaron niveles significativamente más altos a mediados de septiembre, mediados de octubre y febrero, o lo que es lo mismo, en las fases proliferativa temprana, proliferativa tardía y espermiogénica.

### 4.4.7 Perfil temporal de 11-KT en plasma

Los perfiles plasmáticos de 11-KT de los peces grandes mostraron un pico menor, pero significativo, a final de septiembre (fase inmadura) y otro a mediados de diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica temprana) (**Fig. 4.23**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los peces grandes, excepto por la ausencia del primer pico y la presencia de valores más bajos de 11-KT en el segundo. Así, los niveles plasmáticos de 11-KT de los peces grandes fueron significativamente mayores que los de los peces pequeños a finales de septiembre, mediados de octubre y diciembre, es decir, las fases proliferativa temprana, proliferativa tardía y meiótica tardía/espermiogénica temprana.

## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.23** Perfiles de los niveles de 11-KT en plasma de peces pequeños (barras negras) y peces grandes (barras grises). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.2**.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

## 4. Resultados y desarrollo argumental

### Capítulo 4.5 Estudio de la participación del sistema Kiss/Gpr54 y de factores endocrinos en la señalización de la información fotoperiódica

#### 4.5.1 Desarrollo gonadal

Al igual que se hizo en los animales bajo fotoperiodo natural (NP), descrito en apartados anteriores, para estudiar los grupos AP (régimen de fotoperiodo que adelanta el ciclo reproductor) y LL (fotoperiodo inhibidor de la pubertad precoz, consistente en la administración de iluminación constante durante todo el año) (ver apartado 3.4.2) sus animales también se separaron en grandes (entre el 15% de mayor tamaño) y pequeños (entre el 25% de menor tamaño). Así, en los testículos de los peces grandes del grupo AP se observaron espermatozoides (estados IV y V), por primera vez, a finales de octubre y diciembre, respectivamente (**Tabla 4.4**). En los peces grandes la suma de los porcentajes de peces en los estados IV y V, fue de 27,68%, 26,25% y 33,93% a finales de octubre, diciembre y febrero, respectivamente. En los peces pequeños el desarrollo testicular fue mucho menor y más atrasado, por lo que a finales de febrero solo el 14,3% de ellos alcanzaron el estado V.

**Tabla 4.4** Porcentaje de estados de desarrollo testicular del grupo AP. El área gris compartida indica etapas de desarrollo gonadal con espermatozoides. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las dos poblaciones de peces en cada punto de muestreo y para un estado testicular determinado.

Fecha/Estado	Peces pequeños					Peces grandes				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Ago20	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Sep04	100	0	0	0	0	81,25	18,75	0	0	0
Sep16	100	0	0	0	0	75	18,75	6,25	0	0
Sep30	100(a)	0	0	0	0	58,33(b)	33,33	8,33	0	0
Oct14	71,10	28,90	0	0	0	67,86	32,14	0	0	0
Oct29	50(a)	37,50	12,50	0	0	0(b)	32,14	40,18	27,68	0
Nov11	57,10	42,90	0(a)	0	0	28,57	21,43	50(b)	0	0
Dic14	41,67	41,67	16,67	0	0	18,75	18,75	36,25	10	16,25
Feb24	28,60	14,30	42,90	0	14,30	8,93	8,93	48,21	0	33,93

## 4. Resultados y desarrollo argumental

Por otro lado, a finales de septiembre y octubre, los peces grandes mostraron porcentajes de estado I inferiores a los de los animales pequeños, claramente debido a la aparición de estados de desarrollo testicular más avanzados (II, III y IV) en los peces grandes. Así mismo, en noviembre, en los animales grandes se observó un mayor porcentaje de estado III en comparación con los pequeños, donde no hubo animales en dicho estado. En el grupo LL no se observaron estados IV o V en ningún punto de muestreo, ni en peces grandes ni en pequeños. No obstante, en los peces grandes, a finales de octubre, hubo un porcentaje menor de individuos en estado I que en los pequeños, aunque los testículos de los primeros no evolucionaron más allá del estado III (**Tabla 4.5**). Por tanto, el grupo LL mostró una inhibición clara de los estados avanzados de espermatogénesis testicular.

**Tabla 4.5** Porcentaje de estados de desarrollo testicular del grupo LL. El área gris compartida indica etapas de desarrollo gonadal con espermatozoides. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las dos poblaciones de peces en cada punto de muestreo y para un estado testicular determinado.

Fecha/Estado	Peces pequeños					Peces grandes				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Ago20	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Sep04	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Sep16	100	0	0	0	0	91,67	8,33	0	0	0
Sep30	100	0	0	0	0	90	10	0	0	0
Oct14										
Oct29	100(a)	0	0	0	0	60,12(b)	23,51	16,37	0	0
Nov11	50	50	0	0	0	39,29	60,71	0	0	0
Dic14	37,50	62,50	0	0	0	18,75	71,25	10	0	0
Feb24	50	50	0	0	0	33,33	66,67	0	0	0

Estos resultados, al igual que los encontrados para los peces del grupo NP (ver apartado 4.4.2), muestran que en los grupos AP y LL los peces pequeños tampoco llegaron a madurar. Por este motivo, se ha procedido a comparar el efecto de los tres tratamientos (NP, AP y LL) en aquellas poblaciones donde los peces espermiaron o desarrollaron el testículo en cierta medida, es decir, las tres poblaciones de peces grandes (**Tabla 4.6**).

## 4. Resultados y desarrollo argumental

**Tabla 4.6** Porcentaje de estados de desarrollo testicular en los animales grandes de los grupos NP, AP y LL. El área gris compartida indica las etapas de desarrollo gonadal con espermatozoides. Las letras minúscula distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las dos poblaciones de peces en cada punto de muestreo y para un estado testicular determinado.

Fecha/Estado	Fotoperiodo Natural (NP)				
	I	II	III	IV	V
Ago20	100	0	0	0	0
Sep04	100	0	0	0	0
Sep16	87,5	12,5	0	0	0
Sep30	100(a)	0	0	0	0
Oct14	50	50(a)	0	0	0
Oct29	0(a)	80	20	0	0
Nov11	0	57,14	42(ab)	0	0
Dic14	0	16,66(ab)	50	16,66	16,66
Feb24	0	12,5(a)	12,5	0	75(a)
Fecha/Estado	Fotoperiodo Acelerador (AP)				
	I	II	III	IV	V
Ago20	100	0	0	0	0
Sep04	81,25	18,75	0	0	0
Sep16	75	18,75	6,25	0	0
Sep30	58,33(b)	33,33	8,33	0	0
Oct14	0	100(b)	0	0	0
Oct29	0(a)	32,14	40,18	27,68	0
Nov11	28,57	21,43	50(a)	0	0
Dic14	18,75	18,75(a)	36,25	10	16,25
Feb24	8,93	8,93(a)	48,21	0	33,93(ab)
Fecha/Estado	Luz continua (LL)				
	I	II	III	IV	V
Ago20	100	0	0	0	0
Sep04	100	0	0	0	0
Sep16	91,67	8,33	0	0	0
Sep30	90(ab)	10	0	0	0
Oct14					
Oct29	60,12(b)	23,51	16,37	0	0
Nov11	39,29	60,71	0(b)	0	0
Dic14	18,75	71,25(b)	10	0	0
Feb24	33,33	66,67(b)	0	0	0(b)

Así, los datos histológicos muestran que en el NP la primera presencia de esperma en los testículos se observó a mediados de diciembre y los mayores porcentajes de testículos con esperma (estado IV y V) acaecieron en diciembre y en febrero. En el grupo AP, la primera presencia de espermatozoides en los testículos se observó a finales de octubre, con más de un mes de antelación con respecto al grupo control (**Tabla 4.6**). A finales de septiembre, el grupo AP presentó un porcentaje menor de peces con testículos en I que el grupo NP, debido a que en AP, en esta misma fecha, hubo peces

## 4. Resultados y desarrollo argumental

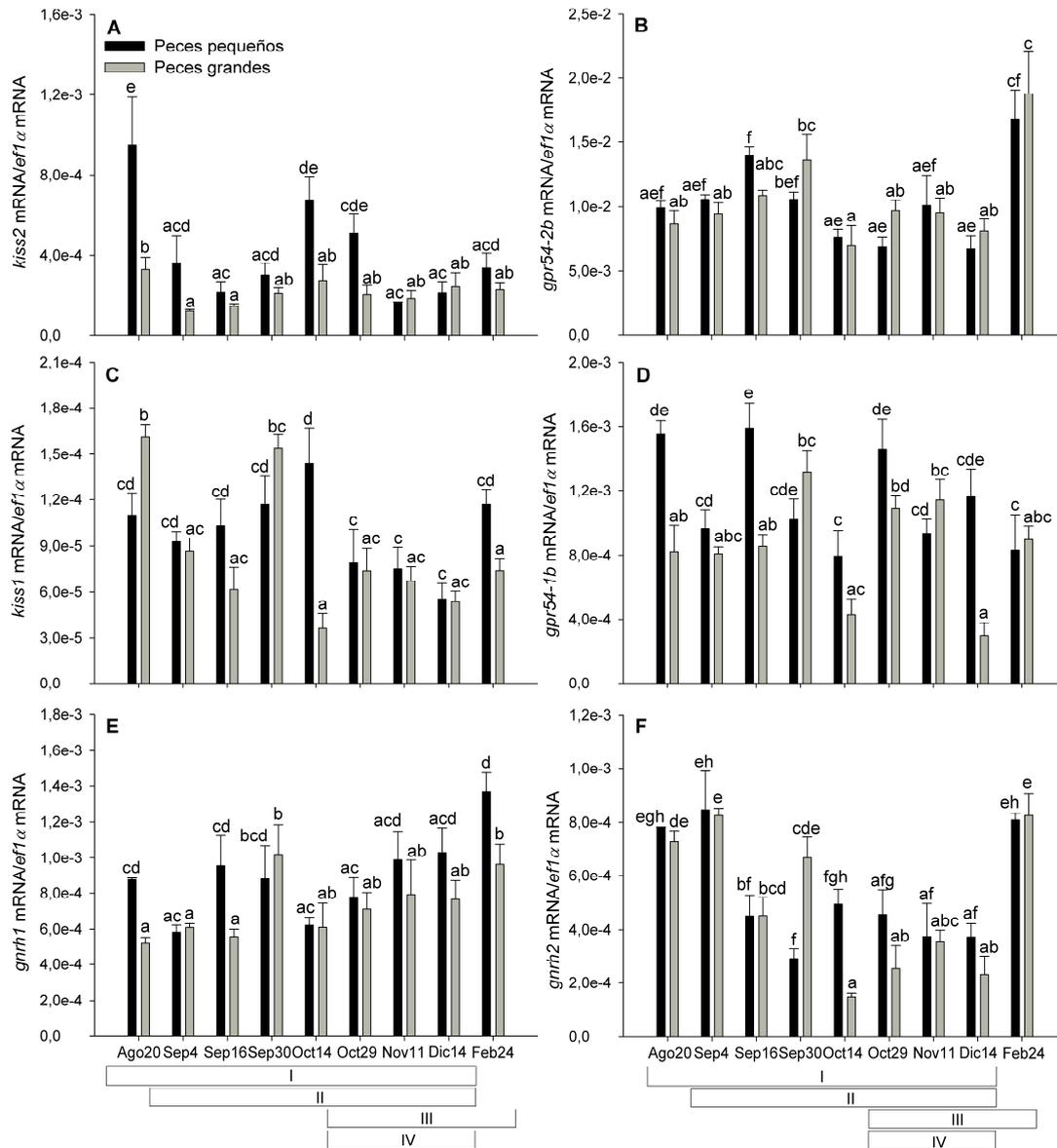
---

con testículos en estado II y III que no se observaron en el grupo NP. De forma similar, a mediados de octubre, el grupo AP presentó mayores porcentajes de estado II que el grupo NP (**Tabla 4.6**). Estos resultados indican que, el inicio de la gametogénesis se vio claramente adelantado en aquellos animales del grupo AP, respecto a los del grupo NP. Por otro lado, en el grupo LL no se observaron machos con espermatozoides, en los testículos, en ninguno de los puntos de muestreo analizados. Además, en febrero dicho grupo presentó un porcentaje de estados tempranos de desarrollo testicular (estado II) significativamente más elevado que los grupos NP y AP que mostraron estados más avanzados y con presencia de espermatozoides (estado V). Estos resultados indican que la luz continua inhibe la progresión de la espermatogénesis.

### 4.5.2 Expresión temporal de genes *kiss* y *gnrh* en el FB-MB de peces bajo AP

Para mayor comprensión de los resultados obtenidos en la **Tabla 4.7** se muestra la relación entre los estados testiculares y las fases de gametogénesis testicular de los peces grandes bajo el régimen de fotoperiodo AP y en las fechas concretas de muestreo. En este grupo, los niveles de transcritos de *kiss2* alcanzaron su punto máximo en agosto (fase inmadura), regresaron a niveles basales en septiembre (fase proliferativa temprana) y se mantuvieron bajos hasta el final del experimento (**Fig. 4.24A**). Por su parte, en el grupo de peces pequeños los niveles de expresión de *kiss2* mostraron un patrón bimodal caracterizado por niveles altos en agosto (fase inmadura) y a mediados de octubre (fase proliferativa media). Además los niveles de expresión de *kiss2* de los peces pequeños, fueron significativamente más elevados que los de los grandes en las fases inmadura (agosto), proliferativa media (mediados de octubre) y proliferativa tardía/meiótica (finales de octubre) (ver **Tabla 4.7**, Partes 1 AP y 3 para comparación y relación entre estados testiculares, fases de desarrollo testicular y tipos celulares característicos de cada estado).

## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.24** Perfiles de expresión de *kiss2* (A), *gpr54-2b* (B), *kiss1* (C), *gpr54-1b* (D), *gnrh1* (E) y *gnrh2* (F) en el FB-MB de los peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises) del grupo AP. Los datos se expresan como la media ± SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.7**.

Los niveles de expresión de *gpr54-2b* mostraron el mismo patrón en peces grandes y pequeños (**Fig. 4.24B**). Los niveles de expresión de transcritos de *gpr54-2b* más elevados se observaron en febrero (fase meiótica tardía/espermioogénica) y los más bajos a mediados de octubre (fase proliferativa media). Además, durante la fase proliferativa

## 4. Resultados y desarrollo argumental

temprana (mediados de septiembre), los niveles de expresión de *gpr54-2b* de los peces pequeños fueron significativamente mayores que los de los grandes.

**Tabla 4.7** Sucesión de las diferentes fases de desarrollo testicular observadas durante el primer ciclo reproductivo de los peces grandes mantenidos bajo AP (Parte 1) y LL (Parte 2). Las letras en negrita indican el estado de desarrollo testicular dominante en cada punto de muestreo. Sumario de los tipos celulares germinales más característicos de cada estado testicular <sup>a</sup> (Parte 3).

<b>Parte 1 AP</b>						
Fecha	Estado Testicular			Fase Testicular		
Ago20	<b>I</b>			Inmadura		
Sep04	<b>I, II</b>			Proliferativa temprana		
Sep16	<b>I, II, III</b>			Proliferativa temprana		
Sep30	<b>I, II, III</b>			Proliferativa media		
Oct14	<b>I,II</b>			Proliferativa media		
Oct29	<b>II, III, IV</b>			Proliferativa tardía/Meiótica		
Nov11	<b>I, II, III</b>			Proliferativa tardía/Meiótica		
Dic14	<b>I, II, III, IV+V</b>			Meiótica tardía/Espermiogénica		
Feb24	<b>I, II, III, V</b>			Meiótica tardía/Espermiogénica		
<b>Parte 2 LL</b>						
Fecha	Estado Testicular			Fase Testicular		
Ago20	<b>I</b>			Inmadura		
Sep04	<b>I</b>			Inmadura		
Sep16	<b>I, II</b>			Proliferativa temprana		
Sep30	<b>I, II</b>			Proliferativa temprana		
Oct14						
Oct29	<b>I, II, III</b>			Proliferativa media		
Nov11	<b>I, II</b>			Proliferativa media		
Dic14	<b>I, II, III</b>			Proliferativa media		
Feb24	<b>I, II</b>			Proliferativa media		
<b>Parte 3</b>						
Estado/Tipo celular <sup>b</sup>	SgA	SgB	Sc1	Sc2	Spt	Sz
Estado I	+++ <sup>c</sup>					
Estado II	++	++	(+)			
Estado III	+	+	++	++	+	
Estado IV	(+)	(+)	++	++	++	++
Estado V			+	+	+	+++

<sup>a</sup> Adaptado de Begtashi *et al.* 2004.

<sup>b</sup> SgA, espermatogonias A; SgB, espermatogonias B; Sc1, espermátocitos primarios; Sc2, espermátocitos secundarios; Spt, espermátidas; Sz, espermatozoides.

<sup>c</sup> La abundancia de cada tipo celular se indica con signos +; (+) indica presencia residual.

Los niveles de transcritos *kiss1* en el FB-MB de los peces grandes mostraron un patrón bimodal con niveles altos en agosto (fase inmadura) y finales de septiembre (fase proliferativa media) y niveles mínimos a mediados de octubre (fase proliferativa media)

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

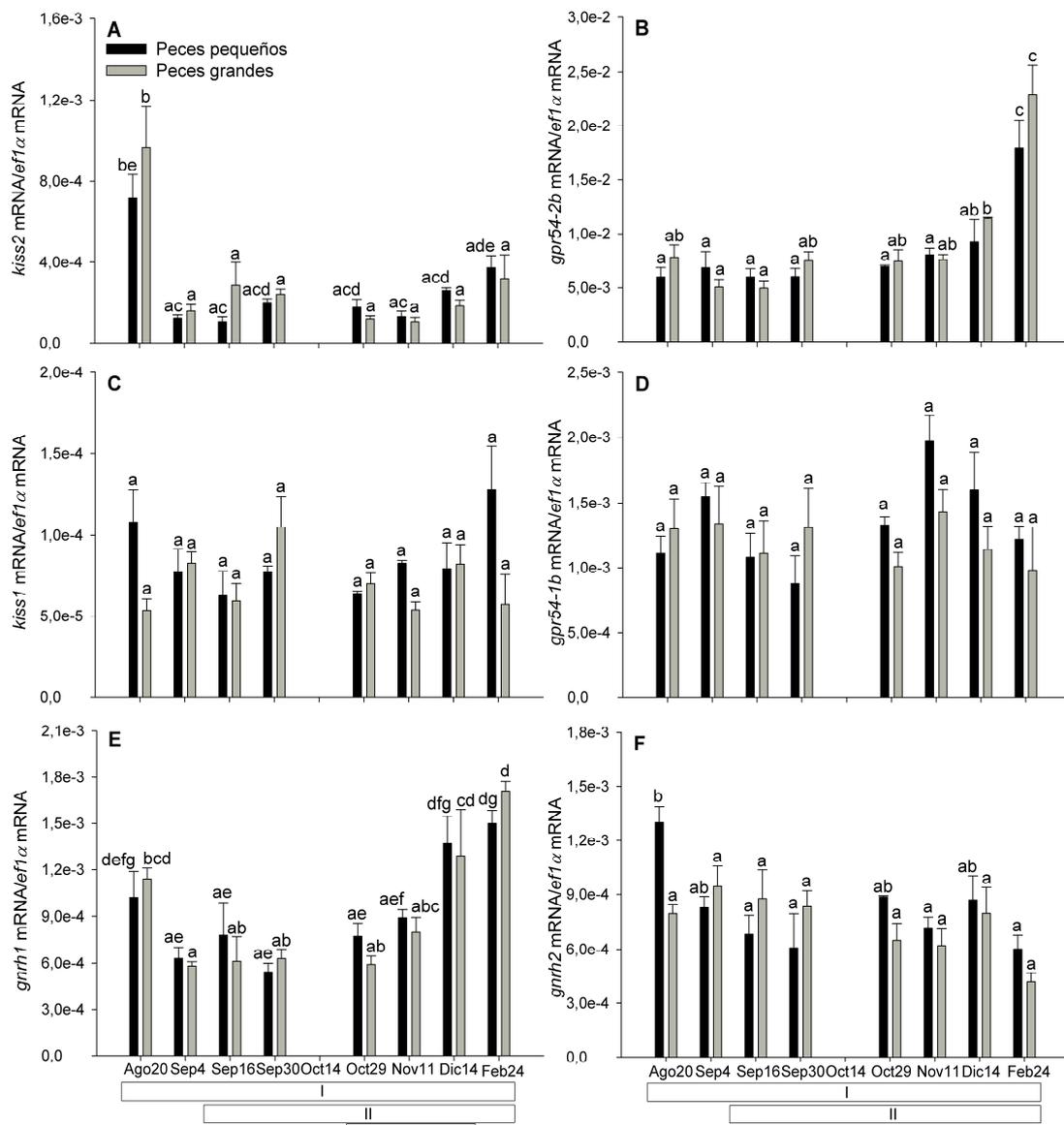
(**Fig. 4.24C**). En los peces pequeños los niveles de expresión de *kiss1* mostraron un pico a mediados de octubre (fase proliferativa media). Los niveles de expresión de *kiss1* de los peces pequeños fueron significativamente más altos que los de los peces grandes en las fases proliferativa media (mediados de octubre) y meiótica tardía/espermiogénica (febrero), pero en la fase inmadura (agosto) la relación fue inversa. Los niveles de transcritos de *gpr54-1b* de los peces grandes fueron altos a finales de septiembre (fase proliferativa media), finales de octubre (fase proliferativa tardía/meiótica) y principios de noviembre (fase proliferativa tardía/meiótica) (**Fig. 4.24D**). En peces pequeños, los niveles de expresión de *gpr54-1b* mostraron un pico significativo a mediados de septiembre (fase proliferativa temprana) y el valor mínimo se observó a mediados de octubre (fase proliferativa media). Por otra parte, en las fases inmadura (agosto), proliferativa temprana (principios de septiembre) y meiótica tardía/espermiogénica (diciembre), los niveles de transcritos de *gpr54-1b* de los peces pequeños fueron significativamente mayores que los de los peces grandes. El perfil de los niveles de expresión de *gnrh1* de los peces grandes fue bimodal con un primer pico a finales de septiembre (fase proliferativa media), y un segundo en febrero (fase meiótica tardía/espermiogénica) (**Fig. 4.24E**). Los peces pequeños sólo mostraron un pico en febrero (fase meiótica tardía/espermiogénica) y presentaron niveles mayores que los peces grandes en las fases inmadura (agosto), proliferativa temprana (mediados de septiembre) y meiótica tardía/espermiogénica (febrero). Los niveles de *gnrh2* de los peces grandes mostraron un patrón caracterizado por valores altos en agosto (fase inmadura), principios de septiembre (fase proliferativa temprana) y febrero (fase meiótica tardía/espermiogénica) (**Fig. 4.24F**). Los peces pequeños mostraron un perfil bimodal con valores altos en agosto (fase inmadura) y principios de septiembre (fase proliferativa temprana) y en febrero (fase meiótica tardía/espermiogénica). Además, la

## 4. Resultados y desarrollo argumental

expresión de *gnrh2* en los peces pequeños fue más alta que la de los grandes a mediados de octubre (fase proliferativa media), aunque dos semanas antes la relación era inversa.

