

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



Distribución neuroanatómica de los receptores
de estrógenos en la lubina (*Dicentrarchus
labrax*): implicaciones en la función
reproductora y el comportamiento alimenticio.
Control transcripcional de la hormona folículo
estimulante (FSH)

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Borja Muriach Saurí

Dirigida por: Dr. José Miguel Cerdá Reverter

Dr. Manuel Carrillo Estévez

VALENCIA
2012

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
PRESENTACIÓN	5
INTRODUCCIÓN	
1) Hormonas esteroideas.....	13
2) Estructura, origen y evolución de los receptores de estrógenos.....	16
2.1) Receptores nucleares.....	16
2.2) Receptores de esteroides.....	20
2.3) Receptores de estrógenos.....	22
2.3.1) Receptores de estrógenos en la lubina.....	28
2.3.1.1) Estructura génica de los receptores de estrógenos de la lubina.....	30
2.3.2) Mecanismos de acción clásicos de los receptores de estrógenos.....	31
2.3.3) Receptores esteroideos de membrana.....	33
2.3.4) Funciones diferenciales y redundantes de los receptores de estrógenos.....	35
3) Control neuroendocrino de la reproducción.....	38
3.1) El complejo cerebro-pituitaria.....	38
3.2) Gonadotropinas.....	39
3.3) Factores reguladores de las gonadotropinas.....	42
3.3.1) Hormona liberadora de gonadotropinas.....	42
3.3.2) Kipeptinas.....	46
3.3.3) Dopamina.....	47
3.3.4) Ácido gamma-aminobutírico.....	48

3.3.5) Esteroides sexuales. Retroalimentación del complejo cerebro-pituitaria.....	50
4) Control neuroendocrino de la ingesta.....	51
4.1) Factores anorexigénicos.....	52
4.1.1) Proopiomelanocortinas.....	52
4.1.2) Transcrito regulado por cocaína-anfetamina.....	53
4.1.3) Coleocistoquinina.....	54
4.1.4) Leptina.....	55
4.2) Factores orexigénicos.....	56
4.2.1) Neuropéptido Y.....	56
4.2.2) Proteína relacionada con el gen agutí.....	57
4.2.3) Orexinas.....	60
4.2.4) Hormona concentradora de melanocitos.....	60
4.2.5) Grelina.....	61
4.3) Esteroides sexuales e ingesta.....	62
OBJETIVOS.....	67
MATERIAL Y MÉTODOS	
1) Manejo de los animales.....	73
2) Distribución central de los receptores de estrógenos.....	73
2.1) Animales.....	73
2.2) Hibridación <i>in situ</i>	73
3) Estudios de localización conjunta.....	75
3.1) Animales.....	75
3.2) Doble hibridación <i>in situ</i>	75
4) Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión del gen β FSH. Caracterización de la región promotora β FSH.....	76
4.1) Efecto <i>in vitro</i> de los esteroides sexuales sobre la expresión del gen β FSH.....	76

4.1.1) Cultivo primario de células de pituitaria.....	76
4.1.2) Cuantificación de la expresión de la subunidad β FSH.....	78
4.1.3) Expresión de los resultados y análisis estadísticos.....	78
4.2) Caracterización de la región promotora del gen β FSH.....	79
4.2.1) Clonación del promotor β FSH.....	79
4.2.2) Determinación de la actividad basal y sensibilidad a los estrógenos.....	81
4.2.2.1) Construcciones.....	81
4.2.2.2) Transfecciones y condiciones de cultivo.....	82
4.2.2.3) Expresión de los resultados y análisis estadísticos.....	83
5) Estudios de transactivación del receptor de estrógenos (Esr1).....	84
5.1) Extracción y procesado de las muestras.....	84
5.2) Clonación del Esr1.....	84
5.3) Experimentos de transfección y condiciones de cultivo.....	85
5.4) Expresión de los resultados y análisis estadísticos.....	87
6) Detección de componentes estrogénicos en dietas para peces de cultivo.....	87
6.1) Creación de la línea celular HEsr1-LUC.....	87
6.2) Extracción y detección de componentes estrogénicos.....	87
6.3) Expresión de los resultados y análisis estadísticos.....	88

RESULTADOS

1) Distribución central de los receptores de estrógenos.....	91
1.1) Distribución del Esr1.....	96
1.1.1) Telencéfalo.....	96
1.1.2) Diencéfalo.....	96
1.1.3) Sinencéfalo.....	97
1.1.4) Mesencéfalo.....	98
1.1.5) Rombencéfalo.....	98

1.2) Distribución del Esr2a.....	105
1.2.1) Telencéfalo.....	105
1.2.2) Diencefalo.....	105
1.2.3) Mesencefalo.....	106
1.2.4) Rombencefalo.....	106
1.3) Distribución del Esr2b.....	106
1.3.1) Diencefalo.....	106
2) Distribución de los receptores de estrógenos en la pituitaria. Localización conjunta con las hormonas gonadotropas.....	113
3) Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión del gen β FSH. Caracterización de la región promotora β FSH.....	121
3.1) Cultivo primario de células de pituitaria.....	121
3.2) Caracterización de la región promotora del gen β FSH.....	122
3.2.1) Clonación del promotor β FSH. Análisis <i>in silico</i>	122
3.2.2) Determinación de la actividad basal y sensibilidad a los estrógenos.....	125
4) Perfil farmacológico del Esr1.....	129
5) Detección de componentes estrogénicos en piensos de acuicultura.....	130
DISCUSIÓN	
1) Distribución neuroanatómica de los receptores de estrógenos.....	135
2) Bases anatómicas del control estrogénico de la reproducción.....	140
3) Bases moleculares del control estrogénico de la reproducción.....	152
4) Bases anatómicas del control estrogénico de la ingesta.....	163
5) Componentes estrogénicos en piensos de acuicultura: implicaciones en el cultivo de peces.....	167
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175
APÉNDICES	229

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AgRP	Proteína relacionada con el gen agutí
AP 1	Proteína activadora 1
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elemento de respuesta a los andrógenos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CAR	Receptor de androstano
CART	Transcrito regulado por cocaína-anfetamina
CCK	Colecistoquinina
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Factor de transcripción dependiente de AMPc
CREM	Elemento modulador dependiente de AMPc
CRF	Hormona liberadora de corticotropinas
CPA	Eje cerebro-pituitaria-glándula adrenal
CPG	Eje cerebro-pituitaria-gónada
CYP	Citocromo P450
DA	Dopamina
DBD	Dominio de unión al DNA del receptor nuclear
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHP	17 α , 20 β -dihidroxiprogesterona
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a los estrógenos
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor de la hormona folículo estimulante
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GFP	Proteína de fluorescencia verde
GH	Hormona del crecimiento
GLP	Péptido relacionado con el glucagón
GnIH	Hormona inhibidora de gonadotropinas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GnRH-R	Receptor de hormona liberadora de gonadotropinas
GPER	Receptor de estrógenos acoplado a proteína G
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a los glucocorticoides

GSE	Elemento de respuesta específico de gonadotropos
GTH	Hormona gonadotropa
HSD	Hidroxiesteroide deshidrogenasa
ICER	Isoforma de CREM
KISS	Kispeptinas
11-KT	11-quetotestosterona
LBD	Dominio de unión al ligando del receptor nuclear
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de la hormona luteinizante
MAP	Proteína quinasa activada por mitógeno
MCH	Hormona concentradora de melanocitos
MCR	Receptor de melanocortinas
MSH	Hormona estimuladora de melanocitos
MR	Receptor de mineralocorticoides
NPY	Neuropéptido Y
OX	Receptor de orexinas
pb	Par de bases nitrogenadas
PIT 1	Factor de transcripción específico de pituitaria
POMC	Proopiomelanocortinas
PR	Receptor de progesterona
PRE	Elemento de respuesta a progesterona
PRL	Prolactina
PXR	Receptor x de pregnano
PY	Péptido Y
PYY	Péptido YY
RE	Receptor de esteroides
RN	Receptor nuclear
RXR	Receptor x de ácido retinoico
SF 1	Factor esteroideogénico 1
SNC	Sistema nervioso central
TRE	Elemento de respuesta a hormonas tiroideas
TSH	Hormona estimuladora del tiroides
Y	Receptor del neuropéptido Y

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los esteroides sexuales y adrenales.....	13
Figura 2. Biosíntesis de las hormonas esteroideas.....	14
Figura 3. Dominios funcionales de los receptores nucleares.....	18
Figura 4. Evolución de los receptores de esteroides.....	21
Figura 5. Secuencia aminoacídica de los receptores de estrógenos del corvín brasileño.....	26
Figura 6. Árbol filogenético basado en el alineamiento de secuencias aminoacídicas para los receptores de estrógenos en vertebrados.....	29
Figura 7. Secuencias consenso para el elemento de respuesta a los estrógenos y a los glucocorticoides.....	32
Figura 8. Mecanismos de acción de los receptores de estrógenos.....	34
Figura 9. Principales circuitos neuronales que controlan la síntesis y secreción de las gonadotropinas en peces.....	43
Figura 10. Principales circuitos reguladores de la ingesta en peces.....	59
Figura 11. Visión lateral del cerebro de la lubina.....	91
Figura 12. Dibujos esquemáticos de sucesivas secciones transversales rostrocaudales del cerebro y pituitaria de la lubina.....	92
Figura 13. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina, a nivel del telencéfalo, área preóptica e hipotálamo, procesadas mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas antisentido del Esr1 de la lubina.....	99
Figura 14. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina, a nivel del hipotálamo y tubérculo posterior, procesadas mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas antisentido del Esr1 de la lubina.....	101
Figura 15. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina, a nivel del sinencéfalo, tálamo dorsal y ventral, área preóptica, techo mesencefálico y área pretectal, tegmento mesencefálico y rombencéfalo, procesadas mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas antisentido del Esr1.....	103
Figura 16. Microfotografías en campo claro y oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina, a nivel del telencéfalo, área preóptica, tálamo ventral e hipotálamo tuberal, procesadas mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas antisentido del Esr2a de la lubina.....	107
Figura 17. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina, a nivel del tubérculo posterior, techo mesencefálico, metencéfalo y tegmento mesencefálico, procesadas mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas antisentido del Esr2a de la lubina.....	109
Figura 18. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina, a nivel del área preóptica e hipotálamo tuberal, procesadas mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas antisentido del Esr2b de la lubina.....	111

Figura 19. Microfotografías en campo claro de secciones transversales de la pituitaria de la lubina, mostrando la localización conjunta de la expresión del Esr1 con la de la β FSH y β LH.....	115
Figura 20. Microfotografías en campo claro de secciones transversales de la pituitaria de la lubina, mostrando la localización conjunta de la expresión de la β LH con la del Esr2a y Esr2b.....	117
Figura 21. Microfotografías en campo claro de secciones transversales de la pituitaria de la lubina, mostrando la localización conjunta de la expresión de la β FSH con la del Esr2a y Esr2b.....	119
Figura 22. Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión de la β FSH en cultivo primario de pituitarias de lubina.....	121
Figura 23. Análisis de restricción y “Southern blot” del clon 14.3.1.2, conteniendo las primeras 2.4 Kb de la región promotora del gen β FSH de la lubina.....	122
Figura 24. Representación esquemática del clon 14.3.1.2.....	123
Figura 25. Secuencia de nucleótidos de las 3.5 Kb de región promotora del gen β FSH de la lubina en la que se muestran sitios putativos de reconocimiento para diferentes factores de transcripción.....	125
Figura 26. Caracterización de la actividad basal del promotor β FSH de lubina en la línea celular HEK 293.....	127
Figura 27. Caracterización de la actividad basal del promotor β FSH de lubina en la línea celular L β T2.....	127
Figura 28a. Determinación de la sensibilidad a los estrógenos de la línea celular L β T2.....	128
Figura 28b. Determinación de la sensibilidad a los estrógenos de la línea celular L β T2.....	128
Figura 29. Regulación transcripcional por estrógenos del promotor β FSH en la línea celular L β T2.....	129
Figura 30. Caracterización farmacológica del Esr1 de la lubina.....	130
Figura 31. Curvas dosis-respuesta de clones HEK 293 expresando de manera estable el gen luciferasa y el Esr1 de la lubina.....	131
Figura 32. Detección de actividad estrogénica en piensos comerciales para peces.....	132

PRESENTACIÓN

Los estudios presentes se han desarrollado en el Departamento de Fisiología de Peces y Biotecnología del Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

La investigación desarrollada en este Departamento se centra principalmente en el estudio general del proceso reproductor de peces, con un énfasis especial en el control genético, hormonal y ambiental de la reproducción, la conducta alimenticia, así como la interrelación metabolismo energético-reproducción. Para ello se utilizan como modelos a la lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*) y el lenguado (*Solea senegalensis*).

Durante los últimos años, con el fin de aplicar la biotecnología a la mejora de las condiciones de cultivo en la acuicultura, se han ido integrando paulatinamente técnicas de biología molecular al estudio de la fisiología de peces. Ejemplo de algunas de estas técnicas llevadas a cabo en el Departamento de Fisiología y Biotecnología del IATS son: i) la caracterización de sondas genéticas ligadas al sexo, ii) la caracterización molecular de péptidos y hormonas reguladoras del balance energético y la reproducción y iii) el desarrollo de técnicas de transgénesis somática con genes testigo y líneas celulares transducibles.

En peces, al igual que en el resto de vertebrados, los esteroides sexuales ejercen un papel fisiológico fundamental en el control de la reproducción y el metabolismo energético. La idea original de los trabajos que aquí se presentan fue realizar la distribución neuroanatómica de los distintos subtipos de receptores de estrógenos caracterizados en la lubina, mediante la determinación de su expresión por experimentos de hibridación *in situ*. Dicha caracterización permite establecer una primera aproximación a las posibles funciones redundantes y diferenciales que estos pueden desarrollar de manera general, y sobre la reproducción y el comportamiento alimenticio, más concretamente. Asimismo, se llevaron a cabo experimentos para profundizar en la regulación de la producción de FSH a nivel de su expresión génica. Para ello, se realizó la caracterización de la región promotora de la subunidad β de dicha hormona y se determinó su actividad basal. El estudio se completó dilucidando el efecto *in vitro* de los esteroides sexuales sobre el control de la expresión de dicha subunidad mediante el uso de cultivos primarios de células de pituitaria y líneas celulares homólogas y heterólogas. Finalmente, a partir de los estudios que demuestran un efecto inhibitorio de los estrógenos sobre la ingesta en la lubina, se plantea la hipótesis de la susceptibilidad de

los mecanismos encargados de regular dicha conducta, a la presencia de componentes estrogénicos en las dietas de peces de cultivo.

La lubina pertenece al Orden de los Perciformes, Familia Serranidae. Esta especie es característica de las costas atlánticas y mediterráneas. Es una especie euriterma, lo que le permite tolerar temperaturas del agua de entre 5-6 °C en invierno, y de 27-28 °C en verano. Sin embargo la temperatura necesaria para su reproducción está restringida entre los 10 °C y los 12 °C. Asimismo, su carácter de especie eurihalina, le confiere una gran ventaja adaptativa ya que soporta el agua dulce, la salobre y la hipersalina (90‰), aunque su medio natural es el mar (~35 ‰). Si bien pertenece a una familia donde el hermafroditismo es frecuente, la lubina es una especie de sexos separados. Como muchos otros peces teleósteos, la lubina exhibe un proceso reproductor de carácter estacional (la puesta suele suceder en invierno, durante los meses de enero-marzo). La estacionalidad del proceso está fundamentalmente regulada por las condiciones ambientales, en particular el fotoperiodo y la temperatura. El comportamiento alimenticio de esta especie, también muestra un carácter estacional que está inversamente relacionado con los procesos reproductores. Las épocas de maduración y puesta coinciden con las menores tasas de ingesta anual, por el contrario las fases iniciales de su ciclo reproductor están relacionadas con las épocas de mayor actividad alimenticia.

Los resultados obtenidos en la tesis doctoral presente se presentaron en varios congresos celebrados en los últimos años: 3º Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada. Córdoba, 2003; 5th International Symposium on Fish Endocrinology. Castellón de la Plana, 2004; V Congreso de la Sociedad Ibérica de Endocrinología Comparada. Algarbe, 2005; 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. St Malo, 2007; XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid, 2009.

Una parte de los resultados que en esta tesis doctoral se presentan, han dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

Muriach B, Cerdá-Reverter J, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M (2008) Molecular characterization and central distribution of the estradiol receptor alpha (ER α) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 35, 33-48.

Muriach B, Carrillo M, Zanuy S, Cerdá-Reverter J (2008) Distribution of estrogen receptor 2 mRNAs (Esr2a and Esr2b) in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Brain Research 1210, 126-141.

Asimismo, se ha contribuido a la realización de estudios que dan soporte a la tesis doctoral presente, cuyos resultados han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Cerdá-Reverter J, Muriach B, Zanuy S, Muñoz-Cueto J (2008) A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): the midbrain and hindbrain. acta histochemica 110, 433-450.

Leal E, Sánchez E, Muriach B, Cerdá-Reverter J (2009) Sex steroid-induced inhibition of food intake in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Comparative physiology B 179, 77-86.

El trabajo presente se financió con los siguientes proyectos de investigación:

- AGL 2005-00796. Organismo financiador: Ministerio de Educación y Ciencia.
- PUBERTIMING QLTR-2001-01801. Organismo financiador: UE LIFE.
- PROBASS QLTR-2001-01801. Organismo financiador: UE (Programa FAIR).

INTRODUCCIÓN

1) HORMONAS ESTEROIDEAS

Los glucocorticoides, mineralocorticoides, y las hormonas sexuales constituyen las denominadas hormonas esteroideas, las cuales controlan una gama amplia de funciones fisiológicas y metabólicas, entre las que se encuentran: el control de la homeostasis de la glucosa, el control del balance electrolítico, la diferenciación sexual, la reproducción, el desarrollo de caracteres sexuales secundarios, respuesta inmunitaria y control del sistema nervioso (Chung et al., 1997, Baker, 2011, Eick y Thornton, 2011). Dichas hormonas se sintetizan a partir de un precursor común, el colesterol, el cual les confiere a todas ellas una estructura tetracíclica similar (Fig.1).

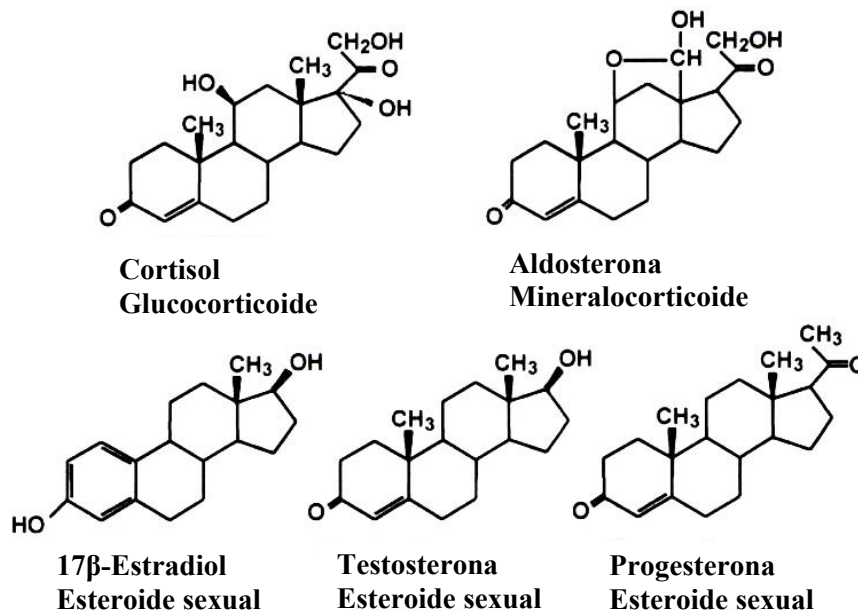


Fig. 1. Estructura de los esteroides sexuales y adrenales. Adaptado de Baker, 2011.

En la biosíntesis de los esteroides (Fig.2) están implicadas dos clases de enzimas principalmente, los citocromos P450 (CYP) y las hidroxisteroide deshidrogenasas (HSD). Ambas familias de enzimas contienen diversos miembros con secuencias y propiedades similares (Miller, 1988), pudiendo catalizar un mismo enzima diferentes reacciones de la biosíntesis esteroidea.

La esteroidogénesis comienza con la conversión del colesterol en pregnenolona mediante la actuación del CYP11A. Dicho enzima cataliza la reacción que elimina la cadena lateral del colesterol siendo el paso limitante en la síntesis de todos los esteroides y, por lo tanto, el punto de mayor control en la regulación de dicho proceso. Después de la formación de la pregnenolona, la ruta esteroidogénica se ramifica en: i) la

biosíntesis de mineralocorticoides vía intermediarios como la progesterona y la deoxicorticosterona para dar lugar a la aldosterona, ii) la biosíntesis de glucocorticoides vía intermediarios como la 17-hidroxipregnenolona y la 17-hidroxiprogesterona para dar lugar al cortisol y finalmente, iii) la biosíntesis de esteroides gonadales a partir de la 17-hidroxipregnenolona y la dehidroepiandrosterona para dar lugar al principal esteroide sexual masculino, la testosterona y el principal femenino, el 17 β -estradiol (Hu et al., 2001, Payne et al., 2004, Hsu et al., 2006).

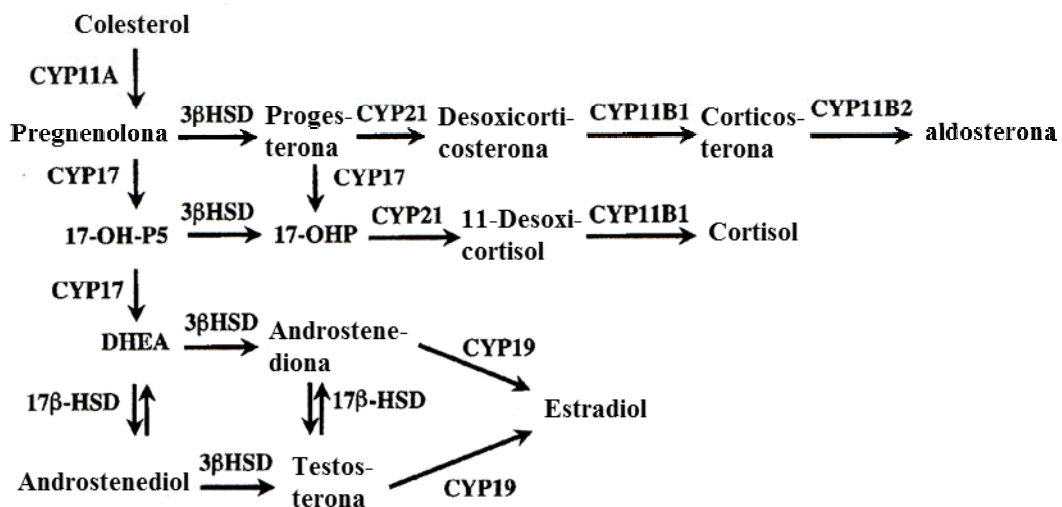


Fig. 2. Biosíntesis de hormonas esteroideas. Se muestran las tres rutas principales: síntesis de mineralocorticoides, glucocorticoides y esteroides gonadales. 17-OH-P5: 17-hidroxipregnenolona, 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona, DHEA: dehidroepiandrosterona, CYP11A: citocromo P450 familia 11 subfamilia A, CYP21: citocromo P450 familia 21, CYP11B1: citocromo P450 familia 11 subfamilia B polipéptido 1, CYP11B2: citocromo P450 familia 11 subfamilia B polipéptido 2, CYP19: citocromo P450aromatasa, 3 β HSD: 3-beta-hidroxiesteroide-deshidrogenasa, 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Adaptado de Hu et al., 2001.

La biosíntesis de estrógenos se produce a partir de la aromatización irreversible de los andrógenos por el enzima aromatasa (CYP19). Este proceso que comprende tres reacciones (hidroxilación, oxidación y demetilación), transforma andrógenos de diecinueve carbonos como la dehidroepiandrosterona (DHEA), la androstenediona y la testosterona, en estrógenos de dieciocho carbonos como son, el estriol, la estrona y el 17 β -estradiol (Boon et al., 2010). Dada la variedad amplia de funciones que desempeñan los estrógenos en los animales, deficiencias en la actividad aromatasa causan, entre otras, anomalías en el sistema nervioso, el sistema reproductor, metabolismo y conductas comportamentales (Santen et al., 2009, Boon et al., 2010, Czajka y Simpson, 2010).

Los principales sitios donde se produce la síntesis de esteroides son la corteza adrenal, el ovario y las células de Leydig testiculares. En la corteza adrenal la esteroidogénesis está bajo el control de la pituitaria dentro del eje cerebro-pituitaria-glándula adrenal (CPA). El hipotálamo secreta la hormona estimuladora de corticotropinas (CRF), que actúa en la pituitaria estimulando la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH llega, vía sanguínea, a las células de la corteza adrenal donde se une a receptores de membrana desencadenando una cascada de segundos mensajeros que finaliza con la producción de cortisol. Los niveles de cortisol regulan, a su vez, mediante un sistema de retroalimentación la actividad del hipotálamo y la pituitaria, completándose de esta manera la regulación de la esteroidogénesis a través del eje CPA (Simpson y Waterman, 1988). En las gónadas, la producción de esteroides está bajo el control del eje cerebro-pituitaria-gónada (CPG). El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual estimula en la pituitaria la producción de las mismas. De manera análoga a la estimulación de la producción de cortisol en la corteza adrenal por la ACTH, las gonadotropinas, vía sanguínea, estimularán en las gónadas la producción de esteroides sexuales. Dichos esteroides, actuarán regulando el eje CPG en todos sus niveles (Smith, 2008).

El cerebro también sintetiza neuroesteroides (Sinchak et al., 2003). Si bien, los esteroides sexuales periféricos son clasificados como hormonas, los neuroesteroides están considerados como neurotransmisores que modulan la actividad neuronal. La síntesis de neuroesteroides está sometida a un control fisiológico diferente de la esteroidogénesis periférica e implica la síntesis *de novo* de colesterol en el cerebro, actuando las mismas familias de enzimas que en la síntesis periférica de esteroides (Zwain et al., 1999, Micevych y Sinchak, 2008). Según los distintos tipos de células cerebrales que se trate, estos presentarán una determinada especificidad en la producción de neuroesteroides. Los astrocitos son las principales células esteroidogénicas y producen principalmente neuroprogesterona, pero también dehidroepiandrosterona y andrógenos. Los oligodendrocitos sintetizan principalmente pregnenolona mientras que las neuronas aromatizan los andrógenos circulantes en estrógenos.

2) ESTRUCTURA, ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (ERs)

Muchas de las acciones fisiológicas de las moléculas lipofílicas, como son las hormonas esteroideas, están mediadas por su unión a receptores nucleares (RNs). La unión de dichas hormonas a los mismos, provoca su activación desencadenando, en última instancia, la transcripción de diversos genes diana los cuales provocan cambios en el estado fisiológico y metabólico del animal. Sin embargo, los esteroides también pueden ejercer sus acciones por mecanismos alternativos a las acciones genómicas clásicas. Estas acciones, que producen efectos rápidos y que no activan la transcripción génica, están mediadas por receptores de membrana a través de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y las proteínas quinasa activadas por mitógenos (quinasas MAP, Norman et al., 2004).

2.1) RNs

Los RNs, pertenecen a una superfamilia de factores transcripcionales relacionados, los cuales, regulan la acción de las hormonas liposolubles y otros compuestos sobre numerosos procesos fisiológicos en los metazoos (Thornton y De Salle, 2000). Estos compuestos, entre los que se encuentran los esteroides sexuales y adrenales, ecdiesteroides, tiroxina, ácidos retinoicos, vitamina D, ácidos grasos y ácidos bólicos, atraviesan las membranas celulares uniéndose específicamente a dichos receptores. La localización intracelular de los RNs, puede variar en función del tipo de hormona, pudiéndose encontrar estos, en el citoplasma, en el mismo núcleo o divididos entre el citoplasma y el núcleo (Walters et al., 1981). La unión del ligando, provoca un cambio en la conformación del receptor. Esto, permite su unión a determinadas secuencias del DNA de las regiones promotoras, activando o inhibiendo la expresión génica.

Los RNs, se caracterizan en base a su bien conservada estructura basada en dominios. La arquitectura canónica de un RN consta de cinco regiones (Fig.3). Las regiones más conservadas son la de unión al DNA (DBD, región C) y la de unión al ligando (LBD, región E) y las menos conservadas son los dominios A, B, D y F (Owen y Zelent, 2000).

La DBD está formada por dos motivos “dedos de cinc” ricos en cisteínas (CI y CII). Entre las dos últimas cisteínas del CI se encuentra la caja P (P-box), la cual confiere especificidad para la unión al DNA diana. Algunos RNs como los del ácido

retinoico, hormona tiroidea, vitamina D y ERs disponen de una P-box que reconoce la secuencia AGGTCA (grupo ER P-box, en referencia al ER). Receptores como los de glucocorticoides (GRs), mineralocorticoides (MRs), andrógenos (ARs) y progesterona (PRs) disponen de una P-box que reconoce la secuencia AGAACA (grupo GR P-box, en referencia al GR; Zilliacus et al., 1994, Laudet et al., 1997). Mutaciones en los residuos de la P-box del grupo ER por residuos de la P-box del grupo GR provoca que, receptores del grupo ER P-box se unan a secuencias del grupo GR P-box, lo cual podría haber sido el motivo de la divergencia y evolución que han sufrido los RNs. Así, mutaciones en un receptor ancestral con una ER P-box daría lugar a una proteína que reconocería la secuencia correspondiente a la GR P-box y que dicho nuevo receptor mutado tendría libertad para adquirir nuevas funciones evolucionando hacia los PRs, GRs, MRs y AR (Owen y Zelent, 2000).

Las secuencias diana para la DBD en el DNA, presentan un alto grado de conservación. Un motivo formado por dos secuencias palindrómicas, evertidas o repeticiones directas de PuGGTCA (Pu, purina), se encuentran en los promotores de genes diana para los RNs desde equinodermos hasta mamíferos (Mangelsdorf et al., 1995, Le Jossic y Michel, 1998).

La LBD es la región encargada de la unión al ligando. Es un complejo funcional en el que se distinguen diferentes subregiones que permiten la unión al ligando, la capacidad de dimerización y la regulación de la actividad transcripcional. Existen dos regiones conservadas dentro de este dominio. La primera, es el motivo AF2 encargado de la transactivación dependiente de ligando, a través del reclutamiento de coactivadores que permiten una remodelación de la cromatina, favoreciendo así la actividad transcripcional (Lemon y Freedman, 1999). La segunda, es el dominio Ti. Alteraciones en este dominio no afectan a la unión del ligando ni a la capacidad de dimerización, pero sí a la transactivación dependiente de ligando (Bourguet et al., 1995).

Las regiones A y B designadas como el dominio A/B contienen la función de activación independiente de ligando (AF1). Este dominio está muy poco conservado dentro de la superfamilia de RNs, pero bien conservado a lo largo de la evolución de un receptor concreto (Owen y Zelent, 2000). La AF1 es específica de regiones promotoras y tipos celulares concretos, regulando la transcripción de manera coordinada con la AF2 (Leid et al., 1992). Diversos estudios, ponen de manifiesto, que la fosforilación del

dominio A/B facilita la unión al DNA de manera independiente del ligando (Kato et al., 1995, Taneja et al., 1997, Rochette-Egly et al., 1997).

El dominio D, denominado como región bisagra, es una zona flexible adyacente a las regiones C y E. Se ha visto que en muchos RNs esta región contiene señales de localización nuclear y que sus extremos forman parte de los dominios contiguos (C, E), influenciando en la actividad de ambos. La región N-terminal del dominio D está implicada en la capacidad de dimerización del receptor y en el reconocimiento de secuencias en el DNA (cajas T y A). La región C-terminal de dicho dominio está implicada en la regulación dependiente de ligando entre el receptor y represores génicos (Heinzel et al., 1997). La importancia de los extremos del dominio D en la actividad del RN explica la conservación de los mismos pero no así de la región central (Owen y Zelent, 2000).

El dominio F, que en algunos RNs está ausente, es la región menos conservada de todas, y se entiende poco el papel que desarrolla. En receptores de esteroides (REs), se ha comprobado que este dominio está implicado en la activación transcripcional y en conferir especificidad dependiente de ligando (Montano et al., 1995).

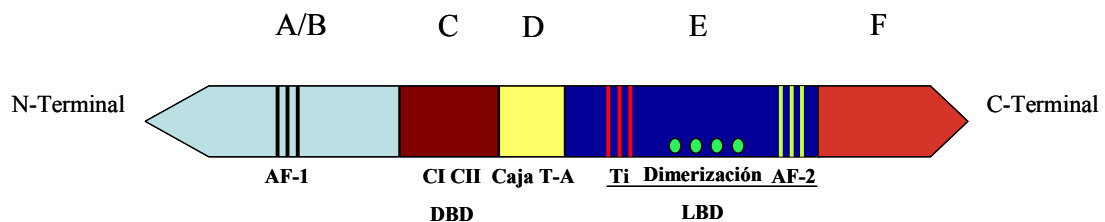


Fig. 3. Dominios funcionales conservados de los RNs. El dominio N-terminal (A/B), el dominio de unión al DNA (DBD, C), el dominio variable bisagra (D), el dominio de unión al ligando (LBD, E) y el dominio C-terminal (F). En el dominio A/B, se muestra la transactivación independiente de ligando (AF-1). En el dominio C, se muestra los motivos dedos de zinc. En el dominio D se muestra la cajas T y A implicadas en la capacidad de dimerización y reconocimiento de secuencias en el DNA. Finalmente, en el dominio E se muestran la caja conservada Ti, los residuos implicados en la dimerización del receptor y la transactivación dependiente de ligando (AF-2). Adaptado de Owen y Zelent, 2000.

La amplia diversidad de funciones esenciales que los genes controlados por los RNs desempeñan, sugiere, que estos son un eslabón clave en la evolución de los organismos (Thornton y DeSalle, 2000).

Se han sugerido dos hipótesis para explicar la evolución de los RNs. La primera hipótesis defiende, que esta superfamilia habría evolucionado por un estricto proceso de

duplicación y divergencia a partir de un gen ancestral (Amero et al., 1992, Laudet et al., 1992). La segunda considera a los RNs como construcciones modulares producidas cuando los dominios de unión al DNA y al ligando se juntan para producir nuevos receptores (Yamamoto, 1985). Estudios recientes han propuesto un nuevo modelo evolutivo a partir del cual los RNs habrían podido diversificarse y especializarse. Este modelo, denominado “explosión del ligando”, implicaría al ligando como una fuerza conductora de la evolución del receptor. A través de la selección, metabolitos intermediarios de las rutas biosintéticas de las hormonas podrían unirse a receptores duplicados tras una alteración de las afinidades de estos últimos, creándose un nuevo par receptor-ligando (Thornton, 2001, Bridgham et al., 2006).

Los estudios filogenéticos (Thornton y DeSalle, 2000) indican que hay cinco clases principales de RNs. Esta clasificación contrasta con la que presenta Laudet que integra siete clases principales de receptores (Laudet, 1997). La clase I contiene receptores activadores del proliferador de peroxisomas (PPARs), los represores transcripcionales Rev-erb A y B, los receptores huérfanos retinoicos ROR/RZR, algunos receptores de protóstomos relacionados (DHR3, receptor regulador del crecimiento de *Drosophila* (E78a y E75a), receptores de ecdisona de *Drosophila* (CHR3), receptor de nemátodo homólogo al DHR3 y CNR14, receptor de hormona tiroidea (TR) de nematodo, y los receptores de ácido retinoico (RARs) y TRs. La clase II incluye al receptor de ecdisona y los receptores relacionados en vertebrados: receptor X farsenoide (FXR), proteína de interacción con el receptor X de ácido retinoico (UR), receptor X alfa hepático (LXR) y finalmente el receptor de la vitamina D. La clase III incluye al receptor B inductor del factor nervioso de crecimiento (NGFI-B) y proteínas relacionadas como el receptor de artrópodos DHR38. La clase IV incluye numerosos receptores implicados en el desarrollo como los receptores X de ácido retinoico (RXRs), el factor de transcripción de ovoalbúmina de pollo (COUP-TF1), la proteína reguladora de la apolipoproteína-A1 (COUP-TF2), el factor nuclear hepático 4 (HNF4), las proteínas sin cola de *Drosophila* (TLL) y de vertebrados (TLX), los receptores testiculares (TR2, TR4) y su ortólogo artrópodo DHR78 (RN huérfano de *Drosophila*). Finalmente, la clase V, contiene a los receptores esteroideos de vertebrados incluyendo el factor esteroideogénico 1 (SF1), los receptores de artrópodos Ftz-F1a y Ftz-F1b (factores fusi tarazu) y el factor nuclear de células germinales implicado en la gametogénesis (GCNF). Cada una de las cinco clases de receptores contiene secuencias tanto de vertebrados como de artrópodos, indicando que las cinco, probablemente se

encontrarían representadas en el ancestro común, y que la superfamilia de los RNs estaría ya bien diversificada cuando los linajes de protóstomos y deuteróstomos divergieron (Thornton y DeSalle, 2000).

2.2) REs

Los REs pertenecen a la superfamilia de los RNs. Existen seis tipos de REs, todos ellos relacionados entre sí: ER α , ER β , PR, AR, GR y MR. Si bien los RNs se encuentran tanto en invertebrados como en vertebrados, en un principio se pensó que los REs surgieron con la aparición de los primeros vertebrados (Baker, 1997, Escrivá et al., 2000, Thornton, 2001, Guerriero, 2009).

Estudios filogenéticos indican que el receptor ancestral a partir del cual los REs habrían evolucionado, aparecería por primera vez en la lamprea (*Petromyzon Marinus*) cuando ésta divergió de los vertebrados mandibulados hace 450 millones de años (Thornton, 2001, Guerriero, 2009). Estudios posteriores identificaron un ortólogo del ER en el gasterópodo *Aplysia californica* (Thornton et al., 2003) y en el cefalópodo *Octopus vulgaris* (Keay et al., 2006). Dicho ER estaría relacionado filogenéticamente con los ERs de vertebrados.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto que el receptor ancestral (AncSR1), que permitió mediante una serie de duplicaciones génicas la evolución y diversificación de los REs, apareció con anterioridad a la separación de los linajes de vertebrados e invertebrados (protóstomos-deuteróstomos, Eick y Thornton, 2011, Fig. 4). Dicho ancestro sería un ER, corroborando así los estudios previos de Thornton (Thornton, 2001). La filogenia de los REs indica que existen dos subgrupos principales de REs, i) ER α y ER β y ii) AR, PR, GR y MR. La duplicación del AncSR1 ocurrida con anterioridad a la separación de deuteróstomos y protóstomos, dio lugar a la aparición del ER y a un receptor ancestral (AncSR2) del AR, PR, GR y MR. Dentro de los protóstomos, la ausencia en moluscos y anélidos de los REs no estrogénicos posiblemente se deba a una subsiguiente pérdida evolutiva del AncSR2. De manera similar, la pérdida tanto del ER como del AncSR2 habría propiciado la ausencia de todos los REs en nemátodos y artrópodos. Con posterioridad a la separación de vertebrados del resto de cordados, el AncSR2 sufrió de manera sucesiva las dos duplicaciones completas del genoma ocurridas al comienzo del linaje de los vertebrados (Van de Peer et al., 2009). Como resultado de la primera duplicación, los primeros vertebrados (peces sin mandíbula), contendrían tres REs: un ER, un AR/PR y un

GR/MR. Sería ya en la segunda duplicación, cuando aparecerían los seis REs ($ER\alpha$, $ER\beta$, AR, PR, GR y MR) conocidos en la mayoría de vertebrados mandibulados. En peces, se han identificado ortólogos de los seis tipos de REs presentes en los tetrápodos (Escriva et al., 1997, Colombe et al., 2000). Similar a lo ocurrido en protóstomos, dentro de los deuteróstomos, los equinodermos y urocordados habrían sufrido también la pérdida de todos sus REs (Eick y Thornton, 2011).