### 4.5.3 Expresión temporal de genes *kiss* y *gnrh* en el FB-MB de peces bajo LL

Los niveles de expresión de *kiss2* mostraron un perfil similar en ambas poblaciones, caracterizado por un pico significativo en agosto (fase inmadura) (Fig. 4.25A).



**Figura 4.25** Perfiles de expresión de *kiss2* (A), *gpr54-2b* (B), *kiss1* (C), *gpr54-1b* (D), *gnrh1* (E) y *gnrh2* (F) en el FB-MB de los peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises) del grupo LL. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.7**.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

También fueron similares, en ambas poblaciones, los perfiles de los niveles de expresión de *gpr54-2b* y *gnrh1*, pero esta vez caracterizado por un incremento importante en febrero (fase proliferativa media) (**Figs. 4.25B y 4.25E**). No hubo diferencias entre los peces grandes y pequeños en ninguno de estos genes.

Los niveles de mRNA de *kiss1*, *gpr54-1b* y *gnrh2* no mostraron ritmo estacional en ninguna de las dos poblaciones (**Figs. 4.25C, 4.25D y 4.25F**). En agosto (fase inmadura) los niveles de expresión de *gnrh2* de los peces pequeños fueron significativamente mayores que los de los grandes. En el caso de la expresión de *kiss1* y *gpr54-1b* no hubo diferencias entre los peces grandes y pequeños.

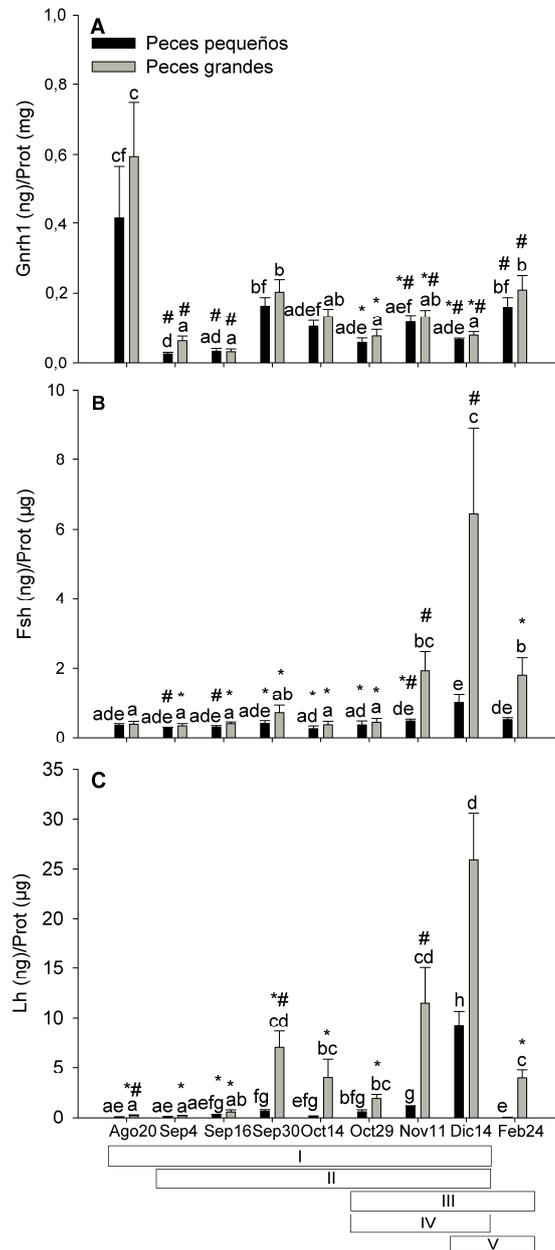
### 4.5.4 Patrón temporal de los niveles de gonadotrofinas y Gnrh1 en la hipófisis de peces bajo AP

El contenido hipofisario de Gnrh1 mostró un perfil similar en ambos grupos, caracterizado por un pico significativo en agosto (fase inmadura) y dos picos menores, pero significativos, a finales de septiembre (fase proliferativa media) y febrero (fase meiótica tardía/espermiogénica), respectivamente (**Fig. 4.26A**). Durante la fase proliferativa temprana (principios de septiembre), los niveles de Gnrh1 en la hipófisis de los peces grandes, aunque bajos, fueron significativamente mayores que los de los pequeños. Los peces grandes del grupo NP presentaron mayores niveles de Gnrh1 en la hipófisis que los del grupo AP a finales de octubre y diciembre, mientras que en noviembre la relación fue la inversa.

El contenido de Fsh en la hipófisis de peces grandes mostró un pico significativo a mediados de diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica) (**Fig. 4.26B**). Los peces pequeños también mostraron este pico a mediados de diciembre y además presentaron niveles más bajos que los peces grandes durante las fases proliferativa tardía/meiótica

## 4. Resultados y desarrollo argumental

(noviembre) y meiótica tardía/espermiogénica (diciembre y febrero). Los peces grandes del grupo AP presentaron niveles inferiores de Fsh en hipófisis a los encontrados en el grupo NP, a excepción de noviembre y diciembre, donde los niveles fueron similares.



**Figura 4.26** Contenido de Gnrh1 (A), Fsh (B) y Lh (C) en la hipófisis de los peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises) del grupo AP. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre AP y NP (ver apartado 4.4.3, figura 4.19 y apartado 4.4.6, figura 4.22) para cada punto de muestreo. Las almohadillas (#) indican diferencias significativas entre AP y LL (ver apartado 4.5.5, figura 4.27) para cada punto de muestreo. Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.7**.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

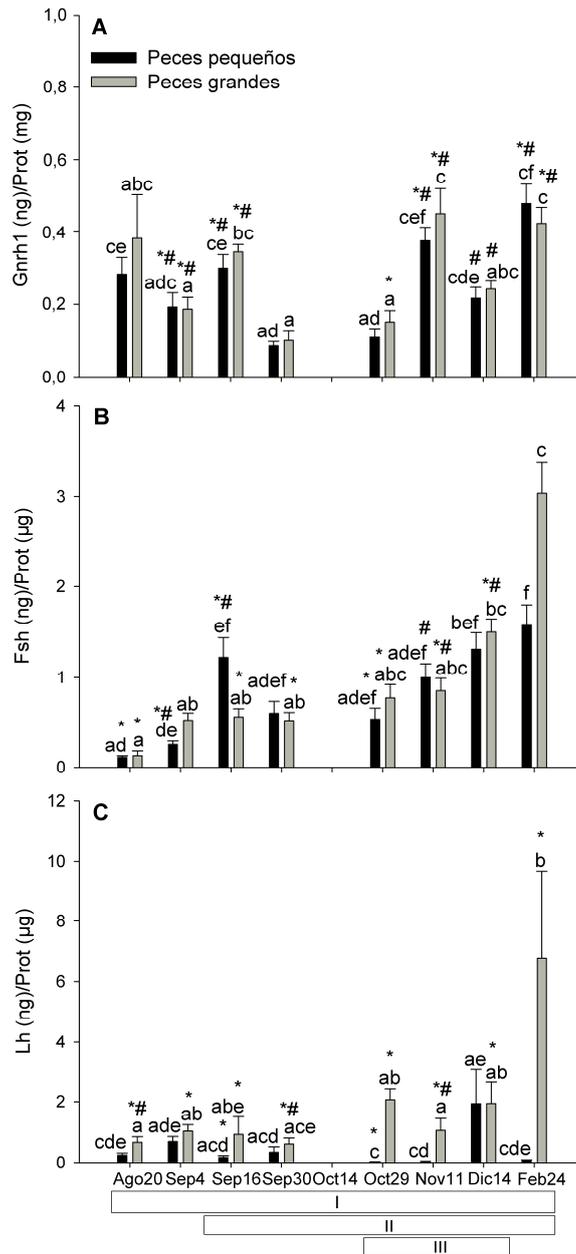
Los niveles de Lh en la hipófisis de los peces grandes mostraron valores mínimos en agosto (fase inmadura) y principios de septiembre (fase proliferativa temprana), aunque a finales de septiembre (fase proliferativa media) hubo una primera elevación significativa, alcanzando un máximo a mediados de diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica) (**Fig. 4.26C**). Esta misma tendencia se observó en los peces pequeños que alcanzaron valores máximos a mediados de diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica) pero de menor magnitud y con niveles significativamente menores que los de los peces grandes durante las fases proliferativa media (finales de septiembre y mediados de octubre), proliferativa tardía/meiótica (noviembre) y meiótica tardía/espermiogénica (diciembre y febrero).

Los peces grandes del grupo AP presentaron niveles superiores de Lh en hipófisis a los encontrados en el grupo NP a finales de septiembre. Sin embargo, en octubre y febrero, la relación fue inversa. Los peces grandes de ambos grupos presentaron similares niveles de Lh en hipófisis durante noviembre y diciembre.

### **4.5.5 Patrón temporal de los niveles de gonadotrofinas y Gnrh1 en la hipófisis de peces bajo LL**

El perfil de los niveles de Gnrh1 hipofisario en peces grandes mostró valores elevados a mediados de septiembre (fase proliferativa temprana), y desde noviembre hasta febrero (fase proliferativa media) (**Fig. 4.27A**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los peces grandes. No hubo diferencias significativas en el contenido hipofisario de Gnrh1 entre ambas poblaciones. Los peces grandes del grupo LL presentaron mayores niveles de Gnrh1 en la hipófisis que los del grupo NP a principios y mediados de septiembre, noviembre y febrero mientras que a finales de octubre la relación fue inversa.

## 4. Resultados y desarrollo argumental



**Figura 4.27** Contenido de Gnrh1 (A), Fsh (B) y Lh (C) en la hipófisis de los peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises) del grupo LL. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre LL y NP (ver apartado 4.4.3, figura 4.19 y apartado 4.4.6, figura 4.22) para cada punto de muestreo. Las almohadillas (#) indican diferencias significativas entre LL y AP (ver apartado 4.5.4, figura 4.26) para cada punto de muestreo. Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.7**.

En los peces grandes, los niveles de Fsh en hipófisis fueron bajos en agosto (fase inmadura) (**Fig. 4.27B**). A partir de este momento se observó un aumento paulatino y

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

constante hasta alcanzar un máximo en febrero (fase proliferativa media). En los peces pequeños el patrón de la Fsh hipofisaria mostró cierto paralelismo con el de los peces grandes pero con niveles significativamente menores que los de estos últimos en la fase inmadura (principios de septiembre) y en la fase proliferativa media (febrero), mientras que en la fase proliferativa temprana (mediados de septiembre) la relación fue inversa. Los peces grandes del grupo LL presentaron niveles inferiores de Fsh en hipófisis a los encontrados en el grupo NP durante prácticamente todo el ciclo reproductivo.

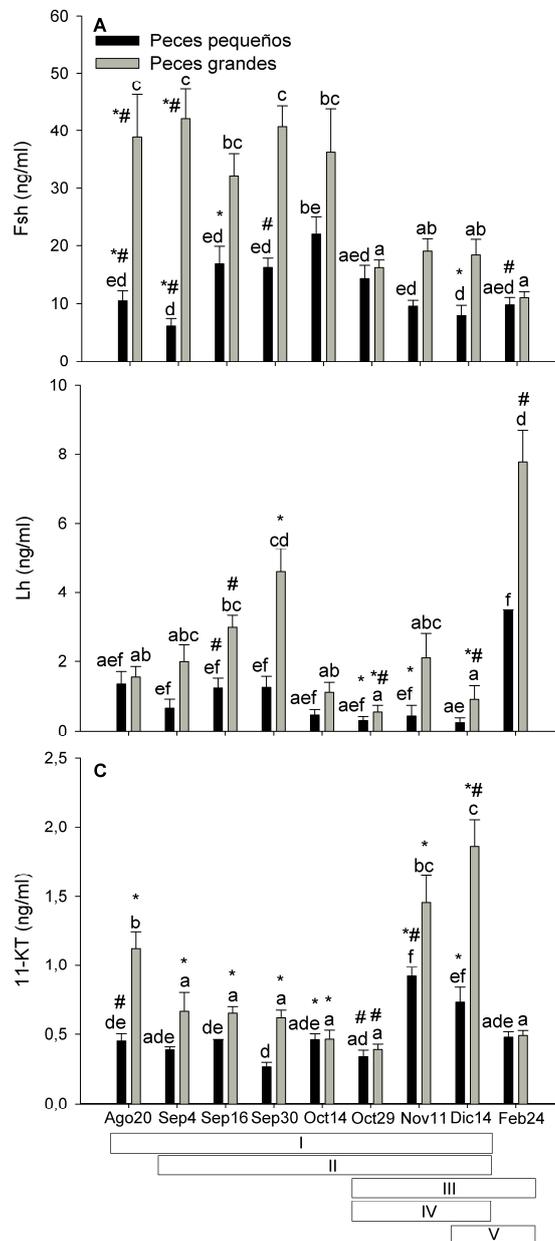
Los niveles de Lh hipofisaria de los peces grandes fueron bajos durante todo el periodo gametogénico, a excepción de un claro aumento en febrero (fase proliferativa media). En los peces pequeños los niveles significativamente más elevados se observaron en diciembre (fase proliferativa media) (**Fig. 4.27C**). Durante las fase inmadura (agosto) y proliferativa media (finales de octubre, noviembre y febrero) los peces grandes presentaron niveles significativamente mayores que los peces pequeños. Sin embargo, los niveles hipofisarios de Lh fueron muy bajos en ambas poblaciones en comparación con los de NP y AP, no sobrepasando valores de 8 ng/μg de proteína en ningún caso. Los peces grandes del grupo LL presentaron niveles de Lh en hipófisis inferiores a los encontrados en el grupo NP durante prácticamente todo el ciclo reproductivo.

### 4.5.6 Patrón temporal de los niveles de gonadotrofinas y 11-KT de peces bajo AP

En peces grandes, los niveles de Fsh en plasma se mantuvieron elevados desde agosto (fase inmadura) hasta mediados de octubre (fase proliferativa media). A finales de octubre (fase proliferativa tardía/meiótica) se produjo una disminución manteniendo niveles constantemente bajos hasta el final del experimento (**Fig. 4.28A**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los grandes, aunque con valores de Fsh casi siempre más bajos que los grandes. Los peces grandes del grupo AP presentaron niveles

## 4. Resultados y desarrollo argumental

superiores de Fsh en plasma a los encontrados en el grupo NP durante agosto y principios de septiembre.



**Figura 4.28** Niveles de Fsh (A), Lh (B) y 11-KT (C) en el plasma de los peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises) del grupo AP. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre AP y NP (ver apartado 4.4.6, figura 4.22 y apartado 4.4.7, figura 4.23) para cada punto de muestreo. Las almohadillas (#) indican diferencias significativas entre AP y LL (ver apartado 4.5.7, figura 4.29) para cada punto de muestreo. Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.7**.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Los niveles de Lh en el plasma de los peces grandes mostraron un patrón bimodal, aumentaron progresivamente desde agosto hasta alcanzar un máximo a finales de septiembre (fase proliferativa media) y en los meses sucesivos permanecieron bajos hasta un segundo incremento en febrero (fase meiótica tardía/espermiogénica) (**Fig. 4.28B**). Los peces pequeños mostraron un patrón similar al de los grandes y además tuvieron niveles significativamente más bajos durante las fases proliferativa temprana (principios y mediados de septiembre), proliferativa media (finales de septiembre), proliferativa tardía/meiótica (noviembre) y meiótica tardía/espermiogénica (febrero). Los peces grandes del grupo NP presentaron niveles superiores de Lh en plasma a los encontrados en el grupo AP durante finales de octubre y diciembre.

Los niveles de 11-KT de los peces grandes también mostraron un patrón bimodal, caracterizado por un primer pico en agosto (fase inmadura) y un segundo aumento desde mediados de noviembre (fase proliferativa tardía/meiótica) hasta mediados de diciembre (fase meiótica tardía/espermiogénica) (**Fig. 4.28C**). Los peces pequeños tuvieron un patrón similar al de los grandes, excepto por la ausencia en los primeros del pico de agosto (fase inmadura). Los peces grandes presentaron niveles significativamente mayores que los de los peces pequeños durante casi todas las fases de desarrollo testicular. Los peces grandes del grupo AP presentaron niveles superiores de 11-KT en plasma a los encontrados en el grupo NP durante prácticamente toda la etapa de crecimiento testicular. Sin embargo, en diciembre la relación fue inversa.

### **4.5.7 Patrón temporal de los niveles plasmáticos de gonadotrofinas y 11-KT de peces bajo LL**

Los niveles plasmáticos de Fsh en los peces grandes fueron altos a lo largo de septiembre (fases inmadura y proliferativa temprana). En los peces pequeños, los

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

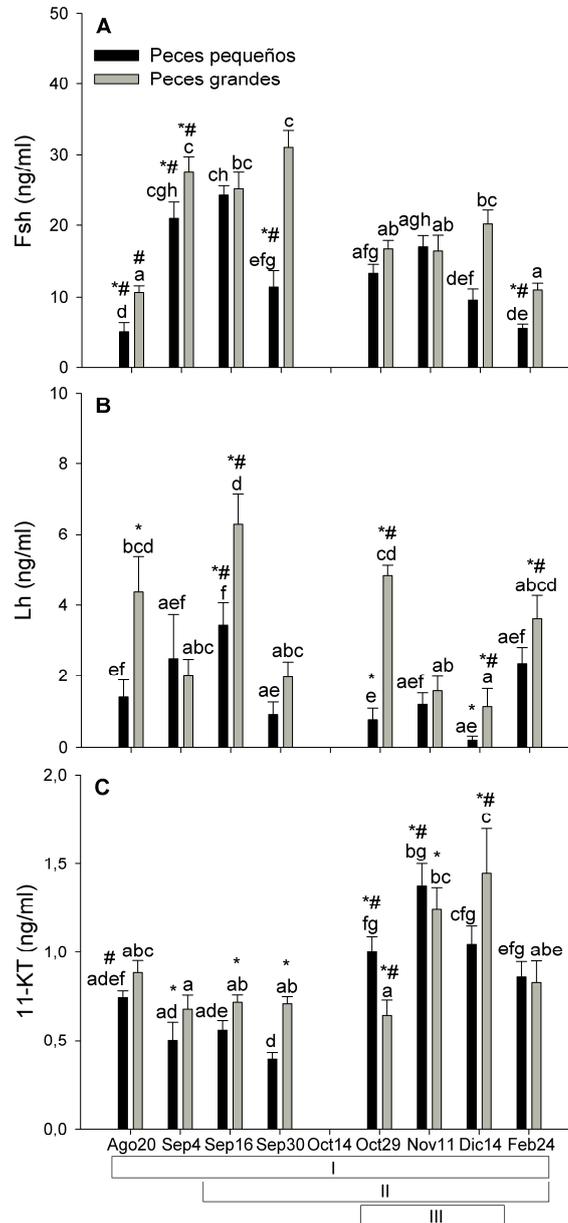
niveles plasmáticos de Fsh fueron elevados a principios y mediados de septiembre (fases inmadura y proliferativa temprana, respectivamente) (**Fig. 4.29A**). Después los niveles de Fsh disminuyeron significativamente en ambas poblaciones. Los peces pequeños presentaron niveles de Fsh en plasma significativamente menores que los peces grandes en agosto, finales de septiembre, diciembre y febrero (fases inmadura, proliferativa temprana y proliferativa media, respectivamente). Los peces grandes del grupo NP presentaron niveles superiores de Fsh en plasma a los encontrados en el grupo LL a principios de septiembre.

En los peces grandes, los niveles de Lh en plasma mostraron dos picos, uno a mediados de septiembre (fase proliferativa temprana) y el otro finales de octubre (fase proliferativa media) (**Fig. 4.29B**). En estos puntos de muestreo, los peces grandes tuvieron niveles significativamente mayores que los peces pequeños, además de en la fase inmadura (agosto). En los peces pequeños se observó un patrón de variación similar a la de los peces grandes, aunque sólo mostraron un único pico a mediados de septiembre (fase proliferativa temprana). Los peces grandes del grupo LL presentaron niveles superiores de Lh en plasma a los encontrados en el grupo NP durante agosto, mediados de septiembre y finales de octubre, mientras que en diciembre y febrero la relación fue inversa.

Los niveles de 11-KT de los peces grandes exhibieron un aumento en noviembre (fase proliferativa media) para alcanzar un pico en diciembre (fase proliferativa media). En cambio, los pequeños incrementaron sus valores a finales de octubre para alcanzar sus valores máximos en el mes siguiente (fase proliferativa media) (**Fig. 4.29C**). Los peces pequeños presentaron niveles significativamente mayores que los peces grandes durante la fase proliferativa media (finales de octubre), mientras que durante la fase proliferativa temprana (finales de septiembre) la relación fue inversa. Los peces grandes del grupo

## 4. Resultados y desarrollo argumental

LL presentaron niveles superiores de 11-KT en plasma a los encontrados en el grupo NP durante la segunda mitad de septiembre, finales de octubre y noviembre. Sin embargo, en diciembre la relación fue inversa.



**Figura 4.29** Niveles de Fsh (A), Lh (B) y 11-KT (C) en el plasma de los peces pequeños (barras negras) y grandes (barras grises) del grupo LL. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre puntos de muestreo y entre cada grupo experimental (peces pequeños o grandes). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre LL y NP (ver apartado 4.4.6, figura 4.22 y apartado 4.4.7, figura 4.23) para cada punto de muestreo. Las almohadillas (#) indican diferencias significativas entre LL y AP (ver apartado 4.5.6, figura 4.28) para cada punto de muestreo. Los estados de desarrollo testicular esperables en animales púberes, durante el periodo experimental, se representan como barras horizontales en la parte inferior de las gráficas. La descripción correspondiente a cada estado se indica en la **Tabla 4.7**.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

### Capítulo 4.6 Desarrollo argumental

#### 4.6.1 Interacción diferencial ligando-receptor del sistema Kiss/Gpr54 en la lubina

La primera indicación de la existencia del sistema Kiss/Gpr54 en peces se obtuvo tras el aislamiento del receptor *kiss1r* en tilapia (Parhar *et al.*, 2004). Desde entonces, este sistema se ha descrito en diversas especies de peces teleósteos. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde sólo está presente un gen *KISS1* y un gen *GPR54*, en varias especies de peces teleósteos y en otros vertebrados se ha observado que existen dos genes distintos que codifican kisspeptinas (*kiss1* y *kiss2*) y hasta 4 genes diferentes que codifican a sus receptores (*gpr54-1a*, *gpr54-1b*, *gpr54-2a* y *gpr54-2b*) (Biran *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Tena-Sempere *et al.*, 2012; Zohar *et al.*, 2010; Akazome *et al.*, 2010; Um *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). Por tanto, es de esperar, que la duplicidad de este sistema en peces, de lugar a una selectividad diferente de los ligandos por los receptores. Los ensayos funcionales *in vitro*, descritos en esta memoria y realizados para determinar la especificidad ligando-receptor del sistema Kiss/Gpr54 en la lubina, demuestran que las señales de los receptores Gpr54-1b y Gpr54-2b son transducidas tanto a través de la vía PKA, como de la vía PKC. Estos resultados coinciden con lo observado en pez cebra (Biran *et al.*, 2008), carpín dorado (Li *et al.*, 2009), medaka (Kanda *et al.*, 2013) y caballa (*Scomber japonicus*) (Ohga *et al.*, 2013). En el mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*) (Shi *et al.*, 2010) y en la rana toro (*Rana catesbeiana*) (Moon *et al.*, 2009) no hay activación de la vía de señalización PKA, de forma similar a lo observado en mamíferos (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001).

El receptor Gpr54-1b, con una unión preferencial al péptido Kiss1-15, responde con una elevada sensibilidad a los péptidos derivados del Kiss1. La estimulación de este receptor activó ambas rutas de señalización, pero la ruta cAMP/PKA fue más efectiva. En el caso

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

del receptor Gpr54-2b la interacción con los ligandos fue distinta, mostrando una discriminación clara entre las formas cortas y largas de los péptidos. Así, se observó mayor potencia y afinidad por las formas más largas, Kiss1-15 y Kiss2-12, que por los deca péptidos. El péptido Kiss2-12 provocó la activación más alta del receptor Gpr54-2b. En este caso, la activación del plásmido SRE-Luc fue similar a la del CRE-Luc. En conjunto, nuestros resultados indican que existen distintas preferencias de unión de los diferentes ligandos a estos receptores, así como diferentes niveles de activación de las vías de señalización estudiadas. Además, también se puede concluir que los péptidos más largos, Kiss1-15 y Kiss2-12, son activadores más potentes de los receptores de las kisspeptinas que los deca péptidos correspondientes, Kiss1-10 y Kiss2-12, como se ha descrito en pez cebra (Lee *et al.*, 2009), medaka (Kanda *et al.*, 2013) y caballa (Ohga *et al.*, 2013).

En definitiva, los péptidos derivados de Kiss2 tienen una mayor afinidad por el receptor Gpr54-2b, aunque dicho receptor también se puede activar por los péptidos derivados de Kiss1, aunque de forma menos eficiente. Por otro lado, el receptor Gpr54-1b parece tener preferencia por los péptidos derivados de Kiss1. Al contrastar nuestros resultados con los de otras especies de peces se observaron algunas diferencias con respecto a la actividad biológica *in vitro* de los pares ligando/receptor. En carpín dorado, se ha demostrado que el receptor Gpr54-1b se activaba con el deca péptido Kiss2, mientras que el receptor Gpr54-2b lo hace mediante el deca péptido Kiss1 (Li *et al.*, 2009). En conjunto, todos estos datos ponen en evidencia que en los teleósteos, existen diferentes niveles de activación para los pares Kiss/Gpr54.

Cuando coexisten dos receptores de kisspeptina en una misma especie, ambos pueden ser activados por los dos ligandos, aunque con diferentes potencias. Ello indica que hay una selectividad diferencial del ligando (Biran *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Li *et al.*

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

2009; Kanda *et al.*, 2013; Ohga *et al.* 2013; este estudio) que influencia las acciones fisiológicas (Felip *et al.* 2009, Kitashi *et al.* 2009, Li *et al.* 2009). Por otro lado, se ha observado que los péptidos derivados de Kiss1 presentan una elevada potencia en la activación del GPR54 humano. Sin embargo, el dodecapéptido Kiss2, que hasta el momento no se ha descrito en mamíferos, presenta una potencia similar a la observada para los péptidos derivados de Kiss1. En relación a la activación del receptor Gpr54 de ratón, el péptido Kiss1-15 muestra la mayor potencia, mientras que Kiss1-10 y Kiss2-12 tuvieron una potencia similar, aunque menor a la de Kiss1-15. La ya mencionada capacidad de los péptidos derivados de Kiss2 para activar el GPR54 humano apoyaría la existencia de un gen similar a *kiss2*, el cual se ha encontrado recientemente en la base de datos del genoma de primates, incluyendo humanos (Osugi *et al.*, 2013).

La distribución neuroanatómica de las células que expresan las kisspeptinas y sus receptores en lubina (Escobar *et al.* 2013a, 2013b) y en pez cebra (Servili *et al.* 2011), es coherente con la mayor potencia observada para los péptidos derivados de Kiss2 en la activación de Gpr54-2b. Mientras que el mRNA del receptor *gpr54-1b* presenta una expresión modesta en regiones limitadas del cerebro, el del receptor *gpr54-2b* muestra una distribución amplia, además de altos niveles de expresión en el cerebro anterior, medio y posterior (Servili *et al.* 2011, Escobar *et al.* 2013b). Al igual que el pez cebra, la lubina presenta células Kiss2 inmunoreactivas en el telencéfalo central y en la región que rodea el receso lateral del hipotálamo, donde se observan neuronas que expresan el receptor *gpr54-2b* (Escobar *et al.* 2013b). Por ello, se ha sugerido que en estas regiones cerebrales, el Kiss2 puede ser el ligando biológicamente activo del receptor Gpr54-2b (Escobar *et al.* 2013b), apoyando así los resultados obtenidos en la presente memoria.

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

### 4.6.2 En la lubina, el cerebro anterior-medio (FB-MB) actúa como una ruta de señalización endocrina del sistema Kiss2/Gnrh1 en el control de la actividad gonadotropa

La presente memoria proporciona la primera evidencia, en una especie de teleosteo, de la implicación de las áreas neuroendocrinas del FB-MB, el telencéfalo y el área preóptica, en el control del eje reproductivo vía Kiss2/Gnrh1. Este hallazgo ha sido posible gracias a que la inyección i.c.v. de Kiss2 en machos de lubina modificó los niveles de expresión de *gpr54-2b*, *gnrh1* y *gnrh2* en el FB-MB. Consecuentemente, la administración central de Kiss2 provocó la secreción de Gnrh1 desde, al menos, el FB-MB, dando lugar a niveles elevados de Lh y T en plasma. Esto tuvo como consecuencia un incremento en la cantidad de volumen espermático y calidad del espermatozoide. Estos resultados sugieren que la administración central de péptidos es la forma más adecuada para estudiar el papel de las kisspeptinas cerebrales en la función reproductiva y sus diferentes rutas de señalización endocrina. En los peces hasta el momento, la mayoría de los estudios, con tratamientos sistémicos de kisspeptina, a corto plazo *in vivo*, se han centrado principalmente en los efectos, a nivel de cerebro-hipófisis (Filby *et al.*, 2008; Felip *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010; Zmora *et al.*, 2012). Otros estudios, también *in vivo*, han examinado las respuestas a nivel gonadal después de la administración sistémica de kisspeptinas a corto (Selvaraj *et al.*, 2013) y a largo plazo (Beck *et al.*, 2012; Nocillado *et al.*, 2013; Zmora *et al.*, 2014). Sin embargo, todos estos estudios sólo han proporcionado resultados parciales del efecto de las kisspeptinas en la expresión de *gnrh*, en la secreción o expresión de las gonadotropinas y/o en el estado gonadal. Además, la administración sistémica podría enmascarar la señalización real de las kisspeptinas en el cerebro, debido a la acción que ejercen estos neuropéptidos sobre la hipófisis (ver apartados 4.3.2 y 4.6.3). Hasta la fecha, el efecto directo de las

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

kisspeptinas sobre el cerebro de peces sólo se ha estudiado en un trabajo (Ohga *et al.*, 2014). Por lo que, los mecanismos moleculares y endocrinos de las kisspeptinas cerebrales implicados en la reproducción de los peces todavía no son muy conocidos.

Los resultados de esta memoria muestran que Kiss1-15 and Kiss2-12 provocaron un aumento de los niveles de expresión del gen *gpr54-2b* en el FB-MB. En este sentido y como se ha comentado anteriormente, en el telencéfalo central de la lubina se ha descrito una superposición entre las células que expresan el gen del receptor *gpr54-2b* y las fibras de Kiss2 (Escobar *et al.*, 2013b). Además, este hecho es consistente con los resultados obtenidos *in vitro* que muestran que el receptor Gpr54-2b de lubina se activa de manera eficiente por ambos péptidos, Kiss1-15 y Kiss2-12, aunque preferentemente por Kiss2-12. Así, nuestros datos sugieren que el neuropéptido Kiss2, presente en las células del área preóptica (Escobar *et al.*, 2013a), es el ligando biológicamente activo de las células que expresan el receptor *gpr54-2b* en las áreas neuroendocrinas del FB-MB, por lo que este se podría considerar como un regulador neuroendocrino potencial de la actividad hipofisaria. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en el FB-MB de la lubina no existen evidencias neuroanatómicas de la superposición entre las fibras Kiss1 y las células que expresan el receptor *gpr54-2b* y por tanto, los efectos estimulantes de la administración de Kiss1 sobre los niveles de expresión de este receptor en el FB-MB podrían ser farmacológicos y poco relevantes desde un punto de vista fisiológico. Sin embargo, la expresión de ambos genes *gpr54-1b* y *gpr54-2b* en la otra área neuroendocrina del cerebro estudiada, el hipotálamo, no se vio afectada por ningún tratamiento. Por otro lado, la administración de ambos péptidos provocó una disminución de los niveles de expresión de *gnrh1* y *gnrh2* en el FB-MB, aunque no afectó a los niveles de expresión de *gnrh1* hipotalámico. En la lubina, el transcrito de *gnrh1* tiene una amplia distribución en las áreas neuroendocrinas del FB-MB

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

(González-Martínez *et al.*, 2002a), aunque otro estudio en esta misma especie no logró demostrar la presencia de mRNA de *gpr54-2b* en las células Gnrh1. Esto sugiere que las neuronas Gnrh1 del FB-MB no constituyen un objetivo directo de las kisspeptinas (Escobar *et al.*, 2013b). No obstante, algunas neuronas Gnrh1 se encontraban situadas muy cerca, prácticamente en contacto directo, con las células que expresan *gpr54-2b* y, por tanto, no se puede descartar que Kiss2 tenga un papel indirecto en la modulación de la liberación de Gnrh1. Tomando en cuenta todos estos datos, nuestros resultados indican que Kiss2 puede actuar a través de, al menos, dos mecanismos diferentes para modular la regulación central de la función reproductiva. En esta misma línea y en primer lugar, en la lubina americana, una especie muy cercana a la lubina, a nivel hipotalámico, en el núcleo del receso lateral, se han visto poblaciones neuronales de Kiss2, que probablemente actúan sobre las inervaciones de Gnrh1 del núcleo tuberal lateral y de la NH, mientras que las poblaciones neuronales de Kiss1 y Kiss2 del núcleo lateral tuberal probablemente actúan sobre los axones Gnrh1 y sobre las células gonadotropas (Zmora *et al.*, 2014). Además, en la lubina se ha encontrado una inervación prominente de Kiss2 en la NH, al nivel de la PPD (Escobar *et al.*, 2013b). Estos datos sugieren que existe una ruta de señalización hipotalámica funcional de Kiss2 que controla la actividad de las células gonadotropas (Zmora *et al.*, 2014), a pesar de que ésta no se vio afectada por la inyección i.c.v. de Kiss2 (ver apartado 4.2.1). En este sentido, en el hipotálamo mediobasal se han observado células que expresan el gen del receptor de estrógenos *erb2* muy cerca de células que expresan *kiss2* y, por tanto, es posible que en esta área se encuentren células Kiss2, cuya expresión se vea afectada por células *erb2* (Escobar *et al.*, 2013a). Así pues, es posible que la ruta de señalización hipotalámica del sistema Kiss2/Gnrh1 esté regulada por un sistema de retroalimentación esterooidal, que podría depender del estado de desarrollo gonadal. En segundo lugar, en

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

el FB-MB se observó un efecto claro del tratamiento con Kiss2 sobre los niveles de expresión de *gpr54-2b*, *gnrh1* y *gnrh2*. Esto podría indicar que las áreas neuroendocrinas del FB-MB son parte de una segunda ruta de señalización endocrina, donde las poblaciones neuronales de Kiss2, presentes en el área preóptica (Escobar *et al.*, 2013a), estarían implicadas en la regulación de la actividad gonadotropa y, por tanto, en la función reproductiva.

Como ya se ha comentado, la administración central de Kiss1 y Kiss2 fue responsable de la disminución de los niveles de expresión de *gnrh1* y *gnrh2* en el FB-MB. En teleósteos, algunos estudios farmacológicos describen cambios en los niveles de expresión cerebral de *gpr54* y *gnrh* después de la administración exógena de ambas formas de kisspeptina. Por ejemplo, la administración central de los dos péptidos, Kiss1-15 o Kiss2-12, disminuyó los niveles de expresión de *gnrh1* en el cerebro de las hembras de caballa (Ohga *et al.*, 2014). De igual forma, la administración sistémica crónica de Kiss2 provocó una disminución de los niveles de expresión de las tres formas de *gnrh* en el cerebro de la lubina americana (Zmora *et al.*, 2014). Sin embargo, en otros estudios se ha observado un aumento de los niveles de expresión de *gpr54* y *gnrh* en el cerebro en respuesta a la administración de kisspeptina exógena. Así, la inyección intraperitoneal de Kiss-10 de mamíferos provocó un aumento de los niveles de expresión de *gpr54-1b* y *gnrh3* (Gnrh hipofisiotrópica en ciprínidos) en el cerebro de la carpita cabezona (*Pimephales promelas*), en pubertad temprana y media (Filby *et al.*, 2008). De la misma forma, la inyección intraperitoneal de Kiss2-10 aumentó los niveles de expresión de *gnrh1* en el hipotálamo del mero de pintas naranjas (Shi *et al.*, 2010). Por otro lado, el péptido Kiss2-12 provocó un aumento de la expresión de *gnrh1* y *gpr54-2b* en ejemplares pre-púberes de lubina híbrida (hembras de lubina americana *Morone saxatilis* × machos lubina blanca *Morone chrysops*), mientras que el péptido

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Kiss1-15 sólo aumentó los niveles de expresión de *gnrh1*. En cambio, durante el desarrollo gonadal, Kiss2-12 provocó la disminución de los niveles de expresión de *gnrh1* y *gpr54-2*, mientras que Kiss1-15 sólo disminuyó los de *gpr54-2b* (Zmora *et al.*, 2012). Todas estas observaciones sugieren que el mecanismo mediante el cual las kisspeptinas estimulan o inhiben la expresión de *gpr54* y *gnrh* puede depender del estado gonadal. En este sentido, se sabe que en la lubina americana puberal existe un sistema de retroalimentación esteroideal positiva sobre la *gnrh1* mientras que durante la recrudescencia gonadal esta retroalimentación es negativa (Klenke, 2006).

En mamíferos está demostrado que la administración de kisspeptinas estimula la secreción de la Gnrh en el fluido cerebroespinal de la oveja (Messenger *et al.*, 2005b). En peces, hasta el presente este efecto no se conocía, y por tanto, los resultados descritos en esta memoria constituyen, por primera vez en una especie de teleosteo, una evidencia fisiológica clara de la acción del Kiss2 sobre la secreción de Gnrh1. En este estudio hemos visto que la administración central de Kiss2 provocó un aumento significativo del contenido hipotalámico de Gnrh1 6h después del tratamiento pero, como se ha descrito anteriormente, no se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de expresión de *gnrh1* en esta misma área, donde se encuentra una pequeña población de células Gnrh1 (González-Martínez *et al.*, 2001). Esto sugiere que el aumento del contenido de Gnrh1 hipotalámico podría corresponder a Gnrh1 circulante, liberada en las fibras hipotalámicas en respuesta al tratamiento con Kiss2, procedente de las poblaciones neuronales de Gnrh1 del telencéfalo ventral y área preóptica. Además, se ha descrito que la hipófisis de lubina recibe una fuerte innervación de las fibras Gnrh1 que provienen del telencéfalo ventral y área preóptica (González-Martínez *et al.*, 2002a), lo cual apoya la hipótesis de que las áreas neuroendocrinas del FB-MB son parte de una ruta de señalización endocrina del sistema Kiss2/Gnrh1 implicado en la regulación

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

central de la actividad gonadotropa. Por otro lado, en los peces tratados con Kiss1-15, la Gnrh1 hipofisiaria aumentó 12h después de la inyección pero, en los peces tratados con Kiss2-12 no hubo ningún efecto, aunque no se puede descartar la posibilidad de que la Gnrh1 hipofisiaria alcanzara su punto máximo antes de 6h o entre las 8 y las 12 horas después de la inyección de Kiss2-12.

Los datos descritos en el apartado 4.2.3 muestran que a las 12h post-inyección, la expresión hipofisiaria de *gnrhr-II-1a*, que se localiza en todas las células Lh y en algunas Fsh (González-Martínez *et al.*, 2004a), fue significativamente menor en los peces tratados con Kiss2-12 en comparación con el control y los tratados con Kiss1-15. Curiosamente, en este mismo punto de muestreo, los animales tratados con Kiss2-12 también mostraron un incremento de los niveles plasmáticos de 11-KT lo que sugiere que en peces, al igual que en mamíferos, este receptor de la Gnrh puede ser sensible a los esteroides sexuales (Hapgood *et al.*, 2005).

A lo largo del periodo de desarrollo gonadal de la lubina se han observado diferencias en los niveles de expresión génica cerebral del sistema kisspeptina, lo cual sugiere que es posible que las dos formas de kisspeptina estén implicadas de manera diferencial en eventos tempranos o tardíos de la gametogénesis (Alvarado *et al.*, 2013). En el presente estudio, la administración i.c.v. de Kiss2-12 generó un efecto más potente y de larga duración en la liberación de Lh que el tratamiento con Kiss1-15. Estos niveles elevados de Lh en plasma pueden estar correlacionados con la liberación de Gnrh1, ya descrita. De hecho, en lubinas maduras, tanto las formas nativas de Gnrh como las modificadas, inducen, de manera efectiva, la secreción de Lh, *in vivo* e *in vitro* (Forniés *et al.*, 2003). Además, se ha visto que la estimulación de la síntesis de Lh, mediada por la Gnrh1, podría ser un mecanismo relevante en la modulación de la primera maduración de esta especie (Rodríguez *et al.*, 2000b). Los resultados de esta memoria apoyan el papel de la

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Lh sobre las fases finales de la maduración de los gametos y espermiación de la lubina, tal como se había sugerido previamente (Rocha *et al.*, 2009). Por otro lado, algunos estudios en peces teleósteos corroboran este efecto estimulador de las kisspeptinas sobre la síntesis y/o secreción de las gonadotrofinas. En este sentido, una sola inyección i.c.v. de Kiss2-12 aumentó los niveles de expresión de las subunidades *fsh $\beta$*  y *lh $\beta$*  en la hipófisis de machos y hembras de caballa (Ohga *et al.*, 2014). Sin embargo, este estudio sólo midió los niveles de expresión génica y, por tanto, no es posible discernir los efectos de las kisspeptinas sobre la secreción de las gonadotrofinas. Otros estudios en peces han analizado la liberación de gonadotrofinas tras la administración sistémica de kisspeptinas (Li *et al.*, 2009; Felip *et al.*, 2009, Kitahashi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010; Filby *et al.*, 2008; Zmora *et al.*, 2012; Zmora *et al.*, 2014). Aunque no se puede descartar que la secreción de gonadotrofinas tras la administración sistémica, observada en estos estudios, sea debida, al menos en parte, al efecto directo de las kisspeptinas sobre las células gonadotropas. En este aspecto, la administración sistémica de Kiss2-12, pero no Kiss1-15, en lubinas híbridas prepuberales provocó un incremento de los niveles plasmáticos de Lh, mientras que durante el estado de desarrollo gonadal medio, ambos péptidos, Kiss1-15 y Kiss2-12, indujeron la secreción de Lh (Zmora *et al.*, 2012). Todas estas observaciones sugieren que en las distintas especies de lubina (Moronidae) los péptidos derivados de Kiss2 son más potentes induciendo la liberación de Lh que los péptidos derivados de Kiss1, tanto a nivel periférico (Felip *et al.*, 2009; Zmora *et al.*, 2012) como cerebral (este estudio). Aunque, la potencia relativa de los péptidos derivados de Kiss1 o Kiss2 sobre la liberación de Lh, depende de la especie. Esto explica por qué, en el carpín dorado, la administración de Kiss1-10 aumentó los niveles de Lh en plasma, mientras que no se observó efecto alguno después del tratamiento con Kiss2-10 (Li *et al.*, 2009).

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Tal como se expone en los resultados, y contrariamente a los efectos de Kiss1-15 y Kiss2-12 sobre la liberación de Lh, la administración de ambos péptidos no se tradujo en ningún aumento de Fsh en plasma. Sin embargo, en un estudio previo llevado a cabo con lubina prepuberal, en el grupo de Fisiología de Reproducción de Peces, si se observó secreción de Fsh 60 minutos después de la inyección sistémica de Kiss2-10 (Felip *et al.*, 2009). La discrepancia entre ambos estudios probablemente se debe a diferencias en el estado de desarrollo testicular de los animales experimentales. Así, mientras que el tratamiento de peces prepuberales con Kiss2-10 estimuló la secreción de Fsh en plasma, la de la forma más larga, Kiss2-12, a peces espermiantes fue incapaz de provocar su liberación. Estos resultados, estarían de acuerdo con el hecho de que en la lubina, la Fsh juega un papel importante en la regulación de las fases tempranas y medias de la espermatogénesis, incluyendo la proliferación de células del testículo (Molés *et al.*, 2012; Mazón *et al.*, 2014). Además, hay que considerar que en este estudio previo se usó un tratamiento sistémico y, por tanto, no se puede descartar la posibilidad de un efecto directo de Kiss2-10 sobre la hipófisis.