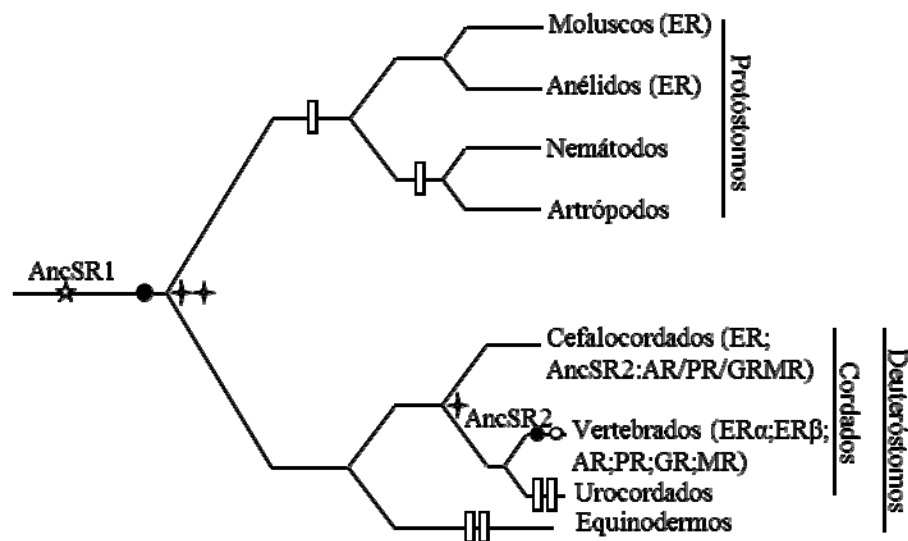


Fig. 4. Evolución de los REs. La estrella blanca indica el origen de la familia de los REs (AncSR1). Los círculos señalan el momento de las duplicaciones génicas, negro, para la duplicación de los dos ancestros de los REs, y blanco, para la duplicación que dio lugar a los seis tipos de REs. La duplicación del AncSR2 correspondería posiblemente con la primera duplicación completa del genoma ocurrida al comienzo de la aparición de los vertebrados. La duplicación, que originó los seis tipos de REs en vertebrados habría tenido lugar, posiblemente durante la segunda duplicación completa del genoma acontecida al comienzo del linaje de los vertebrados. El doble asterisco, señala el último ancestro común de protóstomos-deuteróstomos. El asterisco, señala el último ancestro común de vertebrados y cordados. Los rectángulos blancos, indican pérdidas génicas que explicarían la ausencia de REs en los nemátodos, artrópodos, urocordados y equinodermos. Adaptado de Eick y Thornton, 2011.

Los ERs, PRs, y ARs presentan un elevado grado de homología en los dominios funcionales más importantes (DBD y LBD) a lo largo de los vertebrados. Sin embargo, pese a este elevado grado de homología, cada uno de ellos ha desarrollado una elevada especificidad a nivel de ligando. El PR tiene dos isoformas, PR-A y PR-B, las cuales regulan la actividad transcripcional de manera diferente debido a diferencias en el dominio A/B, así como también presentan diferente afinidad de unión por la progesterona. De la misma manera, diversas isoformas han sido detectadas para el AR. Dada la existencia de isoformas y subtipos, así como de diferentes propiedades de

afinidad y selectividad por el ligando, y por su amplia distribución tisular, todo ello hace, que los REs ejerzan un papel clave en multitud de efectos pleiotrópicos.

Desde un punto de vista filogenético, los REs sexuales pueden ser utilizados como marcadores genéticos para el estudio y la comprensión de los mecanismos de duplicación que permitieron conocer el origen de los linajes de vertebrados y peces teleósteos (Robinson-Rechavi et al., 2001, Escriva et al., 2003).

2.3) ERs

El ER, es el único dentro de la subfamilia de los REs que presenta más de un subtipo ($ER\alpha$ y $ER\beta$). Ambos, presentan diferentes propiedades de unión, expresión y distribución. Los estudios llevados a cabo en humanos permitieron clonar el primer ER de una línea celular cancerígena de mama (Walter et al., 1985). Gracias a las homologías encontradas al comparar los cDNAs de dicho receptor y el ER del pollo, y del conocimiento previo sobre el comportamiento similar que los ERs presentan con respecto a los MRs y los GRs, se pudo determinar que el ER clonado en humanos presenta la estructura clásica, basada en dominios de los RNs (Walter et al., 1985). Estudios posteriores, permitieron clonar un ER en el útero de rata el cual presenta una alta afinidad por el 17β -estradiol (Koike et al., 1987). Dicho trabajo pone de manifiesto que los ERs de humano, rata y pollo (Krust et al., 1986) presentan un grado elevado de identidad proteica (88% rata/humano, 77% rata/pollo). Estudios comparativos, corroboran, que los dominios DBD y LBD son los más conservados filogenéticamente. El DBD de los ERs de las tres especies presenta un 100% de homología y el LBD entre rata y humano, y rata y pollo muestran un 96% y 93.6%, respectivamente (Koike et al., 1987).

Con posterioridad, trabajos llevados a cabo en humano y rata, permitieron identificar un nuevo subtipo de ER (Kuiper et al., 1996, Mosselman et al., 1996), al que se denominó $ER\beta$ en contraposición al primer subtipo descubierto, que pasó a denominarse $ER\alpha$. En humanos el $ER\beta$, cuya expresión se detecta en ovario, testículo, timo y bazo presenta un elevado grado de homología con el $ER\alpha$ en el DBD (96%) y algo menos en el LBD (58%). Ambos subtipos muestran una elevada afinidad por el 17β -estradiol, siendo la del $ER\alpha$ algo superior a la del $ER\beta$ (Mosselman et al., 1996). En la rata, el $ER\beta$ se localiza en las células de la granulosa de los folículos ováricos y en el epitelio de los alvéolos prostáticos. El grado de homología de las secuencias aminoacídicas del DBD y el LBD entre el subtipo α y el β fue de 95% y 55%,

respectivamente. Estudios de afinidad por el ligando, pusieron de manifiesto que el ER β también es capaz de unir, aunque con menor afinidad, dietilestilbestrol, estriol, estrona y 5 α -androstano-3 β , 17 β -diol. Por el contrario, no existe afinidad alguna por la testosterona, progesterona, corticosterona y el 5 α -androstano-3 α , 17 β -diol, ni siquiera a elevadas concentraciones (Kuiper et al., 1996).

En mamíferos, cada subtipo presenta diferentes isoformas. Estudios desarrollados en la rata muestran dos isoformas del ER en la pituitaria. Dichas isoformas, se producen como resultado de un procesado alternativo de los exones 1-4 del gen original. Ambas se encuentran en la pituitaria de hembras pero no en el útero, ni en machos. El tratamiento con 17 β -estradiol, induce la expresión de estas isoformas alternativas en la pituitaria de machos indicando que estas podrían modular los efectos del 17 β -estradiol de manera específica según el promotor génico y el tejido donde se expresen (Friend et al., 1995). De la misma manera, una isoforma truncada del ER α , presente en la pituitaria de rata, se expresa sustancialmente durante la fase estro en comparación con los niveles del ER α durante la fase proestro, sugiriendo que dicha isoforma estaría implicada en los mecanismos de retroalimentación a nivel de la pituitaria (Schreihofner et al., 1999). Respecto al ER β , los experimentos llevados a cabo en la rata para amplificar el LBD permitieron descubrir una nueva isoforma. Dicha isoforma, que es de mayor tamaño que la secuencia del receptor original, incluye 18 aminoácidos adicionales. Ambas isoformas se expresan de manera similar en un amplio rango de tejidos (Chu y Fuller, 1997). Experimentos realizados en bovinos, permitieron descubrir varias isoformas del ER β en los tejidos reproductivos, alguna de las cuales carece de LBD (Walther et al., 1999). En humanos, también se han identificado isoformas del ER β . Una de estas isoformas presenta un truncamiento en la región C-terminal y 26 aminoácidos adicionales. Fisiológicamente, la importancia de dicha isoforma, que se expresa en el timo, ovario, testículo y próstata, radica en que no muestra capacidad de unión al ligando e inhibe los efectos de los estrógenos mediados por el ER α (Ogawa et al., 1998).

Al igual que en mamíferos, los ERs también se han clonado en aves, reptiles y anfibios. En reptiles, los trabajos desarrollados en la tortuga (*Trachemys scripta*), permitieron clonar un ER durante el periodo crítico en el que los embriones, según a la temperatura a la que se encontrasen, se diferenciaban en machos o hembras. Dicho efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual está dirigido por los estrógenos a través de sus receptores (Bergeron et al., 1998). Por otro lado, los experimentos

realizados en la rana africana (*Xenopus laevis*) permitieron clonar el primer ER en un animal de sangre fría. Este receptor, clonado en el hígado, presenta un LBD y un DBD con una secuencia aminoacídica prácticamente iguales a las del pollo y humano (Weiler et al., 1987).

En peces, los estrógenos desempeñan un papel clave en la diferenciación sexual, en el metabolismo de los ácidos grasos y en la síntesis de vitelogenina en el hígado (Pakdel et al., 2000). Varios estudios han puesto de manifiesto la presencia del ER α (Pakdel et al., 1990, Tan et al., 1996, Muñoz-Cueto et al., 1999) y del ER β (Todo et al., 1996, Tchoudakova et al., 1999, Xhia et al., 2000). El ER α clonado a partir del hígado de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), presenta afinidad por el 17 β -estradiol y el dietilestilbestrol aunque no por la testosterona y el cortisol (Pakdel et al., 1990). Por otro lado, el ER α , clonado en el hígado de la dorada (*Sparus aurata*), presenta un elevado grado de homología con los ERs de otros perciformes [trucha arcoíris, medaka (*Oryzias latipes*) y tilapia (*Oreochromis aureus*)] y un grado moderado de homología con la anguila japonesa (*Anguilla japonica*), anfibios, aves y mamíferos (Muñoz-Cueto et al., 1999).

La clonación del ER β en la anguila japonesa (Todo et al., 1996) se realizó de forma simultánea a la clonación de dicho subtipo en mamíferos, aunque sin reconocerlo como un subtipo diferente al ER α (Andreassen et al., 2003). El nuevo subtipo presentaba su mayor afinidad por el 17 β -estradiol. De manera similar, experimentos llevados a cabo en la carpa dorada (*Carassius auratus*) pusieron también de manifiesto la presencia de este subtipo en dicha especie, demostrando su expresión en el cerebro, pituitaria, hígado, testículo, ovario y retina (Tchoudakova et al., 1999). El ER β clonado a partir del hígado del pez gato (*Ictalurus punctatus*), presenta una mayor afinidad y especificidad por el 17 β -estradiol que el ER α , así como también, variaciones en su patrón de expresión (Xia et al., 2000).

Los trabajos desarrollados en el corvinón brasileño (*Micropogonias undulatus*) mostraron la presencia exclusiva en peces, de un nuevo subtipo de ER (Hawkins et al., 2000). A este nuevo receptor se le denominó ER γ o ER β 2. Los estudios posteriores desarrollados en el pez cebra (*Danio rerio*; Filby y Tyler, 2005) corroboraron la existencia de los tres subtipos de ERs en peces, sugiriendo además un cambio en su nomenclatura, cambio que a partir de este punto, el trabajo presente adoptará. Al ER α se le denominará Esr1, y a los subtipos ER β 1 y ER β 2 se les denominará Esr2b y Esr2a, respectivamente. El nuevo Esr2a diverge algo más que el Esr1 y Esr2b en las secuencias

aminoacídicas del DBD y el LBD con respecto a los ERs de mamíferos, pero presenta todas las características de un ER clásico: función de transactivación, capacidad de dimerización y capacidad de unión al ligando. Este receptor, es un nuevo subtipo y no una isoforma derivada de un procesado alternativo de la transcripción o actuación de una región promotora diferente, como lo demuestra el hecho de las diferencias aminoacídicas encontradas en toda la región codificante del gen (Fig.5). El análisis filogenético revela, por un lado, que dentro de los vertebrados, el ESR2a está solo presente en peces teleósteos y, por otro, que el ESR2a está filogenéticamente más próximo al ESR2b que al ESR1. Como consecuencia de esta proximidad se desprende que el origen del ESR2a sería el resultado de una duplicación general del genoma. Esta duplicación, ocurrió hace al menos 150 millones de años, después de la divergencia entre actinopterigios y sarcopterigios pero con anterioridad a la radiación que dio lugar a la mayoría de los peces teleósteos (Amores et al., 1998, Hawkins et al., 2000).

Tras un proceso de duplicación, los nuevos genes están sujetos a tres posibilidades: i) el silenciamiento génico de uno de los miembros del par duplicado (Mighell et al., 2000), ii) la adquisición de una nueva función por una de las copias (neofuncionalización; Ohno, 1970) o bien iii) la partición, de las dos copias, en las funciones que venía desarrollando el gen original (subfuncionalización; Force et al., 1999). El rápido proceso de divergencia que el ESR2a sufre después de la duplicación del ESR2b ancestral, seguido de un bajo porcentaje de cambio de su secuencia dentro de su rama filogenética sugiere que, en vez de convertirse en un pseudogen o de sufrir un proceso de subfuncionalización, el ESR2a adquirió una o más funciones nuevas. Veintidós diferencias aminoacídicas y dos deleciones cortas son características de los ESR2a conocidos. Dichos cambios se encuentran en regiones importantes de los ERs como el LBD (Hawkins et al., 2000). Los estudios de afinidad por los estrógenos de los tres subtipos de ERs en el corvión brasileño parecen corroborar este posible proceso de neofuncionalización. En dichos estudios se vio que el ESR2a, pese a tener una afinidad alta por el 17 β -estradiol al igual que los otros dos subtipos, también presentaba propiedades inusuales de unión por el estríol y otros compuestos estrogénicos.

Esr2a	-----	-----	---MAVASS	PEKD-QPLLQ	LQKVDSSRVG	GQVLSPTLSS	S-----	LETSQPICIT	SPYTDLGHDF	P----TIPFY	SPTIFSYAG-	PSISDCT---	78	
Esr1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----PTS-	3	
Esr2b	-----	-----	-----	..SSPG	LDPHPL.M..	..E.G..K.S	ERPR..G.LP	AVYS---PPL	GMD.HTV..PSS.EY	NHSHGLPT..	..SVL..SR-	.P.TNSPS--	90
Esr2a	SVHQSLNPSL	FWPSRGHMGS	PIPLHHS---	---QHQPQIQ	SPWVEISPLD	NVLKTKQDGA	SLPLAVVPVR	HKSARRRSQE	S-----EEAV	VTSGGKTDLH	YCAVCHDYAS	GYHYGVWSCE	187	
Esr1	PLVFPVPS---	-S.RLSPFMH	.PSH.-----	---YLETTS	T.VYRS.VSS	SQQQLS----	-----REDQC	GTSDSYSVE	GSGAGAGAGA	GGFEMAKEMR	F....S....	..D.....	101	
Esr2b	.LCP..S..AHN.P-T	MPS.TLHCPE	SIVYNEPSPH	A..L.SKAHS	INASSSS---	-----IIGC	N..LVK..E.	GVEDMNSSLC	SSAV..A.M.	F.....	200	
Esr2a	GCKAFFKRSI	QRDNEYICPA	TNECTIDKNR	RKSCQACRLR	KCYEVMTKC	GMRKERGNR	SPQMRMTRL	TSQ--GRIDS	SSVLTGSAV	SLNAPQP---	-----	--SALT	SEQL 290	
Esr1GH.D.M...	..Q...R..Q...M.G	.V..D.--G.	VLRRDLRRTG	..DKASKDLE	HRTAPPQDRR	KHSSSSSSAG	-----GGGKS	SIIGMS	PD.V 214	
Esr2bGH.D.....	..Q.....M..	.V.R..CS..	GARH..GGLQ	PRDPT..GLV	RVG.GSR.QR	H.HLEA.LTP	LAPILQAKHV	HL..MS	P.EF 320	
Esr2a	IERLMEAEPP	EIYLMKDMKK	PLTEAKVMS*	** *** **	LTNLADKELV	HMITWAKKIP	GFVELGLLDQ	VHLLLECCWLE	VLMVGLMWS	VDHPGKLVFS	PDL S LSREEG	SCVQGF A E I F	DMLLAATSRV	410
Esr1	LLL.QG...	VLCSRQKLSR	.Y.VTM.TL	..SM.....	..A...L.	..LQ.S.H.	.Q...SS...	...I..I...	IHC...I.A	Q..I.D.S.	D..E.M...T...F	334	
Esr2b	.S.I.D...E.L.	.F...SM...	F..S.....S.A.	IN..K.....	I..L.....I..	..FK.N...	Q..E.IM...G...F	440	
Esr2a	RELKLQREEY	VCLKAMILLN	SNMCL S SS--	---ESSSKL	LRLLD A VTDA	LVSAIGKTVL	SFRQ Y TRLA	HLLM L LSHIR	HVSNKGM D HL	H C M K M K N M V P	LYD L LLEMLD	AHIM H S-	SRL 523	
Esr1	.M...KT..FI....	.GAFS F CTGT	MEPLHDGAAV	QNM..TI...	.IHH.SQSGC	.AQ..SR.Q.	...L.....	.M.....E..	YS..C..K..RI.RP	D.P 454	
Esr2bL.T..PQT	AEEL..RN..S.I..	..W..S.MG.	TTQ..TL..G	..T.....	ST..R..V.L	V.....	..NTSSG	SQP 560	
											TAF-2			
Esr2a	PRRSPEQEPE	DQADAPAPP-	-----HSS	G-----SG	PSYTWTPSSS	EGAGEPQ---	-----	-----	-----	-----	-----	---	565	
Esr1	AESWSQADR.	PPY---TTSN	NNNSSSSSGG	.DG---GP.S	AGSGSG.RVN	HESL-----S	RAPT P VLYQG	GPRSD C THIL	-----	-----	-----	---	523	
Esr2b	SSSPSSETYS	..HQYPQ..S	HLHPGSEQTT	ADHAI V PPL.	.ADDPILDGH	LDAMPL.SSP	PFQSLV V PHM	DTNDYIHPEQ	WSLGTGDAAP	SVEPTDYITT	ERVVMETALV	TQP	674	

Fig. 5. Secuencia aminoacídica deducida de los tres cDNAs para los ERs del corvínico brasileño. Los aminoácidos marcados en rojo son los que caracterizan al nuevo subtipo encontrado (Esr2a). La DBD aparece subrayada y la LBD entre corchetes. Los aminoácidos implicados en la dimerización del receptor están marcados con rombo negro. Los asteriscos señalan los aminoácidos encargados de la unión del ligando en los ERs de mamíferos. Las flechas muestran los aminoácidos críticos en la unión del 17β-estradiol en la LBD. TAF-2: función de transactivación dependiente de ligando. (.) Identidad con el Esr2a. (-) Espaciadores introducidos para maximizar la identidad de las secuencias. Adaptado de Hawkins et al., 2000.

Esta particularidad podría deberse a la variación aminoacídica del LBD adquirida por el Esr2a (Hawkins y Thomas, 2004).

Alternativamente, los estudios de hibridación *in situ* desarrollados en el cerebro del corvinón, evidencian un patrón diferente de expresión de los subtipos Esr2. La complementariedad de expresión de los dos subtipos en diferentes áreas cerebrales, podría sugerir también un proceso de subfuncionalización (Hawkins et al., 2005). Fuera del cerebro del corvinón, el Esr1 se expresa de forma predominante en el hígado y testículo y en menor cantidad en el ovario. En este último tejido, se observa que la forma predominante es una isoforma de menor tamaño que también aparece de forma vaga en el músculo. La expresión del Esr2b se localiza de manera patente en hígado y testículo, de manera más tenue en ovario y apenas perceptible en músculo. Finalmente, al contrario que el Esr1 y Esr2b, el Esr2a se expresa de forma abundante en el ovario y el testículo, pero no se detectó en el hígado (Hawkins et al., 2000).

Trabajos posteriores al de Hawkins han permitido identificar la presencia de los tres subtipos de ERs en otras especies (pez dorado, Ma et al., 2000, pez cebra, Menuet et al., 2002, dorada, Pinto et al., 2005, carpa (*Pimephales promelas*), Filby y Tyler, 2005, trucha arcoíris, Nagler et al., 2007, perca amarilla (*Perca flavescens*), Lynn et al., 2007, *Acanthopagrus schlegeli*, An et al., 2008, medaka, Chakraborty et al., 2011).

Un caso especial de los estudios realizados en peces sobre los ERs es el de la trucha arcoíris, donde se han encontrado 2 subtipos diferentes Esr1 (Nagler et al., 2007). El segundo subtipo de Esr1, no identificado en ningún otro teleosteo, fue clonado en el ovario, presentando un elevado grado de homología con el Esr1 original en los dominios C (95,5%) y E (91,4%) y una menor similitud con los dominios A/B (57%), D (62,2%) y F (60%). Por el contrario, el grado de homología del nuevo subtipo de Esr1 con los subtipos Esr2b y Esr2a fue muy bajo. Las relaciones filogenéticas entre los cuatro subtipos de ERs hallados en esta especie, indican que los dos subtipos de Esr1 no son variantes alélicas de un mismo gen, como es el caso en otras especies [carpa dorada, GenBank nº de acceso AY344444 y AY055725, trucha arcoíris (Pakdel et al., 2000), pez gato (Patiño et al., 2000)], sino que provienen de genes diferentes. Dado que el nuevo Esr1 no se ha encontrado en ninguna otra especie, ni siquiera entre los salmónidos, su origen correspondería a una duplicación aislada de dicho gen en esta especie. Dicha duplicación habría tenido lugar con bastante posterioridad a la ocurrida al comienzo del linaje de los teleosteos, la cual dio lugar a los dos subtipos de Esr2 (Nagler et al., 2007). Sin embargo, también es posible que la presencia del nuevo

subtipo del Esr1 en la trucha arcoíris sea consecuencia del fenómeno de tetraploidización que se da en los salmónidos (Hordvik, 1998) y que aun no haya sido identificado en otras especies de los mismos.

2.3.1) ERs en la lubina

Al igual que en numerosas especies de peces, en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), también se han identificado los tres subtipos de ERs (Halm et al., 2004). El Esr1, se clonó a partir de tejido hepático mientras que el Esr2b y Esr2a, se clonaron de forma parcial a partir de tejido ovárico. Las secuencias obtenidas representan en todo caso el 90% de la secuencia codificante del gen. El análisis molecular indicó que los ERs clonados en la lubina presentan los dominios característicos de los ERs en vertebrados (A/B, C, D, E y F), incluyendo las ocho cisteínas de los dos motivos “dedos de zinc” fundamentales para la unión al DNA, la función de transactivación dependiente de ligando (AF2) y la independiente de ligando (AF1). Los análisis llevados a cabo para establecer la filogenia de los tres subtipos de ERs, agrupan al subtipo Esr1 junto a los demás Esr1 de peces y a los subtipos Esr2 con sus ortólogos respectivos (Fig. 6). El grado de identidad entre el subtipo Esr1 y los subtipos Esr2b y Esr2a es de 53,2% y 52,3%, respectivamente. La identidad entre los dos subtipos Esr2 es del 63,9%. La similitud de los dos subtipos Esr2 de la lubina con los correspondientes en tetrápodos y peces, es elevada en comparación con la del subtipo Esr1. Todo ello sugiere, que la divergencia entre tetrápodos y peces para el subtipo Esr1 pudo haber ocurrido con anterioridad a la divergencia de los subtipos Esr2 (Halm et al., 2004).

En cuanto a la distribución tisular, el Esr1 se expresa principalmente en el hígado y la pituitaria. Estos resultados se corresponden con los encontrados en otras especies (Roger et al., 2000, Menuet et al., 2002, Andreassen et al., 2003, Choi y Habibi, 2003). En las gónadas, el Esr1 se expresa profusamente en individuos juveniles pero no en adultos; en cambio los niveles en el cerebro, son bajos tanto en individuos adultos como juveniles. Los subtipos Esr2 presentan un patrón de expresión más amplio y con niveles de expresión similares. Ambos receptores se expresan en la pituitaria, el hígado, el cerebro, las gónadas y el corazón. Los resultados obtenidos para los subtipos Esr2 en las gónadas y pituitaria están en consonancia con los encontrados en el la carpa dorada (Choi y Habibi, 2003), en el pez cebra (Lassiter et al., 2002), y en la dorada (Socorro et al., 2000).

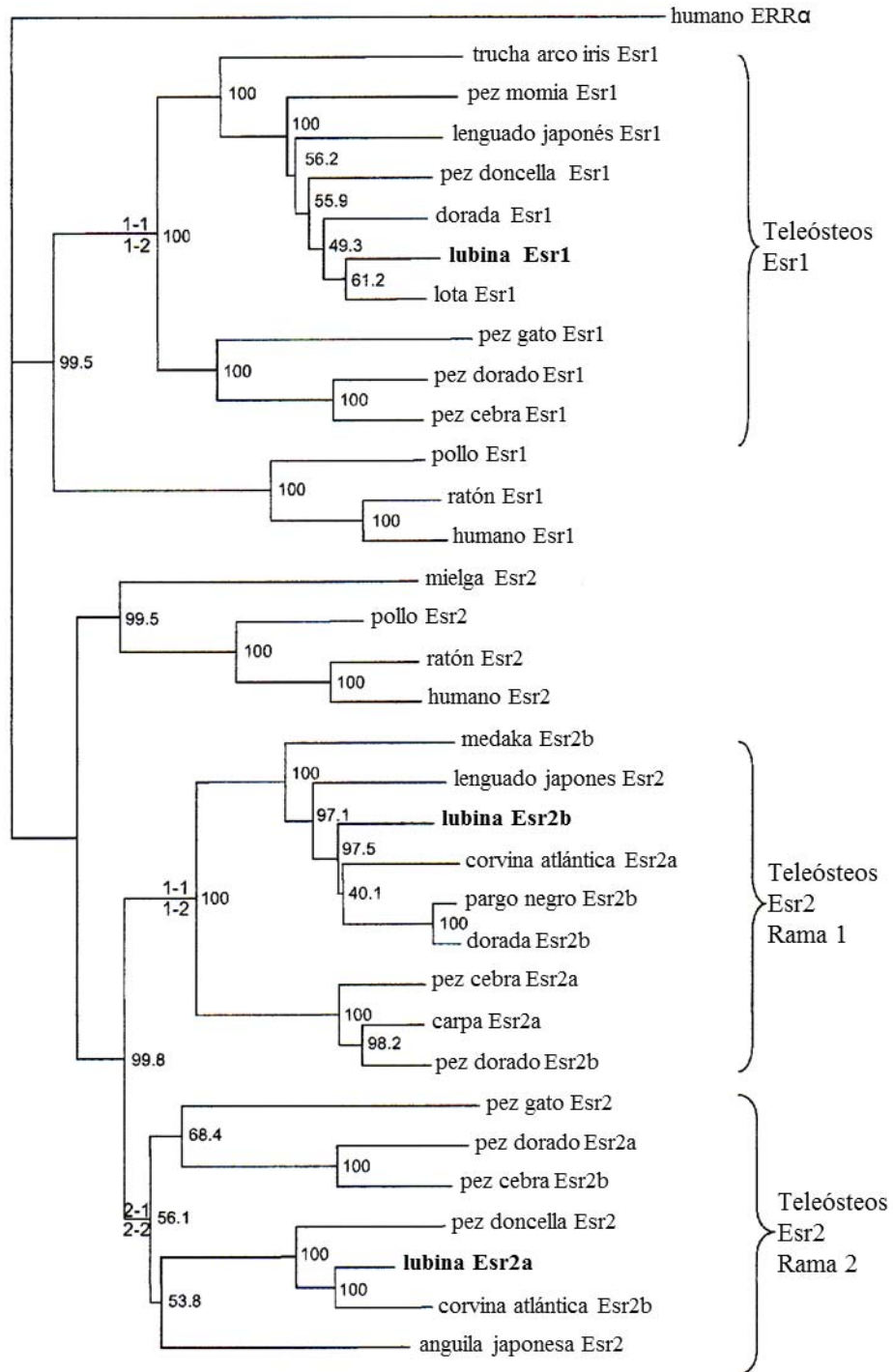


Fig. 6. Árbol filogenético basado en el alineamiento de secuencias aminoacídicas para los ERs de mamíferos, aves, tiburón y peces teleósteos. El receptor relacionado con el receptor de estrógenos alfa de humano (ERR α), se utilizó como grupo externo. En peces teleósteos existe una rama principal con dos subramas para el Esr1 (Esr1 1-1 y Esr1 1-2) y dos ramas principales (1-2) con dos subramas cada una para el Esr2 (Esr2 1-1, Esr2 1-2, Esr2 2-1 y Esr2 2-2). Adaptado de Halm et al., 2004.

2.3.1.1) Estructura génica de los ERs de la lubina

Los ERs, presentan una estructura conservada a lo largo de los vertebrados como así lo demuestra la considerable homología encontrada entre la especie humana y los peces en cuanto al número de exones, tamaño de la región codificante y longitud de la proteína. En humano, el ESR1 presenta cuatro isoformas con 8-10 exones y una región codificante para todas ellas de 1788 pb (pares de bases) expresando la misma proteína de 595 aminoácidos (GenBank n° de acceso NM_000125.3, NM_001122740.1, NM_001122741.1, NM_001122742.1). Dichas isoformas difieren en la región 5' no trasladada del gen así como en el uso de una región promotora también diferente. Respecto al ESR2 de humano, se han descubierto 5 variantes las cuales contienen 8-9 exones y unas regiones codificantes de 1450 a 1600 pb que producen proteínas con una secuencia aminoacídica de 480 a 530 aminoácidos (NM_001437.2, NM_001040275.1, NM_001040276.1, NM_001214902.1, NM_001214903.1). Estas variantes difieren tanto en la región 5' como en la 3' no trasladada, así como en la región codificante.

El RNAm del ESR1 aislado en la lubina (Halm et al., 2004) consta de 2521 pb, 10 exones y una región codificante de 1917 pb con un codón (ATG) de inicio de la traducción situado a 117 pb del extremo 5' del gen. La región codificante, la cual abarca los 10 exones, da lugar a una proteína de 639 aminoácidos. Un segundo codón (ATG) potencial del inicio de la traducción se localiza a 261 pb del extremo 5', al comienzo del exón 2, el cual da lugar a una región codificante de 1773 pb y a una proteína de 591 aminoácidos. Ambas regiones codificantes terminan con un codón (TGA) de parada situado a 477 pb del extremo 3' del gen, incluyendo una cola poliadenilada. La presencia de isoformas para el ESR1, se ha demostrado previamente en varias especies de peces (Pakdel et al., 2000, Patiño et al., 2000, Socorro et al., 2000, Urushitani et al., 2003). En el pez gato, la isoforma larga del ESR1 se produce como consecuencia de la adición de 503 pb en el extremo 5' con respecto a la isoforma corta, implicando 36 aminoácidos extra en el extremo N-terminal de la proteína (Patiño et al., 2000). Por el contrario, en la trucha arcoíris, la variante larga del gen se obtiene gracias a un procesado alternativo entre el exón I, intrón I y exón II que le añade 45 aminoácidos al extremo N-terminal de la proteína (Pakdel et al., 2000). Pese a tenerse constancia únicamente de la variante larga del ESR1 en la lubina (Halm et al., 2004), existen evidencias que indican que al igual que en otras especies, en la lubina podrían darse más de una isoforma para dicho subtipo. Para la realización de la caracterización farmacológica y molecular del ESR1 de la lubina, se clonó el ESR1 a partir de tejido

cerebral. Dicha clonación, determina que la isoforma expresada en el cerebro era la variante corta (Muriach et al., 2008b).

El RNAm del *Esr1* obtenido a partir del hígado de la lubina, presenta un procesamiento parcial que incluye parte de los intrones I, II y IV (Halm et al., 2004). Un tercer codón (ATG) potencial de inicio de la traducción para el *Esr1*, se localiza dentro del intrón I, a 11 pb del inicio del exón II, con un patrón de lectura acorde con los dos anteriores. Existen evidencias de que la variante producida a partir del procesado alternativo en el intrón I, se expresa en el hígado de esta especie (Halm et al., resultados no publicados).

Respecto a los subtipos *Esr2*, los RNAm aislados en la lubina (Halm et al., 2004) permitieron obtener secuencias parciales de los dos subtipos, con un tamaño de 1934 pb para el *Esr2b* y de 1926 pb para el *Esr2a*, faltando en ambos casos los extremos 5' del gen. La región codificante del *Esr2b* es de 1554 pb con un codón de parada (TAG) situado a 336 pb del extremo 3'. La secuencia aminoacídica parcial obtenida es de 517 aminoácidos. En cuanto al *Esr2a*, la región codificante consta de 1827 pb con un codón (TAA) de parada a 82 pb del extremo 3'. La traducción de dicha región codificante da lugar a una proteína de 608 aminoácidos. Ambos RNAm presentan una cola poliadenilada. Pese a no disponerse de los extremos 5' de ambos genes, de los estudios comparativos con los subtipos 2 de otras especies próximas a la lubina, como son la dorada y el corvinón brasileño, cabría esperar que el subtipo *Esr2a* sea de mayor tamaño, aproximadamente 50 aminoácidos, que el subtipo *Esr2b*. Los análisis filogenéticos basados en alineamientos aminoacídicos entre mamíferos, aves, tiburón y peces teleósteos, muestran, que la rama que incluye a los subtipos *Esr2* entre los que se encuentra el *Esr2a* de lubina, son de mayor tamaño que la rama que incluye a otros subtipos *Esr2* de especies más alejadas filogenéticamente (Halm et al., 2004).

2.3.2) Mecanismos de acción clásicos de los ERs

El mecanismo de acción clásico por el cual los ERs median los efectos biológicos de los estrógenos, implica su actuación como factores de transcripción dependientes de ligando. Dicho mecanismo comporta la unión del estrógeno al receptor en el núcleo, después de lo cual, el receptor dimeriza y se une a elementos de respuesta específicos (EREs) localizados en los promotores de los genes (Nilsson et al., 2001). La unión del ligando al receptor, induce además un cambio conformacional en el LBD

permitiendo el reclutamiento de proteínas coactivadoras que son necesarias para activar la transcripción génica (Rosenfeld y Glass, 2001).

Los GRs, MRs y ARs se unen a secuencias derivadas de una común denominada elemento de respuesta a los glucocorticoides (GRE). Sin embargo, el ERE presenta diferencias con respecto a dicha secuencia. La secuencia consenso para el ERE consta de 13 pb dispuestas como dos medias secuencias palindrómicas invertidas separadas por 3 pb (Fig. 7). En la unión del receptor al ERE, son cruciales tres aminoácidos del primer dedo de zinc (P-Box) del DBD, mientras que el segundo dedo de zinc está implicado en la capacidad de dimerización del receptor y del reconocimiento de parte de la secuencia del ERE (Gruber et al., 2004). Tanto el Esr1 como el Esr2 pueden formar homodímeros y heterodímeros (Pettersson et al., 1997). Ambos receptores reconocen por igual al ERE (Yi et al., 2002). El cambio conformacional que sufre el receptor, necesario para la activación de la transcripción, está mediado principalmente por el ligando pero el ERE juega también un papel importante (Gruber et al., 2004).

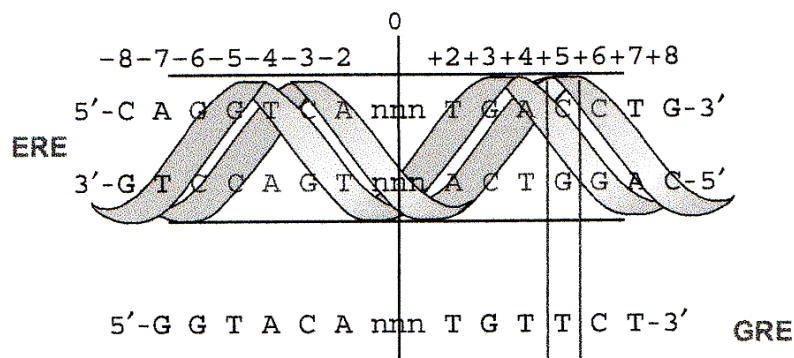


Fig. 7. Secuencias consenso para el ERE y GRE. El ERE consta de 13 pb dispuestas como dos medias secuencias palindrómicas invertidas separadas por 3 pb. La sustitución de la adenina en la posición +4 por una timina da lugar a la secuencia del GRE. Las posiciones +2, +3 y +6 están conservadas en ambos elementos de respuesta. Adaptado de Gruber et al., 2004.

Existen evidencias de que los efectos producidos por los estrógenos, a través de sus receptores, presentan mecanismos de acción alternativos al clásico (Björnström y Sjöberg, 2005). Los ERs pueden regular la expresión génica sin necesidad de unirse al ERE mediante la unión a otras proteínas en el núcleo (acciones genómicas independientes de los EREs). Este es un mecanismo comúnmente utilizado por la superfamilia de RNs (Gottlicher et al., 1998). Un ejemplo, es la activación de varios genes a través de la unión del 17β -estradiol al ER y este al factor de transcripción Sp-1.

El complejo ER-Sp-1 se une a secuencias específicas para el SP-1 en las regiones promotoras de aquellos genes que pueden ser regulados por la presencia de estrógenos (Saville et al., 2000).

2.3.3) REs de membrana

Las hormonas esteroideas, además de ejercer sus efectos a través del mecanismo clásico de unión a los RNs (acciones genómicas), también pueden desarrollar respuestas rápidas que implican la actuación de mecanismos alternativos a la transcripción génica (acciones no genómicas, Fig. 8). Los efectos rápidos producidos por la unión del esteroide a su receptor dependerán del sistema y el contexto en el que se halle el complejo hormona-receptor, desencadenándose en un periodo de tiempo del orden de segundos o minutos. En contraposición, las respuestas genómicas clásicas de los REs pueden demorarse en el tiempo desde varias horas hasta incluso días.

Si bien el complejo ligando-receptor implicado en la transcripción génica se localiza en el núcleo, en la mayoría de los casos, el par hormona-receptor relacionado con las respuestas no genómicas de los esteroides, está asociado a las membranas plasmáticas. En esta situación, los esteroides, actúan mediante los mecanismos clásicos de los receptores asociados a las mismas, a través de segundos mensajeros (Norman et al., 2004). Diversos estudios en mamíferos y peces, ponen de manifiesto la presencia de receptores de membrana para progesterona, andrógenos y estrógenos acoplados a proteína G (Thomas et al., 2006, Thomas et al., 2010). Se ha demostrado que los estrógenos provocan una activación rápida de segundos mensajeros en una línea celular cancerígena humana (SKBR3) que no expresa los subtipos Esr1 y Esr2, pero sí el receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER, Filardo et al., 2000). El trabajo anterior propone que los efectos producidos por los estrógenos están mediados por el GPER. Sin embargo, no se encontraron evidencias de la interacción de los mismos con dicho receptor. Estudios posteriores, además de demostrar la interacción anterior, indican que el GPER une estrógenos con afinidad elevada, provocando la estimulación de la actividad adenilato ciclasa y el consiguiente incremento de AMPc (Filardo et al., 2002). Respecto a la funcionalidad del GPER, se sabe que está implicado en numerosas funciones fisiológicas entre las cuales se encuentran: funciones de neurotransmisión y regulación neuroendocrina (Xu et al., 2009, Noel et al., 2009), metabolismo lipídico y sistema cardiovascular (Hass et al., 2009), secreción de insulina (Martensson et al., 2009) y maduración de los oocitos en peces (Pang et al., 2008).

Además de los receptores de membrana acoplados a proteína G, los RNs también están implicados en las acciones rápidas de las hormonas esteroideas (Norman et al., 2004, Björnström y Sjöberg, 2005). Tanto el ESR1 como el ESR2, pueden encontrarse asociados a la membrana plasmática (Razandi et al., 2004, Norman et al., 2004). Dado que los RNs carecen de dominio transmembrana, su asociación con la membrana plasmática estaría inducida por la palmitoilación del receptor (Acconcia et al., 2004). Parece ser que el estado conformacional del ligando, induce su unión a diferentes regiones de la LBD, promoviendo que el RN medie en acciones genómicas o no genómicas (Norman et al., 2004).

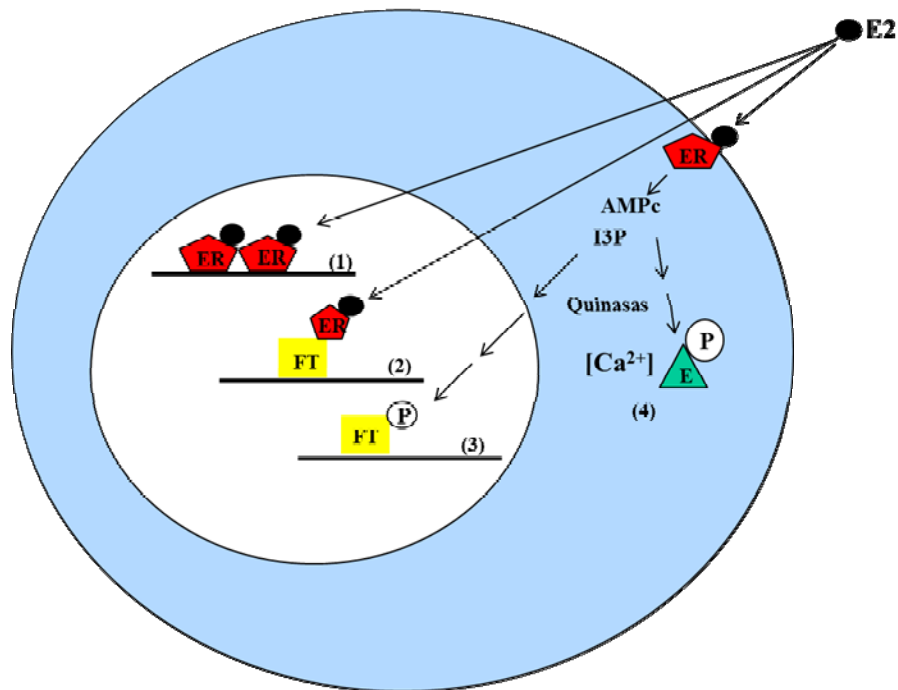


Fig. 8. Esquema ilustrativo de los mecanismos de acción de los ERs. (1) Mecanismo clásico de acción genómica del ER. El complejo nuclear E2-ER se une a los EREs en la región promotora del gen, activando o reprimiendo su expresión. (2) Acción genómica independiente de ERE. El complejo E2-ER se une mediante interacción proteína-proteína a otros factores de transcripción, los cuales contactan con la región promotora del gen. (3) Acción no genómica-genómica. El complejo de membrana E2-ER activa cascadas de quinasas las cuales conducen a la expresión génica a través de fosforilaciones de factores de transcripción. (4) Acciones no genómicas. Acciones que desencadenan respuestas biológicas rápidas y específicas según el tipo celular donde se produzcan. E2: 17 β -estradiol, ER: receptor de estrógenos, P: grupo fosfato, Ft: factor de transcripción, I3P: inositol trifosfato AMPc: adenosin-monofosfato cíclico, Ca: calcio, E: enzima. Adaptado de Björnstrom y Sjöberg, 2005.

Las acciones no genómicas de los estrógenos incluyen, entre otras, movilización del calcio intracelular, estimulación de la adenilato ciclasa y síntesis de AMPc, activación de quinasas MAP, activación de los receptores tirosina-quinasa y activación de proteínas G, las cuales desencadenan respuestas biológicas específicas del tipo celular donde se produzcan (Björnström y Sjöberg, 2005). Las respuestas no genómicas de los estrógenos también pueden implicar la regulación de factores de transcripción en lo que se conoce como “acciones no genómicas-genómicas”. Dichos mecanismos implican la regulación de factores de transcripción a través de fosforilaciones mediadas por quinasas. Ejemplo de lo anterior es la inducción del factor de transcripción AP-1 por el 17 β -estradiol (Björnström y Sjöberg, 2005). La activación del ER por el 17 β -estradiol, desencadena la activación de una quinasa MAP que a su vez estimula la unión de AP1 al DNA induciendo, en última instancia, la transcripción génica.

2.3.4) Funciones diferenciales y redundantes de los ERs

Tras el descubrimiento del Esr2, hubo que reevaluar la visión que se tenía de cómo los estrógenos ejercían sus múltiples efectos y funciones. Pese a presentar gran similitud en sus DBD y LBD, la variación encontrada en los otros dominios estructurales hace que los dos subtipos de ERs presenten diferencias en las afinidades por los ligandos y en la forma de activar la transcripción génica (Schultz et al., 2002, Bodo et al., 2006). En mamíferos, el subtipo Esr1 presenta un rango amplio de expresión, detectándose su presencia en el útero, ovario, pituitaria, órganos reproductivos masculinos, tejido adiposo, próstata, piel, músculo, riñón, vesícula biliar y hueso. Por el contrario, la expresión del subtipo Esr2 fue predominante en el ovario, bazo, órganos reproductivos masculinos, colon, cerebro y riñón (Bookout et al., 2006). Pese a encontrarse cierto solapamiento funcional, el subtipo Esr1 parece mediar sus acciones en tejidos diana como el útero, las glándulas mamarias y el esqueleto, mientras que el Esr2 ejerce un papel importante en el ovario, el sistema inmunológico, el sistema cardiovascular, la próstata, el tracto gastrointestinal y el cerebro (Harris , 2007). Además, en órganos donde se ha determinado la expresión de ambos subtipos, se ha visto que éstos, lo hacen en distintos tipos celulares. En el ovario, el subtipo Esr2 predomina en las células de la granulosa mientras que el subtipo Esr1 se expresa principalmente en las células de la teca (Hiroi et al., 1999). De manera similar, en el estroma de la próstata se expresa principalmente el subtipo Esr1 y en el epitelio el Esr2 (Kuiper et al., 1996).

Dentro del cerebro, existe un claro patrón diferencial de expresión para los dos subtipos. Estudios realizados tanto en ratón como en humano, demuestran, que el Esr1 se expresa en áreas cerebrales asociadas al control de la reproducción, como son el hipotálamo, el núcleo del lecho de la estría terminal, el área preóptica y los núcleos hipotalámicos arcuato y ventromedial. Por el contrario, el Esr2 es el subtipo predominante en el cortex cerebral, hipocampo, amígdala, cerebelo, rafe dorsal, núcleo anterior olfatorio, sustancia nigra y área ventral tegmental del cerebro medio (Fan et al., 2010, Sugiyama et al., 2010) y parece desempeñar un papel importante en la morfogénesis cerebral, así como en aspectos comportamentales relacionados con el aprendizaje, la memoria, la ansiedad, las conductas agresivas y los mecanismos de modulación del dolor (Bodo et al., 2006, Fan et al., 2010, Sugiyama et al., 2010). A nivel neuroendocrino, la activación del eje CPA es sexualmente dimórfico en rata, presentando las hembras niveles de adrenocorticotropina y glucocorticoides más elevados que el macho. Dicho dimorfismo sexual es en parte debido, a los niveles de 17β -estradiol circulante, y sus efectos están mediados por los Esr2. Por otro lado, los efectos regulatorios de los estrógenos sobre el CPG, están mediados principalmente por el Esr1, como demuestran los experimentos llevados a cabo mediante inactivaciones génicas para dicho subtipo de receptor en ambos sexos del ratón (Bodo et al., 2006).

En peces, es más escasa la información sobre la acción de los estrógenos fuera de la regulación de las funciones reproductoras. Experimentos llevados a cabo en cultivos primarios de hepatocitos de la carpa dorada, han demostrado que los tres subtipos de ERs, están implicados en la síntesis de vitelogenina. Los subtipos Esr2 (en especial el Esr2b), además de promover de manera directa la síntesis de dicha proteína, también sensibilizan al hígado frente al aumento de los niveles circulantes de 17β -estradiol, induciendo la transcripción y elevando los niveles basales del Esr1 (Nelson y Habibi, 2010). Estudios similares realizados en el pez cebra, mostraron que los tres subtipos también se expresan en el hígado de esta especie, y que además, el 17β -estradiol produce una respuesta diferencial de los mismos. El Esr1 es el que más sensibilidad muestra en su regulación. Por el contrario, el 17β -estradiol inhibe, de manera considerable, la expresión del Esr2b pero no la del Esr2a. Experimentos de transfección simultánea en diferentes líneas celulares con un gen testigo bajo el control del promotor del Esr1 del pez cebra, y un vector de expresión portador del gen de este último subtipo, confirman los resultados obtenidos *in vivo* en los que se demostraba la estimulación de la síntesis del Esr1 por el 17β -estradiol. Sin embargo, análisis similares

demuestran que el Esr2a, si bien estimula la expresión del Esr1, lo hace con menor intensidad que el propio Esr1, mientras que el Esr2b no es capaz de estimularla. En conjunto, los resultados anteriores sugieren, que los tres subtipos de ERs están regulados de manera diferente por el 17 β -estradiol en el hígado del pez cebra y que dicha regulación diferencial comporta una diversa funcionalidad de cada uno de ellos. Al no presentar el Esr2a una alteración de su expresión por el 17 β -estradiol y sí, en cambio, modular la expresión del Esr1, podría indicar que estaría implicado en el mantenimiento de los niveles de expresión del Esr1 durante el ciclo reproductivo cuando los niveles de 17 β -estradiol son bajos. Por el contrario, al estar la expresión del Esr2b, fuertemente inhibida por el 17 β -estradiol, y no participar además en la regulación de la expresión del Esr1, podría no estar implicado en la síntesis de vitelogenina (Menuet et al., 2004).

Estudios de expresión en el cerebro de peces, ponen de manifiesto un solapamiento de los tres subtipos de ERs en regiones cerebrales relacionadas con la reproducción, ingesta y comportamiento, como son el hipotálamo y el área preóptica (Menuet et al., 2002, Hawkins et al., 2005, Forlano et al., 2005, Muriach et al., 2008a,b, Munchrat y Hofmann, 2010). Sin embargo, existe también una expresión diferencial de cada uno de los subtipos en diferentes núcleos de las anteriores áreas cerebrales, sugiriendo la existencia de funciones redundantes, pero también diferenciales, de los ERs en el cerebro. Dichos resultados coinciden con los obtenidos en el cerebro de mamíferos (Shughrue et al., 1997).

Los fitoestrógenos, metabolitos secundarios que se encuentran en una amplia variedad de plantas, son capaces de inducir respuestas biológicas, así como mimetizar o modular los efectos de los estrógenos endógenos mediante la unión a sus receptores. Estudios epidemiológicos apoyan que una dieta rica en fitoestrógenos disminuye el riesgo de cánceres inducidos por respuestas hormonales como el de mama y próstata (Adlercreutz, 2002). Los efectos protectores de los fitoestrógenos, están mediados por el Esr2 en mayor medida que por el Esr1 (Harris et al., 2005). Los resultados anteriores coinciden con los de Kuiper, en los cuales se observa que la afinidad de los fitoestrógenos es mayor para el subtipo Esr2 que para el Esr1 (Kuiper et al., 1998).

Experimentos en peces, demuestran que la exposición a compuestos estrogénicos, incluidos los fitoestrógenos, pueden inducir cambios comportamentales, morfológicos y fisiológicos (Sumpter, 2005). La incorporación en las dietas de peces de proteínas de origen vegetal ha incrementado dramáticamente el nivel de sustancias

estrogénicas no esteroideas principalmente en forma de fitoestrógenos (Pelissero y Sumpter, 1992). Son varios los trabajos en peces en los que se demuestra que las disrupciones endocrinas, que pueden producir los fitoestrógenos, están mediadas por los ERs (Latonelle et al., 2002, Tollefsen et al., 2003). La genisteína es un fitoestrógeno perteneciente a la clase de los flavonoides. En humanos se sabe que dicho fitoestrógeno presenta afinidad por los ERs mimetizando actividades estrogénicas, mostrando una mayor afinidad por el Esr2 que por el Esr1 (Kuiper et al., 1998; Henley et al., 2006). Por el contrario, experimentos *in vitro* desarrollados en el pez cebra demuestran que la genisteína une y activa a los tres subtipos de ERs con la misma afinidad (Sassi-Messai et al., 2009).

3) CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

El control neuroendocrino en vertebrados permite ejercer una regulación recíproca entre el cerebro y los sistemas endocrinos. La estrecha conexión entre el sistema nervioso y el endocrino permite a los organismos adaptar sus respuestas frente a cambios ambientales y hormonales. En este contexto, el control neuroendocrino de la reproducción implica una comunicación permanente entre el complejo central cerebro/pituitaria y los órganos periféricos endocrinos asociados a la reproducción. La conexión entre ambos, permite controlar la actividad de los diferentes componentes del eje CPG regulando, en última instancia, las diferentes etapas del ciclo de vida de los animales. Los esteroides sexuales, producidos principalmente por las gónadas, tienen especial importancia en la regulación endocrina del eje CPG, ya que informan al cerebro y pituitaria del estado sexual del animal.

3.1) El complejo cerebro-pituitaria (CP)

En todos los vertebrados, la pituitaria está conectada al hipotálamo y su actividad controlada por varios tipos de neurohormonas, las cuales, se sintetizan en grupos neuronales específicos. La pituitaria es una glándula en la que se diferencian claramente dos regiones: una parte glandular, llamada adenohipófisis, que contiene las células que sintetizan y liberan las hormonas hipofisarias y una parte nerviosa, denominada neurohipófisis, formada por fibras neuronales, procedentes de varias regiones del cerebro.

En peces, la adenohipófisis se divide en la *pars distalis* (lóbulo anterior en vertebrados terrestres) y la *pars intermedia* (lóbulo intermedio). A su vez, la *pars*

distalis se divide en la parte rostral y parte proximal (Olivereau y Ball, 1964). De la misma manera, el lóbulo posterior de la pituitaria de los tetrápodos, formado por fibras nerviosas neurosecretoras, en peces está estrechamente asociado a la *pars intermedia*.

En tetrápodos, la conexión entre el hipotálamo y la adenohipófisis se realiza a través del sistema portal hipofisiario (sistema formado por vasos sanguíneos situados en la eminencia media), donde las neuronas hipofisiotrópicas liberan las neurohormonas. En peces, las neuronas hipotalámicas inervan directamente las células secretoras de la adenohipófisis (Gorbman, 1995). Así, la parte rostral de la *pars distalis* contiene células sintetizadoras de ACTH y prolactina (PRL), mientras que la parte proximal contiene células productoras de gonadotropinas (hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), hormona tirotrópica (TSH) y hormona del crecimiento (GH). En general, existe una correspondencia entre la distribución de las fibras nerviosas encargadas del control de un tipo específico de células y su distribución dentro de la pituitaria. Las neuronas encargadas de controlar la síntesis y secreción de las gonadotropinas, como son las neuronas GnRH, las neuronas dopaminérgicas, las neuronas gabaérgicas y las neuronas productoras del neuropéptido Y, inervan la *pars distalis* donde se encuentran los gonadotropos (González-Martínez et al., 2002, Kah et al., 1986, Kah et al., 1987, Batten et al., 1990). Además, estudios llevados a cabo en el pez dorado y en el pez cebra han puesto de manifiesto que la mayor parte de las neuronas que inervan la pituitaria, provienen del área preóptica y del hipotálamo mediobasal, las cuales son regiones comunes en el control de las funciones reproductoras en vertebrados (Zohar et al., 2010). Sin embargo, también se han encontrado neuronas hipofisiotrópicas provenientes de los bulbos olfatorios, tálamo y tegmento mesencefálico (Anglade et al., 1993, Johnston y Maler, 1992).

3.2) Gonadotropinas

Por definición, las gonadotropinas son hormonas que estimulan el crecimiento y el desarrollo gonadal en vertebrados. Existen dos gonadotropinas: la FSH, encargada de regular el crecimiento gonadal, y la LH, cuya función es regular la maduración final de los gametos así como la ovulación/espermación. Dichas hormonas, ejercen sus efectos a través de la biosíntesis de hormonas esteroideas gonadales y factores de crecimiento (Weltzien et al., 2004). Las gonadotropinas, junto con la TSH y la hormona coriónica placentaria (CG), forman la familia de hormonas glicoproteicas. Estas hormonas presentan una estructura heterodimérica formada por una subunidad α , común a todas

ellas, y una subunidad β , que les confiere la especificidad funcional, unidas de forma no covalente (Pierce, 1988).

La LH se purificó por vez primera en mamíferos a finales de los años 50 (Squire y Li, 1959). Aproximadamente una década más tarde, se obtuvo la FSH (Papkoff et al., 1967; Roos, 1968). Durante muchos años, se pensó que la pituitaria de peces contenía una única gonadotropina (denominada gonadotropina maduracional), la cual regulaba todos los procesos implicados en la reproducción (Burzawa-Gerard, 1982). A finales de los 80, experimentos llevados a cabo en salmónidos, establecieron la dualidad de las gonadotropinas en peces con el descubrimiento de una nueva gonadotropina llamada en ese momento, hormona gonadotropa-1 (GTH-1), químicamente diferente de la previamente identificada como gonadotropina maduracional, llamada entonces hormona gonadotropa-2 (GTH-2, Kawauchi et al., 1989). Basándose en las secuencias de ácidos nucleicos y aminoacídicas, se encontró que las GTHs de peces eran homólogas a la FSH (GTH-1) y LH (GTH-2, Querat, 1994). Desde entonces, han aparecido numerosos estudios que han identificado ambas gonadotropinas en peces (Hassin et al., 1995, Kajimura et al., 2001, Mateos et al., 2003, Weltzien et al., 2003), aportando evidencias suficientes que indican que el sistema dual de gonadotropinas en peces es homólogo al de tetrápodos. Estudios de hibridación *in situ* en peces, sugieren que ambas gonadotropinas se sintetizan en células diferentes (Nozaki et al., 1990, Shimizu et al., 2003)

Si bien, la pituitaria es el principal tejido en la producción y secreción de las gonadotropinas, diferentes estudios han mostrado la presencia de dichas hormonas en otros órganos a lo largo de todos los vertebrados. En los oocitos de la hembra de ratón, se ha detectado la presencia de expresión de LH, GnRH y su receptor (Schirman-Hildesheim et al., 2005). La GnRH se ha detectado también en los ovarios de peces, anfibios, reptiles y aves (Singh et al., 2007). Respecto a los peces, en la tilapia, tanto la FSH como la LH, se sintetizan en el cerebro (Parhar et al., 2003a), mientras que en el pez gato (*Silurus meridionalis*) y en la dorada, ambas gonadotropinas se expresan en el ovario (Wu et al., 2009) y en los oocitos (Wong y Zohar, 2004). En el pez cebra y en la anguila, (*Anguilla marmorata*) se detectan también en el cerebro, el hígado, el riñón, el ovario y el testículo (So et al., 2005, Huang et al., 2009). Pese a que todavía no se sabe con certeza la importancia fisiológica de las gonadotropinas extrapituitarias, se piensa que éstas pueden actuar modulando el eje CPG. En el cerebro de peces, ambas hormonas podrían neuromodular la actividad de la adenohipófisis y conductas

reproductoras (Parhar et al., 2003a, Wu et al., 2009). En las gónadas, tanto la FSH como la LH, podrían actuar de manera autocrina/paracrina en la comunicación intragonadal (Wong y Zohar, 2004).

Los diferentes patrones temporales de síntesis de las gonadotropinas en peces, indican la existencia de mecanismos de regulación diferentes para ambas hormonas. Su expresión durante el ciclo reproductivo, presenta variaciones según la especie que se trate. De manera general, en las especies con una única puesta por ciclo reproductivo, la FSH cobra importancia durante el crecimiento gonadal mientras que la LH lo hace durante la maduración final y la puesta. En salmónidos, la FSH es la hormona predominante en plasma durante las fases de vitelogénesis y gametogénesis, mientras que los niveles circulantes de LH alcanzan su máximo durante la espermiación y la ovulación (Planas y Swanson, 1995, Prat et al., 1996, Breton et al., 1998). Acorde a lo anterior, en individuos macho de salmónidos, los niveles de expresión en la pituitaria de la FSH aumentan durante la gametogénesis, mientras que los de la LH lo hacen durante la maduración final de los gametocitos, espermiación y ovulación (Gómez et al., 1999). Por el contrario, en peces con varias puestas por ciclo reproductivo, ambas gonadotropinas están presentes prácticamente desde el comienzo del ciclo y van aumentando conforme éste progresa. En individuos macho del fletan (*Hippoglossus hippoglossus*), tanto la LH como la FSH están presentes durante todo el ciclo reproductivo, aumentando sus niveles durante la espermiación, sugiriendo que las dos hormonas influyen tanto al principio como al final de los estados reproductivos (Weltzien et al., 2003). *Paralichthys oliváceos*, es otro pleuronectiforme, en el cual, la expresión en la pituitaria de las dos hormonas es alta desde el principio de la espermatogénesis, alcanzando sus máximos durante la espermiación (Kajimura et al., 2001). Patrones similares se encuentran en el pez dorado (Sohn et al., 1999) y la dorada roja (*Pagrus mayor*, Gen et al., 2000).

Respecto al perfil de las gonadotropinas durante el ciclo reproductivo de la lubina, la presencia de la LH y FSH es patente desde su comienzo. En individuos macho de esta especie, la expresión de ambas hormonas en la pituitaria va en aumento durante todo el ciclo reproductivo (Mateos et al., 2003). La expresión de la FSH, es baja al comienzo de la espermatogénesis, pero sus niveles aumentan acorde al crecimiento gonadal, alcanzando los máximos al comienzo de la espermiación. Los niveles se mantienen constantes durante dicha fase y comienzan a declinar una vez finalizada la misma. Los resultados anteriores sugieren que la FSH podría desempeñar también un

papel importante en la maduración gonadal final y la espermiación. Los niveles de expresión de LH siguen un patrón similar a los de FSH indicando, que en la lubina, ambas hormonas son activas durante todo el ciclo reproductivo. Los resultados obtenidos para la LH están en concordancia con los obtenidos en la tilapia (Melamed et al., 2000) y la lubina rayada (*Morone saxatilis* Hassin et al., 1998). Dicha hormona va incrementando sus niveles durante la gametogénesis, alcanzando el máximo al final de dicha fase y durante la ovulación, corroborando su papel principal en la maduración gonadal final y ovulación/espermiación (Swanson, 1991).

De manera similar a los patrones de expresión obtenidos en los experimentos de Mateos y colaboradores (2003), la síntesis de ambas gonadotropinas en la pituitaria de hembras adultas de lubina, va en aumento a lo largo de todo su ciclo reproductivo alcanzándose los niveles máximos en la maduración-ovulación (Molés et al., 2011).

3.3) Factores reguladores de las gonadotropinas

El control de la síntesis y secreción de la FSH y LH implica mecanismos de regulación complejos entre el cerebro, la pituitaria y las gónadas. Se han identificado diversos factores que controlan dicha síntesis y secreción, entre los cuales se encuentran: la GnRH, las kisseptinas (KISS), la dopamina (DA), el ácido aminogammabutírico (GABA) y los esteroides sexuales (Fig. 9).

3.3.1) GnRH

Aunque se sabe con claridad que el control de las gonadotropinas depende de la interacción de múltiples factores, dicha regulación se ejerce principalmente por la GnRH. La GnRH es un decapeptido que se sintetiza en forma de precursor (prepro-GnRH). El prepro-GnRH contiene información que codifica para la síntesis de un péptido señal, el propio decapeptido GnRH, un tripéptido de procesamiento y un péptido asociado a cada GnRH, denominado GAP (Gothilf et al., 1996). Estudios filogenéticos han puesto de manifiesto la existencia de tres subtipos de GnRH como resultado de tres duplicaciones génicas principales ocurridas a lo largo de la evolución de los vertebrados (Kah et al., 2007). El primer subtipo (GnRH-1), se expresa principalmente en el hipotálamo de anfibios y mamíferos, pero también de varias especies de peces. El segundo subtipo (GnRH-2), se expresa en el sinencéfalo/mesencéfalo de vertebrados. Por último, el tercer subtipo (GnRH-3),

aparece expresado únicamente en peces (Sherwood et al., 1983) y principalmente en el cerebro anterior (Zohar et al., 2010, Kah et al., 2007).

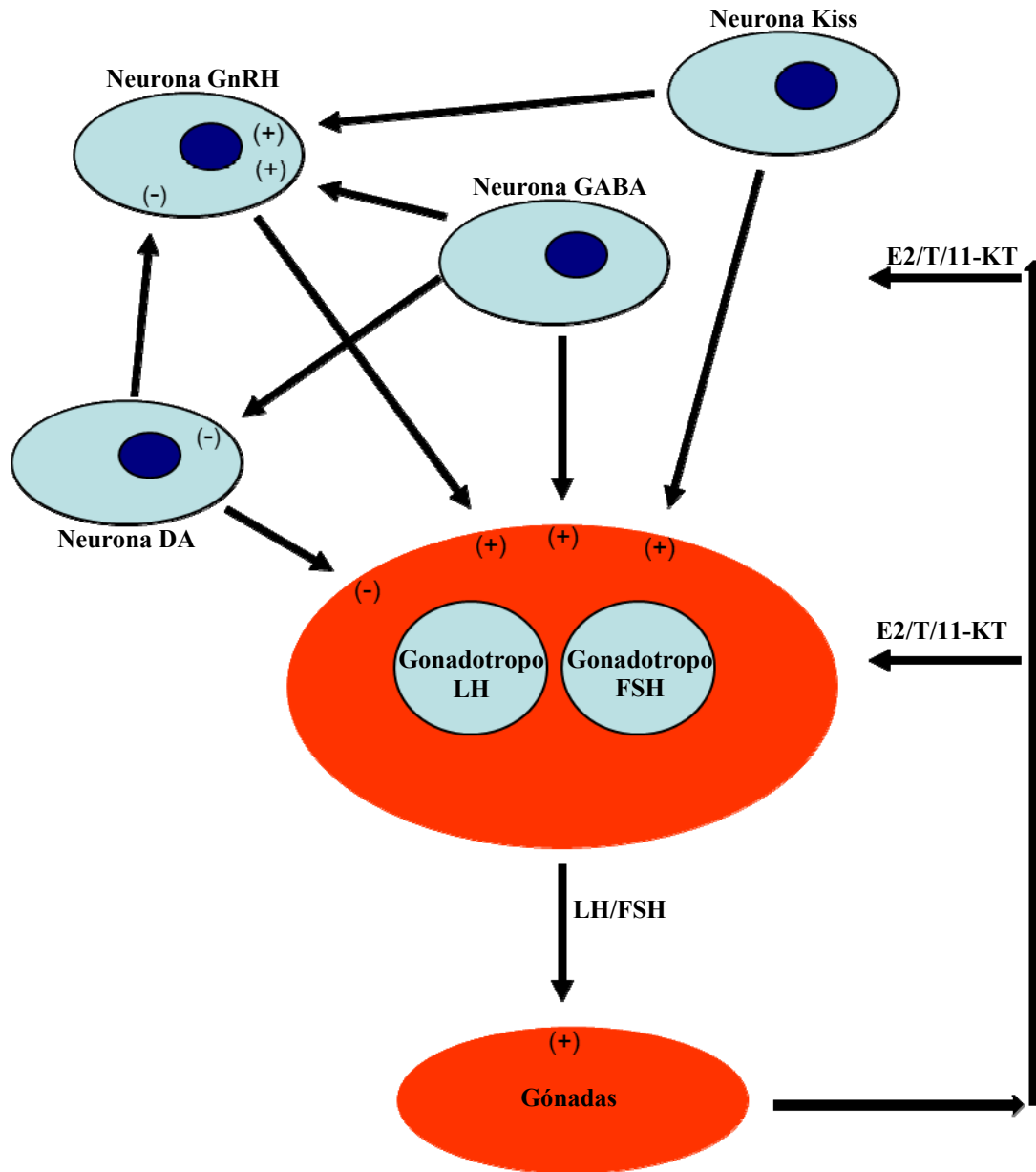


Fig 9. Representación esquemática de los principales circuitos neuronales que controlan la síntesis y secreción de hormonas gonadotropas en peces. GnRH, KISS, GABA y DA estimulan e inhiben, respectivamente, la liberación de FSH/LH de manera directa sobre las células gonadotropas. Los efectos anteriores están modulados por las neuronas GABA, las cuales actúan estimulando la secreción de GnRH e inhibiendo la de dopamina. Los esteroides sexuales, modulan la actividad de los gonadotropos hipofisarios de manera directa sobre los mismos, pero también de manera indirecta, modulando la actividad de los anteriores circuitos neuronales a través de las neuronas dopaminérgicas y gabaérgicas, y posiblemente, los de GnRH de manera indirecta, a través de las neuronas KISS. E2: 17 β -estradiol, DA: dopamina, FSH: hormona foliculo estimulante, GABA: ácido gamma-aminobutírico, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, KISS: kisseptinas, 11-KT: 11-cetotestosterona, LH: Hormona luteinizante, T: testosterona. Adaptado de Zohar et al., 2010.

Desde el descubrimiento de los tres subtipos de GnRH en el cerebro de la dorada (Powell et al., 1994), numerosos estudios han confirmado la presencia de los mismos en peces (Carolsfeld et al., 2000, Andersson et al., 2001, Amano et al., 2002, Mohamed y Khan, 2006). La distribución de los grupos neuronales encargados de expresar los diferentes subtipos de GnRH, se realiza por primera vez en la dorada (Gothilf et al., 1996), y se esclarece con posterioridad en la lubina (González-Martínez et al., 2001, 2002). Así, usando ribosondas y anticuerpos contra el GAP, se ve que la GnRH-2, se expresa únicamente en el sinencéfalo, mientras que la GnRH-3 y la GnRH-1, presentan una distribución solapada en los bulbos olfatorios, telencéfalo ventral y área preóptica. Más concretamente, el subtipo GnRH-2 aparece expresado en el núcleo del fascículo longitudinal medial, la GnRH-3 se expresa, con predominancia, en los bulbos olfatorios, mientras que la GnRH-1 lo hace en el área preóptica e hipotálamo tuberal. Respecto a las proyecciones de los tres subtipos de neuronas GnRH, las neuronas GnRH-3, proyectan principalmente a los bulbos olfatorios, telencéfalo dorsal y ventral, área preóptica, e hipotálamo tuberal, pero también se encuentran proyecciones en el techo óptico, tálamo ventral, tegmento mesencefálico y rombencéfalo ventral. La pituitaria únicamente presenta algunas fibras de dicho subtipo. Por el contrario, las neuronas GnRH-1 proyectan al área preóptica, telencéfalo ventral e hipotálamo tuberal. De los tres subtipos, la GnRH-1, es la que inerva con intensidad la pituitaria [*pars distalis* proximal y *pars intermedia*, donde se localizan las células gonadotrópicas y los receptores de GnRH (González-Martínez et al., 2004)]. Lo anterior sugiere un papel principal de dicho subtipo en el control de la reproducción, estimulando la producción de gonadotropinas. Finalmente, las neuronas GnRH-2 del sinencéfalo inervan al telencéfalo, área preóptica, hipotálamo tuberal, tálamo, tubérculo posterior, tegmento y techo mesencefálico, cerebelo y rombencéfalo (González-Martínez et al., 2002).

El patrón de síntesis y secreción de GnRH varía a lo largo del ciclo de vida de los peces. En la lubina rayada, estudios sobre los niveles de GnRH en la pituitaria durante el estado juvenil, pubertad y madurez muestran que la GnRH-1 y GnRH-2 aumentan durante la fase de recrudescencia gonadal, llegando al máximo en el periodo de puesta, tanto en individuos macho como hembra (Holland et al., 2001). El patrón anterior de expresión estacional, también se puede observar en animales juveniles, pero sin llegar a los mismos niveles, mientras que los niveles de GnRH-3 son bajos durante todo el ciclo reproductivo, observándose picos estacionales sólo en animales maduros.

De la misma manera que la secreción de GnRH está regulada de acuerdo a la fase del estado reproductivo, también lo está su actividad génica. En especies con tres subtipos de GnRH como los perciformes, los niveles de expresión de las tres formas aumentan con la actividad reproductiva de los individuos adultos, aunque dicho aumento no implique necesariamente un efecto directo a nivel de la pituitaria (Zohar et al., 2010). En la dorada, La GnRH-1, es especialmente elevada en las pituitarias de animales macho y hembra durante la época de puesta, en comparación con individuos en fase de recrudescencia. Dichos niveles se corresponden con los de LH en plasma. Por el contrario, la GnRH-3 no se detecta en la pituitaria durante todo el ciclo reproductivo (Gothilf et al., 1997). De manera similar, la expresión de los tres subtipos de GnRH en la dorada roja, alcanzan su máximo justo con anterioridad al momento de la puesta (Okuzawa et al., 2003). Este incremento en la expresión solo se corresponde con la presencia de GnRH-1 en la pituitaria, pero no con la de los otros dos subtipos (Senthilkumaran et al., 1999). Aunque los tres subtipos se han encontrado en la pituitaria de la lubina, estudios diversos señalan a la GnRH-1 como el subtipo principal en la regulación del ciclo reproductivo de la especie anterior (Rodríguez et al., 2000, 2004, Carrillo et al., 2010). Estos resultados, sugieren una relación estrecha entre la presencia de GnRH-1 y la regulación de la producción de gonadotropinas, mientras que los subtipos GnRH-2 y GnRH-3 ejercerían otras funciones neuroendocrinas no hipofisiotróficas asociadas al proceso reproductor.

Si bien se conoce con profundidad el papel central que la GnRH ejerce en la regulación de la síntesis y liberación de LH, es más escasa la información concerniente sobre la regulación que dicho neuropéptido ejerce sobre la FSH. Estudios en salmónidos (Breton et al., 1998, Dickey y Swanson, 1998) han demostrado que, al igual que en mamíferos, la GnRH también estimula la secreción de FSH en peces. En general, los datos parecen indicar que la regulación de la síntesis de las gonadotropinas por la GnRH depende de la especie, sexo y el estado reproductivo del pez (Yaron et al., 2003). En la lubina, se ha demostrado que la GnRH regula, vía gonadotropinas, tanto el proceso de diferenciación sexual (Molés et al., 2007) como el ciclo reproductivo (Mateos et al., 2002, Rodríguez et al., 2004, Carrillo et al., 2010). De las dos gonadotropinas, es la FSH la que estaría implicada de manera principal en el proceso de diferenciación gonadal (Molés et al., 2007). Por otro lado, la administración de GnRH en individuos adultos durante el periodo de inactividad en el ciclo reproductivo estimula la síntesis y liberación de LH, no ejerciendo ningún efecto sobre la síntesis de FSH (Mateos et al.,

2002). Estudios *in vivo* con esteroides sexuales en la anguila (Aroua et al., 2007) sugieren un control cerebral diferente para ambas gonadotropinas. Así, la GnRH, ejercería un papel de menor importancia sobre la FSH con respecto a la LH, como también se ha identificado previamente en mamíferos (Burger et al., 2004). En estos, la regulación de la FSH no solo depende de los esteroides sexuales y neuropéptidos asociados a su regulación, sino también de muchos otros factores como los péptidos gonadales inhibina, folistatina y activina. Los tres se han identificado en varias especies de peces (Wu et al., 2000, Poon et al., 2009, Funkenstein et al., 2009).

3.3.2) KISS

El reciente descubrimiento del sistema KISS/GPR54 ha permitido profundizar en la regulación del control neuroendocrino de la reproducción en vertebrados (de Roux et al., 2003, Seminara et al., 2003). Este sistema basado en el receptor 54 acoplado a proteína G y su ligando las KISS, desempeña un papel clave en la regulación de la GnRH y por tanto en la liberación de LH y FSH. Las KISS también están implicadas en otras funciones biológicas tales como nutrición, metabolismo y respuesta al fotoperiodo (Revel et al., 2006, Roa y Tena-Sempere, 2007).

El sistema KISS está considerado en mamíferos como clave en el desarrollo de la pubertad y los ciclos reproductivos actuando como mediador entre los estímulos ambientales y las señales metabólicas que desencadenan la activación del eje CPG (Tena-Sempere et al., 2012). Las KISS, son el producto del gen KISS1. Dicho gen, se expresa en grupos neuronales de dos núcleos hipotalámicos, el núcleo arcuato y el núcleo periventricular anteroventral (Oakley et al., 2009). Sin embargo, la distribución tisular del sistema KISS no queda circunscrita únicamente al cerebro. Se ha detectado también su expresión, en la pituitaria, ovario, testículos, placenta y tejido adiposo (Colledge, 2008). Los esteroides sexuales regulan de manera diferencial las neuronas KISS de dichos núcleos hipotalámicos, presentando las del núcleo arcuato una retroalimentación negativa por el 17β -estradiol, y las del núcleo periventricular una retroalimentación positiva (Franceschini et al., 2006, Roa et al., 2008a). Dichas retroalimentaciones, son las causantes de la liberación de la FSH y LH a través del sistema GnRH, encontrándose una distribución diferencial del Esr1 y Esr2 asociada a las funciones neuromodulativas específicas de las KISS sobre las gonadotropinas (Franceschini et al., 2006, Roa et al., 2008b).

En peces, la primera identificación y caracterización del KISS1 se realiza en el pez cebra (van Aerle et al., 2008) y en medaka (Kanda et al., 2008). Con posterioridad, trabajos desarrollados en las especies anteriores y en la lubina, han demostrado un segundo subtipo de KISS (KISS2, Kitahashi et al., 2008; Felip et al., 2009). La presencia de este nuevo subtipo estaría propiciada por una duplicación del gen ancestral ocurrida antes de la divergencia de sarcopterigios y actinopterigios. La ausencia del KISS2 en aves y mamíferos placentarios parece indicar que dicho subtipo se habría perdido en la evolución posterior de los vertebrados (Felip et al., 2009).

Respecto a la distribución de las KISS y sus receptores en peces, su expresión se observa en los bulbos olfatorios, telencéfalo, área preóptica, hipotálamo, tálamo, techo óptico, cerebelo y pituitaria. Al igual que en mamíferos, las KISS, también se encuentran presentes, según la especie que se trate, en las gónadas, estómago, intestino, riñón, hígado, tejido adiposo, músculo y corazón (Oakley et al., 2009). Los efectos que los esteroides sexuales ejercen sobre los dos subtipos de KISS sugieren, que en peces, el sistema KISS presenta diferencias interespecie. De manera general, se observa un efecto positivo de los estrógenos sobre la expresión de ambos subtipos. Sin embargo, dependiendo de la especie que se trate varía el subtipo de KISS estimulado, así como también los grupos neuronales afectados por dicha estimulación (Tena-Sempere et al., 2012). Si bien ambos subtipos de KISS intervienen en el control de la reproducción de peces, parece ser que el KISS2 es más potente que el KISS1 en la estimulación de las gonadotropinas (Felip et al., 2009, Kitahashi et al., 2009).

Pese a tenerse constancia del efecto que las KISS ejercen sobre las gonadotropinas a través del sistema GnRH, existe controversia sobre si las KISS también actúan de manera directa sobre la pituitaria. En mamíferos, se ha detectado la presencia de KISS en el sistema portal-hipofisiario, así como la expresión de KISS1 y su receptor en las células gonadotropas. En peces, la presencia de expresión de KISS1 en la pituitaria, junto con la realización de experimentos *in vitro* con cultivos primarios de dicha glándula en los que la KISS1 estimula la secreción de LH, sugieren un efecto directo de las KISS a nivel de la pituitaria, bien de manera paracrina/autocrina, o bien, por un efecto periférico de las KISS (Oakley et al., 2009, Tena-Sempere et al., 2012).

3.3.3) DA

En vertebrados, la DA ejerce en el cerebro y la pituitaria un rango amplio de efectos sobre funciones cognitivas, motoras y endocrinas, actuando como un inhibidor

fundamental del proceso reproductivo (Popesku et al., 2010). Experimentos inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* en la trucha arcoíris y la lubina señalan la síntesis de DA y sus receptores en áreas cerebrales productoras de GnRH como el telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo, así como también en la *pars intermedia* y la *pars distalis* rostral y proximal de la pituitaria (Batten et al., 1993, Vetillard et al., 2002, Vacher et al., 2003). En el pez dorado y en la trucha arcoíris, las neuronas dopaminérgicas del área preóptica proyectan a la *pars distalis* proximal. Dichas neuronas expresan ERs, sugiriendo una interacción entre el 17 β -estradiol y la DA sobre el control de las gonadotropinas (Linard et al., 1996). En relación con lo anterior, estudios llevados a cabo en el pez dorado demuestran que la DA inhibe directamente la liberación de gonadotropinas a través de receptores dopaminérgicos inhibitorios (D2) en las mismas células gonadotrópicas (Chang et al., 1990). Dichos resultados se han confirmado en otras especies de peces (Saligaut et al., 1992, Aizen et al., 2005, Levavi-Sivan et al., 2006). La DA también actúa inhibiendo la liberación de GnRH en el pez dorado (Yu et al., 1991) de manera que, en esta especie, el efecto sobre la liberación de las gonadotropinas es doble, i) actuando de manera directa sobre los gonadotropos y, ii) reduciendo la secreción de GnRH (Trudeau, 1997). Sin embargo, en otras especies no se da un efecto inhibitorio de la DA en la liberación de gonadotropinas (Copeland y Thomas, 1989).