La administración de Kiss2-12 provocó un aumento muy importante de Lh, que a su vez generó una elevación de andrógenos en plasma (T y 11-KT). Sin embargo, la liberación de Lh, provocada por la administración de Kiss1-15, no fue suficiente para generar un aumento adecuado de los niveles de andrógenos plasmáticos. Este resultado apoya la hipótesis de que el efecto de la administración central de Kiss1-15 podría ser farmacológico e irrelevante desde un punto de vista fisiológico. Este efecto estimulador de las kisspeptinas sobre los andrógenos, mediado por la Lh, se ha descrito en machos de caballa prépuberes tratados con Kiss1-15, que mostraron niveles de 11-KT significativamente mayores que los no tratados (Selvaraj *et al.*, 2013). En conjunto, los datos del presente estudio, en lubina, sugieren que el efecto del Kiss2 sobre la liberación

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

de T y 11-KT se lleva a cabo a través de la vía GnRH1/Lh. La capacidad de las kisspeptinas para estimular la liberación de T en plasma también se ha descrito en mamíferos (Patterson *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2004; Ramaswamy *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2012). En ratas macho, la administración central y periférica de Kiss1-10 aumentó los niveles de T en plasma (Patterson *et al.*, 2006), mientras que en cabras machos pre- y post-púberes, la administración intravenosa de Kiss1-10 aumentó los niveles de T en plasma, después de un aumento en la concentración de LH plasmática, (Saito *et al.*, 2012). Por otro lado, en ratón, el efecto de Kiss1-10 sobre la liberación de T fue completamente bloqueado por la Acilina, un antagonista de la GnRH (Mikkelsen *et al.*, 2009).

En peces teleósteos, es bien conocido el papel específico de la Lh sobre la regulación de la producción de andrógenos en los testículos (Ueda *et al.*, 1985; Planas y Swanson, 1995; Kagawa *et al.*, 1998). Por ejemplo, en cultivos *in vitro* de testículos de salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), en estado de espermatogénesis avanzada, la Lh provocó la liberación de 11-KT (Planas y Swanson, 1995). De igual forma, esta misma gonadotrofina provocó un aumento de los niveles de 11-KT en testículos de dorada japonesa (*Pagrus major*) cultivados *in vitro* durante la época de puesta (Kagawa *et al.*, 1998). Por otra parte, la inyección intraperitoneal de estos andrógenos, T y 11-KT, indujo la espermiación *in vivo* en el carpín dorado (Ueda *et al.*, 1985). Todas estas observaciones están de acuerdo con los datos de esta memoria, donde sólo la administración de Kiss2-12 en cerebro provocó una liberación potente de Lh en plasma, junto con una elevación exclusiva de andrógenos plasmáticos (T y 11-KT). El incremento de T plasmática fue mucho mayor y evidente que el de 11-KT que fue más leve y discreto. En este sentido, se sabe que el perfil de la 11-KT plasmática en lubinas europeas macho maduras, muestra niveles altos durante la recrudescencia media y

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

desciende cuando empieza la espermiación (Rocha *et al.*, 2009) y de hecho, se ha visto que la 11-KT no juega un papel relevante durante el transcurso de la espermiación de esta especie (Mañanós *et al.*, 2002; Mazón *et al.*, 2013). Los niveles altos de andrógenos en plasma dieron lugar a un aumento significativo de la densidad del esperma acumulado tras 3 días de tratamiento, y del volumen espermático acumulado a los 3 y 7 días después de la inyección. Debido a este aumento del volumen, el esperma estaba más diluido a los 7 días de tratamiento, lo cual probablemente favoreció una mejor calidad del esperma. Así, el aumento de volumen del esperma puede ser debido a la hidratación del esperma con la consiguiente dilución de la densidad espermática. Por otro lado, la liberación de Lh generada por Kiss1-15 no fue suficiente para aumentar el nivel plasmático de los andrógenos, y consecuentemente el volumen de esperma. En la lubina, hay varios estudios que demuestran la implicación de la Lh y T en la producción de esperma. La administración sostenida de un análogo de la GnRH aumentó el volumen del esperma (Sorbera *et al.*, 1996) y los niveles de Lh, pero no la densidad espermática (Mañanós *et al.*, 2002). Por su parte, la terapia plasmídica de Lh dio lugar a niveles altos sostenidos de Lh circulante y a un aumento de la producción de esperma (Mazón *et al.*, 2013). De acuerdo con estos estudios de administración sostenida de GnRH o Lh, el aumento en el volumen de esperma acumulado provocado por la administración central de Kiss2-12, se puede asociar con un aumento precoz de la densidad del esperma tres días después de la inyección.

Nuestros resultados muestran que en los peces tratados con Kiss2-12, hay un aumento de los parámetros de motilidad del esperma. Este tratamiento dio lugar un porcentaje mayor de espermatozoides rápidos (5,2 veces) y menor de espermatozoides inmóviles (1,3 veces) que el grupo control. Al encontrarse en un medio acuoso, los espermatozoides de los peces se pueden mover en tres dimensiones, por lo que su

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

trayectoria es más curvada que la de los espermatozoides de los mamíferos (Kime *et al.*, 2001). Por ello, en los peces teleósteos, los parámetros curvilíneos de los espermatozoides pueden ser indicadores esenciales de la fertilidad, a diferencia de los mamíferos, donde la velocidad rectilínea (VSL) es el principal indicador de fertilidad (Moore y Akhondi, 1996). En este estudio, los espermatozoides rápidos de los peces tratados con Kiss2-12 mostraron valores más elevados de VCL, VSL y VAP que los del grupo control, lo que sugiere que el esperma de los peces tratados con Kiss2-12 puede tener una mayor capacidad fertilizante. Esto se confirma por el hecho de que los valores de ALH y BCF de los espermatozoides progresivos moderados fue mayor en los peces tratados con Kiss2-12, ya que en estudios previos se observó que en los espermatozoides de peces, valores altos de BCF están correlacionados con una capacidad mayor de fertilización (Billard *et al.*, 1992).

De los resultados obtenidos, se puede concluir que en la lubina el sistema neuronal Kiss2 está implicado en la regulación central de la función reproductiva. Teniendo en cuenta las numerosas herramientas disponibles para estudiar, a nivel molecular y celular, los sistemas endocrinos en esta especie, el cerebro de lubina constituye un excelente modelo para el estudio de su fisiología. Además, se puede concluir que la administración central de kisspeptinas es la forma más adecuada para estudiar el papel de estos péptidos cerebrales sobre la función reproductiva y sus diferentes rutas de señalización endocrina. En este estudio se proporciona la primera evidencia de que los efectos de Kiss2 sobre la regulación central de la función reproductiva pueden estar mediados a través de una ruta de señalización endocrina presente en las áreas neuroendocrinas del FB-MB de los peces teleósteos. Así, el FB-MB y el hipotálamo pueden actuar como dos centros reproductivos implicados en la regulación de la actividad hipofisaria. Estos resultados también proporcionan, por primera vez en una

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

especie de teleosteo, una evidencia fisiológica de la acción directa de las kisspeptinas sobre la secreción de la Gnrh1. El claro efecto de Kiss2 sobre los niveles de expresión de *gpr54-2b* y *gnrh1* en el FB-MB y probablemente sobre la secreción de Gnrh1, sugiere que este sistema neuronal está involucrado en la regulación neuroendocrina de la actividad gonadotropa. Esta hipótesis se confirma por la potente secreción de Lh en el plasma de los peces tratados con Kiss2-12. Este incremento de Lh plasmática es probablemente el responsable de la fuerte estimulación de la secreción de andrógenos y de las variaciones en los parámetros de la calidad del esperma.

### **4.6.3 En la lubina, el neuropéptido Kiss2 regula la función de las células gonadotropas a través de una ruta de señalización paracrina/autocrina**

La implicación de las kisspeptinas hipotalámicas en el control de la reproducción se ha demostrado en varios estudios realizados en peces, pero hasta hace poco no se habían iniciado estudios a cerca de las posibles funciones fisiológicas de las kisspeptinas a nivel hipofisario. En este sentido, en peces, el número de estudios acerca de la acción directa de las kisspeptinas sobre la liberación de Lh por parte de las células gonadotropas es muy limitado (Yang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012). Por tanto, en peces teleosteos, para conocer la función de las kisspeptinas sobre el control directo de las células gonadotropas todavía se precisan más evidencias experimentales.

En el estudio con células hipofisarias dispersas de machos espermiantes de lubina (ver apartado 4.3) se ha realizado un análisis inicial mediante qPCR para conocer los niveles de expresión de los genes que constituyen el sistema kisspeptina en las hipófisis de los animales experimentales. Los niveles expresión obtenidos para los genes de los receptores, *gpr54-1b* y *gpr54-2b*, en las células dispersas de la hipófisis, coincide con lo que ya se describió anteriormente en hipófisis enteras de machos de la misma especie

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

(Alvarado *et al.*, 2013). En este sentido también se ha detectado expresión de *gpr54-1b* en las células gonadotropas de carpín dorado utilizando RT-PCR junto con microdissección con laser de captura (Yang *et al.*, 2010). La presencia de los receptores de kisspeptinas en la hipófisis de varias especies de peces teleósteos sugiere que este sistema puede estar implicado en el control directo de la función gonadotropa. Sin embargo, nuestros resultados con células dispersas de hipófisis de machos de lubina muestran que tan sólo el gen de un ligando, *kiss2*, se expresa a niveles detectables por qPCR. Estos resultados son coherentes con los descritos en hipófisis enteras de machos de lubina, donde la expresión de *kiss2* era 100 veces más elevada que la de *kiss1* (Alvarado *et al.*, 2013). Por el contrario, en otro estudio, con esta misma especie, se detectó, mediante HIS, presencia de transcritos de *kiss1* en la PPD de la hipófisis (Escobar *et al.*, 2013a), los cuales han sido indetectables por qPCR en este estudio. Esta discrepancia podría ser debida al carácter disperso de estas células dentro de la hipófisis y, por tanto, puede que los niveles de expresión se encuentren por debajo del límite de detección del ensayo qPCR. Sin embargo, cabe resaltar que en las especies de peces con dos genes *kiss*, la importancia relativa de la expresión de *kiss1* o de *kiss2*, a nivel de la hipófisis, depende de la especie. Por ejemplo, en las hipófisis de machos de caballa, los niveles de expresión de *kiss2* estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo qPCR, mientras que *kiss1* presentó altos niveles de expresión (Selvaraj *et al.*, 2010).

En el estudio *in vitro* realizado en esta memoria se demuestra la estimulación directa de las células dispersas de la hipófisis por el péptido Kiss2-12. En primer lugar, y más específicamente, Kiss2-12 provocó una liberación significativa de Lh en las células gonadotropas dispersas, de manera dosis-dependiente, mientras que el péptido Kiss1-15 no alteró la liberación de dicha gonadotropina, en las condiciones experimentales utilizadas. Por otro lado, Kiss2-12 también indujo una liberación baja pero significativa

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

de Fsh, a dosis equivalentes a las eficaces para la secreción de Lh. Sin embargo, el péptido Kiss1-15 tampoco fue capaz de inducir la secreción de Fsh. En consecuencia, nuestros datos demuestran que Kiss2 está implicado en la modulación directa de la secreción de gonadotrofinas durante la maduración testicular y espermiogénesis de lubina. Curiosamente, la liberación de Lh fue mayor y más sostenida que la de Fsh. En este sentido, se conoce por trabajos previos en lubina que durante el periodo de espermiación completa los niveles de expresión de las subunidades de ambas gonadotrofinas (Mateos *et al.*, 2003) y los de proteína de estas hormonas (ver apartados 4.4.6 y 4.6.4) presentan valores elevados. Teniendo en cuenta estos datos, nuestros resultados sugieren que existen mecanismos diferenciales de regulación de la secreción de Lh y Fsh mediada por Kiss2. Anteriormente se ha visto que Kiss1-15 no tuvo efecto sobre la secreción de gonadotrofinas. Sin embargo, un estudio previo en esta misma especie demostró por HIS que los transcritos *kiss1* están localizados en la mayoría de las células Fsh-ir presentes en la hipófisis (Escobar *et al.*, 2013a). Por ello no se puede descartar un posible papel directo de Kiss1 sobre la modulación de las células gonadotropas durante la fase de proliferación testicular, o incluso, un control transcripcional similar de *kiss1* y *fsh $\beta$* .

En carpín dorado, se observó que su decapeptido Kiss1 (gKiss1-10) puede estimular *in vitro* la liberación de Lh en cultivo primario de células hipofisarias (Yang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012). Al igual que *in vitro*, la administración sistémica *in vivo* de gKiss1-10 en carpín dorado, también aumentó significativamente los niveles de Lh en plasma, pero el gKiss2-10 no alteró los niveles de esta hormona (Li *et al.*, 2009). Estos datos demuestran que el Kiss1 juega un papel importante en la modulación de eje reproductivo del carpín dorado. Por el contrario, las inyección central (ver apartados 4.2.4, 4.2.5 y 4.6.2) y periférica (Felip *et al.*, 2009) de Kiss2 de lubina indujo la

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

secreción de gonadotrofinas de manera más efectiva que la administración de Kiss1. Estos resultados, junto con el efecto estimulador de Kiss2 en la secreción de Lh y Fsh observado en los cultivos de células hipofisiarias de machos de lubina, sugieren que Kiss2 es un factor neuroendocrino importante, implicado en la regulación de la reproducción a través de su eje gonadotropo.

En esta memoria se presenta, además, un estudio inmunohistoquímico cualitativo que constituye la primera descripción de la naturaleza de las células Kiss2 de la hipófisis de peces teleósteos. En este estudio, lo primero que se observó fue la abundancia de células Kiss2, intensamente teñidas, en la PPD de la hipófisis de machos de lubina. Estos datos coinciden con los observados en la hipófisis del pez cebra, donde se vieron células Kiss2-ir aunque de naturaleza desconocida (Servili *et al.*, 2011). Además, la PPD de lubina es un sitio de expresión del receptor *gpr54-1b* (Escobar *et al.*, 2013b). Todos estos datos, junto con el hecho de que las células Lh y Fsh también se encuentren en la PPD (González-Martínez *et al.*, 2004a), apoyan la hipótesis de que el sistema kisspeptina está implicado en el control directo de la función gonadotropa. Por otro lado, en este estudio el uso de la doble IHC con anticuerpos específicos de lubina para Fsh $\beta$  y Lh $\beta$ , demuestra que tanto en animales inmaduros, como en espermiación completa, las células Kiss2-ir co-localizan, principalmente, con las células Lh $\beta$ -ir. No obstante, en estado de espermiación completa, el anticuerpo anti-Kiss2 sólo tiñó levemente algunas células Fsh-ir. La falta de co-localización entre Kiss2 y Fsh en estado inmaduro se podría deber a que en este estado testicular, los niveles de expresión (Mateos *et al.*, 2003) y de proteína (ver apartados 4.4.6 y 4.6.4) de las dos subunidades de gonadotrofinas son mínimos. No obstante, la presencia de Kiss2 en las células gonadotropas y el efecto estimulador claro de Kiss2-12 sobre la secreción de las gonadotrofinas por células de la hipófisis de lubina, en cultivo, proporcionan una

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

evidencia clara de que Kiss2 está implicado en el proceso reproductivo de peces teleósteos a través de sus acciones como una hormona autocrina/paracrina hipofisaria. También se detectó una inervación prominente de fibras Kiss2 en la NH y al mismo nivel de la PPD, que es coherente con lo observado anteriormente en lubina (Escobar *et al.*, 2013b) y lubina americana (Zmora *et al.*, 2014), donde se vio una inervación masiva de Kiss2 que se distribuye a través de la NH. Curiosamente, en esta última especie, estas proyecciones axonales de Kiss2 inervan las células gonadotropas (Zmora *et al.*, 2014). Estos datos sugieren que el Kiss2 también opera como un neuropéptido hipofisiotrópico que podría participar en la modulación de la función de las células gonadotropas. Por otro lado, se sabe que las fibras de Gnrh1GAP-ir presentes en la NH alcanzan la PPD y el borde de la PI de la hipófisis (González-Martínez *et al.*, 2002a). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que a pesar de que las proyecciones axonales de Kiss2 también penetran en la NH y alcanzan la PPD, en general, se localizan en áreas diferentes de la PPD, respecto a la distribución de las fibras Gnrh1GAP-ir, sugiriendo que ambos axones terminales podrían alcanzar diferentes regiones de la PPD. Estas observaciones indican que Kiss2 también podría estar implicado en la regulación de otras funciones hipofisarias. En este sentido, ya se ha descrito la implicación de las kisspeptinas en el sistema somatotropo de mamíferos (Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2007; Luque *et al.*, 2011). No obstante, también se observaron algunas de las proyecciones de Kiss2 en la misma zona de la NH que las proyecciones hipofisiotrópicas de la Gnrh1. Estos resultados apoyan la hipótesis de que Kiss2 podría actuar como un neuropéptido hipofisiotrópico implicado en el control de la actividad gonadotropa (Zmora *et al.*, 2014). En resumen, los resultados de este estudio indican que Kiss2 podría actuar a través de una ruta de señalización adicional a la ya descrita para modular directamente la función de las células gonadotropas. Así, aparte de actuar

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

como un neuropéptido hipofisiotrópico, el Kiss2 podría hacerlo como un factor autocrino/paracrino implicado en el control de la función reproductiva a nivel hipofisario.

En perciformes la *Gnrh1* es el factor neuroendocrino hipofisiotrópico más importante implicado en la estimulación de la secreción de las gonadotrofinas (Powell *et al.*, 1994; Zohar *et al.*, 1995; Gothilf *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1998; Senthilkumaran *et al.*, 1999). Para estudiar si existía alguna relación en las acciones de estos neuropeptidos, implicados en la liberación de las gonadotrofinas, se examinaron las interacciones entre las dos formas de las kisspeptinas, Kiss1-15 y Kiss2-12 y de un análogo de la GnRH (LHRHa) sobre la secreción de Lh y Fsh. Se usó el análogo de la GnRH por su capacidad para inducir la secreción de Lh, de manera dosis-dependiente, en células dispersas de hipófisis de lubina (Forniés *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos demuestran que la estimulación de la liberación de Lh ejercida por Kiss2-12 es claramente menor que la del análogo LHRHa. Sin embargo, la secreción de Lh por estimulación con Kiss2 fue aditiva a la de la acción del análogo LHRHa, al igual que se ha visto en otros estudios con peces (Chang *et al.*, 2012) y mamíferos (Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2007; Luque *et al.*, 2011). Por ejemplo, en cultivos primarios de hipófisis de carpín dorado, el co-tratamiento con gKiss1-10 y *Gnrh3* aumentó la secreción de Lh de una manera significativa con respecto a la obtenida con gKiss1-10 o *Gnrh3* por separado (Chang *et al.*, 2012). Todo ello apoya e indica que en la lubina el efecto directo de Kiss2 sobre la secreción de Lh es independiente de la acción de la GnRH.

El contenido de gonadotrofinas en la hipófisis y el ambiente hormonal que rodea a las células hipofisarias varían con el estado de desarrollo gonadal. Por tanto, los efectos estimuladores de las kisspeptinas sobre la secreción de gonadotrofinas también pueden variar dependiendo del entorno hormonal de las células y del contenido de

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

gonadotrofinas en la hipófisis. Los resultados presentados en el apartado 4.3.4 muestran que la presencia de esteroides sexuales (E2 o T) inhibe el efecto estimulante de Kiss2 sobre la secreción de Fsh por células dispersas de la hipófisis de lubina. En este sentido, se sabe que los esteroides gonadales influyen en la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Durante las últimas etapas del desarrollo gonadal la gonadectomía aumenta la secreción de Lh, en una gran variedad de especies de teleosteos, mientras que el tratamiento con T y/o E2 es capaz de revertir dicho efecto estimulador (Bommelaer *et al.*, 1981; De Leeuw *et al.*, 1986; Kobayashi y Stacey, 1990; Khan *et al.*, 1999, Klenke y Zohar, 2003). En mamíferos, los tratamientos con E2 o T aumentaron la sensibilidad de las células gonadotropas a la estimulación de la liberación de Lh con el decapeptido de la kisspeptina (Luque *et al.*, 2011, Ezzat *et al.*, 2010). En peces también existe una respuesta de retroalimentación positiva de los esteroides gonadales, pero en una etapa temprana de su desarrollo gonadal (Huang *et al.*, 1997). Así pues en estos últimos, la regulación por parte de los esteroides varía mucho en función el estado de desarrollo gonadal y, por tanto, se pueden observar mecanismos de retroalimentación positiva o negativa que actúan directamente sobre las células de la hipófisis en función del estado gonadal (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos datos, parte de la discrepancia entre nuestros resultados y los encontrados en mamíferos, probablemente se podría atribuir a la fase de desarrollo gonadal en que se encontraban los animales experimentales. Aunque en mamíferos, también se ha descrito la inhibición de la liberación de Fsh en presencia del E2 (Ezzat *et al.*, 2010).

Los resultados de esta memoria muestran que el análogo LHRHa estimula la expresión génica de *kiss2* en la hipófisis. Como se ha comentado anteriormente, los axones terminales de *Gnrh1* alcanzan la PPD de la adenohipófisis e inervan directamente a las células Kiss2. Además, en la PPD de la hipófisis se localizan las células gonadotropas y

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

los receptores de GnRh (González-Martínez *et al.*, 2004b). Por otro lado, en células dispersas o fragmentos de hipófisis de carpín dorado (Khakoo *et al.*, 1994), salmón coho (Dickey *et al.*, 2000), trucha arcoíris (Mañanós *et al.*, 1999) y tilapia (Gur *et al.*, 2002) se ha demostrado que los efectos de la GnRh sobre la actividad gonadotropa incluyen mecanismos que afectan a la transcripción de las subunidades de las gonadotrofinas. Por tanto, nuestros datos indicarían que otro efecto de la GnRh1, sobre la actividad de las células gonadotropas, podría ser la regulación de la transcripción de *kiss2*. Todos estos resultados sugieren que la GnRh1 regularía la transcripción de *kiss2*, en la células gonadotropas, quizás para apoyar la regulación de la GnRh1, sobre la secreción de las gonadotrofinas, mediante la acción paracrina/autocrina de Kiss2. Por otro lado, los datos presentados en este estudio muestran claramente que en la lubina, los esteroides sexuales en el medio circundante estimulan la expresión de *gpr54-1b* y *gpr54-2b* en la hipófisis. Este hecho proporciona un contexto fisiológico que ayuda a comprender el papel del sistema kisspeptina en la hipófisis de lubina, y apoyaría la hipótesis de que el E2 y la T pueden actuar sobre las células gonadotropas mediante el control de la transcripción de los receptores de kisspeptina. De acuerdo con estos datos, en hembras de rata ovariectomizadas e implantadas con estradiol (OVX + E), se incrementó la expresión de *KISS1R* hipofisario durante el pico de LH (Witham *et al.*, 2013). En conjunto, todos estos datos proporcionan una evidencia fuerte de que, durante el proceso reproductivo, el sistema kisspeptina hipofisario está implicado en la regulación de la secreción de gonadotrofinas.

En resumen, en esta memoria se presenta, por primera vez, una descripción detallada del papel de Kiss2 en el control directo de la función de las células gonadotropas de la hipófisis de un pez teleosteo, la lubina. Los resultados presentados proporcionan una serie de evidencias funcionales y neuroanatómicas de que Kiss2 puede modular,

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

directamente la función de las células gonadotropas, a través de dos rutas diferentes. Así, aparte de operar como un neuropéptido hipofisiotrópico, Kiss2 puede actuar como una factor autocrino/paracrino para regular la actividad gonadotropa.

### **4.6.4 Nuevas perspectivas sobre los factores implicados en la regulación del inicio de la pubertad en la lubina**

En este estudio se analizaron los efectos del tamaño corporal en el inicio de la pubertad así como su relación con eventos moleculares, neuroendocrinos y hormonales relevantes inherentes a la primera gametogénesis de machos de lubina. Las diferencias entre los caracteres merísticos, de ambas poblaciones, desaparecieron cuando los valores se expresaron como índices somáticos (HSI and MFI). Este hecho sugiere que el crecimiento es homogéneo en ambas poblaciones, a excepción de los valores del MFI, durante la fase meiótica tardía/espermiogénica temprana en diciembre, que fueron mayores en los peces grandes que en los pequeños. Teniendo en cuenta que ambas poblaciones (pequeños y grandes) eran del mismo origen, nacieron el mismo día y se mantuvieron en idénticas condiciones ambientales, se puede asumir que sus antecedentes genéticos eran similares. No obstante, no se puede descartar cierta variabilidad individual, relacionada con la variación genética y por tanto, es posible que ciertos factores genéticos puedan haber afectado, indirectamente, al inicio de la pubertad a través de otros rasgos hereditarios, como la tasa de crecimiento, la talla por edad y las reservas energéticas. En este sentido, se ha demostrado que en salmónidos el contenido de grasa muscular (Gjerde y Schaeffer, 1989; Rye y Gjerde, 1996) y el crecimiento (Gjerde *et al.*, 1994; Friars *et al.*, 1995) varían dependiendo del componente genético. Sin embargo, no hay que olvidar que los peces también podrían presentar distintos tamaños debido a que nacieron en diferentes momentos (horas) o tenían reservas energéticas diferentes. En consecuencia, se puede establecer la hipótesis de que

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

las diferencias entre las dos poblaciones podrían deberse a estados fisiológicos diferentes ligados al tamaño. De hecho, los peces grandes, con mayores tasas de crecimiento que los pequeños, también mostraron mayores porcentajes de estados más avanzados de desarrollo testicular que los peces pequeños. Por tanto, nuestros resultados coinciden con la hipótesis, ya establecida con anterioridad, que un crecimiento rápido puede reducir la edad de la primera madurez (Thorpe, 1994; Fleming, 1998).

En cuanto a la síntesis de gonadotrofinas en la hipófisis, prácticamente durante todo el ciclo reproductivo, se vio que los peces grandes poseían mayor contenido de Lh y Fsh que los peces pequeños. Por tanto, parece estar claro que la síntesis de gonadotrofinas en la hipófisis de la lubina depende del tamaño corporal. Por otra parte, en los peces grandes se encontraron niveles altos de Lh en plasma, durante la espermiación, lo cual es coherente con la implicación de la Lh en la regulación de los estados finales de la maduración de los gametos y espermiación de la lubina (Rodríguez *et al.*, 2000b; Rocha *et al.*, 2009; Mazón *et al.*, 2013). Este papel de la Lh también se ha descrito en otras especies de teleósteos, incluido el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Weil y Crim, 1983), la sardina ojo dorado (*Hiodon alosoides*) (Pankhurst *et al.*, 1986), el pargo rosado (*Pagrus auratus*) (Pankhurst, 1994) y la lubina americana (Mylonas *et al.*, 1998). Además, durante las fases proliferativa temprana y proliferativa tardía, los peces grandes mostraron niveles de Lh plasmática superiores a los encontrados en los peces pequeños, apoyando así un posible papel de la Lh en la gametogénesis temprana, como se había propuesto anteriormente (Rodríguez *et al.*, 2000b; Rodríguez *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2010). Por otro lado, los niveles de Fsh en el plasma de los peces grandes aumentaron durante el crecimiento testicular, coincidiendo con las fases de proliferación temprana y proliferación tardía. Estos datos apoyan la hipótesis de que la Fsh juega un papel importante en la regulación de las fases tempranas de la gametogénesis (Molés *et*

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

*al.* 2012, Mazón *et al.* 2014). Además, durante la fase proliferativa, las diferencias significativas, entre los niveles de gonadotrofinas plasmáticas de ambas poblaciones ocurrieron antes para la Lh (a mediados de septiembre) que para la Fsh (a finales de septiembre), reforzando el mencionado papel de la Lh en los eventos tempranos de la espermatogénesis. Sin embargo, en los peces grandes, durante la fase meiótica tardía/espermiogénica temprana, también se observaron niveles altos de Fsh plasmática lo cual indicaría que la Fsh juega un papel secundario durante la espermiogénesis. Todos estos resultados están relacionados con un contenido mayor de *Gnrh1* hipofisario en los peces grandes durante las fases proliferativa temprana y espermiogénica. Por tanto, en peces teleósteos y en determinadas condiciones fisiológicas, la *Gnrh* puede ser el secretagogo de ambas gonadotrofinas ya que, a diferencia de los mamíferos, la Lh y la Fsh se secretan a partir de poblaciones celulares distintas. En este sentido, se ha observado que en tilapia, la *Gnrh*, además de modular la liberación de Lh también lo hace con la de Fsh, incrementando sus niveles plasmáticos (Aizen *et al.*, 2007), al igual que en el salmón (Dickey y Swanson, 2000). De hecho en los peces, los mecanismos de regulación diferencial de las gonadotrofinas permiten la dualidad funcional de la Lh y la Fsh (Karigo *et al.*, 2013). Sin embargo, nuestros datos también sugieren que existe una posible colaboración entre ambas gonadotrofinas, en la actividad testicular. Por otro lado, se ha visto que hay una relación estrecha entre el perfil del desarrollo testicular y los perfiles de gonadotrofinas hipofisarias, de tal forma que la proliferación testicular activa fue concomitante con el incremento sostenido de ambas gonadotrofinas en la hipófisis hasta la fase espermiogénica. El perfil hipofisario estacional de Fsh y Lh no se reflejó exactamente en los perfiles plasmáticos de ambas hormonas, sugiriendo que a pesar de que ambas gonadotrofinas están presentes en la hipófisis, durante la mayor parte del periodo de crecimiento gonadal, éstas parece que se secretan diferencialmente

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

según el estado de desarrollo testicular tal y como se ha descrito previamente en trucha arcoíris (Sumpter and Scott, 1998; Gómez *et al.*, 1999).

En peces, los andrógenos, T y 11-KT, están implicados en la modulación de la espermatogénesis (Billard *et al.*, 1982; Billard, 1986; Fostier *et al.*, 1983; Borg, 1994; Nagahama, 1994), y en el inicio de la pubertad (Miura *et al.*, 1991b; Cavaco *et al.*, 1998); pero sin duda, la 11-KT es el andrógeno más importante en la estimulación de la espermatogénesis en peces (Schulz y Miura, 2002) incluyendo la lubina (Rodríguez *et al.*, 2000a). El perfil de la 11-KT obtenido en los peces grandes de este estudio, coincide con el encontrado en estudios anteriores con adultos de lubina (Rodríguez *et al.* 2000a; Rodríguez *et al.* 2005; Felip *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2009; Carrillo *et al.* 2010), con un pico menor, pero significativo, en las fases proliferativa temprana y proliferativa tardía, donde los peces grandes presentaron niveles mayores que los pequeños. Estos patrones de variación son muy similares a los observados para la Fsh plasmática, lo que sugiere que en la lubina, la Fsh y la 11-KT son factores hormonales esenciales para el inicio y el avance de la espermatogénesis. Por otro lado, el perfil de la 11-KT en plasma presentó un segundo pico en la fase meiótica tardía/espermiogénica temprana, donde, de nuevo, los peces grandes presentaron mayores niveles que los pequeños. Estos datos sugieren que la 11-KT es también un factor hormonal esencial para la maduración testicular de la lubina.

En este estudio se observó que los niveles de Gnrh1 hipofisario fluctuaron a lo largo del ciclo sexual. El contenido de Gnrh1, en la hipófisis de los peces grandes, fue más alto que el de los pequeños, pero curiosamente los peces pequeños mostraron mayores niveles de transcritos de *gnrh1* que los peces grandes en el FB-MB y en el hipotálamo. Esto muestra que hay una relación inversa entre los niveles de transcritos de *gnrh1* cerebrales y los de proteína Gnrh1 liberada en la hipófisis. Lo cual podría ser debido a

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

una falta de correlación entre la transcripción de mRNA/transcrito primario y la eficiencia de la traducción, tal y como se ha descrito en otros estudios (Tuller *et al.* 2007, Voguel y Marcotte, 2012), o a un mecanismo de retroalimentación negativa autorregulado (Xu *et al.* 2008). Los datos obtenidos en este estudio sugieren que los peces grandes, que han alcanzado un tamaño crítico y que durante la fase proliferativa temprana presentan niveles de Gnrh1 hipofisarios mayores que los pequeños, son capaces de iniciar la espermatogénesis y, por tanto, de entrar en la pubertad. En la lubina, al igual que en otros teleósteos, las fibras Gnrh1 inervan directamente la PPD de la adenohipófisis (González-Martínez *et al.* 2002a), donde también hay células gonadotropas y receptores de Gnrh (González-Martínez *et al.* 2004a). Los resultados de esta memoria indican que probablemente las poblaciones neuronales de Gnrh1 de las áreas neuroendocrinas del FB-MB, telencéfalo y área preóptica, ejercen su papel sobre el control neuroendocrino de la actividad de las células gonadotropas, durante la fase proliferativa temprana. En este momento, los peces grandes mostraron niveles menores de expresión de *gnrh1* que los pequeños, a la vez que niveles mayores del neuropéptido en la hipófisis. Así mismo, las poblaciones neuronales de Gnrh1 presentes en el FB-MB y en el hipotálamo también podrían estar implicadas en el control reproductivo durante la fase espermiogénica, donde los peces grandes, a su vez, mostraron niveles menores de expresión de *gnrh1* en estas áreas cerebrales y contenidos de Gnrh1 hipofisario mayores que los de los peces pequeños. Estos resultados son coherentes con los encontrados en adultos de lubina, donde se ha visto que la Gnrh1 es la forma de Gnrh más relevante en la modulación del primer desove de esta especie (Rodríguez *et al.*, 2000b).

Al igual que ocurre con los niveles de expresión de *gnrh1* en el FB-MB de los peces pequeños, los niveles de expresión de *kiss2* fueron significativamente mayores que los

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

observados en los peces grandes, durante las fases proliferativa temprana, proliferativa tardía y espermiogénica. De hecho, en el área preóptica de la lubina europea, se ha descrito una pequeña población de células que expresan *kiss2* (Escobar *et al.* 2013a). En peces teleósteos, la región preóptica es una región hipofisiotrópica importante y de expresión de receptores de estrógenos (Anglade *et al.* 1993, Pakdel *et al.* 1994). Así pues, la fuerte relación observada entre los perfiles de expresión de *kiss2* y *gnrh1* en esta área y en ambas poblaciones de peces, sugiere que estas neuronas Kiss2 podrían estar implicadas en el control de las neuronas Gnrh1 presentes en el área preóptica (González-Martínez *et al.* 2001) y, por tanto, lo más posible es que también lo estén en la señalización neuroendocrina de la función reproductiva durante la gametogénesis temprana y tardía. De hecho, en esta misma memoria se mostró que Kiss2-12 tiene un efecto marcado sobre la expresión de *gnrh1* y la liberación de Gnrh1 (ver apartados 4.2.1, 4.2.2 y 4.6.2). Por otro lado, también se ha visto que el hipotálamo mediobasal de la lubina americana (Zmora *et al.* 2014), actúa como un centro reproductivo relacionado con el sistema kisspeptina-Gnrh-hipófisis. En nuestro estudio, en el hipotálamo de los peces pequeños se encontró mayor expresión de *kiss2* que en el de los peces grandes durante las fases tempranas de la gametogénesis, mientras que los niveles de expresión de *gnrh1* hipotalámica fueron mayores en los peces pequeños sólo durante la fase espermiogénica. Esta ausencia de relación, en ambas poblaciones, entre los perfiles temporales de expresión de *kiss2* y *gnrh1* en el hipotálamo sugiere que la actividad de ambos neuropéptidos hipotalámicos no está relacionada y apoya la hipótesis que, al igual que las neuronas Gnrh1 hipotalámicas, las de Kiss2, presentes en el hipotálamo, también pueden actuar directamente sobre las células gonadotropas, tal y como sugiere Zmora *et al.* (2014). Por otro lado, en el FB-MB de los peces pequeños se detectaron niveles de expresión de *kiss1* mayores que en el de los peces grandes, durante las etapas

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

tempranas de la gametogénesis. En este sentido, se ha descrito que, en el FB-MB, las células que expresan *kiss1* están localizadas en la habénula (Escobar *et al.* 2013a), una región del FB-MB que está unida a la glándula pineal por el tallo pineal (Ekstrom y Meissl, 1997). Dado que la lubina europea es una especie de reproducción estacional, parece razonable sugerir que la población neuronal de *Kiss1* de la región habenular podría estar implicada en la modulación de la función reproductiva en la gametogénesis temprana. De hecho, Rodríguez *et al.* (2012) identificaron en esta misma especie un periodo fotosensible que coincidía con el inicio de la pubertad. Finalmente, los datos de la expresión de *gpr54-1b* y *gpr54-2b* entre peces grandes y pequeños (ver apartado 4.4.4) sugieren un papel putativo del receptor *Gpr54-1b* durante el crecimiento gonadal y la maduración, mientras que el receptor *Gpr54-2b* probablemente estaría implicado en la función reproductiva tan sólo en los estados tempranos del desarrollo gonadal.

En resumen, este estudio sugiere que el tamaño del pez es una condición permisiva para asegurar la completa efectividad de las acciones hormonales (*Gnrh1*, gonadotrofinas y andrógenos). Así, mientras que los peces pequeños presentaron unos perfiles hormonales similares a los de los peces grandes pero su magnitud fue mucho menor, siendo posiblemente ésta la razón por la cual el eje reproductivo no llegó a ser funcional. Además, este trabajo proporciona evidencias de la implicación de los sistemas *kisspeptina* y *Gnrh1* en el inicio de la pubertad en un teleósteo marino. Así, es posible que *kisspeptinas* y *Gnrh1* regulen la secreción de las gonadotrofinas y los andrógenos durante determinados periodos de desarrollo testicular. Finalmente, es interesante mencionar que la mayoría de hormonas y genes mostraron diferencias importantes entre peces grandes y pequeños a finales de septiembre – principios de octubre, justo antes de la diferenciación de los espermatoцитos primarios. Así, se puede establecer la hipótesis de que la capacidad de respuesta en este estadio de desarrollo

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

testicular podría ser una condición necesaria para finalizar el proceso de espermatogénesis.

### **4.6.5 La señal fotoperiódica regula el control de las poblaciones neuronales de Kiss1 y Gnrh2 del FB-MB sobre el eje reproductivo**

Otro resultado interesante de esta memoria es que el estudio temporal y a largo plazo de los cambios asociados al inicio de la pubertad y logro de la primera reproducción con éxito, en conjunción con diferentes regímenes de fotoperiodo (tratamientos AP y LL), permite destacar la importancia de los neuropéptidos cerebrales Kiss1 y Gnrh2 como desencadenantes del inicio y continuación posterior del desarrollo testicular de la lubina. Este aspecto es más patente tras la exposición al régimen de iluminación LL que afecta de manera importante al desarrollo testicular. Así, la casi total inhibición de los últimos estados de desarrollo testicular, causada por el régimen LL, parece estar relacionada con su efecto sobre las poblaciones neuronales de Kiss1 y Gnrh2 en el FB-MB, probablemente a causa de la pérdida de estacionalidad en sus perfiles de expresión. Un efecto muy distinto al del régimen LL, fue el obtenido al aplicar el régimen AP que provocó un avance del inicio del ciclo reproductivo, respecto a los peces mantenidos bajo NP, probablemente como consecuencia de un cambio en la fase del ritmo de la expresión tanto de Kiss1 como de Gnrh2 en el FB-MB.

Como era de esperar y de forma similar a lo observado en NP, los peces grandes del grupo AP mostraron mayores porcentajes de los estados más avanzados de desarrollo testicular que los peces pequeños (ver tabla 4.4, apartado 4.5.1). Por otro lado y considerando la progresión de los estados testiculares, es interesante destacar que a finales de septiembre, en el grupo AP, había un número menor de peces grandes en estado I que en NP y, a mediados de octubre, el número de peces grandes del grupo AP

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

en estado II era mayor que en NP. Como consecuencia en AP, a finales de octubre, se observó un alto porcentaje peces grandes en estado IV, pero ninguno en el grupo NP (ver tabla 4.6, apartado 4.5.1). Por tanto, en el grupo AP la aparición de espermatozoides en el testículo se adelantó, aproximadamente en un mes y medio, con respecto al grupo NP. Por otro lado, en los testículos de los peces bajo LL no se observó progresión de la espermatogenesis más allá del estado III, resultando en un bloqueo de la aparición de los estados IV y V. De ello se puede concluir que el régimen LL dio lugar a un retraso considerable en la progresión de la espermatogénesis que probablemente contribuyó, en gran medida, a la ausencia de machos espermiantes. En este sentido, la efectividad de diferentes tratamientos LL para reducir el número de machos precoces de lubina ya se ha descrito en varios estudios previos (Begtashi *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005; Felip *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2012). Este estudio proporciona una descripción detallada adicional del mecanismo histológico que explicaría la reducción de machos espermiantes por efectos de la exposición a luz continua.

El presente estudio constata la evolución, en paralelo, de los niveles de expresión de *kiss1* y *gnrh2* en el FB-MB de los peces grandes del grupo AP, también observado en el grupo NP y mostrando en éste último valores máximos en agosto y febrero (ver apartado 4.4.4, figura 4.20). Sin embargo, en el grupo AP se produjo un cambio de fase de los ritmos de expresión, de los mencionados genes, que se manifestó por la presencia de un pico adicional (además del de agosto) hacia finales de septiembre y que muy probablemente, podría estar relacionado con el avance de las fases del desarrollo testicular inducido por este tratamiento. Este cambio de fase también fue evidente en los niveles de expresión de *gpr54-1b* del grupo AP que se mantuvieron elevados desde finales de septiembre y mostraron un pico adelantado a finales de octubre, apoyando así

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

la participación del sistema Kiss1/Gpr54-1b y del Gnrh2 en la puesta en marcha de la gametogénesis adelantada por este régimen de luz. Por último, la luz continua abolió por completo los ritmos de expresión de *kiss1*, *gpr54-1b* y *gnrh2*, tanto en peces grandes como en pequeños que obviamente, fracasaron en desarrollar las gónadas. En consecuencia, parece claro que los regímenes AP y LL modifican los ritmos estacionales de *kiss1/gpr54-1b* y *gnrh2*. Así, en los peces grandes del grupo AP, el cambio de fase de los ritmos de expresión de estos genes podría estar relacionado con un adelanto del inicio del ciclo reproductivo respecto al de los peces grandes del grupo NP (controles), mientras que la supresión de los ritmos en LL podría ser una de las causas que impidieron la culminación del proceso reproductor de los peces grandes.

En los peces de la zona templada, la reproducción es un proceso rítmico consecuencia de los cambios diarios y estacionales de factores ambientales como el fotoperiodo. Por su parte, la pineal que es una estructura fotosensora y neuroendocrina, está vinculada a la habénula por el tallo pineal. Ambas premisas nos permitirían plantear la hipótesis de una posible relación entre la melatonina y los sistemas Kiss1/Gnrh2 como un enlace para la ritmicidad circadiana/estacional de la actividad reproductiva. De acuerdo con ello nuestros resultados son un aporte adicional a la hipótesis ya planteada, con anterioridad (Escobar *et al.*, 2013a; Servili *et al.*, 2011), acerca de la posible participación de las neuronas Kiss1 habenulares en el proceso de desarrollo gonadal en relación con el fotoperiodo. Por otra parte, estudios previos, realizados también en lubina por Servili *et al.* (2010), demuestran claramente que la Gnrh2 participa en la modulación de la función pineal. En consecuencia, la evolución paralela observada en este estudio entre la expresión de *kiss1* y *gnrh2*, bajo distintos regímenes de fotoperiodo, estaría de acuerdo con los estudios mencionados, y sugiere que en la lubina

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Kiss1 y/o Gnrh2, localizados en el FB-MB, podrían ser moléculas clave capaces de proporcionar una respuesta biológica fiable a los cambios de información lumínica.