El efecto dopaminérgico inhibitorio en la liberación de gonadotropinas en peces posee diferentes significados fisiológicos. En el pez dorado, la DA previene la ovulación cuando las condiciones ambientales no son las apropiadas (Stacey et al., 1979). En salmónidos, la inhibición dopaminérgica previene la liberación de LH durante la fase de vitelogénesis y dicho efecto se estimula por el 17 β -estradiol, el cual es elevado en dicha fase pero decrece al final de la misma (Vacher et al., 2000, 2002).

3.3.4) GABA

El GABA es un neurotransmisor con efectos inhibitorios presente en el cerebro de todos los vertebrados (Decavel y Van den Pol, 1990, Zohar et al., 2010). Sin embargo existe controversia sobre los efectos que este neurotransmisor ejerce sobre la GnRH y las gonadotropinas. Estudios diversos demuestran que el GABA puede inducir tanto acciones estimulantes como inhibitorias sobre la síntesis y secreción de las hormonas anteriores (Chiechanosvka et al., 2009, Christian y Moenter, 2010). Estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* en especies diferentes de peces,

demuestran la expresión de dicho neurotransmisor en áreas cerebrales principales en el control neuroendocrino como el telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo (di Suma et al., 1993, Anglade et al., 1999, Martyniuck et al., 2007). Experimentos de inmunolocalización en la lamprea señalan la localización conjunta de DA y GABA en neuronas de las áreas cerebrales anteriores sugiriendo la existencia de una interacción entre ambos neurotransmisores sobre el control neuroendocrino (Barreiro-Iglesias et al., 2009). En contraposición a la DA, el GABA ejerce un efecto estimulador en la liberación de gonadotropinas. En el pez dorado, dicho neurotransmisor, provoca la liberación de LH a través de la estimulación de la secreción de GnRH y la inhibición de la DA (Sloley et al., 1992, Trudeau et al., 2000). La acción del GABA sobre las gonadotropinas se produce también de manera directa sobre la pituitaria. En el pez dorado, la inyección de un inhibidor del metabolismo del GABA produce un aumento de los niveles de este neurotransmisor en la pituitaria acompañado de una disminución de LH en las células gonadotropas (Blázquez et al., 1998). El efecto estimulante del GABA en la liberación de las gonadotropinas en peces es eliminado por tratamientos con 17β -estradiol pero no con testosterona, provocando un descenso de la concentración de dicho neurotransmisor a nivel telencefálico (Kah et al., 1992, Trudeau, 1997). Además, los esteroides sexuales también afectan a la síntesis de GABA en la pituitaria de peces. Tratamientos con testosterona y progesterona inhiben la síntesis de este neurotransmisor en la pituitaria, mientras que el 17β -estradiol la estimula (Trudeau, 1997).

Sin embargo, no se sabe todavía si las neuronas GABA expresan ERs en el pez dorado. En la trucha arcoíris, se ha comprobado que el GABA estimula tanto la secreción de FSH como de LH (Mañanos et al., 1999). Experimentos *in vitro* con células gonadotropas de la especie anterior indican que dicho efecto estimulante se ejerce, en parte, de manera directa sobre la pituitaria y depende de los niveles de estereoides sexuales circulantes (Mañanos et al., 1999). En relación a las interacciones entre los estrógenos y el GABA, en la trucha arcoíris, se ha visto que neuronas con actividad glutamato descarboxilasa (enzima que sintetiza GABA a partir de la descarboxilación del glutamato), expresan el Esr1 (Anglade y Kah, resultados no publicados).

3.3.5) Esteroides sexuales. Retroalimentación del complejo CP

La existencia de respuestas coordinadas durante el ciclo reproductivo del animal implica la necesidad de una comunicación permanente entre el complejo CP y las gónadas. En vertebrados, los esteroides gonadales actúan a diferentes niveles del eje CPG. De manera paracrina o autocrina, sobre las mismas gónadas, y mediante sistemas endocrinos de retroalimentación, sobre el hipotálamo y la pituitaria (Weltzien et al., 2004). Con independencia del nivel al que actúen, dichos sistemas de retroalimentación terminan produciendo un efecto sobre la síntesis y liberación de las gonadotropinas. Sin embargo, todavía no se conoce con profundidad los mecanismos por los que dichos esteroides, controlan la actividad de dicho eje y los efectos precisos que provocan.

En los animales, la competencia reproductiva se adquiere tras la transformación de un individuo sexualmente inmaduro en uno sexualmente maduro mediante el proceso de la pubertad. Dicho proceso requiere la maduración del eje CPG (Norris, 1997). Cómo este eje adquiere funcionalidad, es algo que todavía no se ha esclarecido en su totalidad en ningún vertebrado. Entre las hipótesis propuestas para explicar el comienzo de dicha funcionalidad se encuentra la denominada hipótesis gonadostática que implicaría una inhibición inducida por los esteroides gonadales sobre el sistema (Ramírez and McCann, 1965). A medida que el animal alcanza la pubertad, la sensibilidad a la inhibición esteroidea decrece, permitiendo la liberación de GnRH y como consecuencia la síntesis y liberación de gonadotropinas. Estas estimulan la maduración gonadal vía síntesis de esteroides gonadales. Una segunda hipótesis, denominada efectos morfogenéticos de las hormonas esteroideas (Styne, 1994), sostiene que la secreción de esteroides sexuales acelera la maduración del eje CPG hasta que el animal adquiere el estado adulto.

En peces, también se encuentran los sistemas de retroalimentación por esteroides gonadales sobre el complejo CP. Existen numerosas evidencias de retroalimentación positiva y negativa sobre la síntesis y liberación de las gonadotropinas, puestas de manifiesto mediante técnicas de gonadectomía y tratamientos sustitutivos con esteroides sexuales. Experimentos llevados a cabo en diferentes especies, demuestran un efecto inhibitorio de dichos esteroides sobre la producción de la LH (De Leeuw et al., 1986, Kobayashi y Stacey, 1990, Larsen y Swanson, 1997). Por el contrario, en otras, los esteroides gonadales ejercen el efecto opuesto sobre dicha gonadotropina (Breton et al., 1997, Dickey y Swanson, 1998, Antonopoulou et al., 1999). Menor es la información disponible sobre los efectos de los esteroides gonadales en la síntesis y liberación de la

FSH. En salmónidos, se ha demostrado un efecto negativo en la síntesis de esta hormona (Breton et al., 1997, Dickey y Swanson, 1998, Saligaut et al., 1998, Antonopoulou et al., 1999). Los resultados observados en salmónidos coinciden con los detectados *in vivo* en la lubina, en los que se demuestra una inhibición de la expresión de la FSH (Mateos et al., al., 2002). Por el contrario, en el pez dorado se observa un efecto positivo *in vivo*.

Experimentos llevados a cabo en salmónidos, muestran, que tratamientos tanto con 17 β -estradiol como con testosterona, provocan efectos similares (Breton et al., 1997, Dickey y Swanson, 1998). Esta similitud, puede deberse a la conversión local de la testosterona a 17 β -estradiol producida por la actividad aromatasa encontrada en el complejo CP de muchas especies de peces (Blázquez y Piferrer, 2004, Piferrer y Blázquez, 2005, Pellegrini et al., 2005). En peces, a diferencia de otros vertebrados, existen dos tipos de aromatasa, un gen que codifica para una aromatasa específica del cerebro (*cyp19a1b*) y otro que se expresa en las gónadas (Tong y Chung, 2003, Blázquez y Piferrer, 2004, Pellegrini et al., 2005). Diversos estudios demuestran que el *cyp19a1b* se expresa en el telencéfalo, área preóptica, hipotálamo tuberal y pituitaria (Timers et al., 1987, Menuet et al., 2003, Forlano et al., 2005).

4) CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA INGESTA

En todos los vertebrados, el control de la ingesta está regulado en última instancia por efectores centrales en el cerebro. Estos reciben y procesan la información procedente de señales metabólicas, neurales o endocrinas periféricas. Dichas señales, indican el estado nutricional del animal y la necesidad de alimentarse (Hillebrand et al., 2002, Park y Bloom, 2005).

A pesar de la variedad amplia de áreas cerebrales implicadas en la conducta alimenticia, experimentos desarrollados en mamíferos en los años 50 demostraron que el hipotálamo es el principal centro de control de la ingesta y peso corporal. Sin embargo, también están implicadas otras áreas como el tálamo, cortex y tallo cerebral, aunque en menor medida. Las áreas hipotalámicas implicadas en el control de la ingesta incluyen al núcleo arcuato, núcleo paraventricular, área lateral hipotalámica, núcleo ventromedial y núcleo dorsomedial. Las neuronas de dichas áreas, en especial las del núcleo arcuato, establecen un contacto directo con las señales periféricas que llegan vía sanguínea, o uno indirecto con fibras aferentes del nervio vago, a través del núcleo del tracto solitario. Dichas señales periféricas proceden, principalmente, del tracto

gastrointestinal, tejido adiposo, páncreas e hígado (Hillebrand et al., 2002, Neary et al., 2004).

La regulación de la ingesta a través de la interconexión de dichos sistemas, central y periférico, se realiza principalmente por neuropéptidos hipotalámicos (Hillebrand et al., 2002, Neary et al., 2004, Sahu, 2004). Entre los neuropéptidos que estimulan la ingesta (orexigénicos) se encuentran, el neuropéptido Y (NPY), la proteína relacionada con el gen agutí (AgRP), la hormona concentradora de melanocitos (MCH) y las orexinas. Entre los neuropéptidos inhibitorios (anorexigénicos) se encuentran, las melanocortinas, el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y hormona liberadora de tirotrópina (TRH). La insulina y la leptina son los principales factores periféricos encargados de regular la ingesta y el balance energético. Se sintetizan en las células beta del páncreas y en el tejido adiposo, respectivamente. Por otro lado, muchos de los péptidos gastrointestinales, como por ejemplo, la grelina, la coleocistoquinina (CCK), la galanina y el péptido YY se sintetizan también en el cerebro, actuando por tanto, como efectores centrales y periféricos (Hillebrand et al., 2002).

Al igual que en mamíferos, en peces, el hipotálamo es el área central implicada en el control de la ingesta (Peter, 1979). El lóbulo inferior hipotalámico recibe información sensorial procedente de la periferia, actuando como un centro integrador y regulando el apetito (Wulliman y Mueller, 2004). Sin embargo, otras regiones cerebrales entre ellas el telencéfalo ventral, área preóptica, techo óptico y tracto olfatorio parecen también estar implicadas en la regulación de la ingesta en peces (Demski y Knigge, 1971, Stacey y Kyle, 1983).

Los peces poseen péptidos orexigénicos y anorexigénicos homólogos a los de mamíferos (Fig.10). Entre ellos, la CCK, CART, CRF, POMC y probablemente la leptina, actúan como señales anorexigénicas, y el NPY, orexina, grelina, galanina, AgRP y MCH actúan como señales orexigénicas (Volkoff et al., 2005).

4.1) Factores anorexigénicos

4.1.1) POMC

Las melanocortinas son productos postranscripcionales resultantes del procesado de un complejo precursor denominado POMC, que engloban a la hormona ACTH y a las α -, β -, γ -, y δ -MSH (Dores y Lecaude, 2005). EL POMC se produce en la pituitaria,

núcleo del tracto solitario y en el núcleo arcuato. En este último núcleo, las neuronas productoras de dicho precursor, también sintetizan el CART (Hillebrand et al., 2002, Neary et al., 2004). La acción de las melanocortinas está mediada por receptores de membrana acoplados a proteína G, estimulando la actividad adenilato ciclasa. En vertebrados, se han identificado cinco tipos de receptores de melanocortinas (MC1R-MC5R, Schiöth et al., 2005). Estudios de expresión llevados a cabo en mamíferos demuestran, que solo los subtipos 3 y 4 de estos receptores se expresan de manera significativa en el sistema nervioso central (SNC). Existen también diversas evidencias en mamíferos, que las melanocortinas controlan la ingesta y el balance energético a través de dichos subtipos de receptores (Cone, 2006). Ratones deficientes para el MC4R exhiben hiperfagia, hiperinsulinemia, mayor crecimiento y obesidad (Huszar et al., 1997), mientras que la administración central de un agonista del receptor de melanocortinas (MTII) produce una reducción dependiente de la dosis de la ingesta (ver AgRP). De manera similar, la administración central de agonistas y antagonistas de los receptores 3 y 4, inhiben y estimulan, respectivamente, la ingesta en ratas (Schiöth et al., 2003).

Varios estudios demuestran que el sistema de melanocortinas desempeña un papel fisiológico en el control de la ingesta de peces. En el pez dorado, la administración de agonistas de melanocortinas inhibe la ingesta, mientras que antagonistas del MC4R la estimula en animales alimentados (Cerdá-Reverter y Peter 2003a, Cerdá-Reverter et al., 2003b,c). En esta especie el POMC se expresa de manera exclusiva en el núcleo lateral tuberal hipotalámico. En la trucha arcoíris, deficiencias en la síntesis de α -MSH provocan hiperfagia y acumulación de grasa en la cavidad abdominal (Yada et al., 2002). De la misma manera, en la trucha arcoíris, antagonistas y agonistas del MC4R provocaron un aumento y una inhibición de la ingesta respectivamente, sugiriendo que el sistema de melanocortinas controla la ingesta y el balance energético principalmente a través de este subtipo de receptor (Schjolden et al., 2009).

4.1.2) CART

El péptido CART se identificó inicialmente en mamíferos a los cuales se les había administrado estimulantes psicomotores como la cocaína y anfetamina (Hunter et al., 2004). En mamíferos, el CART es especialmente abundante en el hipotálamo (Hunter et al., 2004) expresándose de manera prominente en el núcleo arcuato y núcleo

paraventricular, pero también se detecta su presencia en la eminencia media, pituitaria y médula adrenal (Kuhar y Dall Vechia, 1999). El CART se expresa conjuntamente con el POMC en neuronas del núcleo arcuato pero también con péptidos orexigénicos como la MCH en el área lateral hipotalámica (Kuhar y Dall Vechia, 1999) y en el núcleo dorsomedial (Vrang et al., 1999).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto el efecto anorexigénico de este péptido en mamíferos (Vrang et al., 1999, Hillebrand et al., 2002, Hunter et al., 2004, Vicentic y Jones, 2007).

Al igual que en mamíferos, en peces, el CART también está implicado en la regulación de la ingesta. Su expresión, se detecta principalmente en el hipotálamo, pero también en los bulbos olfatorios, telencéfalo, área preóptica, techo óptico, cerebelo y pituitaria (Volkoff y Peter, 2000, MacDonald y Volkoff, 2009a,b, Conde-Sieira et al., 2010, Subhedar et al., 2011). En el pez dorado, inyecciones centrales de fragmentos de CART humano inhiben la ingesta (Volkoff y Peter, 2000), mientras que los niveles de expresión hipotalámicos de dicho péptido aumentan tras la ingesta y disminuyen durante la privación de alimento (Volkoff y Peter, 2001a). El CART interacciona con otros factores reguladores de la conducta alimenticia. La administración del CART inhibe el efecto hiperfágico producido por el NPY y la orexina A (Volkoff y Peter, 2000). En el salmón del atlántico (*Salmo salar*), los niveles de este péptido decrecen tras un período de 6 días de ayuno (Murashita et al., 2009). En el pez gato, períodos de ayuno prolongados producen una disminución del CART, mientras que la realimentación restablece sus niveles normales. Los niveles de CART, en animales de la anterior especie que presentan un mayor consumo de alimento y ganancia de peso, son inferiores a los de aquellos cuya ingesta era menor (Kobayashi et al., 2008). En el bacalao del atlántico (*Gadus morhua*), los niveles de CART disminuyen tanto a corto plazo como en períodos de ayuno prolongado (Kehoe y Volkoff, 2007). Por el contrario, en la solla roja (*Pseudopleuronectes americanus*) y en *Raja ocellata* el ayuno prolongado no altera los niveles del CART (MacDonald y Volkoff, 2009a,b).

4.1.3) CCK

La CCK es un péptido estructuralmente relacionado con la gastrina secretado principalmente por el tracto gastrointestinal pero que también se expresa en los núcleos hipotalámicos ventromedial y paraventricular, tálamo, cortex, amígdala e hipocampo (Hillebrand et al., 2002, Lee y Solstetz, 2011). Los efectos de la CCK están mediados

por dos subtipos de receptores, el subtipo A sintetizado principalmente en el tracto gastrointestinal, y el subtipo B que predomina en el cerebro (Moran y Kinzig, 2004). En mamíferos, la CCK está implicada en diversas funciones fisiológicas pero actúa principalmente como señal de saciedad (Cupples, 2002, Lee y Solstez, 2011). Así, tanto la administración central como periférica de CCK exógena provoca una inhibición de la ingesta (Moran y Kinzig, 2004).

Estudios en peces, demuestran la presencia de expresión de CCK en el cerebro e intestino (Peyon et al., 1998, Jensen et al., 2001, Kurokawa et al., 2003). En el cerebro del pez dorado, la presencia de CCK se detecta principalmente en el hipotálamo (Peyón et al., 1999). Parece ser que en peces existe un único receptor para este péptido, expresado tanto en el tracto gastrointestinal como en el cerebro (Moons et al., 1992, Himick et al., 1996). Dentro del cerebro, el receptor de CCK aparece expresado en los núcleos hipotalámicos asociados a la regulación de la ingesta, en el telencéfalo y área preóptica (Himick et al., 1996). De manera similar a lo demostrado en mamíferos, la CCK está implicada en diversas funciones asociadas con la alimentación y la digestión, tales como la liberación de enzimas pancreáticos, la contracción de la vesícula biliar, la peristalsis intestinal y la ingesta. En el pez dorado, la administración tanto central como periférica de CCK-8 inhibe la ingesta (Volkoff et al., 2003), mientras que en la trucha arcoíris, tratamientos con antagonistas de la CCK la estimulan (Gelineau y Boujard, 2001). En concordancia con los resultados anteriores, experimentos llevados a cabo en la lubina demuestran que la administración oral de CCK produce una reducción significativa de la ingesta. La proglumida, un antagonista no específico del receptor de CCK, es capaz de revertir dicha inhibición, confirmando el efecto anorexigénico de la CCK en esta especie (Rubio et al., 2008).

4.1.4) Leptina

La leptina, es una proteína producida por el gen de la obesidad (*ob*) que fue aislado por primera vez en el ratón, siendo considerada el factor responsable de la obesidad mórbida para los ratones mutantes *ob/ob* (Zhang et al., 1994). En mamíferos, la leptina se produce y secreta principalmente en el tejido adiposo blanco. Tanto la administración central como periférica de esta hormona provoca una disminución en la ingesta y pérdida de peso corporal. Sin embargo, es la administración central la que produce un efecto anorexigénico más potente, sugiriendo que su actuación principal se produce sobre los principales núcleos hipotalámicos encargados de regular dicho

comportamiento (Hillebrand et al., 2002, Neary et al., 2004). De este modo, la leptina actúa a través de sus receptores estimulando a neuronas productoras de factores orexigénicos e inhibiendo a las correspondientes anorexigénicas (Harvey y Ashford, 2003, Sahu, 2004).

Las evidencias sugerían que el gen de la leptina estaba conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados. Sin embargo, a pesar de su detección por inmunoreactividad en la sangre y en el hígado, se tardó más de una década en encontrar el ortólogo de la leptina en peces (Kurokawa et al., 2005, Huising et al., 2006). Desde entonces, varios estudios demuestran su presencia en diferentes especies (Pfundt et al., 2009, Kurokawa y Murashita, 2009, Rønnestad et al., 2010, Li et al., 2010). El mayor sitio de expresión de la leptina en peces es el hígado (Kurokawa et al., 2005, Huising et al., 2006).

Todavía no se conoce en profundidad el papel que la leptina desempeña en el mantenimiento del peso corporal y el balance energético en vertebrados no mamíferos. Estudios en el salmón (*Oncorhynchus kisutch*, Baker et al., 2000), el pez gato (Silverstein y Plisetskaya, 2000) y el pez sol verde (*Lepomis cyanellus* Londraville y Duvall, 2002) muestran, que aparentemente, la leptina no afecta a la ingesta y peso corporal. Sin embargo, en el pez dorado, la administración tanto periférica como central de leptina de mamífero disminuye la ingesta (Volkoff et al., 2003) potenciando la acción de factores anorexigénicos como el CART y la CCK e inhibiendo la de los orexigénicos NPY y orexina A (Volkoff et al., 2003). El efecto hipofágico producido por la leptina a través de la inhibición del NPY y orexina A disminuye mediante el bloqueo de los receptores de CCK, sugiriendo que las acciones anorexigénicas de la leptina, en parte, están mediadas por la CCK (Volkoff et al., 2003). En la carpa (*Cyprinus carpio*), los niveles de leptina aumentaron tras la ingesta de manera seguida al pico de glucosa postprandial (Huising et al., 2006).

4.2) Factores orexigénicos

4.2.1) NPY

El NPY pertenece a la familia de péptidos que comprende al PYY, polipéptido pancreático (PP) y al péptido Y (PY). El NPY actúa a través de receptores de membrana acoplados a proteína G, denominados receptores Y. En vertebrados, se han identificado diversos subtipos de dichos receptores, cuya presencia o ausencia depende de la clase de

vertebrado que se trate (Larhammar y Salaneck, 2004, Larsson et al., 2008). En mamíferos, el NPY está considerado como uno de los más potentes factores orexigénicos. Su expresión se detecta, en abundancia, en los núcleos hipotalámicos arcuato y paraventricular, los cuales, como ya se ha mencionado, son centros clave en la regulación de la ingesta.

El NPY, se ha identificado en numerosas especies de peces (Jensen y Colon, 1992, Blomqvist et al., 1992, Leonard et al., 2001, Soderberg et al., 2000, Kurokawa y Suzuki, 2002) incluida la lubina (Cerdá-Reverter et al., 1998). La expresión de este neuropéptido en peces se produce principalmente en el cerebro (Cerdá-Reverter y Larhammar, 2000a). En la lubina, este neuropéptido aparece en los bulbos olfatorios, telencéfalo dorsal y ventral, área preóptica, hipotálamo tuberal, tálamo, sinencéfalo, techo óptico, tegmento mesencefálico y cerebro posterior (Cerdá-Reverter et al., 2000c).

Diversos estudios demuestran el efecto orexigénico de este neuropéptido en peces. La administración tanto central, como periférica, produce un aumento de la ingesta en el pez dorado (De Pedro et al., 2000, Narnaware et al., 2000), en el salmón y en el pez gato (Silverstein y Plisetskaya, 2000). De manera similar, experimentos de privación de alimento en las especies anteriores demuestran un aumento de la expresión de NPY a nivel del telencéfalo, área preóptica e hipotálamo (Silverstein et al., 1999a,b, Narnaware y Peter, 2001), mientras que la realimentación restablece los niveles del mismo en el pez dorado (Narnaware y Peter, 2001).

4.2.2) AgRP

En mamíferos, el gen agutí está implicado en la regulación de la pigmentación cutánea, expresándose principalmente en la piel. En 1997, se aisló en humanos y en murinos, un gen, prácticamente con el mismo tamaño y estructura que el gen agutí, al que se denominó AgRP (Ollmann et al., 1997). La AgRP se expresa principalmente en neuronas del núcleo arcuato encargadas también de la producción de NPY y al igual que éste, la AgRP ejerce un papel principal en la regulación de la ingesta y el balance energético (Hillebrand et al., 2002, MacNeil et al., 2002, Neary et al., 2004).

En mamíferos, el sistema de melanocortinas no solo está controlado por sus agonistas endógenos ACTH y MSH. Agutí y AgRP compiten también como antagonistas de las melanocortinas uniéndose a sus receptores. Mientras que la proteína agutí es un potente antagonista del receptor de melanocortinas 1 y 4, la AgRP se une tanto al receptor tipo 3 como al 4, inhibiendo la señal de las melanocortinas sobre estos

receptores (Schiöth et al., 2003). Varios estudios indican que la AgRP está implicada en el aumento de la ingesta y crecimiento en roedores (Klebig et al., 1995, Ollmann et al., 1997). La administración central de un agonista (MTII) del receptor de melanocortinas produce una reducción de la ingesta dependiente de la dosis en ratón (Fan et al., 1997) pero no en aquellos con una mutación para el receptor tipo 4 (Marsh et al., 1999). Los anteriores efectos anorexigénicos producidos por el MTII son bloqueados por la coadministración de AgRP (Patten et al., 2007). Estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* en rata demuestran que tanto neuronas AgRP como las neuronas MSH establecen proyecciones sobre neuronas que expresan el receptor de melanocortinas 4 (Bagnol et al., 1999). Sin embargo, la presencia de fibras neuronales AgRP sobre neuronas expresando el receptor tipo 4, pero sin recibir inervación MSH, sugiere que el AgRP no solo actúa como un antagonista competidor del receptor de melanocortinas (Fekete et al., 2004). Estudios *in vivo* realizados sobre ratones mutantes con deficiencias en el POMC demuestran que la AgRP modula el balance energético a través de un mecanismo independiente de la competición con la MSH por los receptores de melanocortinas 3 y 4 (Tolle y Low, 2008). El receptor de melanocortinas tipo 4 posee una actividad constitutiva que le permite actuar como señal tónica de saciedad, regulando la homeostasis del balance energético a largo plazo (Srinivasan et al., 2004). La pérdida de dicha actividad del receptor 4 va asociada a problemas de obesidad en humanos. Diversos estudios *in vitro* demuestran que la unión de la AgRP al receptor tipo 4 disminuye los niveles de AMPc, suprimiendo la actividad constitutiva de dicho receptor (Chai et al., 2003, Chen et al., 2006). La actuación anterior de la AgRP como un agonista inverso puede suponer una inhibición de dicha señal tónica de saciedad (Srinivasan et al., 2004).

Al igual que en mamíferos, diversos experimentos en peces han puesto de manifiesto el efecto orexigénico del AgRP. Experimentos en el pez cebra, demuestran que el AgRP actúa como un competidor antagonista del receptor de melanocortinas tipo 4 y una sobreexpresión de este neuropéptido en individuos transgénicos produce obesidad y un aumento del crecimiento (Song y Cone, 2007). Además, estudios inmunohistoquímicos en la especie anterior y de hibridación *in situ* en el pez dorado indican que las neuronas sintetizadoras de AgRP se localizan en el núcleo lateral tuberal hipotalámico considerado como el homólogo del núcleo arcuato en peces (Cerdá-Reverter y Peter, 2003, Forlano y Cone, 2007). Por otro lado, periodos cortos y prolongados de ayuno en el pez dorado, no inducen cambios de los niveles

hipotalámicos de POMC pero si un aumento del AgRP (Cerdá-Reverter et al., 2003b,c, Cerdá-Reverter y Peter, 2003a). Experimentos *in vitro* llevados a cabo en la lubina demuestran, que el AgRP además de actuar como un antagonista competidor del sistema de melanocortinas también ejerce sus efectos en la regulación de la ingesta y control del balance energético, actuando como un agonista inverso del receptor de melanocortinas tipo 4 (Sánchez et al., 2009).

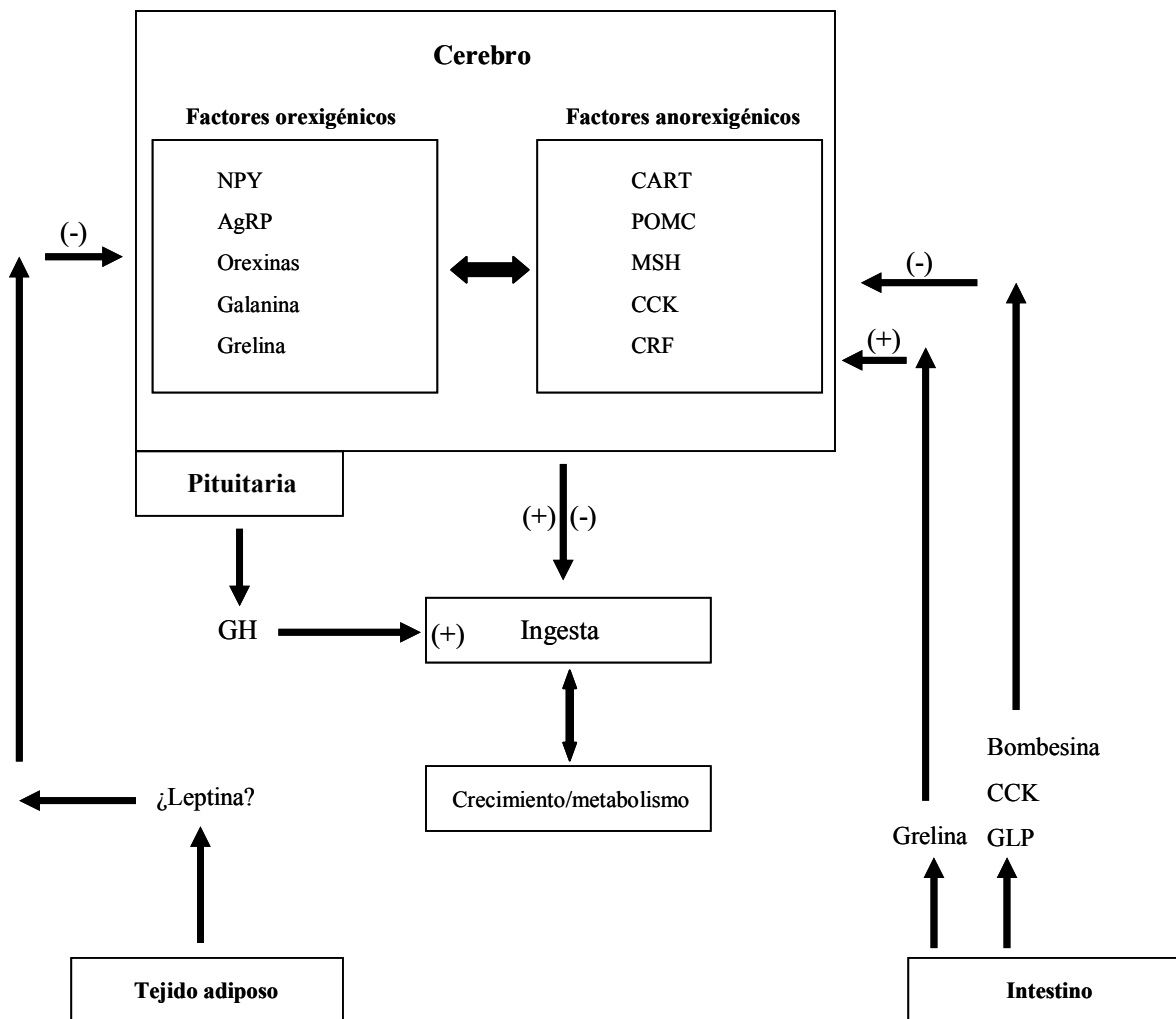


Fig. 10. Diagrama esquemático de los principales circuitos y péptidos periféricos y centrales reguladores de la ingesta en peces. Dentro del cerebro, los neuropéptidos reciben e integran las señales procedentes de la periferia, modulando en última instancia la ingesta. Este sistema central consiste en factores estimuladores (orexigénicos) e inhibidores (anorexigénicos) de la ingesta, algunos de los cuales pueden interactuar entre ellos. Las señales hormonales periféricas procedentes del intestino y probablemente del tejido adiposo, llegan al SNC a través del nervio vago o del sistema circulatorio influenciando a su vez sobre las señales producidas por los neuropéptidos centrales reguladores de la ingesta. AgRP: proteína reguladora del gen agutí, CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina, CCK: coleocistoquinina, CRF: hormona liberadora de corticotropinas, GH: hormona del crecimiento, GLP: péptido relacionado con el glucagón, MSH: hormona estimuladora de los melanocitos, NPY: neuropéptido Y, POMC: proopiomelanocortinas. Adaptado de Volkoff et al., 2005.

4.2.3) Orexinas

Las orexinas (hipocretinas) son péptidos formados a partir de un mismo precursor denominado prepro-orexina. Existen dos tipos de orexinas, orexina A (hipocretina-1) y orexina B (hipocretina-2). En mamíferos, las orexinas y sus receptores se producen en el hipotálamo lateral pero también se han localizado en tejidos periféricos como en el tracto gastrointestinal, páncreas y en el nervio vago (Kirchgessner, 2002, Korszynski et al., 2006).

Se han identificado dos subtipos de receptores, el OX 1R, con afinidad elevada para la orexina A, y el OX 2R que une ambas orexinas con similar afinidad (Ferguson y Samson, 2003). Las orexinas se han detectado en varias especies de peces como el pez pulmonado (*Protopterus dolloi*, *Neoceratodus forsteri*, López et al., 2009), el pez dorado (Kojima et al., 2009), el pez cebra (Kaslin et al., 2004) y el fugu (Álvarez y Sutcliffe, 2002). En el pez dorado, se han identificado neuronas inmunoreactivas para dicho neuropéptido en el telencéfalo ventral, tálamo e hipotálamo (Huesa et al., 2005). De manera similar, en el pez cebra, experimentos inmunológicos y de expresión sitúan la producción de orexinas en el hipotálamo y área preóptica (Kaslin et al., 2004). Tanto en peces, como en mamíferos, las orexinas ejercen un efecto orexigénico sobre la ingesta (Novak et al., 2005, Chen et al., 2011, Amiya et al., 2012). Las orexinas interactúan con otros factores reguladores de la ingesta como el NPY, galanina, CART y leptina (Kirchgessner, 2002, Rodgers et al., 2002). Experimentos realizados en el pez dorado demuestran que el bloqueo de los receptores de orexina con elevadas dosis de orexina A, provoca una disminución del efecto orexigénico del NPY. De la misma manera, el bloqueo de los receptores NPY supone un descenso de la estimulación de la ingesta mediada por las orexinas, indicando una interacción de ambos péptidos en la regulación de la misma. La administración conjunta de ambos péptidos supuso un aumento de la ingesta, en comparación con peces tratados únicamente con NPY. Los niveles cerebrales de expresión de NPY aumentan tras la administración de orexina A (Volkoff y Peter, 2001 b).

4.2.4) MCH

La MCH se aisló originalmente en la pituitaria del salmón (*Oncorhynchus keta*) considerándose una neurohormona implicada en los cambios de coloración pigmentaria (Kawauchi et al., 1983). Por el contrario, en mamíferos, la MCH no presenta efectos demostrables sobre la pigmentación pero si ejerce un papel principal en el control de la

ingesta y el balance energético (Qu et al., 1996, Ludwig et al., 2001, Hillebrand et al., 2002, Pissios et al., 2006). Las neuronas MCH se localizan en el área lateral hipotalámica y reciben información procedente del núcleo arcuato (Elias et al., 1999) estableciendo conexiones con diferentes áreas cerebrales implicadas en el gusto, olfato y zonas integradoras de información visceral (Bittencourt et al., 1992).

En peces, la MCH se localiza principalmente en el hipotálmo tuberal aunque su presencia se detecta también en mayor o menor medida dependiendo de la especie, en el telencéfalo, área preóptica, techo óptico, tálamo y pituitaria (Tuziak y Volkoff, 2012). Aunque estudios previos indicaban, que si bien la MCH ejercía un papel principal sobre la pigmentación, no existían evidencias claras sobre su participación en el control de la ingesta (Kinoshita et al., 2001, Cerdá-Reverter y Peter, resultados no publicados). Posteriormente se han demostrado, tanto efectos orexigénicos, como anorexigénicos, de dicha neurohormona. Estudios recientes ponen de manifiesto que la administración central de MCH en el pez dorado inhibe la ingesta actuando a través de la modulación de neuronas productoras de α -MSH (Shimakura et al., 2008a, Matsuda et al., 2009). En la especie anterior, períodos de ayuno disminuyen la producción de MCH en neuronas localizadas en la parte dorsal del núcleo del receso lateral hipotalámico (Matsuda et al., 2007). Experimentos de doble inmunofluorescencia demuestran que las neuronas MCH proyectan sobre neuronas NPY en el núcleo posterior periventricular hipotalámico del pez dorado (Matsuda, 2009) y la administración central de MCH inhibe la expresión de NPY y grelina en el diencéfalo (Shimakura et al., 2008 b). Por el contrario, en el lenguado (*Pseudopleuronectes americanus*) y en el pez cebra, periodos de ayuno incrementan los niveles de MCH, indicando el efecto orexigénico de la MCH (Berman et al., 2009, Tuziak y Volkoff, 2012)

4.2.5) Grelina

La grelina es un péptido sintetizado en el estómago y cerebro, encargado del control del balance energético y que estimula la ingesta en mamíferos (Nakazato et al., 2001, Hillebrand et al., 2002, Hillman et al., 2011). Los receptores de grelina se localizan en el hipotálamo, sugiriendo que sus efectos orexigénicos se producen en dicha área (Inui et al., 2004, Hillman et al., 2011).

La grelina se ha identificado en varias especies de peces (Unniappan et al., 2002, Parhar et al., 2003b, Kaiya et al., 2003). La expresión de este péptido se localiza en el estómago, intestino y cerebro (Unniappan et al., 2002, Kaiya et al., 2003), mientras que

sus receptores se expresaron de forma prominente en el hipotálamo (Chan y Cheng, 2004). Al igual que en mamíferos, la grelina está implicada en el control de la ingesta en peces. Numerosos experimentos ponen de manifiesto su efecto orexigénico. En el pez dorado su administración, tanto central como periférica, estimula la ingesta (Unniappan et al., 2002, 2004, Kang et al., 2011). Estudios desarrollados en la lubina americana indican que la privación de alimento eleva los niveles de grelina, y estos disminuyen tras la ingesta (Picha et al., 2009). Trabajos realizados en el salmón Atlántico, para evaluar el efecto que ejerce sobre la ingesta la variación de temperatura del agua, señalan que el efecto inhibitorio observado a elevadas temperaturas, va acompañado de un descenso de los niveles circulantes de grelina (Hevroy et al., 2012). Periodos de ayuno y realimentación en la lubina producen un incremento y un descenso, respectivamente de la expresión estomacal de dicho péptido (Terova et al., 2008).

4.3) Esteroides sexuales e ingesta

A lo largo de las últimas décadas se ha confirmado la influencia que los esteroides sexuales ejercen sobre la ingesta y el peso corporal. De manera general se sabe que los andrógenos actúan como efectores anabólicos estimulando la ingesta, mientras que los estrógenos son agentes catabólicos que la disminuyen (Mystkowski y Schwartz, 2000).

De forma consistente con la acción anabólica establecida para los andrógenos, técnicas de orquiectomía en rata ponen de manifiesto una disminución permanente en la ingesta, la cual es revertida con la administración de testosterona (Gentry y Wade, 1976). Los efectos producidos por los andrógenos en el control del balance energético dependen de la dosis a la que estos actúen. Su administración a bajas concentraciones estimula la ingesta en ratas, mientras que elevadas concentraciones la inhiben. Los efectos antagónicos producidos como consecuencia de la dosis aplicada sugieren que dichas diferencias son consecuencia de la aromatización de los andrógenos a estrógenos. La administración de andrógenos no aromatizables en ratas macho castradas no disminuye su ingesta de manera dosis dependiente. Tanto la administración de progesterona, esteroide que antagoniza los efectos anorexigénicos de los estrógenos, como la inhibición de la actividad aromatasa bloquean, respectivamente, la acción anorexigénica de altas dosis de testosterona. Esto corrobora que la acción catabólica producida por altas concentraciones de andrógenos se debe a su aromatización y conversión en estrógenos (Gentry y Wade, 1976).

El efecto que los esteroides sexuales ejercen sobre el control del balance energético está mediado por factores orexigénicos y anorexigénicos tanto periféricos como centrales. Estudios *in vivo* en humanos demuestran que la administración de testosterona reduce los niveles de leptina (Jockenhovel et al., 1997) y que la castración en roedores disminuye la expresión de NPY, pudiendo revertirse dicho efecto tras la administración de testosterona (Urban et al., 1993).

En la rata, la liberación de progesterona y 17β -estradiol, durante los cuatro/cinco días que dura el ciclo estro, va acompañada de una fluctuación de los niveles de ingesta en respuesta al ritmo ovárico, disminuyendo ésta conforme aumentan los niveles de estrógenos (Butcher et al., 1974). Efectos similares a los anteriores se han demostrado en especies de mamíferos con un ciclo ovárico más largo, como es el caso de la oveja, determinados primates, y humanos (Tarttelin et al., 1968, Czaja et al., 1975, Dalvit-McPhillips, 1983). Contrastando los resultados anteriores, se encuentran los experimentos de ovariectomización y tratamientos hormonales sustitutivos en diferentes especies de mamíferos, los cuales demuestran que el 17β -estradiol es la hormona responsable en la inhibición de la ingesta durante el ciclo ovárico (Tarttelin et al., 1973, Asarian y Geary, 2002, Sullivan et al., 2003). Por el contrario, tratamientos sustitutivos con progesterona, no alteran la conducta alimenticia, aunque se ha comprobado que dosis farmacológicas de dicho esteroide antagonizan los efectos inhibitorios del 17β -estradiol sobre la ingesta (Czaja, 1978, Wade, 1975).

En mamíferos, los efectos del 17β -estradiol en la regulación de la ingesta se ejercen sobre las principales áreas cerebrales implicadas en dicha regulación (Butera, 2010, Santollo et al., 2011). Experimentos realizados con implantes o microinfusiones de 17β -estradiol en los núcleos hipotalámicos paraventricular y arcuato inhiben la ingesta en ratas ovariectomizadas (Butera y Beikirch, 1989, Santollo et al., 2010). Sin embargo, el efecto de los estrógenos sobre el control de la ingesta no se circunscribe únicamente al hipotálamo, sino que incluyen también al área preóptica medial, núcleo del rafe dorsal (Santollo et al., 2010) y cerebro posterior (Butera, 2010). Respecto a esta última área, la aplicación de 17β -estradiol en la región caudal del núcleo del tracto solitario en ratas ovariectomizadas, provoca una disminución de los niveles de la ingesta (Thammacharoen et al., 2008). Existe evidencia neuroanatómica de la presencia de conexiones recíprocas entre neuronas sensibles a los estrógenos del núcleo paraventricular hipotalámico y neuronas del núcleo del tracto solitario y núcleo dorsal motor del vago (Corodimas y Morrell, 1990) que hacen pensar en la existencia de una

ruta hipotálamo-cerebro posterior a través de la cual los estrógenos regulan la ingesta (Kirchgessner y Sclafani, 1988).

Los efectos centrales que el 17β -estradiol produce sobre la regulación de la ingesta están mediados por los ERs (Butera, 2010, Santollo et al., 2011). Estudios de hibridación *in situ* e inmunolocalización en la rata y el ratón, han detectado la presencia de los ERs en los principales núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta, así como también en el área preóptica medial, núcleo del tracto solitario y núcleo dorsal motor del vago (Shughrue y Merchenthaler, 1997, Mitra et al., 2003, Merchenthaler et al., 2004). No se sabe con certeza si los efectos centrales producidos por el 17β -estradiol sobre el control de la ingesta están mediados por el Esr1 o por el Esr2. Estudios en ratas ovariectomizadas, en los que se aplica de manera intracerebroventricular oligodeoxinucleótidos antisentido para el Esr2 pero no para el Esr1, bloquean los efectos del 17β -estradiol sobre la ingesta (Clegg et al., 2007). Por el contrario, trabajos desarrollados en ratones ovariectomizados, en los que se inactiva el Esr1, la administración de 17β -estradiol no produce una inhibición de la misma, sugiriendo que en esta última especie, el Esr1 es el responsable de los efectos causados sobre la regulación de la alimentación por dicho esteroide (Geary et al., 2001). Experimentos con agonistas del Esr1 y del Esr2 en rata parecen confirmar la hipótesis de que es el subtipo Esr1, y no el Esr2, el implicado en la inhibición de la ingesta (Santollo et al., 2007). Sin embargo, la aplicación directa de 17β -estradiol sobre el núcleo paraventricular de ratas ovariectomizadas provoca una reducción de la ingesta y aunque se sabe que el núcleo anterior contiene neuronas sensibles a los estrógenos, el subtipo de ER expresado en dicho núcleo, es el 2 y no el 1 (Shughrue et al., 1997).

Estudios alternativos han permitido poner de manifiesto que el efecto de los estrógenos sobre la ingesta, está relacionado con las acciones que producen sobre la activación o inhibición de factores anorexigénicos y orexigénicos, respectivamente. En concreto, se ha visto que el 17β -estradiol, potencia las señales de saciedad producidas por la CCK, e inhibe los efectos estimulantes generados por la grelina y el NPY (Butera, 2010). En ratas, la administración periférica de 17β -estradiol potencia los efectos inhibitorios causados por la administración intraperitoneal de CCK (Asarian y Geary, 1999). La administración de antagonistas del receptor de la CCK atenúa los efectos anorexigénicos producidos por el 17β -estradiol en ratas ovariectomizadas (Butera, 1996). Se cree que los efectos potenciadores del 17β -estradiol sobre la CCK tienen lugar en el cerebro a través de acciones estrogénicas mediadas por los ERs (Geary et al.,

2001). La aplicación de implantes de 17β -estradiol en el núcleo paraventricular potencia los efectos anorexigénicos causados por la administración periférica de CCK (Butera et al., 1996).

Aunque los efectos anorexigénicos producidos por la CCK se ven potenciados por los estrógenos, también se ha observado que la presencia de antagonistas de la CCK no revierten por completo la acción anorexigénica producida por el 17β -estradiol, sugiriendo que la CCK no es el único factor implicado en la regulación de la ingesta por estrógenos. En la rata, los efectos orexigénicos producidos por la grelina se ven atenuados por tratamientos con 17β -estradiol (Clegg et al., 2007). Dicha atenuación, probablemente ocurre a través de la neuromodulación de neuropéptidos como el NPY. El 17β -estradiol disminuye la acción orexigénica producida por la administración intracerebroventricular de NPY, así como también la liberación de este neuropéptido en el núcleo paraventricular en ratas ovarioctemizadas (Santollo y Eckel, 2008).

La información disponible en peces sobre los efectos de los esteroides sexuales en la regulación de la ingesta y crecimiento es controvertida. Estudios en salmónidos y ciprínidos demuestran que los andrógenos causan efectos orexigénicos cuando son suministrados con la dieta (McBride et al., 1982, Lone, 1989). De manera similar, en la dorada roja (*Chrysophrys major*), la testosterona ejerce una acción anabólica aumentando el apetito, la eficiencia en la conversión del alimento y el crecimiento (Woo et al., 1993). En la tilapia se observa que tanto la testosterona como la 11-cetotestosterona son responsables de una mayor tasa de crecimiento en machos que en hembras (Toguyeni et al., 1997). Por el contrario, estudios llevados a cabo en el pez gato y en la perca demuestran que la 17α -metiltestosterona y la testosterona inhiben el crecimiento y la ingesta (Simone, 1990, Mandiki et al., 2004).

Al igual que con los andrógenos, los resultados obtenidos a partir de trabajos realizados para determinar el efecto de los estrógenos sobre la ingesta en peces, sugieren que los efectos de estos son dependientes de la especie. Trabajos desarrollados en la solla (*Pleuronectes plateas*) con dietilestilbestrol muestran que dicho compuesto estrogénico a dosis bajas, causa un aumento de la tasa de crecimiento por estimulación de la ingesta (Cowey et al., 1973). Por el contrario, dosis bajas de dietilestilbestrol, producen efectos adversos en el crecimiento del pez gato y la trucha arcoíris (Bulkley, 1972, Matty y Cheema, 1978). Trabajos posteriores en la anguila y en el fletan demuestran que la presencia de 17β -estradiol en las dietas produce un aumento de peso

en la primera especie y una reducción del crecimiento en la segunda (Tzchori et al., 2004, Woo et al., 1993).

OBJETIVOS

Atendiendo a los efectos múltiples que los esteroides sexuales ejercen en los procesos fisiológicos, metabólicos y en el comportamiento de los vertebrados, el trabajo presente tiene por objetivo, el desarrollo de los siguientes puntos:

- 1) Establecer la distribución cerebral de los tres subtipos de ERs, Esr1, Esr2a y Esr2b caracterizados en la lubina, como primera aproximación en el estudio de los efectos que los estrógenos desempeñan en el SNC de peces, así como para dilucidar las posibles funciones diferenciales y redundantes de cada uno de los subtipos.
- 2) Dilucidar la participación de los tres subtipos de ERs, en el proceso reproductor de la lubina, a partir de su implicación en la regulación de la producción de gonadotropinas, de forma indirecta a través de la modulación de las neuronas hipofisiotrópicas, y de forma directa sobre las propias células gonadotropas.
- 3) Estudio del efecto de los esteroides sexuales sobre la producción de FSH en la lubina:
 - 3.1) Efecto *in vitro* de andrógenos y estrógenos sobre la expresión de la subunidad β FSH.
 - 3.2) Clonación y caracterización de la región promotora de la subunidad β FSH.
 - 3.3) Caracterización de la actividad basal de la región promotora de la subunidad β FSH.
 - 3.4) Control transcripcional por estrógenos de la subunidad β FSH.
- 4) Debido a la relación existente entre los estrógenos y la conducta alimenticia en los vertebrados:
 - 4.1) Determinar la presencia de los ERs en núcleos y áreas cerebrales de la lubina, implicados en el control de la ingesta y el comportamiento alimenticio, como primera aproximación del efecto que los estrógenos ejercen sobre los mismos.
 - 4.2) Desarrollo de un sistema de detección de compuestos estrogénicos en las dietas para peces de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) MANEJO DE LOS ANIMALES

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo las normativas internacionales de la Unión Europea en lo concerniente a la protección de animales de experimentación. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento. A menos que se especifique, todos los reactivos y el material plástico para cultivo celular se adquirieron en Sigma y Corning, respectivamente.

2) DISTRIBUCIÓN CENTRAL DE LOS ERs

2.1) Animales

Para dicho estudio, se utilizó una población de machos de lubina con una talla de 15-20 cm en época de reposo sexual. Los peces se distribuyeron en tanques circulares de 2000-l de capacidad y se mantuvieron bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura. Cada tanque estaba provisto de un sistema individual de aireación con toma de agua de mar en circuito abierto. Durante su manejo, los peces se anestesiaron con 2-fenoxietanol (Merck) a una dosis de 0.1 % (v/v).

2.2) Hibridación *in situ*

Tras ser anestesiados, los animales se perfundieron vía cardíaca con 60 ml de solución salina (0,65%) y seguidamente con el mismo volumen de solución fijadora de paraformaldehído (PAF 4%) en tampón fosfato (PB 0,1 M, pH=7.4). Tras la disección, los cerebros, se postfijaron con la misma solución fijadora durante toda una noche (ON) a 4°C, se deshidrataron y se incluyeron en parafina (Merck). Mediante el uso de microtomo, se realizaron secciones transversales seriadas de 6 µm. Una vez obtenidos los cortes, se procedió al montaje de una sección cada 200 µm en portaobjetos tratados con 3-aminopropiltriétoxissilano (TESPA) dejándose secar ON a temperatura ambiente (RT). Para la realización de la hibridación *in situ* con sondas sentido y antisentido, se seleccionaron dos series consecutivas representando todo el cerebro y pituitaria de la lubina. Las secciones se almacenaron a 4°C en ambiente seco hasta su uso dentro de un periodo de tiempo que no excedió de las dos semanas.

Para la realización de la hibridación, las secciones se desparafinaron, rehidrataron y refijaron en PAF 4% durante 20 min. Los portaobjetos se sumergieron dos veces en PB durante 5 min y se trataron con proteinasa (20 µg/ml en Tris-HCl 50

mM, EDTA 5 mM, pH=8) durante 5 min a RT. Seguidamente, los portaobjetos se sumergieron en trietanolamina 0,1M pH=8/anhídrido acético. Finalmente, las secciones se deshidrataron y secaron a RT. Para la síntesis de las ribosondas, se insertaron fragmentos de DNA de 800 pb, 850 pb y 1000 pb, los cuales contenían las regiones 3' no trasladadas del Esr1, Esr2b y Esr2a de la lubina, respectivamente, en el vector pGEM-T "easy" (Promega). La homología de la sonda Esr1 con los subtipos Esr2b y Esr2a es de 10% y 11.5%, respectivamente. La homología de la sonda Esr2b con los subtipos Esr1 y Esr2a es de 9.1% y 10.9%, respectivamente. La homología de la sonda Esr2a con los subtipos Esr1 y Esr2b es de 9.9% y 12.4%, respectivamente. Las sondas antisentido y con sentido se sintetizaron *in vitro* mediante linearización de los plásmidos con los enzimas de restricción SstII o SpeI (Invitrogen) para Esr1, SstII o SalI (Invitrogen) para Esr2b y SstII o SpeI (Invitrogen) para Esr2a. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con la polimerasa de RNA SP6 para las sondas antisentido y con la T7 para las sondas con sentido. Tanto las sondas con sentido como las antisentido se marcaron con 8 μ l de 35 S-UTP (12,5 mCi/ml) mediante el kit para la síntesis de ribosondas (Promega) según las condiciones del proveedor. Tras la síntesis *in vitro* de RNA, se trataron las muestras con RQ1-DNAsa (Promega) durante 15 min a 37°C en presencia de 50 unidades de RNAsin (Promega) y luego se incubaron a -20°C durante 3h con 1 μ l (10mg/ml) de RNAt de levadura en solución de formamida al 8%. Seguidamente, las sondas se purificaron en columnas de Sephadex G50 y las dos fracciones con mayor cantidad de radiactividad se unieron y se precipitaron con 1 μ l de RNAt (10 mg/ml) en 1/10 de volumen de NaCl 5M y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C.

Tras la precipitación, las ribosondas se disolvieron en el volumen adecuado de ditionitrotol (DTT) 0,1 M para obtener 2×10^5 cpm/ μ l. Tras 5 min de incubación a 80°C, las ribosondas se diluyeron 1/10 en el tampón de hibridación (formamida 50%, NaCl-dietilpirocarbonato (DEPC) 0,3 M, Tris-HCl 20mM pH=8, EDTA 5mM pH=8, dextran sulfato 10%, solución de Denhardt 1x, RNAt de levadura 0.5 μ g/ml) para obtener una concentración final de DTT 10 mM y 2×10^4 cpm/ μ l. Seguidamente, se añadieron 60 μ l de la solución de hibridación a cada portaobjetos y se incubó en cámara húmeda a 55°C ON. Al día siguiente, se retiraron los cubreobjetos mediante incubación de las muestras durante 30 min a 55°C en tampón citrato salino (SSC) 5x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 75 mM, agua estéril, pH=7), DDT 10 mM. Tras la extracción de los cubreobjetos, los portaobjetos se lavaron en SSC 2x, formamida 50%, DTT 10 mM durante 30 min a 65°C y posteriormente tres veces durante 10 min a 37°C en tampón NTE (NaCl 0,5 M,

Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, pH=7.5). Tras tratamiento con RNAsa (20 µg/ml en NTE) durante 30 min a 37°C, las muestras se lavaron tres veces en tampón NTE durante 10 min a 37°C, una vez en SSC 2x, formamida 50%, DTT 10 mM durante 30 min a 65°C, una vez en SSC 2x durante 15 min, y dos veces en SSC 0,1x durante 15 min a RT. Finalmente, las muestras se deshidrataron en soluciones de graduación creciente de etanol con acetato amónico 0.3 M, dejándose secar a RT.

Finalizado el proceso de hibridación, se sumergieron los portaobjetos en emulsión fotográfica Hypercoat LM-1 (Amersham) y se dejaron en exposición a 4°C en ambiente seco durante 15 días. Transcurrido este periodo de tiempo, se reveló con Kodak D-19 y se hizo una contratinción con azul de toluidina. Para la identificación y nomenclatura de los núcleos y áreas cerebrales, se utilizó el atlas del cerebro de la lubina (Cerdá-Reverter et al., 2001 a, b, Cerdá-Reverter et al., 2008).

3) ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN CONJUNTA

3.1) Animales

Para la realización de los estudios de localización conjunta, se utilizó una población de hembras adultas de lubina con una talla de 50-60 cm durante la fase final de su ovulación.

3.2) Doble hibridación *in situ*

La extracción y procesado histológico de las muestras se llevó a cabo según los protocolos indicados anteriormente. Para la detección de la expresión de las hormonas gonadotropas, se clonaron las secuencias completas de la subunidad beta de la FSH (β FSH, 521 pb) y de la subunidad beta de la LH (β LH, 591 pb) en el vector pBluescript II SK (PBSSK, Mateos et al., 2003). Las sondas antisentido y con sentido se sintetizaron *in vitro* mediante linearización de los plásmidos con los enzimas de restricción EcoRI o XhoI (Invitrogen) para la β FSH y con BamHI o XhoI (Invitrogen) para la β LH, respectivamente. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con la polimerasa de RNA T7 para la obtención de la sonda antisentido y con la polimerasa de RNA T3 para la sonda sentido. Ambas sondas, se marcaron con 2µl de digoxigenina (DIG)-UTP mediante el kit DIG-RNA (Roche) siguiendo las condiciones del proveedor.

Seguidamente, las ribosondas se disolvieron en el volumen adecuado de agua tratada con DEPC para obtener una concentración de 200 ng/µl. La obtención de

ribosondas marcadas con ^{35}S para los diferentes ERs, se llevó a cabo según los protocolos indicados anteriormente. Tras incubación de las ribosondas durante 5 min a 80°C , ambas (Esr- ^{35}S -UTP y FSH/LH-DIG-UTP) se mezclaron de manera simultánea en una dilución 1/10 en tampón de hibridación, obteniendo una concentración final de las mismas de 2×10^4 cpm/ μl y 20 ng/ μl , respectivamente. Seguidamente, se añadió a los portaobjetos 100 μl de solución de hibridación conteniendo bien la ribosonda DIG- βFSH o DIG- βLH con cada una de las ribosondas ^{35}S -ER. El procedimiento de hibridación y posthibridación fue el mismo que el utilizado para el estudio de la distribución central de los ERs pero, previo al paso de la deshidratación, los portaobjetos se lavaron durante 10 min a RT en el tampón A (Tris-HCl 0,1 M mM, NaCl 0,15 M, pH=7,5) y, posteriormente, se incubaron en solución de bloqueo (2% reactivo de bloqueo en tampón A, Roche) durante 30 min a RT. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con fragmentos anti-DIG Fab de oveja conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) diluidos 1/1000 en solución de bloqueo durante 60 min a RT. Transcurridos los 60 min, los portaobjetos se lavaron dos veces en el tampón B (Tris-HCl 0,1 M, MgCl_2 50 mM, NaCl 0,1 M, pH=9,5). La detección de la señal, se realizó mediante 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoly-fosfato, Roche) diluido en tampón B conteniendo 1mM de levamisol, durante 60 min a RT. Tras la aparición de color, los portaobjetos se deshidrataron con etanol de graduación creciente con acetato amónico 0.3 M, se sumergieron en emulsión fotográfica y se dejaron en exposición a 4°C en ambiente seco. Transcurridos doce días, los portaobjetos se revelaron como se ha descrito previamente.

4) EFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN βFSH . CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA βFSH

4.1) Efecto *in vitro* de los esteroides sexuales sobre la expresión del gen βFSH

4.1.1) Cultivo primario de células de la pituitaria

La preparación de cultivos primarios se llevó a cabo a partir de pituitarias de individuos con una talla de 35-40 cm y un peso corporal de 500-700g durante el periodo de reposo sexual. Tras la extracción, las pituitarias se pusieron en medio de dispersión (DM, solución salina 75%, L-15 + L-Glutamina 25%, tampón Hepes 25 mM, albumina de suero bovino 0,5% [BSA fracción V], 0,1 gentamicina 0,1 mg/ml,

penicilina/streptomina 1%) enfriado en hielo. Seguidamente, se traspasaron a placa Petri y se lavaron varias veces con DM hasta quedar libres de grasa y sangre. Una vez limpias, se cortaron con escalpelo hasta conseguir fragmentos de aproximadamente 1mm^3 y se transfirieron a un tubo estéril (Falcon) de 15 ml para la dispersión enzimática con tripsina. Para ello, se disolvieron 25 mg de tripsina tipo II en 10 ml de DM, dejándose los fragmentos en agitación suave durante 40 minutos a 25°C . Transcurrido dicho periodo de tiempo, se centrifugó a 500 g (2000 rpm) durante 15 minutos a 25°C y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió el precipitado en inhibidor de tripsina atemperado (25 mg/10 ml DM) dejándose en agitación durante 10 minutos. Las células dispersadas se centrifugaron a 500 g durante 15 minutos a 25°C . Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en DM con DNAsa II tipo IV (0,1 mg/10 ml) durante 10 minutos en agitación suave. Tras su centrifugación durante 15 minutos a 25°C , se eliminó el sobrenadante y se procedió a la dispersión mecánica de las células en 5-10 ml (según la cantidad de células) de DM. Las células se filtraron con filtro de nylon (poro de $40\ \mu\text{m}$) en tubo estéril (Falcon) de 50ml, lavándose tres veces el filtro con 10 ml de DM. El filtrado se recogió mediante centrifugación a 200 g (1700 rpm) durante 15 minutos tras lo cual, las células se resuspendieron en 5 ml de DM para la determinación de su viabilidad y conteo. Finalmente, se centrifugaron las células a 500 g durante 5 minutos a 25°C y se resuspendieron en medio de cultivo L-15 (L15 + L-Glutamina 100%, Hepes 25 mM, BSA fracción V 0,1%, penicilina/estreptomina 1%, gentamicina 0,1 mg/ml) con suero fetal bovino (FBS 10%, Invitrogen).

Una vez obtenidas las células, se repartieron en placas de 24 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/pocillo. Transcurridas 48 horas, se recogieron muestras de los pocillos correspondientes a la expresión basal de la βFSH (T_0). Seguidamente, se les añadió medio fresco a las demás células, con los tratamientos correspondientes de 17β -estradiol y 11-cetotestosterona. Para los tratamientos, los esteroides se diluyeron en etanol 100% (Panreac) realizándose diluciones progresivas hasta obtener una concentración final en DMEM de 10^{-6} M. Las células utilizadas como control se trataron con etanol 1/1000. Transcurridas 48, 72 y 96 horas de la adición del tratamiento, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se precipitaron por centrifugación a 200 g durante 15 minutos a 4°C para su posterior extracción de RNA. La extracción de RNA se realizó con 500 μl /pocillo de trizol (TRI REAGENT) siguiendo las condiciones del proveedor. Las muestras se resuspendieron en 10 μl de agua estéril tratada con DPEC.

4.1.2) Cuantificación de la expresión de la subunidad β FSH

La expresión de la β FSH se determinó mediante dot-blot con el aparato Bio-Dot (BioRad). Se diluyeron 4 μ g de RNA de cada muestra en agua estéril hasta obtener un volumen final de 10 μ l. Seguidamente, se añadieron 30 μ l de solución desnaturante [1 ml contiene, 0,8 ml formamida, 318 μ l formaldehído 37%, 196 μ l tampón 3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico (MOPS) 10x (MOPS 0,5 M pH=7, NaAc 3 M, EDTA 0,5 M pH=8, agua estéril)] y se incubaron las muestras a 65°C durante 15 minutos. Transcurrido dicho periodo de tiempo, se añadieron 60 μ l de 20x SSPE (NaCl 3M, NaH₂PO₄ 0,2 M, EDTA 0,02 M, NaOH 0,15 M, agua estéril, pH=7,4) y se cargaron las muestras (100 μ l) sobre una membrana Hybond-N (Amersham) previamente humedecida con SSPE 10x durante 15 minutos en agitación. Finalmente, se hicieron dos lavados sucesivos de 500 μ l SSPE 10x y, tras un secado rápido sobre papel de filtro Whatman, la membrana se fijó a 80°C durante dos horas.

La hibridación se llevó a cabo utilizando como sonda el gen β FSH de lubina (Mateos et al., 2003). La membrana se prehibridó durante al menos 3 horas a 42°C en solución de hibridación (formamida 50%, SSPE 5x, SDS 1%, solución Denhardt 5x, RNAt de levadura 20 μ l/ml). La secuencia completa del gen β FSH se marcó con dCTP[α -³²P](Amersham) mediante el kit de marcaje con hexámeros aleatorios (Invitrogen) siguiendo las condiciones del proveedor. La purificación de la sonda se realizó mediante centrifugación en columna de Sephadex G-50 a 3000 rpm durante 2 minutos. La hibridación se llevó a cabo ON en solución de hibridación fresca a 42°C con una concentración final de 8 x 10⁵ cpm/ml dCTP[α -³²P]. Tras la hibridación, las membranas se lavaron con SSPE 0,1x/SDS 0.1% a 65°C. La normalización de los niveles de expresión se realizó mediante hibridación de la membrana con la sonda del gen de la subunidad ribosomal 28s bajo las mismas condiciones de la hibridación que con la β FSH. La hibridación se llevó a cabo con una concentración final de 3 x 10⁵ cpm/ml dCTP[α -³²P]. La cuantificación de la intensidad de la señal de hibridación, se realizó mediante análisis densitométrico con el aparato Fosfoimager (Bio-Rad).

4.1.3) Expresión de los resultados y análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron por cuatriplicado y se repitieron dos veces. Los datos se expresan como el valor medio + el error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre el control y los tratamientos se establecieron mediante ANOVA seguido por el test de rango múltiple de Tukey (p < 0.05).

4.2) Caracterización de la región promotora del gen β FSH

4.2.1) Clonación del promotor β FSH

La clonación de la región promotora se realizó mediante rastreo de una librería de DNA genómico de lubina construida con el vector Lambda DASH II/BamHI (Stratagene). Para ello, se pusieron a crecer células XL1-Blue MRA (P2) en medio LB (triptona 1%, levadura 0,5%, NaCl 0,18 M, agua estéril, pH=7) enriquecido con sulfato de magnesio (MgSO_4 10 mM) y maltosa 0,2 % a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,2-0,5 ($\lambda=320$ nm). Seguidamente, las células se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en MgSO_4 10 mM. Se realizaron tres rondas de rastreo sobre $7,5 \times 10^5$, 8250 y 400 unidades formadoras de fagos (pfu), respectivamente. Para ello, se infectaron 600 o 200 μl de células con el volumen de fagos necesarios para obtener 50×10^3 o 750 pfu por placa grande (250 mm de diámetro) y 50 pfu por placa pequeña (100 mm diámetro), respectivamente. La infección se realizó durante 30 minutos a 37°C en tubo estéril (Falcon) de 15 ml. Transcurrido dicho periodo de tiempo, se le añadió 8 (placa grande) ó 3 ml (placa pequeña) de agarosa (0,8%) a 47°C, se mezcló por inversión y se esparció sobre las placas, que contenían NZY-agar como medio de cultivo. Las placas se incubaron de 4 a 8 horas a 37°C hasta conseguir la densidad adecuada de pfu, se precintaron y almacenaron a 4°C. Para la transferencia de fagos, se colocaron membranas de nylon Hybond-N sobre las placas de lisis durante 2 minutos, tras lo cual se retiraron y depositaron sobre papel de filtro humedecido con solución desnaturalizante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M, agua estéril) durante 5 minutos. Seguidamente, las membranas se depositaron sobre papel de filtro humedecido con solución neutralizante (Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M, EDTA 1 mM, HCl, agua estéril, pH=7,2) durante 3 minutos, en un primer paso, y durante dos minutos, en un segundo paso, sobre papel y solución nueva. Finalmente, las membranas se sumergieron durante 20 segundos en SSPE 20x y se dejaron secar a RT sobre papel de filtro. La fijación del DNA se hizo en horno a 80°C durante dos horas. El rastreo se llevó a cabo utilizando como sonda el gen β FSH de lubina. El marcaje de la sonda, las condiciones de prehibridación, hibridación y lavados de las membranas se llevaron a cabo como previamente se ha descrito en el punto 4.1.2.

Los once clones positivos aislados tras las tres rondas de rastreo se conservaron en 500 μl de medio de suspensión (SM, NaCl 0,1 M, MgSO_4 20 mM, Tris 50 mM, gelatina 0,01%, pH=7,5) y 30 μl de cloroformo a 4°C. Seguidamente, se realizó una

preamplificación de los clones seleccionados mediante infección de 200 μ l de células con 10 μ l de cada clon de fagos durante 30 minutos a 37°C en tubo estéril (Falcon) de 50 ml. Transcurrido dicho periodo de tiempo, se añadió 5 ml de LB y se dejó ON a 37°C bajo agitación fuerte. Al día siguiente, se añadió 1 ml de cloroformo y se precipitaron las células por centrifugación. Se transfirió 1 ml del sobrenadante a tubos de 1,5 ml (Eppendorf), se añadió 50 μ l de cloroformo y se guardaron a 4°C. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos del gen β FSH, se determinó aquellos clones que contenían el gen completo de dicha subunidad (n=5), los que contenían el extremo 5' del gen (n=5) y los que contenían el extremo 3' (n=1). Seguidamente, se amplificaron cinco (2 con el extremo 5' y 3 con el gen completo) de los once clones aislados, para la posterior extracción de DNA del fago. Para ello, se infectaron 600 μ l de células con el volumen necesario de fagos para obtener 2×10^5 pfu/placa (4 placas/clon). Tras la infección y la formación de las pfu, se añadieron 10 ml de SM a cada placa y se dejaron ON en agitación a 4°C. A partir del lisado líquido recuperado (30 ml/clon), se realizó la extracción mediante el uso del kit para la extracción de DNA del vector lambda (QIAGEN) siguiendo las condiciones del proveedor. El DNA obtenido se resuspendió en 200 μ l de Tris-EDTA pH=8.

Posteriormente, se realizaron digestiones simples y dobles con diversas enzimas de restricción (Sal I, EcoRI, EcoRV Hind III, SSTI, SSTII, Xho I, BamHI, Xba I, Pst I, Kpn I, Bstx, Sma I) de un clon que contenía el extremo 5' del gen (clon 14.3.1.2). Dichas digestiones se separaron en geles de agarosa (0,8 %) y se transfirieron a membranas Hybond-N para la realización de "Southern blot". El marcaje de la sonda β FSH y las condiciones de prehibridación e hibridación fueron las mismas que las realizadas para las rondas de rastreo de la genoteca de lubina. La concentración final de dCTP[α - 32 P] fue de 5×10^5 cpm/ml. Los lavados de la membrana se realizaron con 0.1x SSPE/SDS 0.1% a 60°C. La determinación del mapa de restricción del fragmento insertado en el clon 14.3.1.2 permitió identificar una primera banda positiva de aproximadamente 3.5 Kb, correspondiente a la digestión EcoRI-BamHI. Dicho fragmento, se aisló, purificó y clonó en el vector PBSSK. La secuenciación con los cebadores T7 y T3 para dicho vector y cebadores específicos del fragmento permitieron determinar, que éste, contenía el extremo 5' del gen β FSH (exón 1, intrón 1, exón 2 e intrón 2) y 1.7 Kb de región promotora, aproximadamente. De manera similar, el resultado de las digestiones dobles con BamHI, SSTI y EcoRV permitieron completar el mapa de restricción y seleccionar dos fragmentos positivos nuevos de aproximadamente

4.2 y 5.2 Kb, correspondientes a la digestión EcoRI-SSTI y EcoRI-EcoRV, respectivamente. Tras su clonación en PBSSK, la secuenciación de sendos fragmentos aportó las siguientes 0.8 y 1 Kb, aproximadamente, de la región promotora del gen β FSH. El análisis de las secuencias para diversos factores de transcripción de las 3.5 Kb (3538 pb) correspondientes a dicha región se llevó a cabo con los programas Matinspector (Genomatix) y TESS (Universidad de Pensilvania, USA).

4.2.2) Determinación de la actividad basal y sensibilidad a los estrógenos

4.2.2.1) Construcciones

A partir de las 3.5 Kb de promotor clonadas en PBSSK se realizaron construcciones delecionadas de 3.5, 2.4, 1.0, 0.5 y 0.15 Kb terminando todas ellas en la posición -1 con respecto al inicio del gen β FSH. Estos fragmentos se insertaron en el vector pTATA LUC+ portador de un gen testigo con actividad luciferasa (Altschmied y Duschl, 1997). Para ello, se amplificó mediante PCR con polimerasa de alta fidelidad (Platinum Pfx, Invitrogen) los fragmentos correspondientes de dicha región promotora. Se utilizaron cinco cebadores para los diferentes extremos 5', todos ellos portadores de un adaptador correspondiente a la secuencia de reconocimiento del enzima de restricción Sal I: For3.5 5'-TCGATAAGCTTCATAT-3', For2.4 5'-CAATGACCCATGACT-3', For1.0 5'-CTACACATTGACCAGC-3', For0.5 5'-GGTCTTATTTCTCAACAA-3' y For0.15 5'-TGGAAAGAAATGAGGGT-3'. Para el extremo 3' se diseñó un cebador adyacente al inicio del exón 1 de la β FSH: Rev 5'-ATCTGTAACAGCTTTCAA-3'. Para la realización de las PCRs, se utilizaron las siguientes condiciones: amplificación de 3.5 y 2,4 Kb, un ciclo de 5 min a 95°C seguido de 12 ciclos de 30 s a 95°C, 40 s a 48°C-42°C disminuyendo 0.5°C en cada ciclo y 3 min a 68°C. Seguidamente, 25 ciclos de 30 s a 95°C, 40 s a 42°C y 3 min a 68°C. Finalmente, un ciclo de 10 min a 68°C. Amplificación de 1.0, 0.5 y 0,15 Kb, un ciclo de 5 min a 95°C seguido de 4 ciclos de 30 s a 95°C, 40 s a 48°C-46°C disminuyendo 0.5°C en cada ciclo y 1 min a 68°C (1.0 Kb) y 30 s a 68°C (0,5 y 0.15 Kb). Seguidamente, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 40 s a 46°C y 1 min a 68°C (1.0 Kb) y 30 s a 68°C (0.5 y 0.15 Kb). Finalmente, un ciclo de 10 min a 68°C (0.3 mM dNTP, 0.4 μ M cebadores específicos, 1x tampón Platinum Pfx, 1 mM MgSO₄ y 1.0 unidades de Platinum Pfx polimerasa).

Los productos resultantes de las PCRs se separaron en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y tras su purificación, se clonaron en pTATA LUC+. Para ello, el vector se abrió primero con BamH I, tras lo cual, se crearon extremos romos, y finalmente, se volvió a digerir con Sal I, dejando un extremo del vector con secuencia complementaria para el adaptador Sal I y el otro extremo, romo. Las nuevas construcciones denominadas pTATA 3.5, pTATA 2.4, pTATA 1.0, pTATA 0.5 y pTATA 0.15 se secuenciaron para verificar la fidelidad de las secuencias.

La normalización de los valores obtenidos en los experimentos de transfección se realizó con el vector pRL (Promega) portador del gen testigo *Renilla luciferasa*. El enzima anterior proviene del pólipo marino *Renilla reniformis* y cataliza la oxidación bioluminiscente de la coelenterazina. Esta actividad luciferasa, es diferente a la presentada por el vector pTATA LUC +, el cual es portador del gen que codifica para la luciferasa de la luciérnaga (*Photinus pyralis*) y que cataliza la oxidación bioluminiscente del sustrato luciferina (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, Promega).

La verificación de la eficiencia de transfección, se realizó con el plásmido GFP, portador del gen testigo que codifica para la proteína de fluorescencia verde.

La respuesta de las células L β T2 a los estrógenos se determinó mediante la construcción plasmídica ERE-TK-LUC, portadora del gen de la luciferasa bajo el control de repeticiones en tándem del elemento de respuesta a los estrógenos (ERE, Le Page et al., 2006).

La respuesta del promotor β FSH a los estrógenos se realizó mediante el uso del vector Esr1-pcDNA.3 (ver clonación del Esr1).

4.2.2.2) Transfecciones y condiciones de cultivo

Para la determinación de la actividad basal del promotor β FSH se utilizaron dos líneas celulares, HEK 293 y L β T2. La primera creada a partir de células renales embrionarias humanas (Graham et al., 1977) y la segunda formada a partir de células gonadotropas maduras de ratón (Alarid et al., 1996).

Los experimentos de transfección en HEK 293 se llevaron a cabo sobre placas de 24 pocillos. Las células crecieron en medio de Eagle modificado según Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con FBS 10%, penicilina (100 u/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml, Invitrogen) en atmósfera de CO₂ (5%) a 37°C. Tras el asentamiento de las células durante 24 horas, se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 75%.

Seguidamente, se transfectaron de manera simultánea con 0,1 y 0,2 μg de GFP y pRL, respectivamente, 1 μg de las diferentes construcciones delecionadas del promotor βFSH y del vector pTATA LUC+ como control de la actividad basal. La transfección se realizó mediante el método del fosfato de calcio (Chen y Okayama, 1987). Transcurridas 72 horas de la transfección, las células se lavaron dos veces con PBS y tras su centrifugación se resuspendieron en 100 μl de tampón de lisis (Promega). Los lisados celulares se almacenaron a -80°C . Para la determinación de la actividad luciferasa, el lisado celular se centrifugó durante 30 s a 15000 g. Posteriormente, la cuantificación se llevó a cabo a partir de 20 μl del sobrenadante con el kit del sistema dual de actividad luciferasa (Promega) siguiendo las condiciones del proveedor. La intensidad lumínica emitida se cuantificó con un luminómetro (Junior, EG&G, Berthold).

Los experimentos de transfección en L β T2 se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que los realizados en HEK 293 con pequeñas modificaciones. Las células se distribuyeron a una densidad de 1×10^5 células/pocillo (placa de 24 pocillos) y 1×10^6 células/pocillo (placa de 6 pocillos). El asentamiento de las células se realizó durante 48 horas. La transfección se realizó con lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las condiciones del proveedor.

Para la evaluación de la sensibilidad de las células L β T2 a los estrógenos, primero, se distribuyeron las células en placa de 6 pocillos. Transcurridas 48 horas, se transfectaron con 4 μg de ERE-TK-LUC y 0,3 μg de GFP/pocillo, y con 3 μg de ERE-TK-LUC, 1 μg Esr1-pcDNA.3 y 0,3 μg de GFP/pocillo. Transcurridas 6-8 horas de la transfección, se añadió medio fresco a las células y se pasaron a placas de 24 pocillos para la obtención de réplicas. Las células se incubaron durante 72 horas con 17 β -estradiol a una concentración de 10^{-6} y 10^{-8} M en etanol, y etanol 1/1000 como control.

Para evaluar la respuesta del promotor βFSH a los estrógenos, se distribuyeron células L β T2 sobre placas de 24 pocillos. Transcurridas 48 horas, se transfectaron con 0,8 μg de las construcciones pTATA 3.5, pTATA1.0 y pTATA0.15, 0,3 μg de Esr1-pcDNA.3, 0,2 μg de pRL y 0,1 μl GFP/pocillo. La incubación se realizó con 17 β -estradiol en etanol (10^{-6} M) y etanol 1/1000 como control durante 72 horas.

4.2.2.3) Expresión de los resultados y análisis estadísticos

Los experimentos de transfección para la determinación de la actividad basal del promotor βFSH y su sensibilidad a los estrógenos se hicieron por triplicado y se

repitieron un mínimo de dos veces. Los datos se expresan como el valor medio + el error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre el control y los tratamientos se establecieron mediante ANOVA seguido por el test de rango múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

5) ESTUDIOS DE TRANSACTIVACIÓN DEL *Esr1*

5.1) Extracción y procesado de las muestras

Para los estudios de transactivación del *Esr1*, se utilizó la misma población de individuos que la usada para la distribución central de los ERs. Tras la extracción del cerebro completo se diseccionó conjuntamente los lóbulos telencefálicos, el área preóptica, el hipotálamo y pituitaria. Posteriormente, se procedió a la extracción de RNA total de las áreas cerebrales anteriores con trizol y tratamiento final con RQ1-DNAsa (Promega). La síntesis de DNAc se llevó a cabo mediante el uso de la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) y oligo (dT)12-18 (Invitrogen) como cebador.

5.2) Clonación del *Esr1*

El DNAc de las áreas cerebrales anteriores se usó para la amplificación del *Esr1* mediante PCR con Taq polimerasa (Genosys) y cebadores específicos para dicho receptor. Se utilizaron las siguientes condiciones: un ciclo de 5 min a 95°C seguido de 10 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 57°C-52°C disminuyendo 0.5°C en cada ciclo y 90 s a 72°C. Seguidamente, 25 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 52°C y 90 s a 72°C. Finalmente, un ciclo de 10 min a 72°C (dNTP 0,2 mM, cebadores específicos 0,4 μ M, tampón Taq DNA polimerasa 1x, MgCl₂ 1,5 mM y 0.5 unidades de Taq DNA polimerasa).