Con independencia del régimen fotoperiódico al que estuvieron sujetos los peces (NP, AP o LL), los patrones de variación de la expresión del sistema *kiss2/gpr54-2b* y de *gnrh1* no sufrieron ninguna alteración significativa en su fase rítmica, tanto en peces grandes como en pequeños. Sin embargo, los peces pequeños del grupo AP mostraron niveles de expresión, de los tres transcritos mencionados, más elevados que los peces grandes de este mismo grupo, prácticamente en los mismos estados de desarrollo testicular donde también se observaron dichas diferencias en el grupo NP, aunque por supuesto en diferentes puntos de muestreo. El hecho de que las diferencias, en los niveles de estos transcritos, entre peces grandes (maduros) y pequeños (inmaduros) se produzcan en determinados estados de desarrollo testicular, apoya la hipótesis de que ambos neuropéptidos, Kiss2 y Gnrh1, en el FB-MB, podrían estar implicados en la señalización neuroendocrina de la función reproductiva (ver apartado 4.6.4). Por otro lado, es interesante destacar que bajo el régimen LL los niveles de los transcritos *kiss2* y *gnrh1* no mostraron diferencias entre peces grandes y pequeños. El hecho de que en este grupo, los niveles de expresión de estos dos genes no muestren diferencias entre tamaños, corrobora el supuesto papel de ambos neuropéptidos en la modulación de la función reproductiva de la lubina ya que, en LL los peces grandes no completaron la espermatogénesis a diferencia de lo observado en los peces grandes de AP o NP que sí lo hicieron. Todos estos datos nos llevan a suponer que la expresión estacional de *kiss2* y *gnrh1* en el FB-MB, probablemente no está modulada directamente por el fotoperiodo ya que tanto peces grandes como pequeños, mostraron perfiles estacionales similares, aunque con algunas diferencias entre grupos, más relacionadas con el estado de desarrollo testicular que con el régimen de luz (NP o AP).

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

En resumen, el tratamiento AP adelantó el desarrollo testicular e indujo un cambio de fase del ritmo de la expresión tanto *kiss1/gpr54-1b* como de *gnrh2*, pero el perfil estacional de *kiss2/gpr54-2b* y *gnrh1* no parece estar afectado de manera directa por este tratamiento. Por tanto, no sería muy descabellado sugerir que el efecto de la señalización fotoperiódica sobre el desarrollo testicular está mediado a través de los neuropéptidos cerebrales Kiss1 y Gnrh2. En peces hay varios estudios que apuntan hacia un posible papel del sistema kisspeptina en el control fotoneuroendocrino de la reproducción. Pero, la literatura disponible acerca del control fotoperiódico del sistema kisspeptina es relativamente escasa y no ausente de controversia. Así, en el pez cebrá, la melatonina puede aumentar la transcripción de los genes kisspeptina y *gnrh3*, la forma hipofisiotrópica cerebral de esta especie (Carnevali *et al.*, 2011). En medaka se demostró que el fotoperiodo afectaba al número de neuronas Kiss1 del *nucleus ventralis tuberis* (NVT), de manera que los días largos (condición necesaria para el desarrollo reproductivo) aumentaron la expresión de *kiss1* (Kanda *et al.*, 2008). Por el contrario, no se llegó a resultados claros respecto al papel del fotoperiodo sobre los mecanismos que regulan la expresión del sistema kisspeptina en el bacalao Atlántico (Cowan *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha tratado de establecer, desde un punto de vista neuroanatómico (población de Kiss2 en el área preóptica y de Kiss1 en la habénula), el papel de las poblaciones neuronales del sistema kisspeptina, directamente implicadas en el control fotoneuroendocrino de la reproducción.

Al igual que en el grupo NP (ver apartado 4.4.3), en el grupo AP se ha establecido una relación inversa, aunque menos marcada en este caso, entre los niveles de transcritos de *gnrh1* en el FB-MB y los niveles de proteína Gnrh1 liberados en la hipófisis. Esto, como se comentó anteriormente, se podría deber a una falta de correlación entre la transcripción de mRNA/transcrito primario y la eficiencia de la traducción ya descrito

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

en otros estudios (Tuller *et al.* 2007, Voguel y Marcotte, 2012), o a un mecanismo de retroalimentación negativa autorregulado (Xu *et al.* 2008). Sin embargo, en el grupo LL no hubo diferencias entre tamaños, ni para los niveles de transcritos en el FB-MB, ni para los niveles de proteína en la hipófisis, en ninguna fecha de muestreo. Esto sería congruente con el hecho de que tanto animales grandes como pequeños expuestos a LL presentaron gónadas inmaduras a lo largo del ciclo sexual, corroborando de nuevo el conocido papel de la *Gnrh1* en la modulación de la función reproductiva de la lubina (Rodríguez *et al.*, 2004). Respecto al contenido de gonadotrofinas en la hipófisis, llama la atención que en los peces grandes del grupo AP, ambas hormonas presentan su valor máximo en diciembre, disminuyendo drásticamente en febrero cuando los peces grandes del grupo NP mostraron valores elevados. Esto probablemente sea debido al cambio en la fase de ritmo de genes específicos a nivel cerebral, ya indicados anteriormente, tales como *kiss1*, *gpr54-1b* y *gnrh2*, provocada por este tratamiento y que podría estar regulando, directa o indirectamente, las fases rítmicas de síntesis y liberación de las gonadotrofinas. Además, la relación prácticamente inversa entre el contenido hipofisario y los niveles plasmáticos de Fsh, observados a lo largo del periodo reproductor en el grupo NP, pudo también constatarse en los ejemplares del grupo AP, que como explicamos anteriormente, indujo un adelanto del inicio del proceso reproductor. Más específicamente, en comparación con el régimen NP, el régimen AP adelantó en un mes la fase del ritmo de Fsh en plasma (ver apartado 4.4.6 versus apartado 4.5.6), lo que sugiere que la liberación de Fsh se ve directamente afectada por la señalización de la luz. Además, en agosto y septiembre los niveles plasmáticos de Fsh de los peces grandes del grupo AP fueron más altos que los de los pequeños, apoyando así la idea de que las primeras etapas de la gametogénesis, incluyendo las divisiones mitóticas y meióticas de las espermatogonias, seguramente están bajo el control de la

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

Fsh. Estos datos están de acuerdo con estudios previos realizados en lubina (Molés *et al.*, 2012; Mazón *et al.*, 2004). Además, en noviembre y diciembre, coincidiendo con la fase meiótica y el inicio de la espermiogénesis (estados III, IV y V) los peces grandes de este grupo presentaron niveles mayores de Fsh que los peces pequeños. Los niveles más altos en los peces grandes que en los pequeños, en estados avanzados de maduración en el grupo AP, apoya la hipótesis de que la Fsh también es necesaria para mantener el desarrollo de la espermatogénesis (ver apartado 4.6.4; Carrillo *et al.*, 2015). Por otro lado, en el grupo LL, hubo menos diferencias de los niveles de Fsh entre los peces grandes y pequeños que en los grupos AP o NP y, además, no se observó ningún pico significativo en diciembre. Lo cual también apoya la hipótesis de que tanto el contenido hipofisario de Fsh, como su liberación al torrente circulatorio, podrían estar directamente afectados por la señalización de la luz. Respecto a la Lh, esta hormona, no parece responder de igual manera que la Fsh a los tratamientos fotoperiódicos y su papel regulador está orientado hacia las etapas más avanzadas del proceso reproductor. Así por ejemplo, en los peces grandes del grupo AP, se observaron niveles mayores de Lh en plasma durante febrero que coincidieron con tasas altas de peces en estados III y V de desarrollo testicular (fase meiótica tardía y espermiogénica). Todo ello corrobora el papel relevante de la Lh en las últimas etapas de maduración testicular y está de acuerdo con estudios previos en lubina (apartado 4.4.6 de esta memoria; Rocha *et al.*, 2009). En general, los perfiles de Lh en los grupos AP y NP fueron similares tanto en fase como en amplitud. En febrero los niveles de Lh de los peces grandes del grupo LL se elevaron, pero no lo hicieron en la misma medida que en NP y AP y no hubo diferencias significativas entre peces grandes y pequeños. Como consecuencia, la espermiación prácticamente no tuvo lugar y como ya se había observado con anterioridad, el régimen LL impidió la pubertad precoz (Begtashi *et al.*, 2004). Por otra parte, es interesante

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

mencionar que, durante la fase de proliferación temprana, los niveles de Lh de los peces grandes fueron significativamente más elevados que los de los peces pequeños, en los tres regímenes de fotoperiodo. Esto sugiere que en este momento, del primer año de vida del macho de lubina, la liberación de Lh no parece estar directamente afectada por la información lumínica, hecho que ya fue previamente observado en machos de la misma especie y edad mantenidos en regímenes similares (Rodríguez *et al.*, 2005, Carrillo *et al.*, 2010). En general nuestros datos parecen apoyar los resultados ya descritos para machos de lubina en estudios anteriores, en los cuales se establece que los tratamientos fotoperiódicos afectan a la liberación de Fsh en plasma, mientras que la secreción de GnRH1 y Lh no se ve afectada por dichos tratamientos (Carrillo *et al.*, 2015). Algo similar se ha visto en estudios previos en hembras de salmón atlántico, donde la señalización dependiente de la Fsh estimuló el reclutamiento y el desarrollo sostenido del oocito durante la vitelogénesis (Andersson *et al.*, 2013).

Finalmente, los resultados de los perfiles de 11-KT en plasma muestran que este esteroide está claramente influenciado por el tratamiento fotoperiódico. Así por ejemplo, en los peces del grupo AP, el perfil estacional de este esteroide, está avanzado en un mes respecto al pico observado durante la espermatogénesis en el grupo NP. En este estado de desarrollo testicular, los peces pequeños de AP también exhibieron valores plasmáticos de 11-KT significativamente menores que los peces grandes, al igual que los del grupo NP. Por otro lado, el tratamiento con LL provocó una disminución significativa de los niveles de 11-KT, respecto a los controles, hacia estados más avanzados de maduración, demostrando una vez más que tratamientos con luz continua afectan negativamente la síntesis y liberación de 11-KT (Carrillo *et al.*, 2015). Por lo tanto, se podría plantear la hipótesis de que la producción reducida de este andrógeno, (regulado por la Fsh circulante) podría ser un factor limitante para la

## 4. Resultados y desarrollo argumental

---

proliferación de células germinales testiculares de lubina, provocando un estado de inmadurez gonadal en los animales, como consecuencia de que las células germinales no pueden ser reclutadas hacia estados avanzados de la espermatogenesis. Estos resultados apoyarían el papel sugerido para la Fsh en estudios previos realizados en la lubina (Felip *et al.*, 2008).

En conclusión, la presente memoria revela una fuerte correlación entre el control ambiental de la pubertad y los sistemas Kiss1 y Gnrh2 presentes en el FB-MB. Así, la señalización fotoperiódica podría modular la actividad de las neuronas Kiss1 habenules con el fin de controlar el inicio de la gametogénesis, mientras que las neuronas Kiss2 participarían en el control del eje reproductivo. Por otro lado, el fotoperíodo sería capaz de alterar la fase y los niveles de los perfiles hormonales que a su vez, estarían implicados en el inicio y la progresión de todo el proceso gametogénico. Más concretamente, la administración de tratamiento fotoperiódico (AP o LL) sería capaz de alterar los perfiles de Fsh y 11-KT en plasma desplazando o inhibiendo respectivamente el proceso espermatogénico.

## **5. CONCLUSIONES**



## 5. Conclusiones

---

1. Las formas más largas de las kisspeptinas de lubina, Kiss1-15 y Kiss2-12, presentan una mayor biopotencia en la activación de los receptores de kisspeptinas que los deca péptidos correspondientes, Kiss1-10 y Kiss2-12.
2. Los receptores de kisspeptinas de lubina muestran una selectividad de ligando diferente. El receptor Gpr54-1b se activa preferentemente por los péptidos derivados de Kiss1, mientras que el receptor Gpr54-2b presenta una unión preferencial a los péptidos derivados de Kiss2, aunque también se activa en presencia de los péptidos derivados de Kiss1.
3. Las áreas neuroendocrinas del FB-MB, el telencéfalo y el área preóptica, están implicadas en el control del eje reproductivo vía Kiss2/Gnrh1.
4. La inyección i.c.v. de Kiss2 en machos de lubina mostró que este neuropéptido provoca la secreción de Gnrh1 desde, al menos, el FB-MB, dando lugar a niveles elevados de Lh y T en plasma, y provocando finalmente un incremento del volumen espermático y de la calidad del esperma.
5. La presencia de Kiss2 en las células gonadotropas de lubina indica que este neuropéptido pueda tener un papel destacado en la reproducción de peces, a través de sus acciones como una hormona autocrina/paracrina, a nivel de la hipófisis.

## 5. Conclusiones

---

6. Kiss2, pero no Kiss1, es capaz de estimular, de manera significativa, la secreción de Lh y Fsh en células hipofisarias dispersas de machos de lubina, siendo la liberación de Lh mayor y más sostenida que la de Fsh.
7. En lubinas macho pre-púberes, el tamaño del pez es una condición permisiva para asegurar la completa efectividad de las acciones hormonales (Gnrh1, gonadotrofinas y andrógenos).
8. Los sistemas kisspeptina y Gnrh1 están implicados en el inicio de la pubertad de machos de lubina. Así, es posible que kisspeptinas y Gnrh1 regulen la secreción de las gonadotrofinas y los andrógenos durante distintos periodos de desarrollo testicular.
9. Existe una fuerte correlación entre el control ambiental de la pubertad en lubina y los sistemas Kiss1/Gpr54-1b y Gnrh2 presentes en el FB-MB.
10. La administración de los tratamientos fotoperiódicos, AP o LL en machos pre-púberes de lubina, es capaz de alterar los perfiles de Fsh y 11-KT en plasma desplazando o previniendo, respectivamente, la progresión normal de la espermatogénesis.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## 6. Bibliografía

---

- Abraham E, Palevitch O, Ijiri S, Du SJ, Gothilf Y, Zohar Y. Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurons and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J Neuroendocrinol* 2008; 20, 394-405.
- Aizen J, Kasuto H, Levavi-Sivan B. Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153, 323-332.
- Akazome Y, Kanda S, Okubo K, Oka Y. Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fishbrain. *J Fish Biol* 2010; 76, 161-182.
- Alvarado MV, Carrillo M, Felip A. Expression of kisspeptins and their Receptors, *gnrh-1/gnrhr-II-1a* and gonadotropin genes in the brain of adult male and female European sea bass during different gonadal stages. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 187, 104-116.
- Amano M, Hyodo S, Kitamura S, Ikuta K, Suzuki Y, Urano A, Aida K. Short photoperiod accelerates preoptic and ventral telencephalic salmon GnRH síntesis and precocious maturation in underyearling male masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 1995; 99, 22-27.
- Amer M, Miura T, Miura C, Yamauchi K. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol Reprod* 2001; 65, 1057-1066.
- Andersson E, Schulz RW, Male R, Bogerd J, Patiña D, Benedet S, Norberg B, Taranger GL. Pituitary gonadotropin and ovarian gonadotropin receptor transcript levels: Seasonal and photoperiod-induced changes in the reproductive physiology of female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gen Comp Endocrinol* 2013; 191, 247-258.
- Ando H, Luo Q, Koide N, Okada H, Urano A. Effects of insulin-like growth factor I on GnRH-induced gonadotropin subunit gene expressions in masu salmon pituitary cells at different stages of sexual maturation. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 149, 21-29.
- Anglade I, Zandbergen TM, Kah O. Origin of the pituitary innervation in goldfish. *Cell Tissue Res* 1993; 273, 345-355.
- Anglade I, Wang Y, Jensen J, Tramu G, Kah O, Conlon JM. Characterization of trout galanin and its distribution in trout brain and pituitary. *J Comp Neurol* 1994; 350, 63-74.
- Anjum S, Krishna A, Sridaran R, Tsutsui K. Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), kisspeptin and GnRH receptor and their possible roles in testicular activities from birth to senescence in mice. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2012; 317, 630-644.
- Barnabé G. La cría de lubina y de dorada. In: Barnabé G. (Ed.), *Acuicultura*, Omega, Barcelona 1991; pp. 573-612.

## 6. Bibliografía

---

- Batten TF, Moons L, Cambre M, Vandesande F. Anatomical distribution of galanin-like immunoreactivity in the brain and pituitary of teleost fishes. *Neurosci Lett* 1990; 111, 12-17.
- Batten TF, Moons L, Vandesande F. Innervation and control of the adenohipophysis by hypothalamic peptidergic neurons in teleost fishes: EM immunohistochemical evidence. *Microsc Res Tech* 1999; 44, 19-35.
- Bayarri MJ, Rol de Lama MA, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Both pineal and lateral eyes are needed to sustain daily circulating melatonin rhythms in sea bass. *Brain Res* 2003; 969, 175-182.
- Bayarri MJ, Falcón J, Zanuy S, Carrillo M. Continuous light and melatonin: Daily and seasonal variations of brain binding sites and plasma concentration during the first reproductive cycle of sea bass. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 169, 58-64.
- Beacham TD, Murray CB. Accelation of maturity of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) using photoperiod control. *Aquaculture* 1993; 109, 315-325
- Beck BH, Fuller SA, Peatman E, McEntire ME, Darwish A, Freeman DW. Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus *Morone*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2012; 162, 265-273.
- Begtashi I, Rodriguez L, Moles G, Zanuy S, Carrillo M. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* 2004; 241, 539-559.
- Bennett HS, Wyrick AD, Lee SW, McNeil JH. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technol* 1976; 51, 71-97.
- Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can J Fish Aquat Sci* 1982; 39, 65-79.
- Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Dev* 1986; 26, 877-920.
- Billard R, Cosson MP. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J Exp Zool* 1992; 261, 122-131.
- Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biol Reprod* 2008; 79, 776-786.
- Biran J, Palevitch O, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. Neurokinin Bs and neurokinin B receptors in zebrafish-potential role in controlling fish reproduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109, 10269-10274.

## 6. Bibliografía

---

Blyte WG, Helfrich LA, Sullivan CV. Sex steroid hormone and vitellogenin levels in striped bass (*Morone saxatilis*) maturing under 6-,9-, and 12-month photothermal cycles. *Gen Comp Endocrinol* 1994; 94, 51-62.

Bobe J, Nguyen T, Jalaber B. Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. *Biol Reprod* 2004; 71, 73-82.

Bommelaer MC, Billard R, Breton B. Changes in plasma gonadotropin after ovariectomy and estradiol supplementation at different stages at the end of the reproductive cycle in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod Nutr Dev* 1981; 21, 989-997.

Bon E, Breton B, Govoroun MS, Le Menn F. Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: II-Seasonal variations of plasma gonadotropins (GTH I and GTH II) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size. *Fish Physiol Biol* 1999; 20, 143-154.

Borg B. Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 1994; 109, 219-245.

Bosma PT, Kolk SM, Rebers FE, Lescroart O, Roelants I, Willems PH, Schulz RW. Gonadotrophs but not somatotrophs carry gonadotrophin-releasing hormone receptors: receptor localization, intracellular calcium, and gonadotrophin and GH release. *J Endocrinol* 1997; 152, 437-446.

Breton B, Govoroun M, Mikolajczyk T. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. *Gen Comp Endocrinol* 1998; 111, 38-50.

Breton B, Mikolajczyk T, Popek W, Bieniarz K, Epler P. Neuropeptide Y stimulates in vivo gonadotropin secretion in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 1991; 84, 277-283.

Bromage N, Elliott JA, Springate JRC, Whitehead C. The effects of constant photoperiods on the timing of spawning in the rainbow trout. *Aquaculture* 1984; 43, 213-223.

Bromage N, Duston J. The control of spawning in the rainbow trout using photoperiodic techniques. *Rep Inst Fres Res Drotttn* 1986; 63, 26-35.

Bromage N, Jones J, Randall C, Thrust M, Davies B, Springate J, Duston J, Baker G. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg reproduction in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 1992; 100, 141-166.

Bromage N, Porter M, Randall C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 2001; 197; 63-98.

## 6. Bibliografía

---

Callard G. Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In: The Leydig Cell, Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Ed.), Vienna, IL, USA: Cache River Press 1996; pp. 308-331.

Campbell B, Dickey J, Beckman B, Young G, Pierce A, Fukada H, Swanson P. Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-Like growth factor-1, estradiol-17beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-Like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatotactin. *Biol Reprod* 2006; 75, 34-44.

Carnevali O, Gioacchini G, Maradonna F, Olivotto I, Migliarini B. Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *PloS one* 2011; 6, e19978.

Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Serrano R, Bromage NJ. Environmental and hormonal control of reproduction in sea bass. In: Bromage NR, Donaldson EM, Carrillo M, Zanuy S, Planas J (Ed.), *Recent Advances in Aquaculture IV*. Blackwell Science Ltd, Oxford 1993; pp. 43-54.

Carrillo M, Bromage N, Zanuy S, Prat F, Serrano R. The effects of modifications in photoperiod on constant spawning time, ovarian development, and egg quality in the sea bass. *Aquaculture* 1989; 81, 351-365.

Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerda J, Ramos J, Mañanós E, Bromage NJ. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Bromage NR, Roberts RJ (Ed.), *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science Ltd, Oxford 1995; pp. 138-168.

Carrillo M, Zanuy S, Bayarri P. El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. En: *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura) 2009; pp. 175-336.

Carrillo M, Begtashi I, Rodríguez L, Marin MC, Zanuy S. Long photoperiod on sea cages delays timing of first spermiation and enhances growth in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 2010; 299, 157-164.

Carrillo M, Espigares F, Felip A, Escobar S, Molés G, Rodríguez R, Alvarado MV, Gómez A, Zanuy S. Updating control of puberty in male European sea bass: a holistic approach. *Gen Comp Endocrinol*, 2015; doi:10.1016/j.ygcen.2015.06.019.

Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castaño JP, Malagón MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2006a; 257-258, 75-83.

Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, Sánchez-Criado JE, Pellicer A, Pinilla L, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expression of

## 6. Bibliografía

---

KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 2006b; 147, 4852-4862.

Cavaco JEB, Vilroix C, Trudeau VL, Schulz RW, Goos HJ. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Am J Physiol-Reg* 1998; I 275, R1793-R1802.

Cerdá-Reverter JM, Sorbera LA, Carrillo M, Zanuy S. Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). *Am J Physiol* 1999; 277, R1627-R1634.

Chang JP, Mar A, Wlasichuk M, Wong AO. Kisspeptin-1 directly stimulates LH and GH secretion from goldfish pituitary cells in a Ca(2+)-dependent manner. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 179, 38-46.

Chauvigné F, Verdura S, Mazón MJ, Boj M, Zanuy S, Gómez A, Cerdà J. Development of a flatfish-specific enzyme-linked immunosorbent assay for Fsh using a recombinant chimeric gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 2014; DOI:10.1016/j.ygcen.2014.10.009

Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006; 147, 5817-5825.

Clements S, Schreck CB. The GABA agonist muscimol enhances locomotor activity, but does not alter the behavioural effects of CRH in juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiol Biochem* 2001; 24, 41-48.