Se utilizaron tres cebadores diferentes para el extremo 5' según los sitios de inicio de la transcripción hepática del gen (Halm et al., 2004): ERaFor 5'-TTCATGTGTAAGAGGCAGAG-3', Era1 5'-GTCGTTGTGCTGTGATGTTGC-3' y Afor3 5'-ATGTACCCCGAAGAGAGCC-3'. Para el extremo 3', se diseñó un cebador localizado 14 pb por debajo del codón de parada con la siguiente secuencia: ERaRev 5'-TATTGACCTCCGCTCTTGCT-3'. Solo la combinación Afor3/ERaRev pudo amplificar un fragmento de DNA del tamaño esperado (1810 pb) a partir de DNAc cerebral. Tras su purificación en LMP (1,4 %), el fragmento se clonó en PGemT "easy". Una vez insertado, se secuenció para verificar la orientación del mismo.

Tras su ligación en PGemT “easy”, se amplificó la región codificante del Esr1 mediante PCR con DNA polimerasa de alta fidelidad (Vent DNA polimerasa, New England Biolabs) y cebadores específicos que contienen secuencias de reconocimiento para los enzimas de restricción HindIII (HiAfor3: 5'-GAATTCATGTACCCCGAAGAGAG-3') y XhoI (XhERaRev: 5'-CTCGAGTATTGACCTCCGCTCT-3'). Se utilizaron las siguientes condiciones: un ciclo de 5 min a 95°C, seguido de 10 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 53-48°C disminuyendo 0.5°C en cada ciclo y 90 s a 72°C. Seguidamente 26 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 48°C y 90 s a 72°C. Finalmente, un ciclo de 10 min a 72°C (dNTP 0.2 mM, cebadores específicos 0.4 µM, 1x tampón Vent DNA polimerasa, MgCl₂ 1.5 mM y 0.5 unidades de Vent DNA polimerasa). El producto resultante de la PCR, se aisló en LMP, se purificó y se ligó en el vector de expresión pcDNA.3 (Invitrogen). La nueva construcción, denominada Esr1-pcDNA.3, se secuenció para verificar la secuencia del Esr1, siendo idéntica a la encontrada previamente en la caracterización de los ERs de la lubina (Halm et al., 2004).

5.3) Experimentos de transfección y condiciones de cultivo

Para los experimentos de transfección, se utilizaron células HEK 293. Las células crecieron en DMEM suplementado con FBS 10%, penicilina (100 u/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) en atmósfera de CO₂ (5%) a 37°C. Para detectar posibles respuestas inespecíficas debido a una sensibilidad a los estrógenos de HEK 293, se realizaron controles mediante la transfección transitoria en células HEK 293 de la construcción ERE-TK-LUC, tras lo cual, se realizaron incubaciones con 17β-estradiol en etanol a una concentración de 10⁻⁶, 10⁻⁸ y 10⁻¹⁰ M y etanol 1/1000 como control. Una vez comprobada la ausencia de efectos, se transfectaron células con Esr1-pcDNA.3 y un vector portador de resistencia a la higromicina en una proporción 50:1, respectivamente, mediante el método del fosfato de calcio. Las células transfectadas se distribuyeron en placas de 96 pocillos y se seleccionaron con 0.4 mg/ml de higromicina (Invitrogen) durante dos semanas. Los clones resistentes, continuaron creciendo en placas de 100 mm de diámetro para su amplificación.

Mediante “Northern blot” se corroboró la presencia de expresión del Esr1 en los clones resistentes a la higromicina. Para ello, se realizó una extracción de RNA total con trizol de las células resistentes a dicho antibiótico. Se separaron 15 µg de RNA total de cada clon en un gel de agarosa, el cual contenía formaldehído 2.2 M y se transfirió por

capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N. La membrana se prehibridó durante al menos 3 horas en solución de hibridación (formamida 50%, SSPE 5x, SDS 1%, solución Denhardt 5x, RNAt de levadura 20 µl/ml). La secuencia completa del Esr1 se marcó con dCTP[α - 32 P] mediante el kit de marcaje con hexámeros aleatorios. La purificación de la sonda se realizó mediante centrifugación en columna de sephadex G-50 a 3000 rpm durante 2 minutos. La hibridación se llevó a cabo ON en solución de hibridación fresca a 42°C con una concentración final de 2×10^6 cpm/ml dCTP[α - 32 P]. Tras la hibridación, las membranas se lavaron con SSPE 0,1x/SDS 0.1% a 65°C.

Seguidamente, aquellos clones que expresaban el Esr1 de manera estable se pusieron a crecer en placas de 100 mm de diámetro hasta alcanzar una confluencia del 75% y se transfectaron de manera transitoria con 19 µg de ERE-TK-LUC. Como control positivo de la transfección se transfectó de manera simultánea, 1 µg del vector GFP. Transcurridas 24 horas de la transfección, se añadió medio fresco y se transfirieron las células a placas de 24 pocillos. Al día siguiente, se trataron las células con concentraciones de 10^{-6} - 10^{-10} M de 17 β -estradiol. Transcurridas 48 horas, las células se lavaron dos veces con PBS y tras su centrifugación a 200 g durante 15 minutos a 4°C se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis. Los lisados celulares se almacenaron a -80°C. Para la determinación de la actividad luciferasa, el lisado celular se centrifugó durante 30 s a 15000 g. Posteriormente, se mezclaron 20 µl de sobrenadante con 200 µl del reactivo luciferina (TricinaKOH 20 mM, EDTA 0.1 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 33.3 mM, CoA 270 µM, ATP 530 µM, luciferina 400 µM, pH=7,8). La intensidad lumínica emitida se cuantificó mediante el uso de luminómetro. Tras las cuantificaciones de la actividad luciferasa se seleccionó el clon más sensible (clon P) para los estudios de transactivación.

Para la realización de los experimentos de transactivación, se transfectó de manera transitoria el clon P con ERE-TK-LUC según el protocolo descrito anteriormente, y 24 horas más tarde, se añadió medio fresco y se distribuyeron las células en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se trataron con concentraciones decrecientes de 17 β -estradiol (10^{-5} - 10^{-10} M), estrona, estriol, testosterona, 11-cetotestosterona (11-KT) y 17 α , 20 β di-hidroxi-progesterona (17 α , 20 β -DHP, 10^{-5} - 10^{-8} M) en etanol, durante 48 horas. Las células utilizadas como control se trataron con etanol 1/1000 en DMEM. La actividad luciferasa se cuantificó de la manera descrita anteriormente.

5.4) Expresión de los resultados y análisis estadísticos

Los experimentos de transactivación se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Los datos se expresan como el valor medio + el error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre el control y los tratamientos se establecieron mediante ANOVA seguido por el test de rango múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

6) DETECCIÓN DE COMPONENTES ESTROGÉNICOS EN PIENSOS DE ACUICULTURA

6.1) Creación de la línea celular HEsr1-LUC

La línea celular HEK293 expresando de manera estable el Esr1 de lubina (clon P), se transfectó simultáneamente en una proporción 50:1, con la construcción ERE-TK-LUC y un plásmido portador de resistencia a puromicina (Muñoz et al., 2005), respectivamente. Las células crecieron en placas de 96 pocillos realizándose la selección de los clones resistentes mediante la adición de DMEM suplementado con FBS 10%, penicilina (100 u/ml), estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) y puromicina (8 $\mu\text{g/ml}$) en atmósfera de CO_2 (5%) y 37°C. La actividad luciferasa se midió, tras incubar los clones resistentes en placas de 96 pocillos (15000 células/pocillo) en medio fresco con concentraciones decrecientes de 17 β -estradiol (10^{-6} - 10^{-14} M). Transcurridas 48 horas, las células se lavaron dos veces con PBS y tras su centrifugación se resuspendieron en 100 μl de tampón de lisis. Los lisados celulares se almacenaron a -80°C. Las células lisadas, se precipitaron a 15000 g durante 30 s, tras lo cual se añadieron 200 μl de reactivo luciferina (ver arriba) a 20 μl del sobrenadante generado. La cuantificación de la luminosidad emitida se realizó mediante el uso de luminómetro. El clon más sensible a la presencia de 17 β -estradiol (HEsr1-LUC) se seleccionó para los estudios de detección de componentes estrogénicos.

6.2) Extracción y detección de componentes estrogénicos

Se evaluó la actividad estrogénica de 4 dietas de peces (pez cebra, carpa roja, lubina y dorada). La extracción de las sustancias estrogénicas se realizó con metanol. Se homogenizaron mecánicamente de 3 a 5 g de pienso y se extrajo 1g de homogenizado con 5 ml de metanol. Tras la aplicación de vortex, se centrifugó el homogenizado a 1700 g durante 10 min. El sobrenadante se secó en corriente de nitrógeno y se resuspendió en 300 μl de metanol. Los extractos se almacenaron a -20°C.

Para la detección de componentes estrogénicos, se distribuyeron células HEsr1-LUC en placas de 24 pocillos (25×10^4 células/pocillo) con DMEM suplementado con FBS (10%), tras lo cual, se añadieron extractos de piensos comprendidos en un rango de 5-20 mg pienso/ml durante 48 horas. Se utilizó como control positivo y negativo, 17β -estradiol (10^{-6} M) en metanol y metanol (1/1000), respectivamente. Transcurridas 48 horas, las células se lavaron dos veces con PBS, y tras su centrifugación, se resuspendieron en 100 μ l de tampón de lisis. Los lisados celulares se almacenaron a -80°C . Las células lisadas, se precipitaron a 15000 g durante 30 s, tras lo cual, se añadieron 200 μ l de reactivo luciferina a 20 μ l del sobrenadante generado. La cuantificación de la luminosidad emitida, se realizó mediante el uso de luminómetro.

6.3) Expresión de los resultados y análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. Los datos se expresan como el valor medio + el error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre el control y los tratamientos se establecieron mediante ANOVA seguido por el test de rango múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1) DISTRIBUCIÓN NEUROANATÓMICA DE LOS ERs

Las hibridaciones *in situ* llevadas a cabo con sondas conteniendo las secuencias codificantes de los genes de los ERs nunca generaron señales específicas (datos no mostrados) corroborando la especificidad de las sondas portadoras de las secuencias complementarias. La Fig. 11 muestra una visión lateral del cerebro de la lubina. La Fig. 12 representa de manera esquemática, la distribución de los ERs en el cerebro de la lubina.

De los tres subtipos, el Esr1 es el que presenta una distribución más amplia, detectándose su RNAm en el telencéfalo, área preóptica, tálamo dorsal y ventral, hipotálamo tuberal y lateral, tubérculo posterior, área pretectal, área mesencefálica tectal y tegmental y rombencéfalo. La expresión del Esr2a se detecta en el telencéfalo ventral, área preóptica, hipotálamo tuberal y lateral, tálamo ventral, tubérculo posterior, área mesencefálica tectal y tegmental, y finalmente, en el rombencéfalo. Por el contrario, el Esr2b se localiza de manera exclusiva en el área preóptica e hipotálamo tuberal.

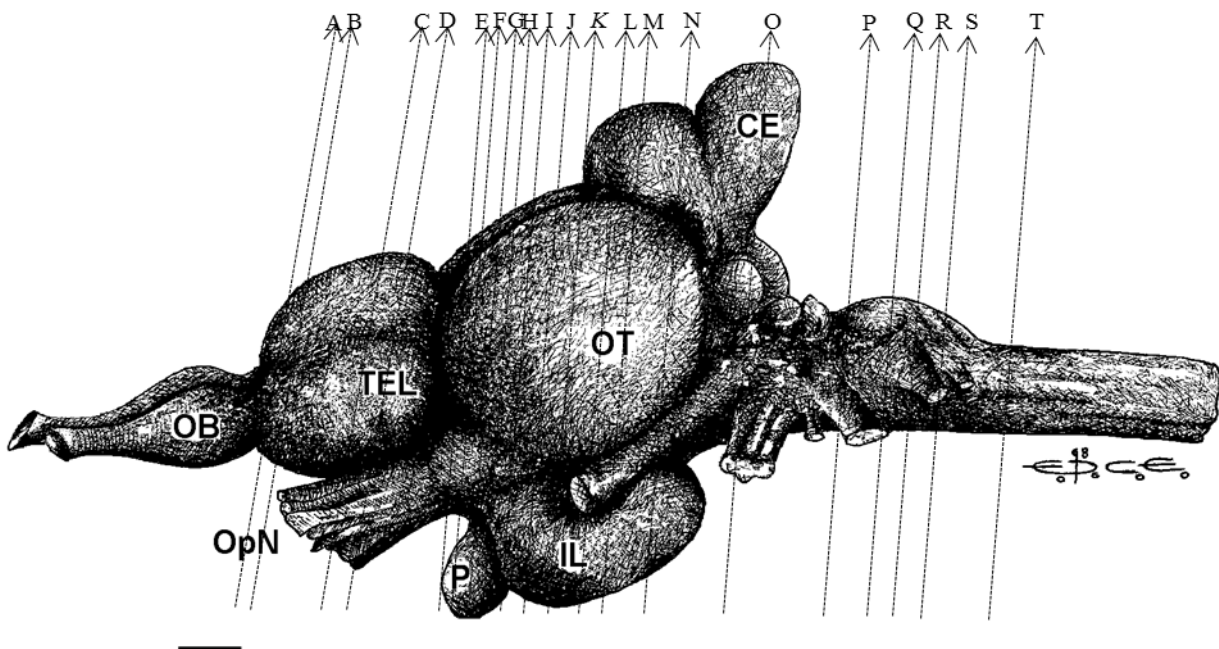


Fig. 11. Plano sagital del cerebro de la lubina. Las flechas indican cada una de las secciones transversales mostradas en la Fig. 12. CE, cerebelo; IL, lóbulo inferior del hipotálamo; OB, bulbos olfatorios; OpN, nervio óptico; OT, techo óptico; P, pituitaria; TEL, telencéfalo. Escala = 1mm.

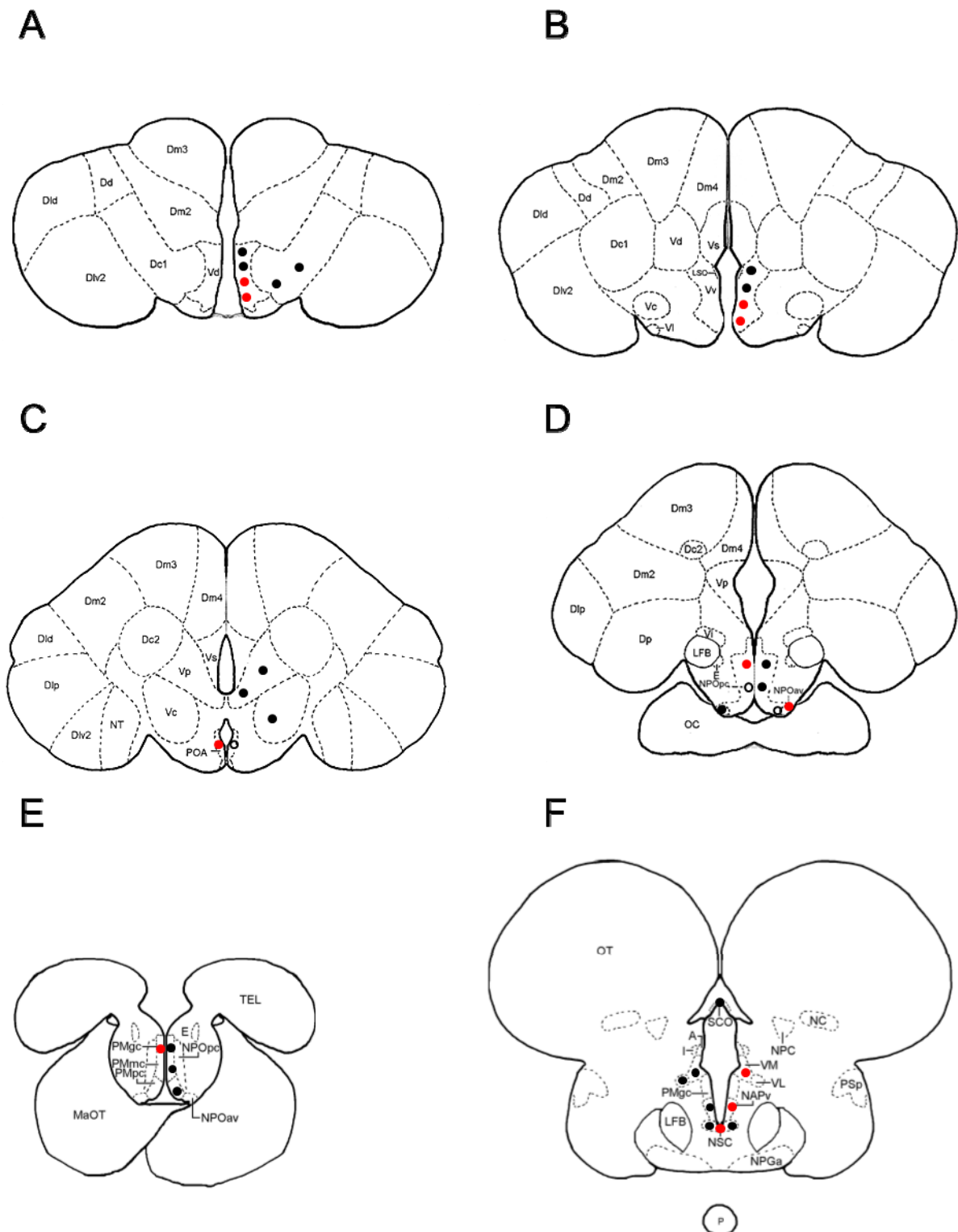


Fig. 12. (A-T) Dibujos esquemáticos de sucesivas secciones transversales rostrocaudales del cerebro y pituitaria de la lubina mostrando la distribución de los ERs. Esr1 (círculo negro), Esr2a (círculo rojo), Esr2b (círculo blanco). Escala = 1mm.

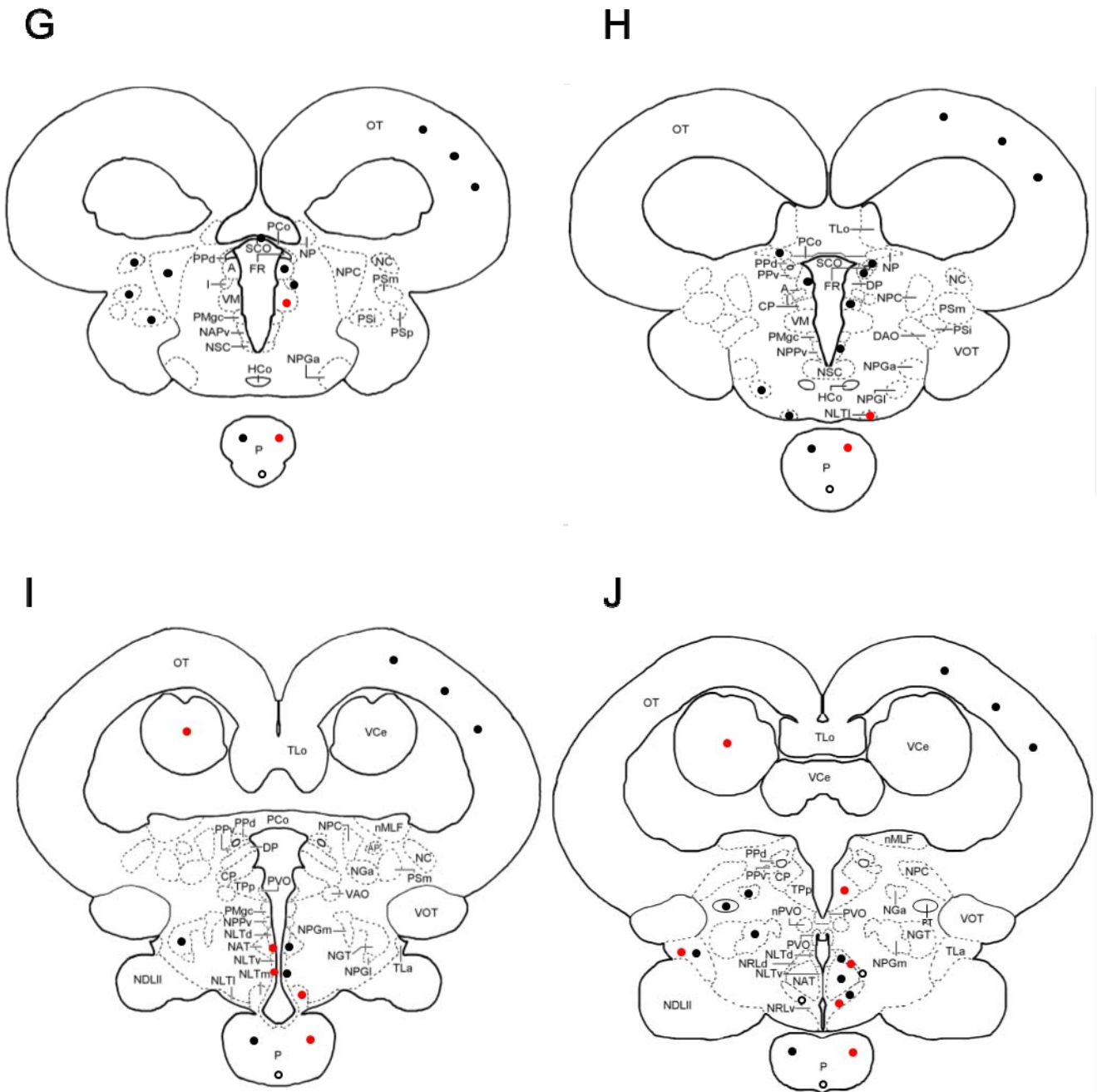
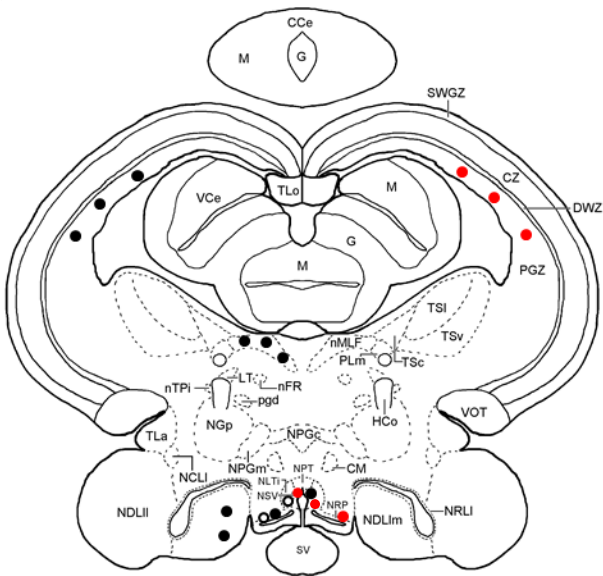
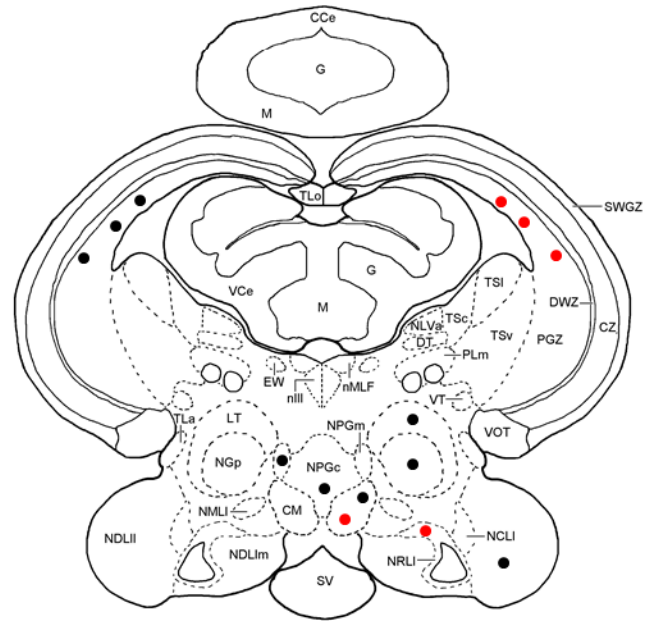


Fig. 12 (continuación)

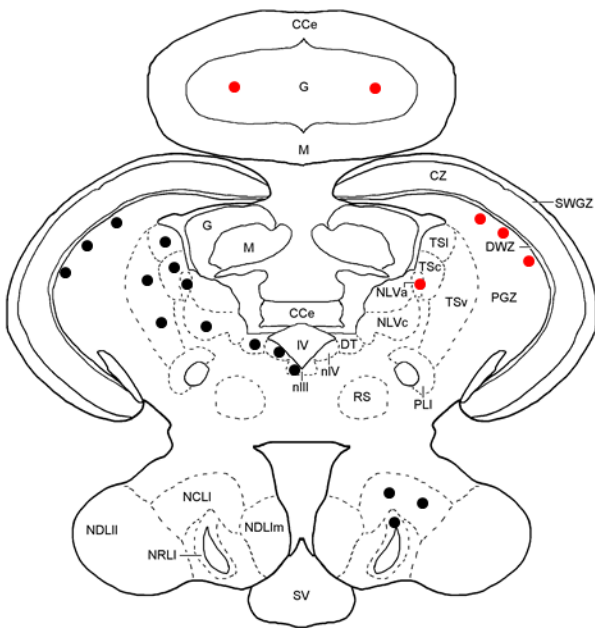
K



L



M



N

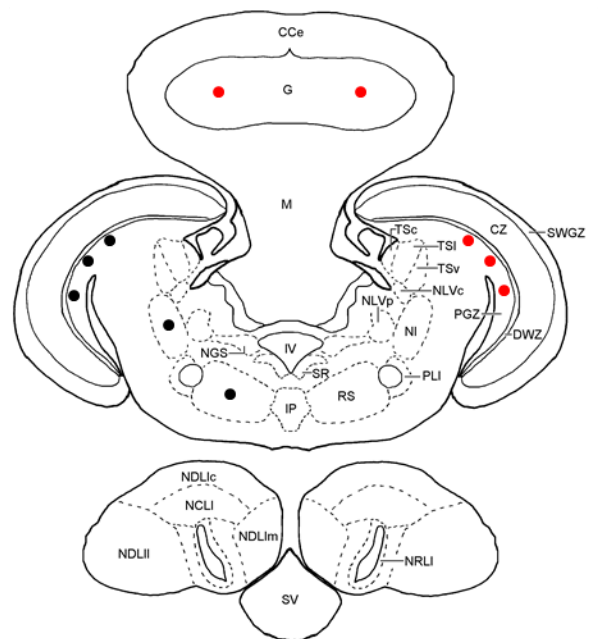
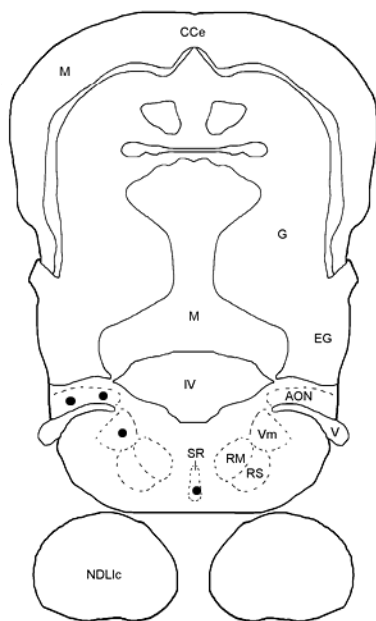
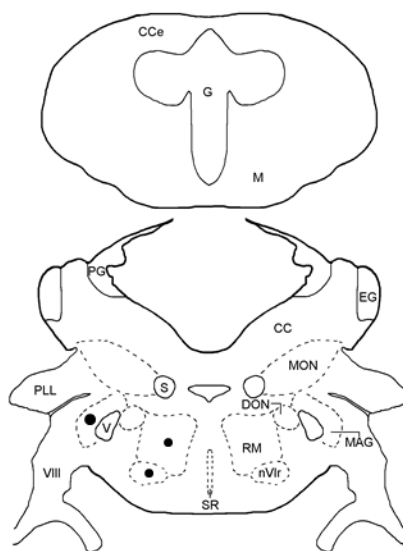


Fig. 12 (continuación)

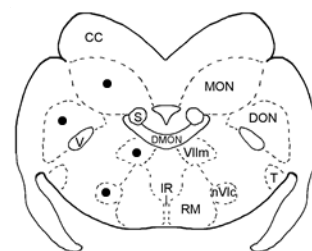
O



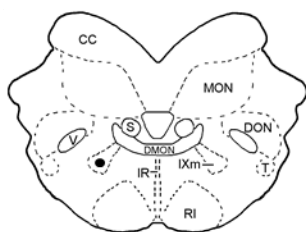
P



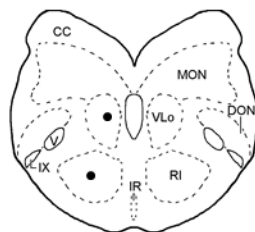
Q



R



S



T

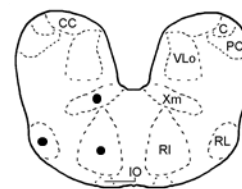


Fig. 12 (continuación)

1.1) Distribución del *Esr1*

1.1.1) Telencéfalo

En el telencéfalo, la hibridación *in situ* muestra la presencia de señal del *Esr1* en la parte central del telencéfalo dorsal (Dc1, Fig. 12A y 13A). En el telencéfalo ventral, se expresa en los núcleos dorsal (Vd, Figs. 12A y 13B) y ventral (Vv, Figs. 12B y 13C). Las células que muestran una señal positiva en el Vv están situadas en su región dorsal, asociadas al epéndima periventricular. Caudalmente, a nivel del receso preóptico, se localizan transcritos, en el núcleo central (Vc, Figs. 12C y 13D) y postcomisural (Vp, Figs. 12C y 13D) del telencéfalo ventral.

1.1.2) Diencéfalo

En el diencéfalo, el *Esr1* se expresa de manera prominente en el área preóptica. Rostralmente, las primeras células en manifestar su expresión son las del polo rostral de la parte parvocelular del núcleo preóptico parvocelular (NPOpc, Figs. 12D y 13E), situadas al comienzo del receso preóptico. Se detectan también numerosas neuronas positivas en la parte anteroventral (NPOav, Figs. 12D y 13E) del mismo núcleo, junto al polo ventrolateral del receso preóptico, así como en el núcleo preóptico magnocelular (PM, Figs. 12E y 13F). Las células del PM son sustituidas caudalmente por células positivas para dicho subtipo en el núcleo periventricular anterior (NAPv, Figs. 12F y 13G). Finalmente, el núcleo periventricular posterior (NPPv, Figs. 12H y 13I) y el núcleo supraquiasmático (NSC, Figs. 12F y 13H) son los núcleos más caudales del área preóptica en mostrar la presencia de RNAm del *Esr1*.

En el tálamo se encuentra una señal positiva tenue en todos sus núcleos: núcleo ventromedial (VM, Figs. 12F y 13I), ventrolateral (VL, Fig. 12F) e intermedio (I, Fig. 12G) del tálamo ventral y núcleo anterior (A, Figs. 12G y 15A), posterior dorsal (DP, Figs. 12H y 15A) y posterior central (CP, Figs. 12H y 15A) del tálamo dorsal. Respecto al hipotálamo tuberal, rostralmente, las primeras células en mostrar señal positiva son las de la parte lateral del núcleo lateral tuberal (NLTL, Fig. 12H). La mayor expresión se detecta en las partes dorsal (NLTD, Figs. 12 y 13I) y ventral (NLTV, Figs. 12 y 13I) del mismo. Se hallan también células positivas en la parte caudal del núcleo anterior tuberal (NAT, Figs. 12J y 14A), lateralmente al NLTV. Coincidiendo con la apertura lateral del receso tuberal se encuentran transcritos del *Esr1* en las partes dorsal (NRLD, Figs. 12J y 14A) y ventral (NRLV, Figs. 12J y 14A) del núcleo del receso lateral. De manera más

caudal, aparecen neuronas expresando dicho subtipo de receptor en el núcleo del receso posterior (NRP, Fig. 12K) y en el núcleo del saco vasculoso (NSV, Fig. 12K). Dentro del lóbulo lateral hipotalámico se detecta señal positiva de hibridación en neuronas de la parte lateral del núcleo del receso lateral (NRLl, Figs. 12M y 14C). Las células anteriores rodean al receso lateral dentro de dicho lóbulo. Además se encuentra RNAm del *Esr1* en la parte medial del núcleo difuso del lóbulo inferior (NDLIm, Figs. 12K y 14B). Las células positivas del núcleo anterior se sitúan bordeando la línea ventromedial del lóbulo inferior. Se hallan también neuronas dispersas expresando este receptor, en la parte lateral (NDLIl, Fig. 12L) de dicho núcleo, y en el núcleo central del lóbulo inferior hipotalámico (NCLl, Figs. 12M y 14C).

En el tubérculo posterior se detecta una señal positiva intensa dentro del complejo preglomerular, siendo especialmente importante en las partes lateral (NPGl, Figs. 12H y 14D), medial (NPGm, Fig. 12J) y comisural (NPGc, Fig. 12L) del núcleo preglomerular, así como en el núcleo terciario gustativo (NGT, Figs. 12I y 14E). También se localizan neuronas que expresan dicho subtipo en las partes anterior (NGa, Fig. 12J) y posterior (NGp, Fig. 12L) del núcleo del glomérulo posterior, núcleo posterior talámico (PT, Figs. 12J y 14G), núcleo lateral talámico (LT, Fig. 12L) y núcleo del *torus* lateral (TLa, Figs. 12J y 14H). Los cuerpos mamilares (CM, Figs. 12L y 14F), localizados en el área caudomedial del tubérculo posterior, constituyen el núcleo más caudal de dicha zona en el que se hallan transcritos del *Esr1*.

En el área pretectal, el *Esr1* está presente en el núcleo central pretectal (NPC, Figs. 12G y 15B). De manera más caudal, se detecta en células del núcleo cortical (NC, Figs. 12G y 15B), núcleo pretectal superficial magnocelular (PSm, Figs. 12G y 15B) y en el núcleo pretectal superficial intermedio (PSi, Figs. 12G y 15B).

1.1.3) Sinencéfalo

El sinencéfalo es la región situada entre el diencefalo y el mesencéfalo (Bradford y Northcutt, 1983). En mamíferos esta región corresponde al prosómero pretectal (Pl, Puelles y Rubenstein, 1993). En el sinencéfalo se detecta señal positiva de hibridación en las partes dorsal (PPd, Figs. 12H y 15A) y ventral (PPv, Figs. 12H y 15A) del núcleo pretectal periventricular, rodeando al fascículo retroflexo (FR, Fig. 12H), en el núcleo paracomisural (NP, Fig. 12H), ventral al *torus* longitudinal (TLo) y en la población neuronal medial y lateral del núcleo del fascículo longitudinal medial (nMLF, Figs. 12K y 15E). Además, se encuentran neuronas positivas, en el órgano subcomisural (SCO,

Fig. 12G), el cual se sitúa de manera caudal a la habénula, y ventral a las fibras de la comisura posterior (PCo).

1.1.4) Mesencéfalo

Dentro del mesencéfalo, se detecta RNAm del *Esr1* tanto en el techo como en el tegmento mesencefálico. En el techo óptico, solo se encuentran transcritos del receptor en las neuronas del estrato granular de la zona gris periventricular (PGZ, Figs. 12K-N y 15B). En el tegmento mesencefálico, el *Esr1* se expresa en las zonas central y lateral. En la zona central, se detecta señal positiva de hibridación en el núcleo tegmental dorsal (DT, Fig. 12M), en las partes anterior (NLVa, Figs. 12M y 15C) y central (NLVc, Figs. 12M y 15C) del núcleo lateral de la válvula cerebelar y en el núcleo isthmi (NI, Fig. 12N). En la zona lateral, se hallan células dispersas que contienen RNAm del *Esr1* en la parte lateral (TSl, Figs. 12M y 15D), central (TSc, Fig. 12M) y ventral (TSv, Figs. 12M y 15D) del *torus* semicircular.

1.1.5) Rombencéfalo

En el rombencéfalo, se detecta señal positiva de hibridación en el núcleo del rafe superior (SR, Fig. 12O), en la formación reticular, incluyendo los núcleos reticulares superior (RS, Figs. 12N y 15G), medial (RM, Fig. 12P), inferior (RI, Figs. 12S y 15H) y lateral (RL, Fig. 12T). En el área octavolateral, el *Esr1* se expresa en el núcleo octavo anterior (AON, Fig. 12O). De manera más caudal, se encuentran neuronas positivas en el núcleo magnocelular (MAG, Fig. 12P), sobre la ruta descendente del trigémino, en el núcleo octavolateral medial (MON, Fig. 12Q) y en el núcleo octavolateral descendiente (DON, Fig. 12Q).

Respecto a los núcleos somatomotores y visceromotores, se detecta expresión del subtipo *Esr1* en el núcleo oculomotor (nIII, Figs. 12M y 15F) y troclear (nIV, Fig. 12M), así como, en las partes rostral (nVlr, Fig. 12P) y caudal (nVlc, Fig. 12Q) del núcleo abducens. De manera similar, el *Esr1* se encuentra presente en el núcleo trigémino (Vm, Figs. 12O y 15G), facial (VIIIm, Fig. 12Q), glossofaríngeo (IXm, Fig. 12R) y vagal (Xm, Figs. 12T y 15H). El lóbulo vagal (VLo, Fig. 12S) es el núcleo más caudal conteniendo RNAm del *Esr1*.

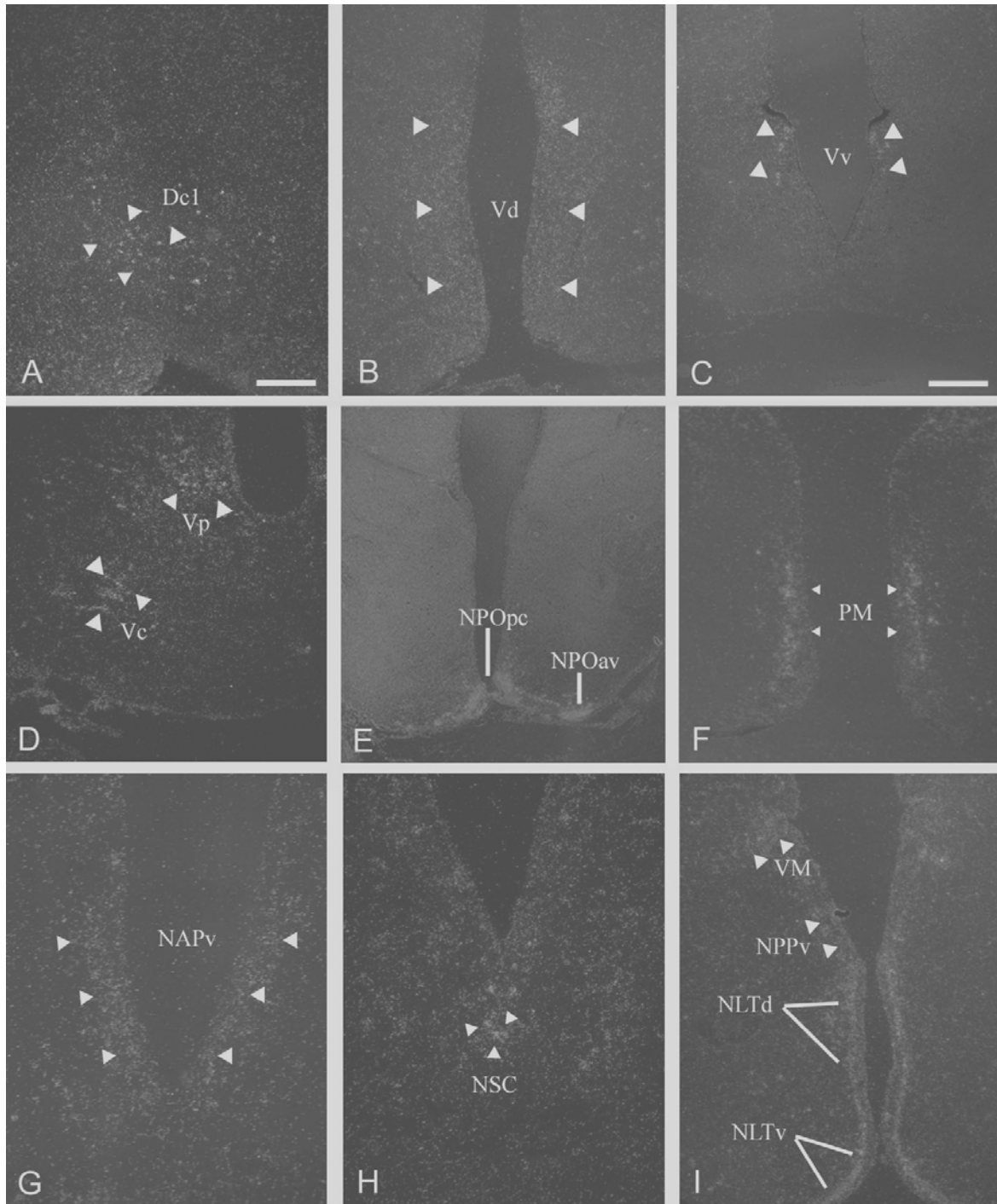


Fig. 13. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina a nivel del telencéfalo (A-D), área preóptica (E-H) e hipotálamo tuberal (I) procesadas mediante hibridación *in situ* con sondas antisentido del *Esr1* de lubina. (A) Señal positiva en la parte central del telencéfalo dorsal (Dc1). (B) Células positivas dispersas en el núcleo dorsal del telencéfalo ventral (Vd). (C) Células positivas en el núcleo ventral del telencéfalo ventral (Vv). (D) Señal positiva de hibridación en los núcleos central (Vc) y postcomisural (Vp) del telencéfalo ventral. (E) Señal positiva intensa en las partes parvocelular (NPOpc) y anteroventral (NPOav) del núcleo preóptico parvocelular. (F) Señal positiva prominente en el núcleo preóptico magnocelular (PM). (G) Células positivas en el núcleo periventricular anterior (NAPv). (H) Señal positiva de hibridación en el núcleo supraquiasmático (NSC). (I) Neuronas expresando el *Esr1* de lubina en el núcleo ventromedial talámico (VM) y núcleo periventricular posterior (NPPv). Señal positiva intensa en las partes dorsal y ventral del núcleo tuberal lateral (NLTd, NLTv). Escala = 200 μm (A, B y H); 400 μm (Fig. C-G e I).

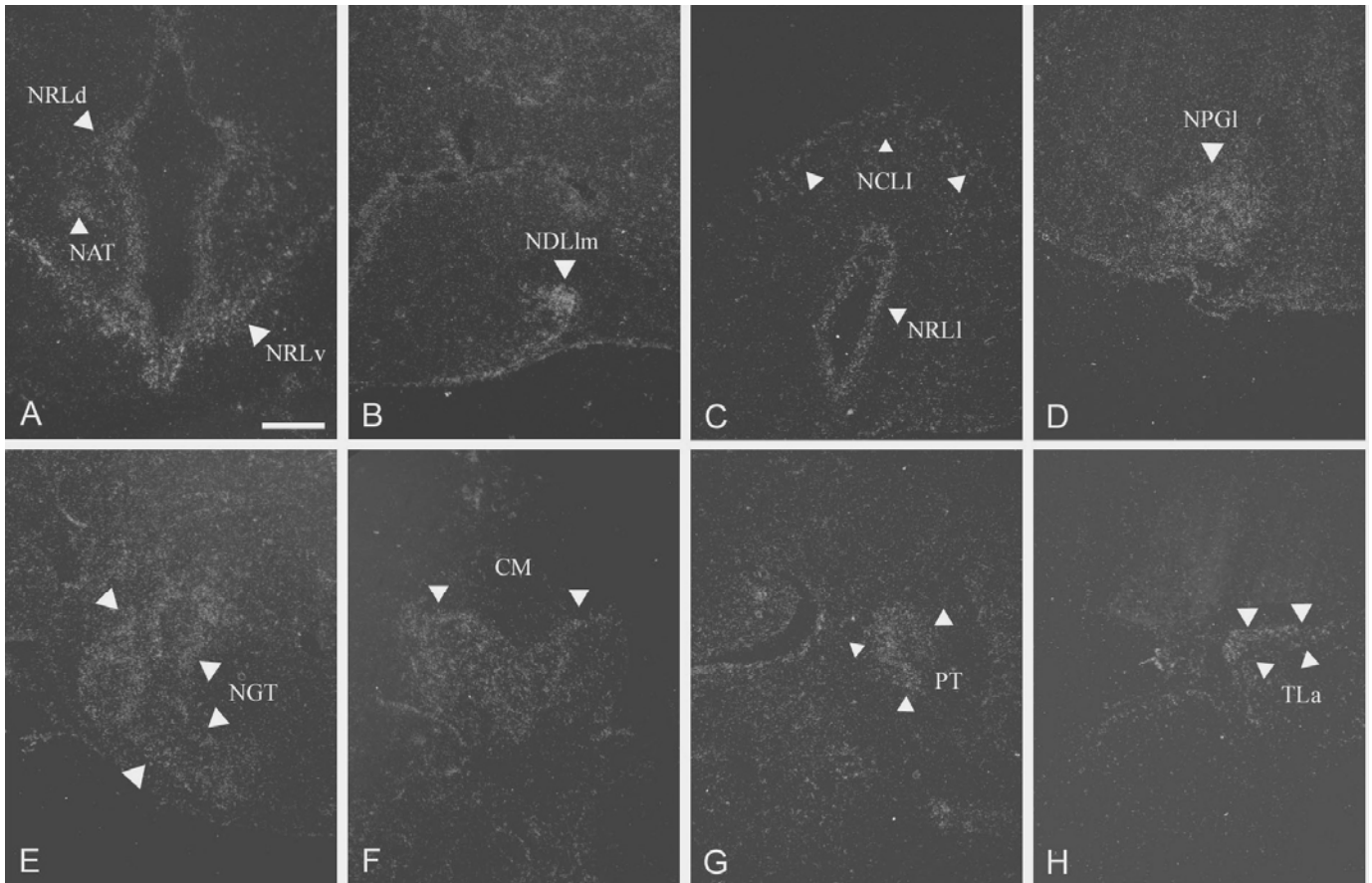


Fig. 14. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina a nivel del hipotálamo (A-C) y tubérculo posterior (D-H) procesadas mediante hibridación *in situ* con sondas antisentido del *Esr1* de lubina. (A) Señal positiva prominente a nivel de las partes dorsal (NRLd) y ventral (NRLv) del núcleo del receso lateral y núcleo tuberal anterior (NAT). (B) Señal positiva intensa en neuronas de la parte medial del núcleo difuso del lóbulo inferior (NDLM). (C) Señal positiva de hibridación en el núcleo central del lóbulo inferior (NCLI) y en la parte lateral del núcleo del receso lateral (NRLl). (D) Neuronas expresando el *Esr1* en la parte lateral del núcleo preglomerular (NPGI). (E) Células positivas dispersas en el núcleo terciario gustativo (NGT). (F) Señal positiva de hibridación en los cuerpos mamilares (CM). (G) Neuronas positivas para el *Esr1* en el núcleo talámico posterior (PT). (H) Señal positiva de hibridación en el núcleo del toro lateral (TLa). Escala = 200 μ m.

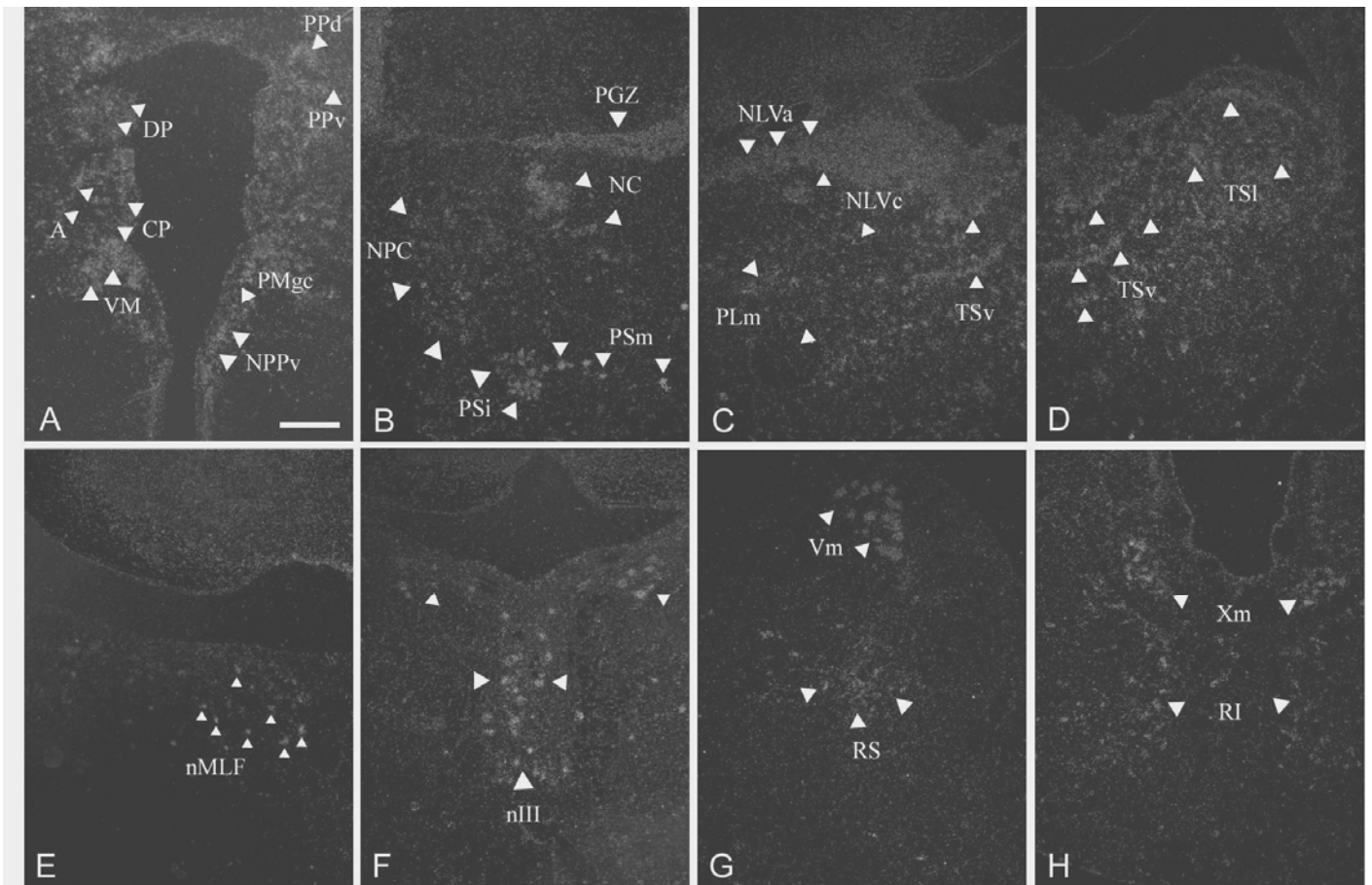


Fig. 15. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina a nivel del sinencéfalo, tálamo dorsal, tálamo ventral y área preóptica (A y E), área pretectal y techo mesencefálico (B), tegmento mesencefálico (C y D) y rombencéfalo (F-H) procesadas mediante hibridación *in situ* utilizando sondas antisentido del *Esr1* de lubina. (A) Neuronas marcadas intensamente en el núcleo preectal periventricular dorsal (PPd) y ventral (PPv), núcleo talámico posterior dorsal (DP), núcleo talámico anterior (A), núcleo talámico posterior central (CP), núcleo talámico ventromedial (VM), parte gigantocelular del núcleo preóptico magnocelular (PMgc) y núcleo periventricular posterior (NPPv). (B) Células con señal positiva intensa en la zona gris periventricular (PGZ) y en el núcleo cortical (NC). Células positivas dispersas en el núcleo central pretectal (NPC). Agrupaciones de neuronas positivas para el *Esr1* en los núcleos preectales superficiales intermedio (PSi) y magnocelular (PSm). (C) Neuronas positivas dispersas en las partes anterior (NLVa) y central (NLVc) del núcleo lateral de la válvula, parte medial del núcleo perilemniscular (PLm) y parte ventral del *torus* semicircular (TSv). (D) Células positivas dispersas en las partes ventral (TSv) y lateral (TSI) del *torus* semicircular. (E) Señal positiva de hibridación en el núcleo del fascículo longitudinal medial (nMLF). (F) Señal positiva intensa en el núcleo oculomotor (nIII). (G) Células marcadas de manera intensa en el núcleo motor del trigémino (Vm). Células positivas dispersas en el núcleo superior reticular (RS). (H) Señal positiva intensa en el núcleo motor vagal (Xm). Células positivas dispersas en el núcleo inferior reticular (RI). Escala = 200 μ m.

1.2) Distribución del *Esr2a*

1.2.1) Telencéfalo

En el telencéfalo, se detecta la expresión del gen *Esr2a* en el Vd (Fig. 12A) y Vv (Fig. 12B y 16A) del telencéfalo ventral. Las neuronas positivas para dicho subtipo en el Vv se localizan siempre en su región dorsal.

1.2.2) Diencéfalo

Dentro del diencéfalo, el área preóptica es el primer lugar donde se observa una expresión prominente del *Esr2a*. La señal de hibridación coincide con la apertura del receso preóptico, encontrándose neuronas positivas en el polo rostral del NPOpc (Figs. 12D y 16B). Al igual que con el *Esr1*, el RNAm del *Esr2a* se encuentra también en el NPOav (Figs. 12D y 16B) y en el PM (Figs. 12E y 16C). Las neuronas positivas encontradas en el núcleo anterior son remplazadas de manera progresiva por células que expresan dicho subtipo en el NAPv (Figs. 12F y 16C). Finalmente, el NSC (Fig. 12F) es el núcleo más caudal del área preóptica en el que se detecta expresión del *Esr2a*.

En el tálamo, se encuentra una señal positiva de hibridación tenue en el núcleo de la eminencia talámica (NTe, Fig. 16C) y en el VM (Figs. 12F y 16D).

Las primeras neuronas encontradas en el hipotálamo, que expresan el *Esr2a* se localizan en el NLTl (Fig. 12H). Se hallan también neuronas positivas en el NLTd (Fig. 12I), NLTv (Figs. 12I y 16E), NLTm (Figs. 12I y 16E) y NLTi (Fig. 12K). Coincidiendo con la apertura lateral del receso tuberal, se detectan transcritos del *Esr2a* en el NRLd (Figs. 12J y 16F) y NRLv (Figs. 12J y 16F). De manera más caudal, se localiza señal positiva de hibridación en el NRP (Figs. 12K y 16F) y en el NSV (Figs. 12K y 16F). Finalmente, dentro del lóbulo hipotalámico lateral, el *Esr2a* se expresa en el NRLl (Figs. 12L y 16F).

La expresión del *Esr2a* es patente en el tubérculo posterior, concretamente, en el núcleo periventricular del tubérculo posterior (TPp, Figs. 12J y 17A) y en el TLa (Fig. 12J). En progresión caudal, también se encuentran transcritos del *Esr2a* en el CM (Figs. 12L y 17D).

1.2.3) Mesencéfalo

La expresión del *Esr2a* dentro del mesencéfalo abarca tanto al techo como al tegmento mesencefálico. En el techo mesencefálico, únicamente se detecta señal positiva de hibridación en la PGZ (Figs. 12K-N y 17B). Dentro del tegmento mesencefálico, se localizan neuronas positivas para el *Esr2a* en el NLVa (Figs. 12M y 17C).

1.2.4) Rombencéfalo

En el rombencéfalo, la presencia de RNAm del *Esr2a* se circunscribe al estrato granular de la válvula del cerebelo (VCe, Figs. 12I-J y 17B).

1.3) Distribución del *Esr2b*

1.3.1) Diencéfalo

El *Esr2b* se expresa de manera intensa en el área preóptica (Figs. 12C y 18A). La señal de hibridación coincide con la apertura del receso preóptico. Al igual que las neuronas encontradas en esta área para el *Esr1* y *Esr2a*, las células positivas para el *Esr2b* se sitúan en el polo rostral del NPOpc (Fig. 12D). A un nivel rostrocaudal similar se encuentra una señal positiva patente en el NPOav (Fig. 12D). Las neuronas positivas encontradas en el NPOav están situadas en el polo ventrolateral del receso preóptico.

Dentro del hipotálamo tuberal, y coincidiendo con la apertura lateral del receso tuberal, se encuentran transcritos del *Esr2b* en el NRLd (Fig. 12J) y NRLv (Figs. 12J y 18B). De manera más caudal, se detecta también la expresión de este subtipo en el NRP (Figs. 12K y 18B) y en el NLTi (Fig. 12K).

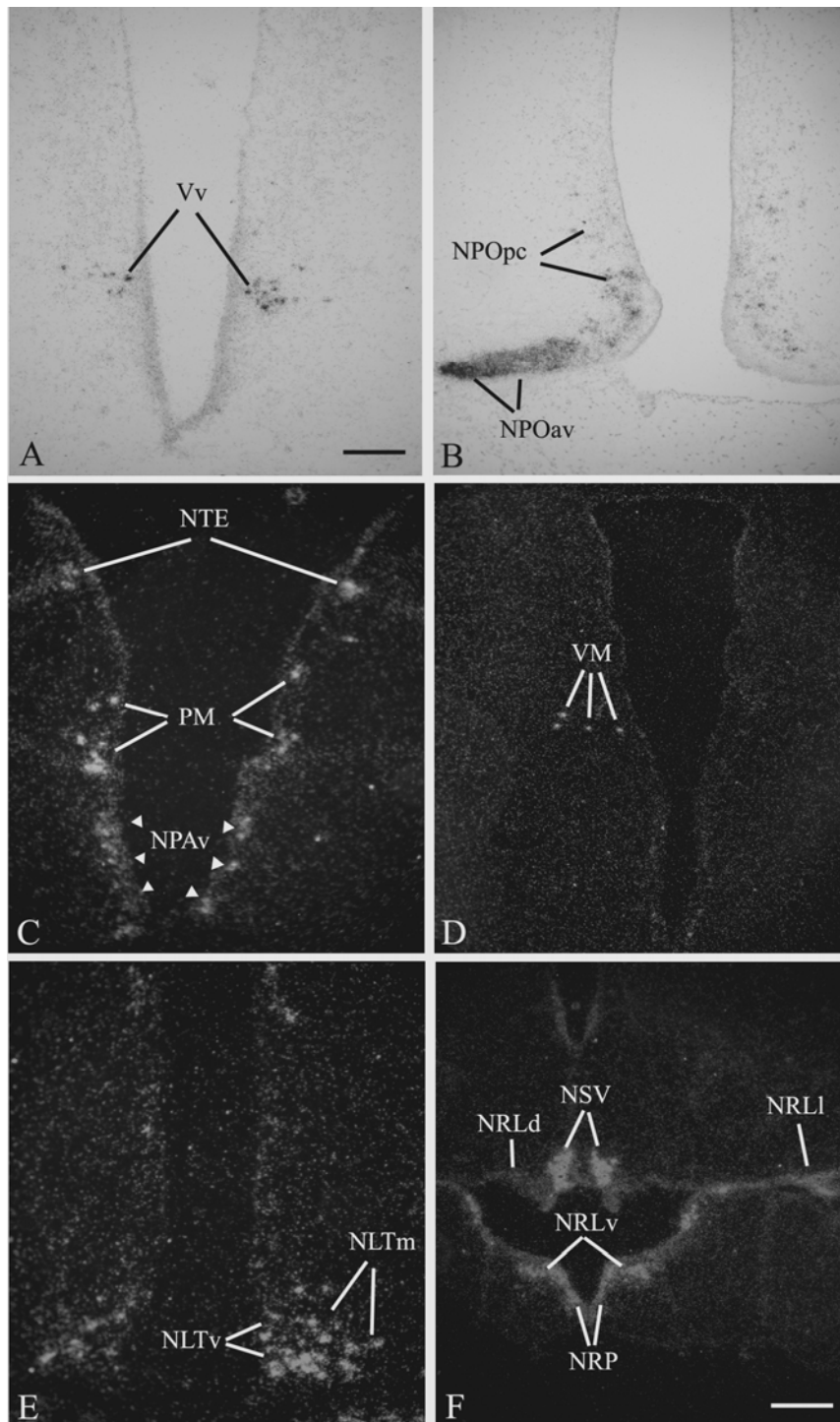


Fig. 16. Microfotografías en campo oscuro y claro de secciones transversales del cerebro de la lubina a nivel del telencéfalo (A, sección ligeramente más rostral respecto a la Fig. 12B), área preóptica (B y C), tálamo ventral (D) e hipotálamo tuberal (E y F) procesadas mediante hibridación *in situ* con sondas antisentido del *Esr2a* de lubina. (A) Células positivas marcadas de manera intensa en el núcleo ventral del telencéfalo ventral (Vv). (B) Señal positiva prominente en las partes parvocelular (NPOpc) y anteroventral (NPOav) del núcleo preóptico parvocelular. (C) Neuronas expresando el *Esr2a* en el núcleo de la eminencia talámica (NTE), núcleo preóptico magnocelular (PM) y núcleo periventricular anterior (NPAv). (D) Células positivas dispersas dentro del núcleo talámico ventromedial (VM). (E) Señal positiva de hibridación en las partes ventral (NLTv) y medial (NLTm) del núcleo lateral tuberal. (F) Células positivas marcadas intensamente en el núcleo del saco vasculoso (NSV), en las partes dorsal (NRLd), ventral (NRLv) y lateral (NRLl) del núcleo del receso lateral y en el núcleo del receso posterior (NRP). Escala = 400 μ m (D, F); 200 μ m (A, B, C y E).

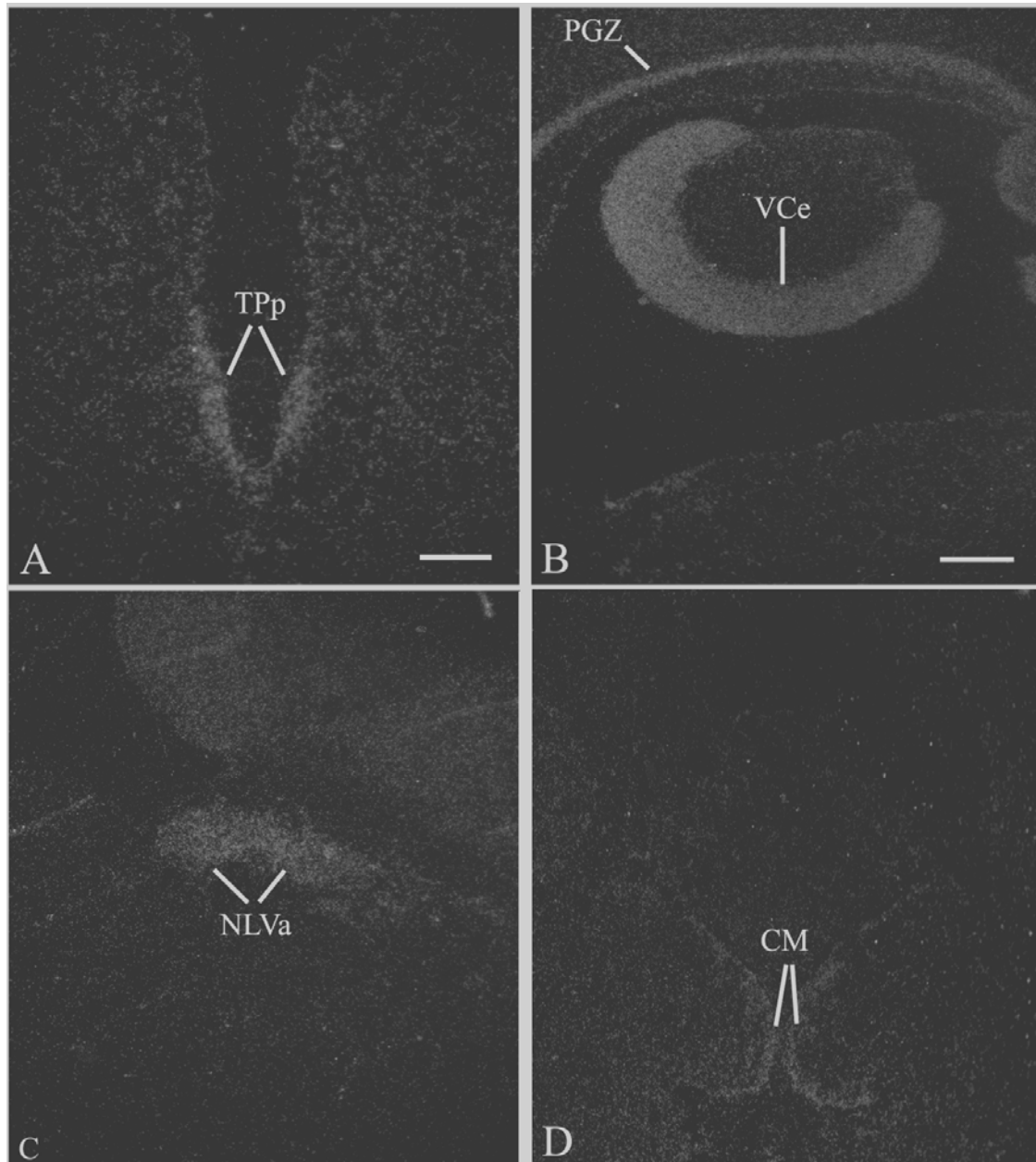


Fig. 17. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina a nivel del tubérculo posterior (A y D), techo mesencefálico, metencéfalo (B), y tegmento mesencefálico (C) procesadas mediante hibridación *in situ* con sondas antisentido del Esr2a de lubina. (A) Neuronas expresando el Esr2a a nivel del núcleo periventricular del tubérculo posterior (TPp). (B) Neuronas positivas marcadas de manera intensa en la zona gris periventricular (PGZ) y en la válvula del cerebelo (VCe). (C) Señal positiva de hibridación en la parte anterior del núcleo lateral de la válvula (NLVa). (D) Neuronas positivas expresando el Esr2a en los cuerpos mamilares (CM). Escala = 400 μ m (B-D); 200 μ m.

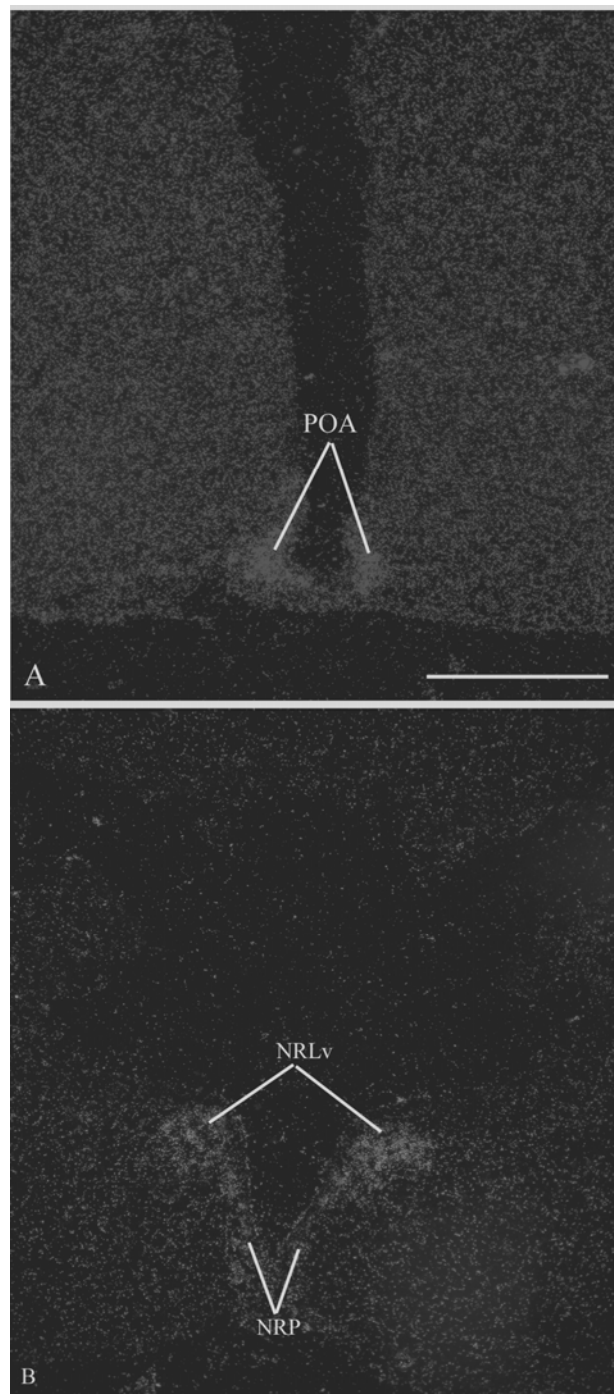


Fig. 18. Microfotografías en campo oscuro de secciones transversales del cerebro de la lubina a nivel del área preóptica (A) e hipotálamo tuberal (B) procesadas mediante hibridación *in situ* con sondas antisentido del Esr2b. (A) señal positiva intensa dentro de las partes parvocelular y anteroventral del núcleo preóptico parvocelular (POA). (B) Neuronas expresando de manera prominente el Esr2b dentro de la parte ventral del núcleo del receso lateral (NRLv) y en el núcleo del receso posterior (NRP). Escala = 200 μ m.

2) DISTRIBUCIÓN DE LOS ERs EN LA PITUITARIA. LOCALIZACIÓN CONJUNTA CON LAS HORMONAS GONADOTROPAS

En comparación con la expresión hallada en el cerebro, la pituitaria de la lubina es el lugar donde se encuentra la máxima expresión de los tres subtipos de ERs. Se detectan células positivas para los tres subtipos en diferentes poblaciones celulares de la *pars distalis proximal* (PPD) y la *pars intermedia* (PI) (Figs. 19A-B, 20A-B y 21A-B).

La doble hibridación *in situ* demuestra que las células gonadotropas de FSH como las de LH expresan los tres subtipos de ERs (Figs. 19C-D, 20C-D y 21C-D). Las células gonadotropas de LH se sitúan dentro de la PPD, así como, en el borde externo de la PI. Sin embargo, la localización de los gonadotropos de FSH queda restringida a la PPD (Figs. 19A-B, 20A-B y 21A-B). A pesar de que no se realizaron análisis cuantitativos, la expresión de los tres receptores en las células gonadotropas de FSH parece muy inferior a la observada en las de LH. De manera similar, la expresión de β FSH parece ser también sustancialmente inferior a la de β LH.

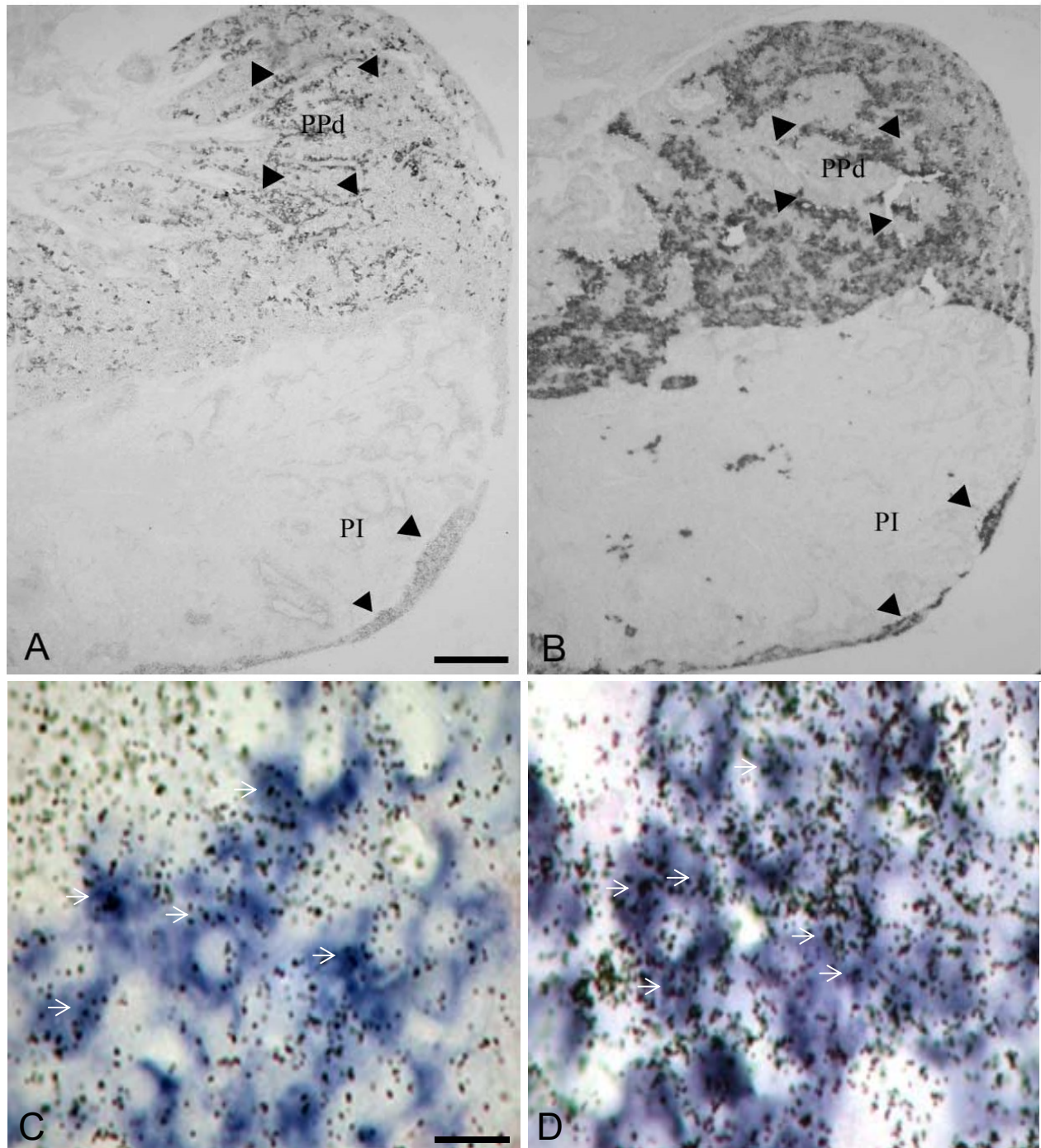


Fig. 19. Microfotografías en campo claro de secciones transversales de la pituitaria de la lubina mostrando la localización conjunta del Esr1 con la hormona folículo estimulante (FSH, A y C) y con la hormona luteinizante (LH, B y D). (A) Gonadotropos de FSH expresando RNAm del Esr1 en la *pars distalis* proximal (PPD) pero no en la *pars intermedia* (PI). (B) Gonadotropos de LH expresando RNAm del Esr1 en la *pars distalis* proximal (PPD) y en la *pars intermedia* (PI). (C) Expresión conjunta de los RNAm de Esr1- β FSH (flechas blancas). (D) Expresión conjunta de los RNAm de Esr1- β LH (flechas blancas). Escala = 400 μ m (A y B); 40 μ m (C y D).

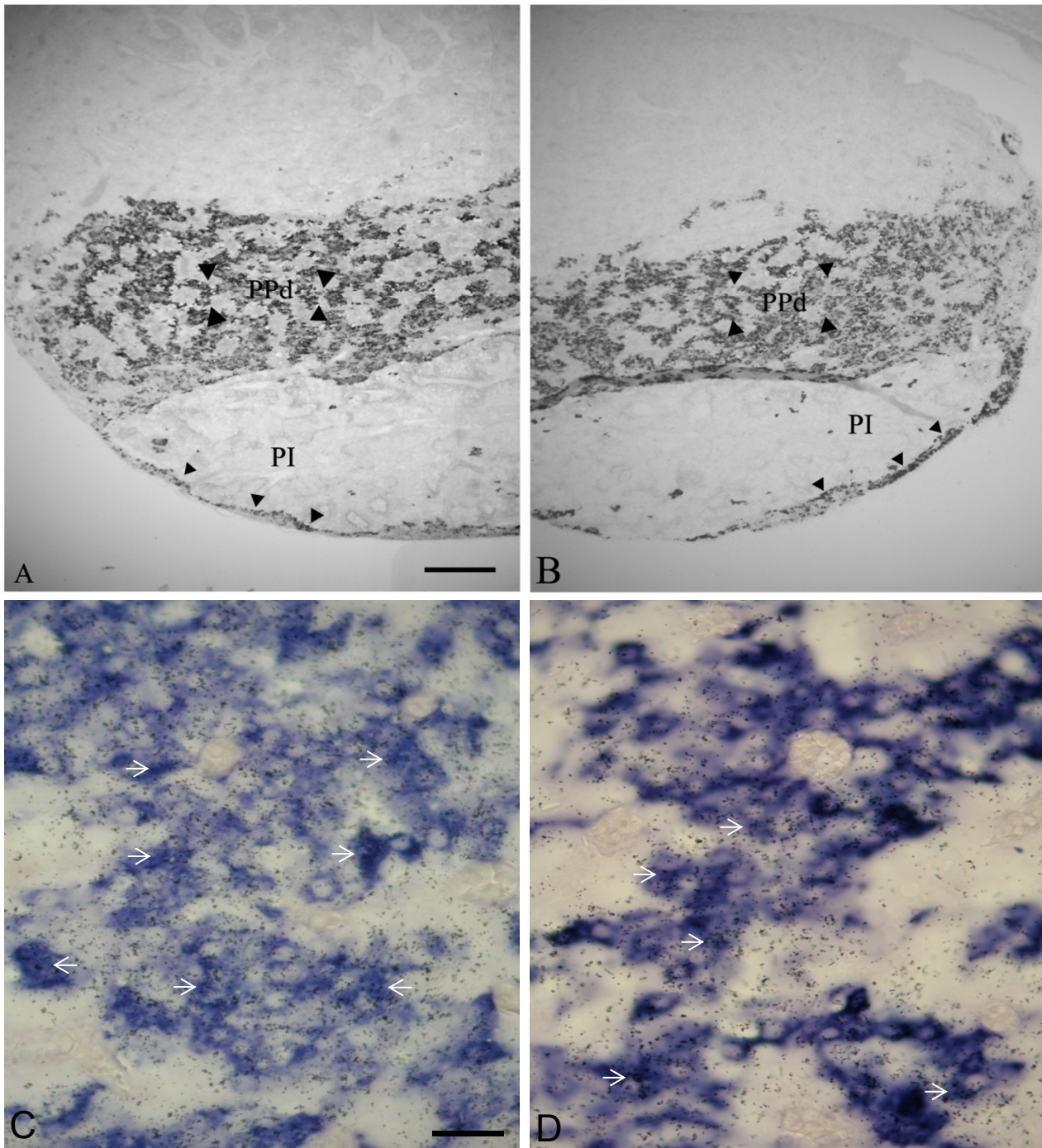


Fig. 20. Microfotografías en campo claro de secciones transversales de la pituitaria de la lubina mostrando la localización conjunta de la hormona luteinizante (LH) con el Esr2b (A y C) y con el Esr2a (B y D). (A) Gonadotropos de LH expresando el Esr2b en la *pars distalis* proximal (PPD) y en la *pars intermedia* (PI). (B) Gonadotropos de LH expresando el Esr2a en la *pars distalis* proximal (PPD) y en la *pars intermedia* (PI). (C) Expresión conjunta de los RNAm de Esr2b-βLH (flechas blancas). (D) Expresión conjunta de los RNAm de Esr2a-βLH (flechas blancas). Escala = 400 μm (A y B); 40 μm (C y D).