Clements S, Schreck CB, Larsen DA, Dickhoff WW. Central Administration of Corticotropin-Releasing Hormone Stimulates Locomotor Activity in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen Comp Endocrinol* 2002; 125, 319-327.

Cobb J, Handel MA. Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9, 445-450.

Cook AM, Mieure KD, Owen RD, Pesaturo AB, Hatton J. Intracerebroventricular administration of drugs. *Pharmacotherapy* 2009; 29, 832-845.

Copeland PA, Thomas P. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 74, 474-483.

Cowan M, Davie A, Migaud H. Photoperiod effects on the expression of kisspeptin and gonadotropin genes in Atlantic cod, *Gadus morhua*, during first maturation. *Comp Biochem Physiol, Part A: Mol Integr Physiol* 2012; 163, 82-94.

Cuisset B, Pradelles P, Kime DE, Kühn ER, Babin P, Davail S, Le Menn F. Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comp Biochem and Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1994; 108, 229-241.

## 6. Bibliografía

---

- Davie A, Porter MJ, Bromage NR, Migaud H. The role of seasonally altering photoperiod in regulating physiology in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Part I. Sexual maturation. *Can J Fish Aquat Sci* 2007; 64, 84-97.
- De Leeuw R, Wurth Y, Zandbergen M, Peute J, Goos HT. The effects of aromatizable androgens, and estrogens on gonadotropin release in castrated African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel): a physiological and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1986; 243, 587-594.
- De Pedro N, Alonso-Gómez AL, Gancedo B, Delgado MJ, Alonso-Bedate M. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) as a food intake regulator in goldfish. *Physiol Behav* 1993; 53, 517-520.
- De Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10, 694-701.
- De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100, 10972-10976.
- Devauchelle N, Coves D. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reproduction in captivity: gametogenesis and spawning. *Aquat Living Resour* 1988; 1, 215-222.
- Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman, MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom, SR. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90, 6609-6615.
- Dickey JT, Swanson P. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Mol Endocrinol* 1998; 21, 291-306.
- Dickey JT, Swanson P. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* 2000; 118, 436-449.
- Ekstrom P, Meissl H. The pineal organ of teleost fishes. *Rev Fish Biol Fisher* 1997; 7, 199-284.
- Escobar S, Felip A, Gueguen MM, Zanuy S, Carrillo M, Kah O, Servili A. Expression of kisspeptins in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol* 2013a; 521, 933-948.
- Escobar S, Servili A, Espigares F, Gueguen MM, Brocal I, Felip A, Gómez A, Carrillo M, Zanuy S, Kah O. Expression of kisspeptins and kiss receptors suggests a large range of functions for kisspeptin systems in the brain of the European sea bass. *PloS one* 2013b; 8, e70177.

## 6. Bibliografía

---

- Ezzat AA, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Goto Y, Nakajima Y, Jin J, Yamashita T, Sawai K, Hashizume T. The role of sexual steroid hormones in the direct stimulation by Kisspeptin-10 of the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin from bovine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 2010; 121, 267-272.
- Falcón J, Migaud H, Munoz-Cueto JA, Carrillo M. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165, 469-482.
- Fauvel C, Suquet M, Dreanno C, Zonno V, Menu B. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquat Living Resour* 1998; 11, 387-394.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M. Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 2006; 256, 570-578.
- Felip A, Zanuy S, Muriach B, Cerdá-Reverter JM, Carrillo M. Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture* 2008; 275, 347-355.
- Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gomez A. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 312, 61-71.
- Fernald RD, White RB. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20, 224-240.
- Filby AL, van Aerle R, Duitman J, Tyler CR. The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biol Reprod* 2008; 78, 278-289.
- Fink G. Neuroendocrine regulation of pituitary function: general principles. In: P. M. Conn, M. E. Freeman, (Eds.), *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine* Human Press Inc., Totowa, New Jersey 2000; pp. 107-134.
- Fleming IA. Pattern and variability in the breeding system of Atlantic salmon (*Salmo salar*), with comparisons to other salmonids. *Can J Fish Aquat Sci* 1998; 55, 59-76.
- Forniés MA, Carrillo M, Mañanós E, Sorbera LA, Zohar Y, Zanuy S. Relative potency of the forms of GnRH and their analogs on LH release in sea bass. *J Fish Biol* 2003; 63, 73-89.
- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. The gonadal steroids. *Fish Physiol*, (Part A) 1983; 9, 277-372.
- Friars GW, Bailey JK, O'Flynn FM. Applications of selection for multiple traits in cage-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 1995; 137, 213-217.

## 6. Bibliografía

---

Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312, 1357-1363.

García-Allegue R, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J Pineal Res* 2001; 31, 68-75.

García-López Á, Bogerd J, Granneman JCM, van Dijk W, Trant JM, Taranger GL, Schulz RW. Leydig cells express FSH receptors in African catfish. *Endocrinology* 2008; 150, 357-365.

Gjerde B, Schaeffer LR. Body traits in rainbow trout: II. Estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 1989; 80, 25-44.

Gjerde B, Simianer H, Refstie T. Estimates of genetic and phenotypic parameters for body weight, growth rate and sexual maturity in Atlantic salmon. *Livestock Prod Sci* 1994; 38, 133-143.

Gómez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail PY, Breton B, Le Gac F. 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* 1999; 113, 413-428.

González-Martínez D, Madigou T, Zmora N, Anglade I, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Muñoz-Cueto JA, Kah. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol* 2001; 429, 144-155.

González-Martínez D, Zmora N, Mananos E, Saligaut D, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto JA. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH associated peptides. *J Comp Neurol* 2002a; 446, 95-113.

González-Martínez D, Zmora N, Zanuy S, Sarasquete C, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto JA. Developmental expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 2002b; 23, 255-267.

González-Martínez D, Madigou T, Mañanos E, Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Kah O, Muñoz-Cueto JA. Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. *Biol Reprod* 2004a; 70, 1380-1391.

## 6. Bibliografía

---

González-Martínez D, Zmora N, Saligaut D, Zanuy S, Elizur A, Kah, O, Munoz-Cueto JA. New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J Chem Neuroanat 2004b; 28, 1-15.

Gothilf Y, Munoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Kah O, Elizur A, Zohar Y. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. Biol Reprod 1996; 55, 636-645.

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology 2004; 145, 4073-4077.

Greives TJ, Mason AO, Scotti MAL, Levine J, Ketterson ED, Kriegsfeld LJ, Demas GE. Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. Endocrinology 2007; 148, 1158-1166.

Guilgur LG, Moncaut NP, Canario AV, Somoza GM. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2006; 144, 272-283.

Gur G, Bonfil D, Safarian H, Naor Z, Yaron Z. GnRH signaling pathways regulate differentially the tilapia gonadotropin subunit genes. Mol Cell Endocrinol 2002; 189, 125-134.

Gutiérrez-Pascual E, Martínez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagón MM, Castaño JP. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. J Neuroendocrinol 2007; 19, 521-530.

Hansen T, Karlsen O, Taranger GL, Hemre G-I, Holm JC, Kjesbu OS. Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. Aquaculture 2001; 203, 51-67.

Hapgood JP, Sadie H, Van Biljon W, Ronacher K. Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. J Neuroendocrinol 2005; 17, 619-638.

Hassin S, Gothilf Y, Blaise O, Zohar Y. Gonadotropin-I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimized ribonuclease protection assay. Biol Reprod 1998; 58, 1233-1240.

Hauge-Evans AC, Richardson CC, Milne HM, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. A role for kisspeptin in islet function. Diabetologia 2006; 49, 2131-2135.

Holland MC, Gothilf Y, Meiri I, King JA, Okuzawa K, Elizur A, Zohar Y. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle. Gen Comp Endocrinol 1998; 112, 394-405.

## 6. Bibliografía

---

Holland MCH, Hassin S, Zohar Y. Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei), during juvenile and pubertal development. *J Endocrinol* 2001; 169, 527-538.

Hoover EE. Experimental modification of the sexual cycle in trout by control of light. *Science* 1937; 86, 425-426.

Huang YS, Schmitz M, LeBelle N, Chang CF, Querat B, Dufour S. Androgens stimulate gonadotropin-II $\beta$ -subunit in eel pituitary cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 131, 157-166.

Hutchings JA, Fraser, DJ. The nature of fisheries- and farming-induced evolution. *Mol Ecol* 2008; 17, 294-313.

Imsland AK, Dragsnes M, Stefansson SO. Exposures to continuous light inhibits maturation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 2003; 219, 911-919.

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004; 80, 264-272.

Jalabert B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45, 261-279.

Jiang JQ, Wang DS, Senthilkumaran B, Kobayashi T, Kobayashi HK, Yamaguchi A, Ge W, Young G, Nagahama Y. Isolation, characterization and expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 cDNAs from the testes of Japanese eel (*Anguilla japonica*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Mol Endocrinol* 2003; 31, 305-315.

Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Kobayashi M. GTH II but Not GTH I Induces Final Maturation and the Development of Maturational Competence of Oocytes of Red Seabream *in Vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 1998, 112, 80-88.

Kah O, Dubourg P, Chambolle P, Calas A. Ultrastructural identification of catecholaminergic fibers in the goldfish pituitary. A high-resolution radioautographic study after in vitro 3H-dopamine administration. *Cell Tissue Res* 1984; 238, 621-626.

Kah O, Dubourg P, Martinoli MG, Rabhi M, Gonnet F, Geffard M, Calas A. Central GABAergic innervation of the pituitary in goldfish: aradioautographic and immunocytochemical study at the electron microscope level. *Gen Comp Endocrinol* 1987; 67, 324-332.

Kah O, Danger JM, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, Calas A. Characterization, cerebral distribution and gonadotrophin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 1989a; 7, 69-76.

Kah O, Pontet A, Danger JM, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, Calas A. Characterization, cerebral distribution, and gonadotrophin-releasing hormone activity of neuropeptide Y in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 1989b; 7, 69-73.

## 6. Bibliografía

---

- Kah O, Trudeau VL, Sloley BD, Chang JP, Dubourg P, Yu KL, Peter RE. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 1992; 55, 396-404.
- Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153, 346-364.
- Kah O. Endocrine targets of the hypothalamus and pituitary. In: Bernier NJ, Van Der Kraak G, Farrell AP, Brauner CJ. (Ed.), *Fish Physiology: Fish Neuroendocrinology: Fish Neuroendocrinology* (Vol. 28), Academic Press 2009; pp. 76-112.
- Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, Aida K. cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-Ib and -IIb) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 2001; 122, 117-129.
- Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda K, Oka Y. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 2008; 149, 2467-2476.
- Kanda S, Akazome Y, Mitani Y, Okubo K, Oka Y. Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons. *PloS One* 2013; 8, e62776.
- Karigo T, Aikawa M, Kondo C, Abe H, Kanda S, Oka Y, 2013. Whole brain-pituitary in vitro preparation of the transgenic medaka (*Oryzias latipes*) as a tool for analyzing the differential regulatory mechanisms of LH and FSH release. *Endocrinology* 2013; 155, 536-547
- Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, Hohmann JG, Pavlova MN, Rohde AD, Clifton DK, Steiner RA, Rissman EF. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci* 2007; 27, 8826-8835.
- Khakoo Z, Bhatia A, Gedamu L, Habibi HR. Functional specificity for salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 1994; 134, 838-847.
- Khan IA, Hawkins MB, Thomas P. Gonadal stage-dependent effects of gonadal steroids on gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Biol Reprod* 1999; 61, 834-841.
- Kim DK, Cho EB, Moon MJ, Park S, Hwang JI, Do Rego JL, Vaudry H, Seong JY. Molecular coevolution of neuropeptides gonadotropin-releasing hormone and kisspeptin with their cognate G protein-coupled receptors. *Front Neurosci* 2012; 6, 3.
- Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001; 130, 425-433.

## 6. Bibliografía

---

- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda KI. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 2005; 146, 4431-4436.
- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar IS. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 2009; 150, 821-831.
- Klenke U, Zohar Y. Gonadal regulation of gonadotropin subunit expression and pituitary Lh protein content in female hybrid striped bass. *Fish Physiol Biochem* 2003; 28, 25-27.
- Klenke U. Gonadal and Steroid Feedback Regulation of the Hypothalamus-Pituitary Axis in Striped Bass (*Morone Saxatilis*). College Park: University of Maryland; 2006.
- Kobayashi M, Stacey NE. Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool Sci* 1990; 7, 715-721.
- Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier . The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276, 34631-34636.
- Koulisch S, Kramer C, Grier H. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei, Labridae). *J Morph* 2002; 254, 292-311.
- Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103, 2410-2415.
- Kroeber S, Schomerus C, Korf HW. A specific and sensitive double-immunofluorescence method for the demonstration of S-antigen and serotonin in trout and rat pinealocytes by means of primary antibodies from the same donor species. *Histochem Cell Biol* 1998; 109, 309-317.
- Kumar RS, Trant JM. Hypophyseal gene expression profiles of FSH $\beta$ , LH $\beta$  and glycoprotein hormone- $\alpha$  subunits in *Ictalurus punctatus* throughout a reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 136, 82-89.
- Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GH, Seminara SB. Kiss1 $^{-/-}$  mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54 $^{-/-}$  mice. *Endocrinology* 2007; 148, 4927-4936.
- Leal MC, de Waal PP, García-López Á, Chen SX, Bogerd J, Schulz RW. Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function ex vivo. *Gen Comp Endocrinol* 2009; 162, 134-138.

## 6. Bibliografía

---

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88, 1731-1737.

Lee JH, Welch DR. Identification of highly expressed genes in metastasis suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* 1997; 71, 1035-1044.

Lee YR, Tsunekawa K, Moon MJ, Um HN, Hwang JI, Osugi T, Otaki N, Sunakawa Y, Kim K, Vaudry H, Kwon HB, Seong JY, Tsutsui K. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinol* 2009; 150, 2837-2846.

Lethimonier C, Madigou T, Munoz-Cueto JA, Lareyre JJ, Kah O. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135, 1-16.

Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós EL, Gómez A, Lareyre JJ. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165, 412-437.

Li S, Zhang Y, Liu Y, Huang X, Huang W, Lu D, Zhu P, Shi Y, Cheng CH, Liu X, Lin H. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol* 2009; 201, 407-418.

Liu X, Lee K, Herbison AE. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* 2008; 149, 4605-4614.

López-Patiño MA, Guijarro AI, Isorna E, Delgado MJ, Alonso-Bedate M, de Pedro N. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behavior in goldfish (*Carassius auratus*). *Eur J Pharmacol* 1999; 377, 147-153

Luque RM, Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Navarro VM, Tena-Sempere M, Kineman RD, Castaño JP. Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms. *Endocrinology* 2011; 152, 957-966.

Mañanós EL, Zanuy S, Carrillo M. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 $\beta$ -estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiol Biochem* 1997a; 16, 211-222.

Mañanós EL, Swanson P, Stubblefield J, Zohar Y. Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Gen Comp Endocrinol* 1997b; 108, 209-222.

Mañanós EL, Anglade I, Chyb J, Saligaut C, Breton B, Kah O. Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinology* 1999; 69, 269-280.

## 6. Bibliografía

---

- Mañanós EL, Carrillo M, Sorbera LA, Mylonas CC, Asturiano JF, Bayarri MJ, Zohat Y, Zanuy S. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J Fish Biol* 2002; 60, 328-339.
- Martínez-Chavez CC, Minghetti M, Migaud H. GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 2008; 156, 224-233.
- Mateos J, Mañanós E, Carrillo M, Zanuy S. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002; 132, 75-86.
- Mateos J, Mañanós E, Martínez-Rodríguez G, Carrillo M, Querat B, Zanuy S. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits ( $\alpha$ , FSH $\beta$ , and LH $\beta$ ) and their expression during the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 133, 216-232.
- Mateos J, Mañanós E, Swanson P, Carrillo M, Zanuy S. Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and development of specific immunoassay (ELISA). *Cienc Marinas* 2006; 32, 271-283.
- Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320, 383-388.
- Matta SL, Vilela DA, Godinho HP, França LR. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 2002; 143, 970-978.
- Mazón MJ, Zanuy S, Muñoz I, Carrillo M, Gómez A. Luteinizing Hormone Plasmid Therapy Results in Long-Lasting High Circulating Lh and Increased Sperm Production in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 2013; 88, 2.
- Mazón MJ, Gómez A, Yilmaz O, Carrillo M, Zanuy. Administration of follicle-stimulating hormone in vivo triggers testicular recrudescence of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 2014; 90, 6.
- McDowell EM, Trump BF. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 1976; 100, 405-414.
- Melamed P, Gur G, Elizur A, Rosenfeld H, Sivan B, Rentier-Delrue F, Yaron Z. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin II beta subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 1996; 64, 320-328.
- Messenger S. Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *J Neuroendocrinol*, 2005a; 17, 687-688.

## 6. Bibliografía

---

Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005b; 102, 1761-1766.

Migaud H, Wang N, Gardeur J-N, Fontaine P. Influence of photoperiod on reproductive performances in eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 2006; 252, 385-393.

Mikkelsen JD, Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Juul, A. Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regul Pept* 2009; 152, 95-100.

Millar RP. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* 2005; 88, 5-28.

Miura C, Miura T, Yamashita M, Yamauchi K, Nagahama Y. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Develop Growth Differ* 1996; 38, 257-262.

Miura T, Kohei Y, Hiroya T, Nagahama Y. Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Dev Biol* 1991a; 146, 258-262.

Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci USA* 1991b; 88, 5774-5778.

Miura T, Miura C, Ohta T, Nader RM, Todo T, Yamauchi K. Estradiol-17 $\beta$  stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264, 230-234.

Miura T, Chiemi M, Yasuko K, Kohei Y. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 2002; 129, 2689-2697.

Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, Ohta T, Miura C. Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103, 7333-7338.

Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J Mol Endocrinol* 2007; 38, 235-244.

Molés G, Gómez A, Rocha A, Carrillo M, Zanuy S. Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 2008; 158, 68-76.

Molés G, Gómez A, Carrillo M, Rocha A, Mylonas CC, Zanuy S. Determination of Fsh quantity and bioactivity during sex differentiation and oogenesis in European sea bass. *Biol Reprod* 2011; 85, 848-857.

## 6. Bibliografía

---

Molés G. Caracterización biológica de las gonadotrofinas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de herramientas biotecnológicas e inmunológicas para su estudio. Valencia; Universidad Politécnica de Valencia, 2011.

Molés G, Gómez A, Carrillo M, Zanuy S. Development of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 176, 70-78.

Moon JS, Lee YR, Oh DY, Hwang JI, Lee JY, Kim JI, Vaudry H, Kwon HB, Seong JY. Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to *Xenopus* kisspeptin. *Peptides* 2009; 30, 171-179.

Moore HD, Akhondi MA. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. *J Androl* 1996; 17, 50-60.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001; 276, 28969-28975.

Mylonas CC, Zohar Y, Woods LC, Thomas P, Schulz RW. Hormone Profiles of Captive Striped Bass *Morone saxatilis* During Spermiation, and Long-Term Enhancement of Milt Production. *J World Aquacult Soc* 1998; 29, 379-392.

Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 1994; 38, 217-217.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004; 145, 4565-4574.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005a; 146, 1689-1697.

Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Characterization of the potent luteinizing hormone releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 2005b; 146, 156-163.

## 6. Bibliografía

---

Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A. Temporal expression of Gprotein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. Gen Comp Endocrinol 2007; 150, 278-287.

Nocillado JN, Zohar Y, Biran J, Levavi-Sivan B, Elizur A. Chronic kisspeptin administration stimulated gonadal development in pre-pubertal male yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*; Perciformes) during the breeding and non-breeding season. Gen Comp Endocrinol 2013; 191, 168-176.

Norberg B, Brown CL, Halldorsson O, Stensland K, Björnsson BJ. Photoperiod regulates the timing of sexual maturation, spawning, sex steroid and thyroid hormone profiles in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture 2004; 229, 451-467.

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. Endocr Rev 2009; 30, 713-743.

Ohga H, Fujinaga Y, Selvaraj S, Kitano H, Nyuji M, Yamaguchi A, Matsuyama M. Identification, characterization, and expression profiles of two subtypes of kisspeptin receptors in a scombroid fish (*Chub mackerel*). Gen Comp Endocrinol 2013; 193, 130-140.

Ohga H, Selvaraj S, Adachi H, Imanaga Y, Nyuji M, Yamaguchi A, Matsuyama M. Functional analysis of kisspeptin peptides in adult immature chub mackerel (*Scomber japonicus*) using an intracerebroventricular administration method. Neurosci Lett 2014. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.072.

Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Biol Reprod 2007; 77, 970-977.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature 2001; 411, 613-617.

Ojima D, Iwata M. Central administration of growth hormone-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone stimulate downstream movement and thyroxine secretion in fall-smolting coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Gen Comp Endocrinol 2010; 168, 82-87.

Oka Y, Ichikawa M. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive system in the brain of the dwarf gourami (*Colisa lalia*) as revealed by light microscopic immunocytochemistry using a monoclonal antibody to common amino acid sequence of GnRH. J Comp Neurol 1990; 300, 511-522.

Okubo K, Nagahama Y. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. Acta Physiol (Oxf) 2008; 193, 3-15.

## 6. Bibliografía

---

- Okuzawa K. Puberty in teleosts. *Fish Physiol Biochem* 2002; 26, 31-41.
- Olivereau M, Ball JN. Contribution to the histophysiology of the pituitary gland of teleosts, particularly those of the *Poecilia* species. *Gen Comp Endocrinol* 1964; 47, 523-532.
- Osugi T, Ukena K, Sower SA, Kawauchi H, Tsutsui K. Evolutionary origin and divergence of PQRFamide peptides and LPXRFamide peptides in the RFamide peptide family. Insights from novel lamprey RFamide peptides. *FEBS J* 2006; 273, 1731-1743.
- Osugi T, Ohtaki N, Sunakawa Y, Son YL, Ohkubo M, Iigo M, Amano M, Tsutsu K. Molecular evolution of Kiss2 genes and peptides in vertebrates. *Endocrinology* 2013; 154, 4270-4280.
- Ozaki Y, Higuchi M, Miura C, Yamaguchi S, Tozawa Y, Miura T. Roles of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology* 2006; 147, 5139-5146.
- Page NM, Woods RJ, Lowry PJ. A regulatory role for neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regul Pept* 2001; 98, 97-104.
- Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61, 1652-1663.
- Pakdel F, Petit F, Anglade I, Kah O, Delaunay F, Bailhache T, Valotaire Y. Overexpression of rainbow trout estrogen receptor domains in *Escherichia coli*: characterization and utilization in the production of antibodies for immunoblotting and immunocytochemistry. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 104, 81-93.
- Pankhurst NW, Stacey NE, Kraak GVD. Reproductive development and plasma levels of reproductive hormones of goldeye, *Hiodon alosoides* (Rafinesque), taken from the North Saskatchewan River during the open-water season. *Can J Zool* 1986; 64, 2843-2849.
- Pankhurst NW. Effects of gonadotropin releasing hormone analogue, human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae). *Aquaculture* 1994; 125, 185-197.
- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. 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* 2004; 145, 3613-3618.
- Pasquier J, Lafont AG, Leprince J, Vaudry H, Rousseau K, Dufour S. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 173, 216-225.
- Patterson M, Murphy KG, Thompson EL, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR. Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinology* 2006; 18, 349-354.

## 6. Bibliografía

---

- Paullada-Salmerón JA, Aliaga-Guerrero M, Cowan M, Gallego-Recio V, Mañanos EL, Gómez A, Zanuy S, Muñoz-Cueto JA. The Gonadotropin-inhibitory hormone system in the European sea bass. 27th Conference of European Comparative Endocrinologists, Rennes (France) August 25-29, 2014.
- Paullada-Salmerón JA, Cowan M, Aliaga-Guerrero M, Gómez A, Zanuy S, Mañanos EL, Muñoz-Cueto JA. LPXRFa peptide system in the European sea bass: A molecular and immunohistochemical approach. *J Comp Neurol* 2015; doi:10.1002/cne.23833.
- Peng C, Chang JP, Yu KL, Wong AO, Van Goor F, Peter RE, Rivier JE. Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary: involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. *Endocrinology* 1993a; 132, 1820-1829.
- Peng C, Humphries S, Peter RE, Rivier JE, Blomqvist AG, Larhammar D. Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of growth hormone and gonadotropin-II in female goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1993b; 90, 306-317.
- Pickett GD, Pawson MG. Sea bass: biology, exploitation and conservation. Chapman & Hall, London (UK) 1994.
- Piche J, Hutchings JA, Blanchard W. Genetic variation in threshold reaction norms for alternative reproductive tactics in male Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Proc Roy Soc B - Biol Sci* 2008; 275, 1571-1575.
- Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*, 2008; 149, 1979-1986.
- Planas JV, Swanson P. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) *in vitro*. *Biol Reprod*, 1995, 52, 697-704.
- Plant TM. The male monkey as a model for the study of the neurobiology of puberty onset in man. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255, 97-102.
- Poncin P. Effects of different photoperiods on the reproduction of barbell, *Barbus barbus* (L.), reared at constant temperature. *J Fish Biol* 1989; 35, 395-400.
- Powell JF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA, Sherwood NM. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *P Natl Acad Sci* 1994; 91, 12081-12085.
- Prat F, Sumpter JP, Tyler CR. 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* 1996; 54, 1375-1382.

## 6. Bibliografía

---

- Prat F, Zanuy S, Bromage N, Carrillo M. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. *J Fish Biol* 1999; 54, 125-137.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 2001; 198, 325-338.
- Pudney J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 1995; 32, 459-467.
- Ramaswamy S, Seminara SB, Pohl CR, DiPietro MJ, Crowley WF Jr, Plant TM. Effect of continuous intravenous administration of human metastatin 45–54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 2007; 148, 3364-3370.
- Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* 2010; 1364, 116-128.
- Rebers FE, Bosma PT, van Dijk W, Goos HJ, Schulz RW. GnRH stimulates LH release directly via inositol phosphate and indirectly via cAMP in African catfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278, R1572-R1578.
- Rebers FE, Hassing GA, van Dijk W, van Straaten E, Goos HJ, Schulz RW. Gonadotropin-releasing hormone does not directly stimulate luteinizing hormone biosynthesis in male African catfish. *Biol Reprod* 2002; 66, 1604-1611.
- Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49, 654-664.
- Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 2006; 16, 1730-1735.
- Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 2008; 20, 381-393.
- Rocha A, Zanuy S, Carrillo M, Gómez A. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *Gen Comp Endocrinol* 2009, 162, 265-275.
- Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiol Biochem* 2000a; 23, 141-150.

## 6. Bibliografía

---

Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Soubrier MA, Mañanos E, Holland MC, Zohar Y, Zanuy S. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen Comp Endocrinol* 2000b; 120, 67-74.

Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Shaw M, Carrillo M. Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture* 2001a; 202, 235-248.

Rodríguez L, Zanuy S, Carrillo M. Influence of daylength on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 2001b; 196, 159-175.

Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Zohar Y, Zanuy S. Effects of photoperiod on pituitary levels of three forms of GnRH and reproductive hormones in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during testicular differentiation and first testicular recrudescence. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 136, 37-48.

Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): hormonal aspects. *Gen Comp Endocrinol* 2005; 140, 116-125.

Rodríguez R, Felip A, Cerqueira V, Hala E, Zanuy S, Carrillo M. Identification of a photolabile period for reducing sexual maturation in juvenile male sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by means of a continuous light regime. *Aquac Int* 2012; 20, 1071-1083.

Rye M, Gjerde B. Phenotypic and genetic parameters of composition traits and flesh color in Atlantic salmon. *Aquacult Res* 1996; 27, 121-133.

Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Goto Y, Jin J, Sawai K, Hashizume T. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. *Anim Sci J* 2012; 83, 487-492.

Sánchez-Vázquez FJ, Iigo M, Madrid JA, Zamora S, Tabata M. Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand-fed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J Comp Physiol B* 1997; 167, 409-415.

Sawada K, Ukena K, Satake H, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K. Novel fish hypothalamic neuropeptide. *Eur J Biochem* 2002; 269, 6000-6008.

Schulz RW, Goos HJT. Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 1999; 177, 5-12.

Schulz RW, Miura T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 2002; 26, 43-56.

## 6. Bibliografía

---

Schulz RW, van Dijk W, Bogerd J. Sertoli cell proliferation and FSH signalling in African catfish, *Clarias gariepinus*. *Fish Physiol Biochem* 2003; 28, 223-224.

Schulz RW, Menting S, Bogerd J, Franca L, Vilela D, Godinho H. Sertoli cell proliferation in the adult testis-evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod* 2005; 73, 891-898.

Schulz RW, de França, LR, Lareyre JJ, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega RH, Miura T. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165, 390-411.

Selvaraj S, Kitano H, Fujinaga Y, Ohga H, Yoneda M, Yamaguchi A, Shimizu A, Matsuyama M. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 169, 28-38.

Selvaraj S, Ohga H, Nyuji M, Kitano H, Nagano N, Yamaguchi A, Matsuyama, M. Subcutaneous administration of Kiss1 pentadecapeptide accelerates spermatogenesis in prepubertal male chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2013; 166, 228-236.

Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley Jr, WF, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349, 1614-1627.

Senthilkumaran B, Okuzawa K, Gen K, Ookura T, Kagawa H. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *J Neuroendocrinol* 1999; 11, 181-186.

Servili A, Lethimonier C, Lareyre JJ, Lopez-Olmeda JF, Sanchez-Vazquez FJ, Kah O, Muñoz-Cueto JA. The highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Endocrinology* 2010; 151, 2265-2275.

Servili A, Le Page Y, Leprince J, Caraty A, Escobar S, Parhar IS, Seong JY, Vaudry H, Kah O. Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology* 2011; 152, 1527-1540.

Servili A, Herrera-Pérez P, del Carmen Rendón M, Muñoz-Cueto JA. Melatonin Inhibits GnRH-1, GnRH-3 and GnRH Receptor Expression in the Brain of the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Int J Mol Sci* 2013; 14, 7603-7616.

Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102, 2129-2134.

## 6. Bibliografía

---

Shahjahan M, Motohashi E, Doi H, Ando H. Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 169, 48-57

Shi Y, Zhang Y, Li S, Liu Q, Lu D, Liu M, Meng Z, Cheng CH, Liu X Lin, H. Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17alpha-methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Biol Reprod* 2010; 83, 63-74.

Silverstein JT, Breininger J, Baskin DG, Plisetskaya EM. Neuropeptide Y like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen Comp Endocrinol* 1998; 110, 157-165.

Simonneaux V, Ansel L, Revel FG, Klosen P, Pevet P, Mikkelsen JD. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides* 2009; 30, 146-153.

Sloley BD, Kah O, Trudeau VL, Dulka JG, Peter RE. Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *J Neurochem* 1992; 58, 2254-2262.

Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 2008; 149, 1951-1959.

Sorbera LA, Mylonas CC, Zanuy S, Carrillo M, Zohar Y. Sustained administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. *J Exp Zool* 1996; 276, 361-368

Stearns SC, Koella JC. The evolution of phenotypic plasticity in life-history traits - predictions of reaction norms for age and size at maturity. *Evolution* 1986; 40, 893-913.

Stearns SC. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften* 2000; 87, 476-486.

Sumpter JP, Scott S. Seasonal variations in plasma and pituitary levels of gonadotrophin in males and females of two strains of rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 75, 376-388.

Suzuki S, Kadokawa H, Hashizume T. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 2008; 103, 360-365.

Svasand T, Jorstad KE, Ottera H, Kjesbu OS. Differences in growth performance between Arcto-Norwegian and Norwegian coastal cod reared under identical conditions. *J Fish Biol* 1996; 49, 108-119.

Swanson P. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. Paper presented at: Fish Symposium (Sheffield) 1991.

## 6. Bibliografía

---

Swanson P, Dickey JT, Campbell B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology Biochem* 2003; 28, 53-59.

Takashima F, Yamada Y. Control of maturation in masu salmon by manipulation of photoperiod. *Aquaculture* 1984; 43, 319-337.

Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien FA, Dufour S, Karlsten O, Norberg B, Andersson E, Hansen T. Control of puberty in farmed fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165, 483-515.

Tena-Sempere M, Felip A, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 175, 234-243.

Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillo WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2004; 16, 850-858.

Thorpe JE. Reproductive strategies in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult Fish Manage* 1994; 25, 77-87.

Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009; 41, 354-358.

Trudeau VL. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 1997; 2, 55-68.

Trudeau VL, Spanswick D, Fraser EJ, Lariviere K, Crump D, Chiu S, MacMillan M, Schulz RW. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish. *Biochem Cell Biol* 2000; 78, 241-259.

Tsutsui K, Ukena K. Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides* 2006; 27, 1121-1129.

Tsutsui K, Bentley GE, Ubuka T, Saigoh E, Yin H, Osugi T, Inoue K, Chowdhury VS, Ukena K, Ciccone N, Sharp PJ, Wingfield JC. The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153, 365-370.

Tuller T, Kupiec M, Ruppin E. Determinants of Protein Abundance and Translation Efficiency in *S. cerevisiae*. *PLoS Comput Biol* 2007; 3, e248.

Ueda H, Kambegawa A, Nagahama Y. Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 1985; 59, 24-30.

## 6. Bibliografía

---

Um HN, Han JM, Hwang JIK, Hong SI, Vaudry H, Seong JY. Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1200, 67-74.

Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Rev Genet* 2012; 13, 227-232.

Wagner GC, Johnston JD, Clarke IJ, Lincoln GA, Hazlerigg DG. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology* 2008; 149, 32-39.

Weil C, Crim LW. Administration of LHRH analogues in various ways: Effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 1983; 35, 103-115.

Weil C, Carre F, Blaise O, Breton B, Le Bail PY. Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. *Endocrinology* 1999; 140, 2054-2062.

West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1998; 54-145 148.

White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD. Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92, 8363-8367.

Witham EA, Meadows JD, Hoffmann HM, Shojaei S, Coss D, Kauffman AS, Mellon PL. Kisspeptin Regulates Gonadotropin Genes via Immediate Early Gene Induction in Pituitary Gonadotropes. *Mol Endocrinol* 2013; 27, 1283-1294

Wong AO, Leung MY, Shea WL, Tse LY, Chang JP, Chow BK. Hypophysiotropic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: immunohistochemical demonstration of PACAP in the pituitary, PACAP stimulation of growth hormone release from pituitary cells, and molecular cloning of pituitary type I PACAP receptor. *Endocrinology* 1998; 139, 3465-3479.

Xu C, Roepke TA, Zhang C, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) activates the m-current in GnRH neurons: an autoregulatory negative feedback mechanism?. *Endocrinology* 2008; 149, 2459-2466.

Yamamoto N, Parhar IS, Sawai N, Oka Y, Ito H. Preoptic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons innervate the pituitary in teleosts. *Neurosci Res* 1998; 31, 31-38.

Yang B, Jiang Q, Chan T, Ko WK, Wong AO. Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165, 60-71.

## 6. Bibliografía

---

Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Levavi-Sivan B. Regulation of fish gonadotropins. *Int Rev Cytol* 2003; 225, 131-185.

Yin H, Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K. A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity. *J Endocrinol* 2005; 184, 257-266.

Zanuy S, Carrillo M, Ruiz F. Delayed gametogenesis and spawning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) kept under different photoperiod and temperature regimes. *Fish Physiol Biochem* 1986; 2, 53-63.

Zanuy S, Prat F, Carrillo M, Bromage N. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 $\beta$ -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Living Resour* 1995; 8, 147-152.

Zanuy S, Carrillo M, Felip A, Rodriguez L, Blazquez M, Ramos J, Piferrer F. Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 2001; 202, 187-203.

Zanuy S, Carrillo M, Rocha A, Molés G. Regulación y control hormonal del proceso reproductor en teleósteos. En: *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura) 2009; pp. 97-154.

Zhang C, Bosch MA, Rønnekleiv OK, Kelly MJ.  $\gamma$ -Aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling. *Endocrinology* 2009; 150, 2388-2394.

Zmora N, Stubblefield J, Zulperi Z, Biran J, Levavi-Sivan B, Muñoz-Cueto JA, Zohar Y. Differential and gonad stage-dependent roles of kisspeptin1 and kisspeptin2 in reproduction in the modern teleosts, morone species. *Biol Reprod* 2012; 86, 177.

Zmora N, Stubblefield J, Golan M, Servili A, Levavi-Sivan B, Zohar Y. The medio-basal hypothalamus as a dynamic and plastic reproduction related kisspeptin-gnrh-pituitary center in fish. *Endocrinology* 2014; 155, 1874-1886.

Zohar Y, Elizur A, Sherwood NM, Powell JFF, Rivier JE, Zmora N. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 1995; 97, 289-299.

Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165, 438-455.

# **ANEXO I**

*Listado de publicaciones*



1. Molés, G., Rocha, A., **Espigares, F.**, Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. (2011) FSH plasma levels during testicular recrudescence of precocious and non precocious male European sea bass using a newly developed species specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Indian Journal of Science and Technology*, 4:58-59.
2. Escobar, S., Servili, A., **Espigares, F.**, Gueguen, M.M., Brocal, I., Felip, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. and Kah, O. (2012) Expression of kisspeptins and kiss receptors suggests a large range of functions for kisspeptin systems in the brain of the European sea bass. *PloS one* 2013; 8:e70177.
3. **Espigares, F.**, Carrillo, M., Gómez, A. and Zanuy, S. (2015) The forebrain-midbrain acts as functional endocrine signaling pathway of Kiss2/Gnrh1 system controlling the gonadotroph activity in the teleost fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 92:70
4. Mazón, M.J., Molés, G., Rocha, A., Crespo, B., Lan-Chow-Wing, O., **Espigares, F.**, Muñoz, I., Felip, A., Carrillo, M., Zanuy, S., Gómez, A. (2015) Gonadotropins in European sea bass: endocrine roles and biotechnological applications. *General and Comparative Endocrinology*, DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.05.002.
5. Felip, A.\*, **Espigares, F.\***, Zanuy, S., Gómez, A. (2015) Differential activation of kiss receptors by Kiss1 and Kiss2 peptides in the sea bass. *Reproduction*, DOI: 10.1530/REP-15-0204. **\*Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo.**
6. Carrillo, M., **Espigares, F.**, Felip, A., Escobar, S., Molés, G., Rodríguez, R., Alvarado, M.V., Gómez, A., Zanuy, S. (2015) Updating control of puberty in male European sea bass: a holistic approach. *General and Comparative Endocrinology*, DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.06.019.
7. **Espigares, F.**, Carrillo, M., Rocha, A., Gómez, A. and Zanuy, S. (2015) New insights into the factors mediating the onset of puberty in sea bass. *General and Comparative Endocrinology*, DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.08.013
8. **Espigares, F.**, Zanuy, S. and Gómez, A. (2015) Kiss2 as a regulator of Lh and Fsh secretion via paracrine/autocrine signaling in the teleost fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, DOI: 10.1095/biolreprod.115.131029
9. **Espigares, F.**, Carrillo, M., Rocha, A., Gómez, A. and Zanuy, S. Photoperiodic signalling mediates the control of Kiss1 and Gnrh2 neuronal populations on the reproductive axis in a teleost fish, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Enviado (General and Comparative Endocrinology)*.



## **ANEXO II**

*Participaciones en Congresos*



## Presentaciones orales

1. Felip, A., **Espigares, F.**, Escobar, S., Alvarado, M.V., Zanuy, S., Carrillo, M. and Gómez, A. Characterization of *Kiss* and *Gpr54* genes in vertebrates, from fish to mammals. 8<sup>th</sup> Congress of the Iberian Association of Comparative Endocrinology (5-7 de Septiembre de 2011). Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, España.
2. Felip, A., **Espigares, F.**, Escobar, S., Alvarado, M.V., Zanuy, S., Carrillo, M. and Gómez, A. Kisspeptin system in fish: Advances in the molecular and physiological characterization of *kiss/gpr54* genes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. XIII Spanish National Congress of Aquaculture (21-24 de Noviembre de 2011), Campus de Baix Llobregat, Universidad Politécnica de Cataluña, España.
3. Escobar, S., Servilli, A., **Espigares, F.**, Carrillo, M., Zanuy, S. and Kah, O. Expression of kiss receptors in somatostatin neurons in the brain of European sea bass, a teleost fish. 39<sup>th</sup> Symposium of the Society of Neuroendocrinology (25-27 de Septiembre de 2013) Fez, Morocco.
4. Carrillo, M., Escobar, S., **Espigares, F.**, Rodríguez, R., Gómez, A. and Zanuy, S. Puberty in sea bass: Environmental control and endocrine aspects (**Invited Closing lecture**, M. Carrillo). 10<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (25-30 de Mayo de 2014), Olhao, Portugal.
5. Gómez, A., Mazón, MJ., Molés, G., Rocha, A., Crespo, B., Lan-Chow Wing, O., Muñoz, I., **Espigares, F.**, Felip, A., Carrillo, M. and Zanuy, S. European sea bass *Dicentrarchus labrax* gonadotropins: endocrine roles and biotechnological applications (**Invited State of the Art Lecture**, A. Gómez). 10<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (25-30 de Mayo de 2014), Olhao, Portugal.
6. Kah O., **Espigares, F.**, Escobar, S., Alvarado, M.V, Gueguen, M.M., Felip, A., Servili, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. Kisspeptins in the brain of the European sea bass: expression, regulation and putative functions (**Invited State of the Art Lecture**, O. Kah). 10<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. (25-30 de Mayo de 2014), Olhao, Portugal.
7. Kah, O., Escobar, S., **Espigares, F.**, Alvarado, V., Servili, A., Felip, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. An overview on kisspeptins in European sea bass. (**Invited Plenary lecture**, O. Kah). International symposium on Reproductive Biology and Comparative Endocrinology (25-27 de Febrero de 2015), Varanasi, India.
8. Felip, A., **Espigares, F.**, Zanuy, S., Gómez, A. Differential activation of kiss receptors by Kiss1 and Kiss2 peptides in the sea bass. 9<sup>th</sup> Congress of the Iberian Association of Comparative Endocrinology (23-25 de Septiembre de 2015). Universidad de Jaume I, Castellón, Spain.

## Presentaciones en poster

1. Escobar, S., Servili, A., Felip, A., **Espigares, F.**, Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M. and Kah, O. Neuroanatomical characterization of the kisspeptin systems in the brain of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 25<sup>th</sup> Conference of European Comparative Endocrinologists (31 de Agosto-4 de Septiembre de 2010), Universidad de Pécs, Hungría.
2. **Espigares, F.**, Felip, A., Zanuy, S. and Gómez, A. Ligand selectivity of the sea bass kisspeptin receptors Gpr54-1b and Gpr54-2b. 8<sup>th</sup> Congress of the Iberian Association of Comparative Endocrinology (5-7 de Septiembre de 2011), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, España.
3. Molés G., Rocha A., **Espigares F.**, Gómez A., Carrillo M. y Zanuy S. FSH plasma levels during testicular recrudescence of precocious and non precocious male European sea bass using a newly developed species specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 9<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (9-14 de Agosto de 2011), Thrissur (Cochin), India.
4. Escobar, S., **Espigares, F.**, Felip, A., Zanuy, S., Giueguen, M.M., Carrillo, M., Kah, O., Servili, A. Kisspeptin/GPR54 expression in the brain of the European sea bass. 9<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (1-6 de Septiembre de 2012), Buenos Aires, Argentina.
5. **Espigares, F.**, Zanuy, S. and Gómez, A. Action of kisspeptin on *in vitro* gonadotropin release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 9<sup>th</sup> Congress of the Iberian Association of Comparative Endocrinology (13-14 de Julio de 2013), Universidad de Barcelona, Spain.
6. **Espigares, F.**, Carrillo, M., Gómez, A. and Zanuy, S. Central administration of Kiss1 and Kiss2 peptides stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology (15-19 de Julio de 2013), Universidad de Barcelona, España.
7. Escobar, S., Servili, A., Brocal, I., Felip, A., **Espigares, F.**, Zanuy, S., Carrillo, M., and Kah, O. Validation and characterization of specific kiss2 antibody: Neuroanatomic study and interactions with Kiss-r1 and Kiss-r2 in the brain of the European sea bass. 17<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology (15-19 de Julio de 2013), Universidad de Barcelona, España.
8. Escobar, S\*, **Espigares, F\***, Servili, A., Felip, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. and Kah, O. Kisspeptins in the brain of the European sea bass. 10<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (25-30 de Mayo de 2014), Olhao, Portugal. *\*Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo.*

9. **Espigares F.**, Rocha A., Gómez A., Carrillo M. y Zanuy S. Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass by regulation *kiss1* and *gnrh2* neuronal expression. 9<sup>th</sup> Congress of the Iberian Association of Comparative Endocrinology (23-25 de Septiembre de 2015). Universidad de Jaume I, Castellón, España.