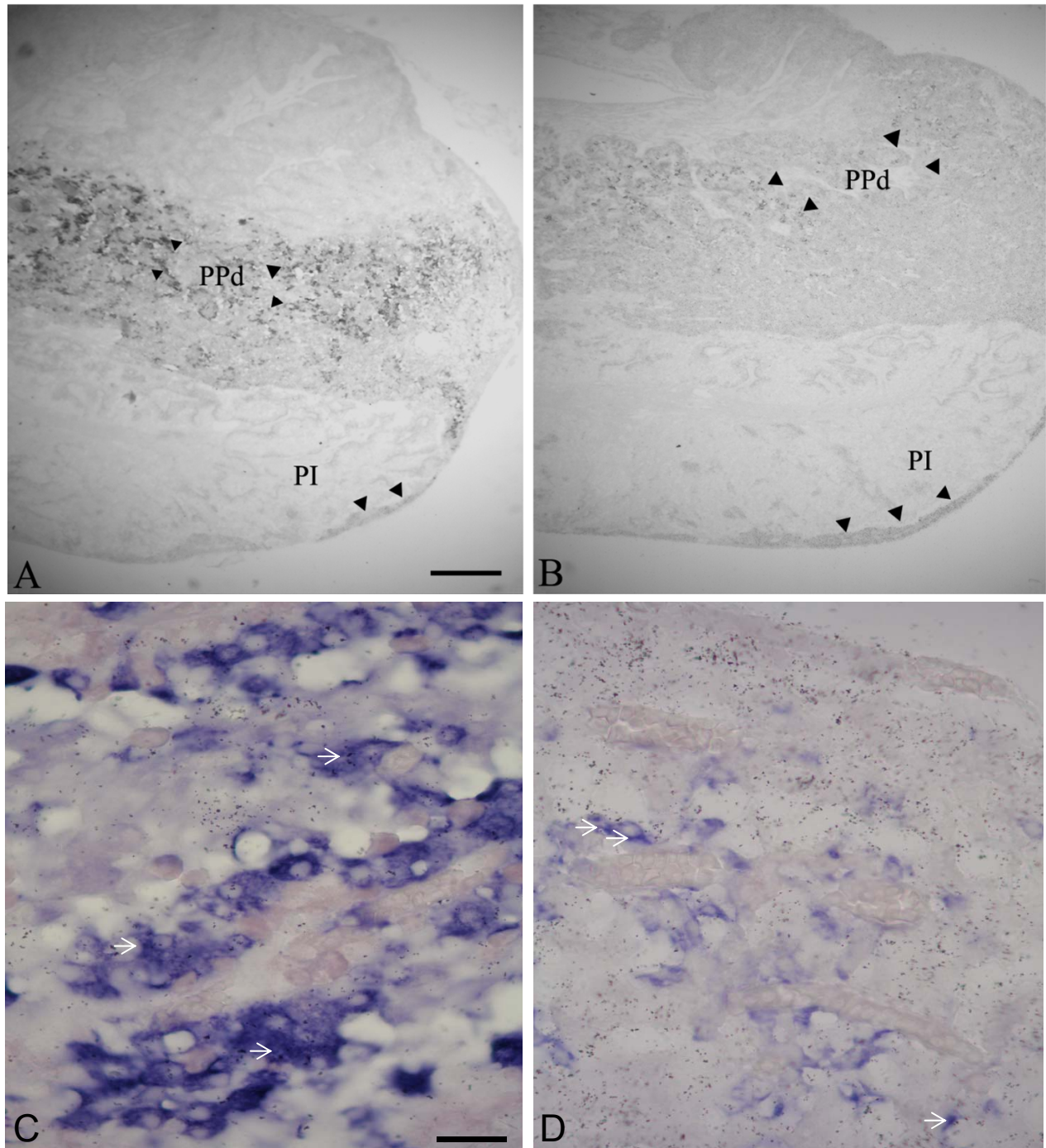


Fig. 21. Microfotografías en campo claro de secciones transversales de la pituitaria de la lubina mostrando la localización conjunta de la hormona foliculo estimulante (FSH) con el Esr2b (A y C) y con el Esr2a (B y D). (A) Gonadotropos de FSH expresando el Esr2b solo en la *pars distalis* proximal (PPD). (B) Gonadotropos de FSH expresando el Esr2a solo en la *pars distalis* proximal (PPD). (C) Expresión conjunta de los RNAm de Esr2b- β FSH (flechas blancas). (D) Expresión conjunta de los RNAm de Esr2a- β FSH (flechas blancas). Escala = 400 μ m (A y B); 40 μ m (C y D).

3) EFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN β FSH. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA β FSH

3.1) Cultivo primario de células de pituitaria

El estudio del efecto *in vitro* de los esteroides sexuales sobre la expresión de la β FSH se llevó a cabo sobre cultivo primario de pituitarias de individuos macho adultos en época de reposo sexual. Se estudió el efecto de dos hormonas esteroideas, el 17β -estradiol y la 11-cetotestosterona. Ambos tratamientos se realizaron a una concentración de 10^{-6} M. En el momento de la adición de los tratamientos se recogieron células para determinar la expresión basal de β FSH (T_0). El efecto causado por ambos esteroides se determinó transcurridas 48, 72 y 96 horas desde su adición (Fig. 22). No se encuentran diferencias significativas de expresión en células sin tratar a lo largo de todo el experimento. Por el contrario, tanto el 17β -estradiol, como la 11-cetotestosterona producen una disminución significativa de la expresión de la β FSH a 48, 72 y 96 horas. Dentro de cada punto de muestreo no se detectan diferencias significativas en la inhibición de la expresión causada por ambos esteroides. A diferencia de lo observado con la 11-cetotestosterona, en la que no se detecta una disminución significativa en la inhibición de la expresión a lo largo del experimento, el 17β -estradiol sí la produce, transcurridas 96 horas.

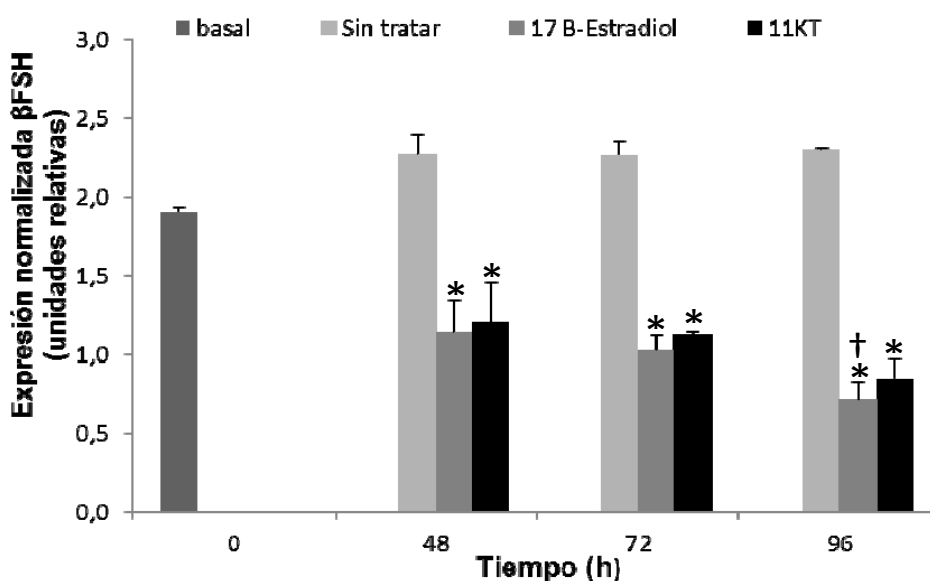


Fig. 22. Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión de la β FSH en cultivo primario de pituitarias de lubina. La incubación con 17β -estradiol y 11-cetotestosterona (11-KT), a concentración de 10^{-6} M, produce una inhibición significativa de la expresión a 48, 72 y 96 horas. * $p < 0.05$ vs. sin tratar; † $p < 0.05$ vs. 48 h.

3.2) Caracterización de la región promotora del gen β FSH

3.2.1) Clonación del promotor β FSH. Análisis *in silico*

Tras la realización de tres rondas de rastreo sobre una librería de DNA genómico de lubina construida con el vector Lambda DASHII/BamHI se logró aislar un clon (14.3.1.2) que contiene el extremo 5' del gen β FSH (exón 1, intrón 1, exón 2 e intrón 2). Los análisis de restricción y "Southern blot" de dicho clon (Fig. 23) permitieron subclonar sucesivamente tres fragmentos de aproximadamente, 3.5, 4.2 y 5.2 Kb que incluyen las primeras 3.5 Kb de región promotora del gen β FSH de la lubina (Fig. 24).

El análisis de dicha región promotora (Fig. 25) revela la presencia, a -48 pb, de una secuencia putativa de reconocimiento (caja TATA) para el complejo RNA polimerasa II, característica de la mayoría de promotores eucariotas. Además, se encuentran también varias secuencias putativas similares o idénticas a la secuencia consenso de elementos cis reguladores, que regulan de manera específica la expresión génica. Más específicamente, se detectan varios elementos de reconocimiento para el factor de transcripción específico de pituitaria (PIT 1, -3078, -2743, -2645, -2460, -1378, -1270, -1230, -979, -760, -257 y -179 pb), un elemento de respuesta específico de gonadotropos (GSE, -179 pb), varios sitios de unión para la proteína activadora 1 (AP1, -3469, -3454, -3179, -3018, -2502, -2397, -1983, -400 y -237 pb) y varios elementos de respuesta a AMPc (CRE, -3385, -3322, -1426, -1378, -1078 y -839 pb).

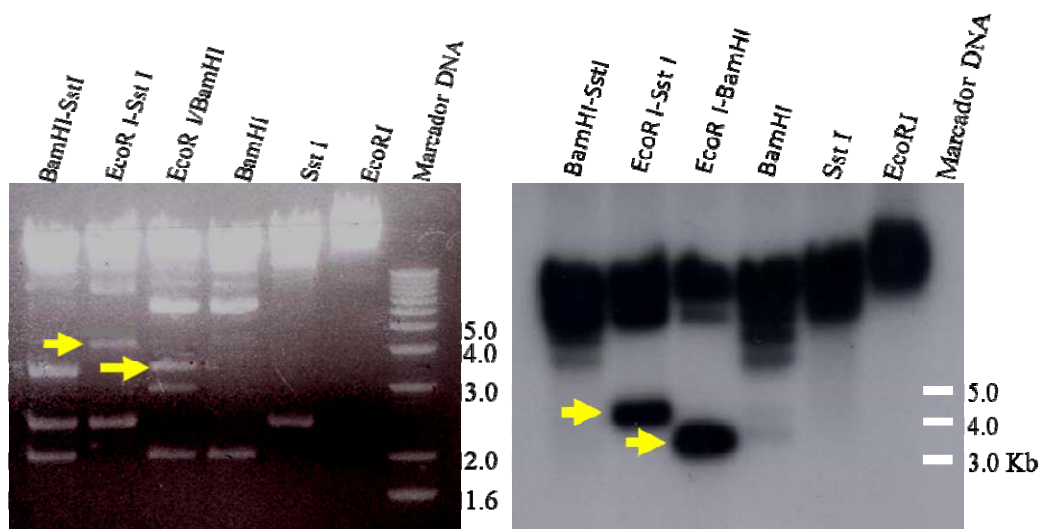


Fig. 23. Análisis de restricción (izquierda) y "Southern blot" (derecha) del clon 14.3.1.2. Las flechas amarillas muestran los dos fragmentos de 3.5 y 4.2 Kb aproximadamente, subclonados en PBSSK a partir de los cuales se determinaron las primeras 2.4 Kb de la región promotora del gen β FSH de lubina.

En lo referente a las hormonas esteroideas, además de encontrarse diferentes elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE, -3072, -2198, -969 y -306 pb) y progesterona (PRE, -2593, -1403 y -942 pb), se detectan también dos medias secuencias del elemento de respuesta a los andrógenos (ARE, -1872 y -933 pb) y dos medias secuencias del elemento de respuesta a los estrógenos (ERE, -2402 y -1010 pb). Finalmente, se identifica un elemento de respuesta común para los heterodímeros formados por el receptor x de pregnano (PXR) y el receptor de androstano (CAR), con el receptor x de ácido retinoico (PXR/RXR, CAR/RXR, -155 pb).

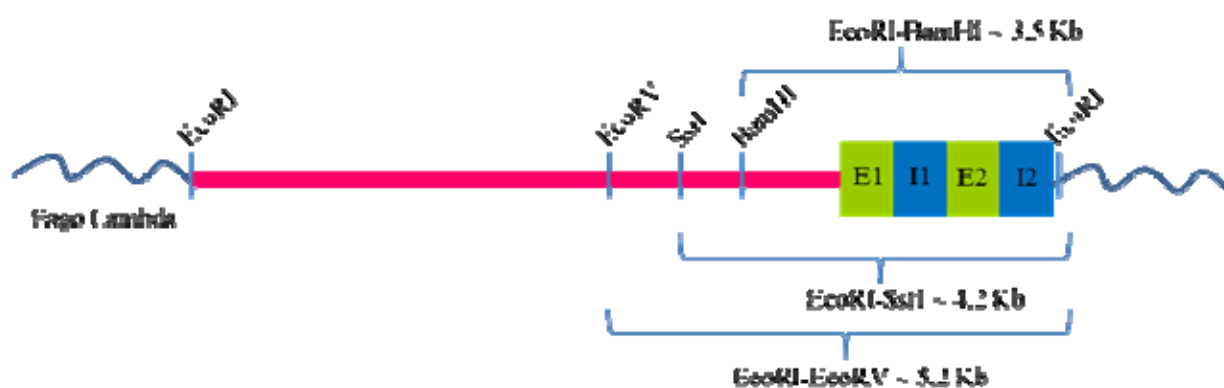


Fig. 24. Representación esquemática del clon 14.3.1.2 (~18Kb) donde se muestra la disposición de los tres fragmentos subclonados en PBSSK.

```

-3538 TCGATAAGCTTGATATCTCTGTCACACTTGTTCAGATCTATGTAATGTAACGCTCAGTC
-3479 TCTGAGCCAATGATGTCACTTGAACTGATGTCAGTCTTCCCATTTCACCAACACACTG
          AP1                AP1
-3420 AAGGCGTTTGCTTCTAAACTTCTAAAACAGATTTTGATCACTCACATAATATGCTTCCA
          CRE
-3361 TTTTGGATGATAATTACTGTACTCACCTGGTGTCAGTGTAATCATTATGTAACATTGCA
          CRE (-)
-3302 ACTGCTCCCTGGTGGGCTGATTGGTTTGCAGGTCTTGGTAAAAGCAGTGTCCACAGA
-3243 GAGGCAGCAGCTCAGAGAACTTGCTTCAGCAGCTTCATCAGCAGCGTCCACACATACC
          GRE
-3184 CCGGGTGACTGAAACGTTTCCAAAATCAACTCCCGAGATTCAGCTTTTTCTGCATCAAG
          AP1
-3125 AGGCTCTTTATGGTAATCGCAGTGTAAACTGATCCCTATTAGTTAAGTGTTTAGTTCT
          PIT1 GRE
-3066 GATGTCTGTGCTCTTCTCTTCCACCAACATTTACTGTAAGGAATTAACTGACTGACACA
          GRE                AP1
-3007 CACTGATAATTCTCACAACCTCGATGTTTGCATGTGTGTTCAAACCTTTGTCTTAAGGGT
-2948 GTGAGCTGCATTTGGAAAGAAAGGTGGAGCTGGAGACCGTGAACAGTTTTCAAACCTCC
ATGTACTGTGTTTGTGAAGCTTAAACTCAAATACAGATTTACTGCTTTTGTGCTTGTGTA
-2830 AATCATAGCTGAGACATGGTTGCTGTTAGCAGGCACTATATGGTAGGCTATATACAGGC
-2771 TGTGGTATTTGTGGCTATTTGCAGTGTGTTTTCATATAAAGGCTATTCACATATTTGTG
          PIT1

```


- 2712 CACAAGACACTTTAAAGACACCCGTGGACTGTATGGTGTGTTGAAATATTGTAATTCTT
-2653 TTCAAAGTTTTTCAT AAGCCATATATTGCATTAAATACTAAATACTGTGTCTTTGTTG
PIT 1
- 2594 TTGTTCA AATAACATGCGGTGATCACGGACCCGTACAGTAGCAGATGGAAGCAGCAGAG
PRE
- 2535 GAGGCAAGGCTCTGCAGAGAGGGGAGCAATGTGTGACTGAGTGGGTTTGTGGATGCTGT
API
- 2476 CAGTCCTGTTATGGCA GTGTTTATGGTGTGTTGATAAAAAAGCGAGAGGACTCCTTTCC
PIT 1
- 2417 AGAGCTCAAACCAA TGACC CATGACTCAA TCTGTGATGTCAGCAAGATGTACGGCTC
½ ERE API (-)
- 2358 TGAGCTGTTTTATGTGTGGCTTCATATAAAGCTTGTGTTGAGCTTTTACACCCAAATGAG
-2299 CTTTCTTTTATAGTAGTGCTTCGAGTTATGAACCAGAAAATCATCCCAGGCACTGACA
-2240 CCATCACCTCGTCCATCATTTCCAAATTGATTCCAGTGGACATCACA GGGCAGGCTTA
GRE
- 2181 TGGCTGAGAGAGATATAAGATGTTCCCTCGGACATCTATTTAATGCTTCTGTAGTGTT
-2122 GTTTTCTTTTAGCTTGCTGCAGCACAATAGGCTATTTTTAGGACCAAATATTGACATG
-2063 AACCTAAATGTATTAATTACCTTTTGTAATAAAAAGAAGGTGTTAATGCAGACAACAT
-2004 ATCAATGCAGTGCATGTGTGGTGTAA TGGTTTCAGCTCCATACTTAATAAATCAGGTT
API
- 1945 TCAGTGCAGATGCGCTCACTTTAAGAGGAATTACAAGCTGTTATTCACACTACTCAGAA
-1886 AAT TACTAATCATG TGTCTACTCTGAATACAAGATTAATAAGCTATGACTAGTGTTCA
PRE ½ ERE
- 1827 TTAAGGACAAAATGCATGCTAACAAATGATGTGTTTCTGCTGAGGTTTCCAAAAGGAAAT
-1768 AGTGCCATACAGGACGAGGGTAAACTCTATAGAAGTCCTTGTTAGGCAGGTATGGCAG
-1709 TACGACAGGATCCTGGGGAACCTGAGTCCCTGGTGGCTGCAAGGGCAGACGGAGCAGCA
-1650 GTTGGATGAACCGTGGCTGCTGCCAAGTACTTATATTCTACTGTCAGTGCAGACTGTC
-1591 CAGCTCGTGGTGCAGTGCCTAACTTTTTACTGAATGCAGCAGACTACAGAATTTCTCAA
-1532 AACACACAGTGCAGGCTTGGCTGCTCTATCTGCCTGAAACAAAAGGGAGGCAGGAAGG
-1473 GGTGAAAAAACATTTACTCAAGTACTGTAGTGAGGTACAATTTGAGGGATTTTACTT
CRE
- 1414 GAGTAGTTATA TGT TACTTTAAACCAGAGATGGAGGAAGTATTCAGATCCTTCATTAAG
PRE PIT1 CRE
- 1355 TAAAAGTACTAATAACCACACAGTGGTAACAGTAAAATATGTATAATCAATAAAATGTA
- 1296 CTTGAAGTTATTTAAAAGTAAAAGTTATTAATGCAGACATACTGTTATATGTAATCAGAT
PIT1
- 1237 TACTGATAATCATGCATTAATATAAAGCAGAGATTTACTGTTGGAGCTGGTTGAGATC
PIT1
- 1178 TTAAAGACAGATATTAAATAACTAATGTTAATGTGGAGTAGACGTATAGAGTGGCATA
-1119 AAAAGAAAATGTGTACTCAGCACTTGAGGAAATATACTTAGTTATATTTACTTTAACTTT
CRE
- 1060 AACATTTTATGGACTAACTAACCATCAGTAGAGA ACTTTAGCTACACAT TGACCAGCT
GRE ½ ERE
- 1001 ACAACACTGCATGCGTTAGTGATGAATAATAAACATGATAAGCAATAATATAACTC
PIT1
- 942 CGAAAGAGGATGTTCTATGTAACGGCTTTTTGCTTTTGATACTTTCTTTTACTTTAATG
PRE ½ ERE
- 883 CAGAACCCTTATATATAACAGAGTATTTGTTTCAGTGTGAGATTGCTACTTTTACATAAT
CRE
- 824 TTAGAA TTAATTGCACCATATTCATAAAAAATATTTTGGAGGCAGTCTATAGTTAAGT
- 765 AAATGTATGATTCATA CAGATCAATTATTTTTACAGATTGAGGTTCCCTGCAGTTGTAG
PIT1

construcción pTATA 1.0, causa una inhibición significativa de la transcripción, con respecto a todas las construcciones delecionadas del promotor β FSH.

La evaluación de la sensibilidad a los estrógenos del promotor β FSH se realizó en L β T2. Para ello, primero se determinó la respuesta a los estrógenos de dicha línea celular mediante transfecciones de la construcción ERE-TK-LUC con y sin la construcción Esr1-pcDNA.3. Las células así transfectadas se trataron con 17 β -estradiol (10^{-6} y 10^{-8} M) durante 72 horas. Los resultados de las transfecciones realizadas sin Esr1-pcDNA.3, ponen de manifiesto la ausencia de diferencias significativas entre las células control y las células tratadas con 17 β -estradiol (Fig. 28 a). Por el contrario, las células transfectadas de manera simultánea con ERE-TK-LUC y Esr1-pcDNA.3, sí exhiben diferencias significativas tras el tratamiento con dicho esteroide (Fig. 28 b). Los resultados anteriores indican la ausencia de expresión funcional del Esr1 en el clon de células L β T2 utilizado. Como consecuencia de ello, dichas células deben transfectarse con Esr1-pcDNA.3 para el estudio del control transcripcional por estrógenos de la subunidad β FSH de la lubina, en L β T2.

Para determinar el control transcripcional por estrógenos del promotor β FSH, se realizaron transfecciones en L β T2 con las construcciones portadoras de elementos putativos de reconocimiento para los estrógenos (pTATA 3.5, pTATA 1.0 y pTATA 0.15) junto con Esr1-pcDNA.3. Tras la transfección, se incubaron las células con 17 β -estradiol (10^{-6} M) durante 72 horas. La cuantificación de la actividad luciferasa de las diferentes construcciones transfectadas, no revela diferencias significativas entre las células control y las células tratadas con 17 β -estradiol (Fig. 29).

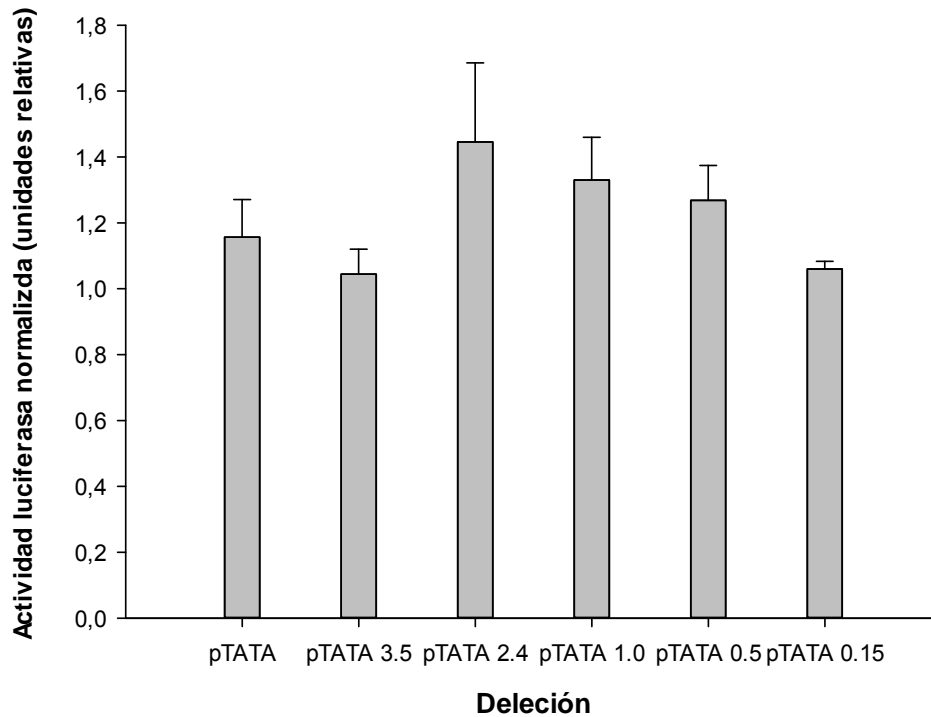


Fig. 26. Caracterización de la actividad basal del promotor β FSH en células HEK 293. Ninguna de las construcciones transfectadas produce diferencias significativas de actividad luciferasa frente al control (pTATA). Los valores representan la media + S.E.M.

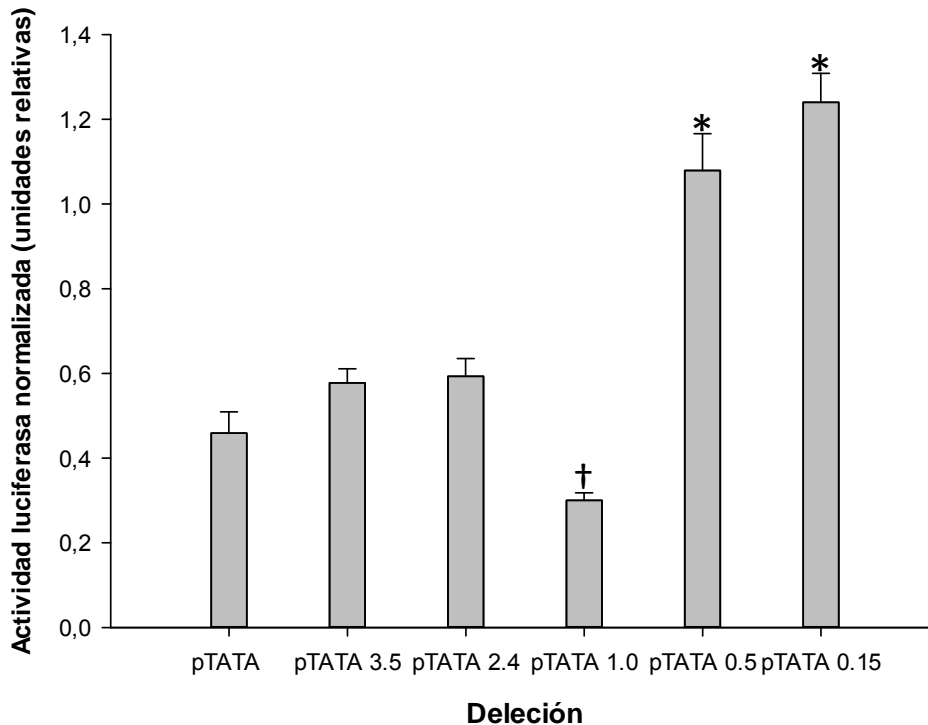


Fig. 27. Caracterización de la actividad basal del promotor β FSH en células L β T2. Las transfecciones realizadas con las construcciones pTATA 0.5 y pTATA 0.15 producen un aumento significativo de actividad luciferasa. La transfección realizada con pTATA 1.0 muestra una disminución significativa de dicha actividad. Los valores representan la media + S.E.M. * $p < 0.05$ vs. todos los grupos; † $p < 0.05$ vs. pTATA 3.5, pTATA 2.4, pTATA 0.5, pTATA 0.15.

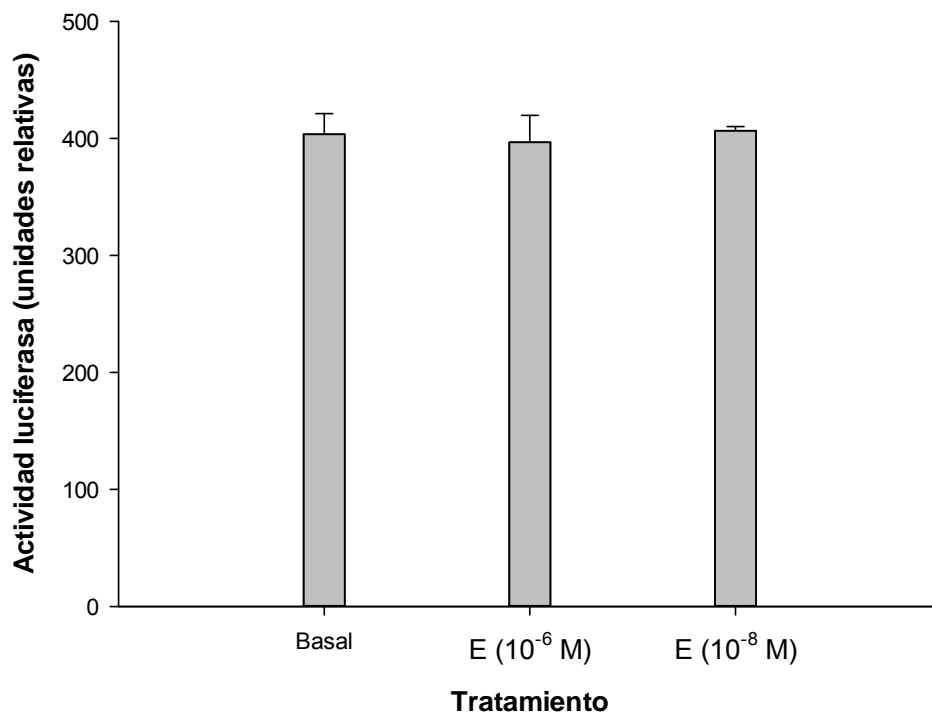


Fig. 28 a. Determinación de la sensibilidad a los estrógenos de las células L β T2. La transfección de la construcción ERE-TK-LUC no produce diferencias significativas de actividad luciferasa entre las células tratadas con 17 β -estradiol (E) y las células tratadas con etanol como control (Basal). Los valores representan la media + S.E.M.

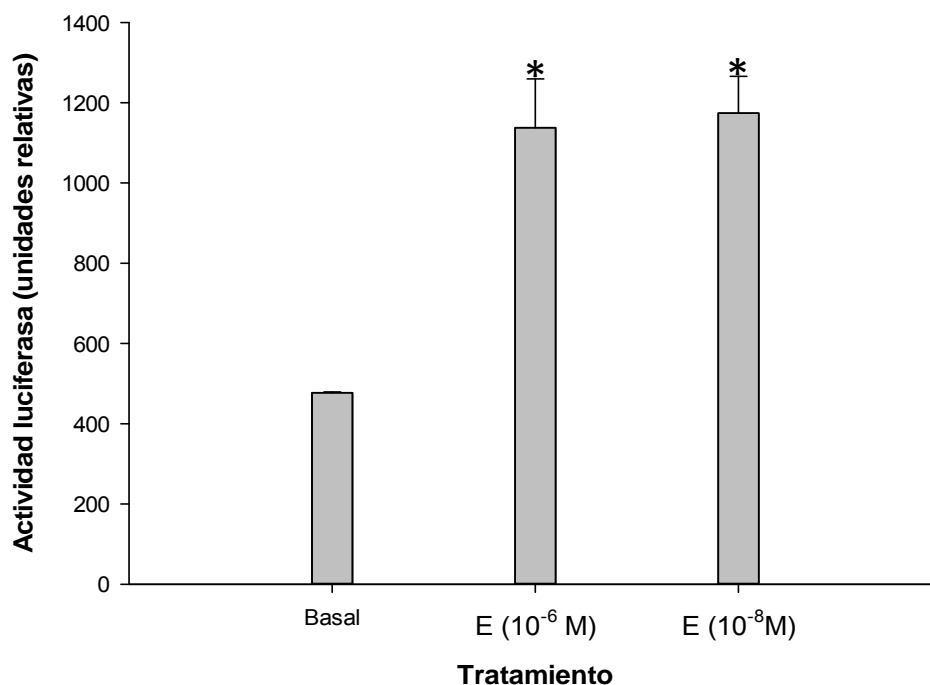


Fig. 28 b. Determinación de la sensibilidad a los estrógenos de las células L β T2. La transfección simultánea de las construcciones ERE-TK-LUC y Esr1-pcDNA.3, produce diferencias significativas de actividad luciferasa entre las células tratadas con 17 β -estradiol (E) y las tratadas con etanol como control (Basal). Los valores representan la media + S.E.M. * $p < 0.05$ vs. Basal.

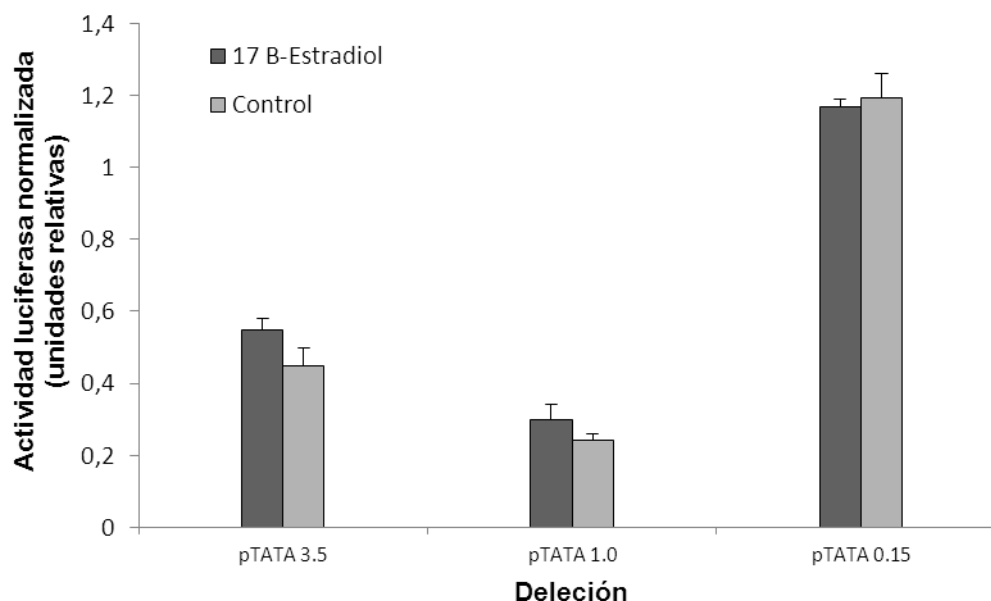


Fig. 29. Regulación transcripcional por estrógenos del promotor β FSH de lubina en células L β T2. Tras la transfección de las diferentes construcciones delecionadas, las células se incubaron durante 72 horas con 17 β -estradiol a una concentración de 10^{-6} M. No se encuentran diferencias significativas de actividad luciferasa entre las células incubadas con etanol (control) y las células incubadas con dicho esteroide. Los valores representan la media + S.E.M. Nótese la similitud del patrón de actividad basal con el caracterizado en la Fig. 27.

4) PERFIL FARMACOLÓGICO DEL Esr1

Las PCRs llevadas a cabo a partir de DNAc de telencéfalo, área preóptica, hipotálamo y pituitaria, amplificaron únicamente el Esr1 con la combinación de los cebadores Afor3/ERaRev. Ello sugiere, que en el eje neuroendocrino de la lubina, solo se expresa la isoforma corta de dicho subtipo (datos no mostrados).

Para la caracterización funcional del Esr1, se realizaron transfecciones estables con la construcción Esr1-pcDNA3 en la línea celular HEK 293. Posteriormente, el clon de células HEK 293 expresando de manera estable el Esr1 de lubina (clon P), se transfectó de manera transitoria con el plásmido ERE-TK-LUC y se incubó con una batería de esteroides diferentes durante 48 horas.

Tras la adición de 17 β -estradiol, se produce un aumento dependiente de la dosis de la actividad luciferasa (Fig. 30). Como se esperaba, el 17 β -estradiol es el agonista más potente en estimular la actividad transcripcional. De los metabolitos del 17 β -estradiol, solo el estriol es capaz de activar el Esr1 a concentraciones inferiores a 10^{-6} M. Únicamente, dosis elevadas de testosterona (10^{-5} M) y estrona (10^{-6} - 10^{-5} M) estimulan de manera significativa la actividad luciferasa. Respecto a la 11-

cetotestosterona y 17α , 20β di-hidroxi-progesterona, ambas, son incapaces de estimular la expresión del gen luciferasa a través del Esr1 de la lubina.

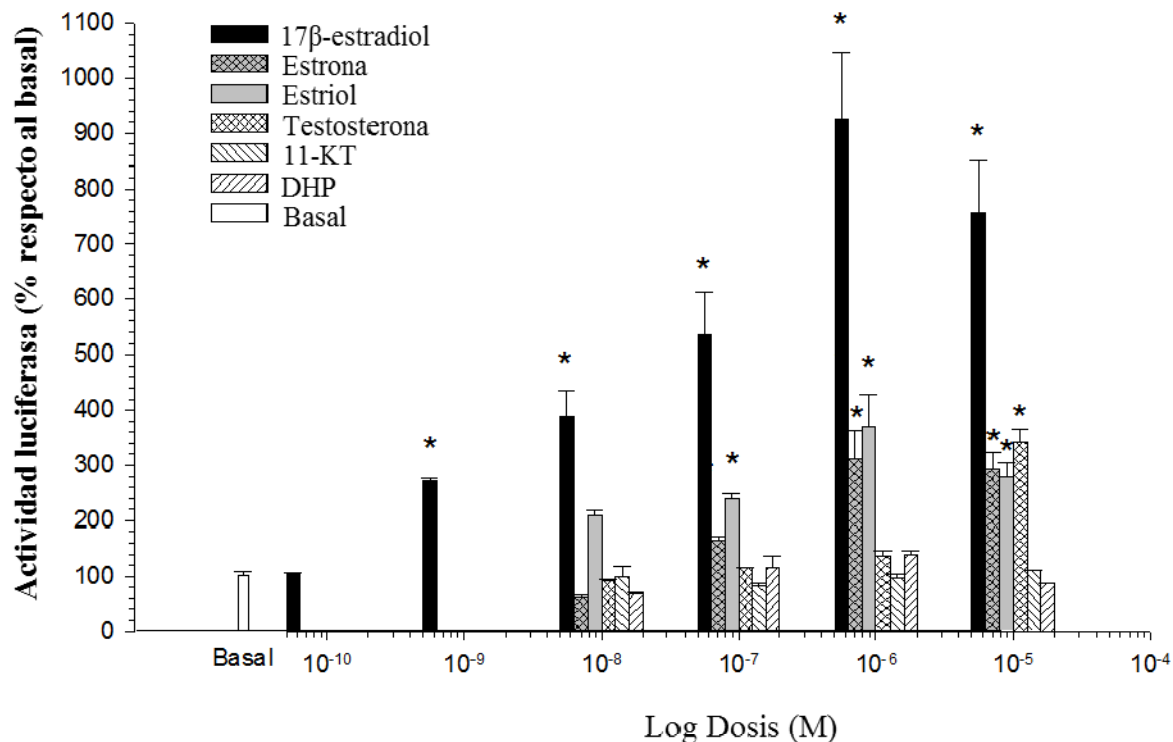


Fig. 30. Caracterización farmacológica del Esr1 de la lubina. El Esr1 activa la expresión del gen luciferasa tras la incubación con concentraciones nanomolares de esteroides diferentes. Se realizaron transfecciones transitorias con el plásmido ERE-TK-LUC en células HEK 293 que expresan de manera estable el Esr1 de lubina (clon P). Tras la transfección, las células se incubaron con 17β -estradiol (10^{-5} - 10^{-10} M), estrona, estriol, testosterona, 11-cetotestosterona (11-KT), 17α , 20β di-hidroxi-progesterona (DHP, 10^{-5} - 10^{-8} M) y etanol como como control (basal). Los valores representan la media + S.E.M. * $p < 0.05$ vs. Basal.

5) DETECCIÓN DE COMPONENTES ESTROGÉNICOS EN DIETAS PARA PECES DE CULTIVO

Mediante selección asistida por antibióticos se obtuvieron diferentes clones celulares que expresan de forma estable el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor con diversos EREs, conjuntamente con el Esr1 de lubina. Tras el periodo de selección se aislaron 5 clones (6, 8, 13, 15, 16) que se testaron para evaluar la sensibilidad a los esteroides (Fig. 31). Las células se incubaron con concentraciones crecientes de estradiol (10^{-14} - 10^{-6} M) y, tras 48 horas, se determinó la actividad luciferasa por duplicado. Tres clones (6, 8 y 16) mostraron un ED_{50} dentro del rango nanomolar (1 - 10^{-9} M). De ellos, el clon 8 fue el que mostró mayor sensibilidad aunque

el clon 6 exhibió la respuesta máxima, en términos de actividad luciferasa, cuando se estimuló con las dosis más elevadas (10^{-6} M). Finalmente, se seleccionó el clon 6 para determinar la presencia de extractos estrogénicos en los piensos de peces.

En el laboratorio se consiguieron reunir alrededor de 40 piensos comerciales diferentes provenientes de otros laboratorios, empresas de cultivo o las propias empresas de piensos. En todos los casos, los componentes solubles en disolventes orgánicos contenidos en 1 gramo de pienso se extrajeron con 5 ml metanol. La figura 32 muestra los resultados obtenidos para 4 piensos comerciales. Uno de los piensos se utiliza de forma rutinaria para la cría del pez cebra (P1), otro se utiliza en la cría de carpas rojas (P2) y los dos restantes en el cultivo de lubina y dorada (P3 y P4). Solamente los extractos de dos piensos (P2 y P3) fueron capaces de inducir la actividad luciferasa. Sorprendentemente, los extractos del pienso P3, utilizado para la cría de especies carnívoras, exhibió mayor capacidad de inducción que el pienso P2, utilizado para la cría de peces herbívoros. En el caso del pienso P3 la inducción de actividad apareció a cantidades tan bajas como el extracto proveniente de 5 mg de pienso. Un reproductor de lubina puede llegar a comer 10.000 veces esta cantidad de pienso diariamente.

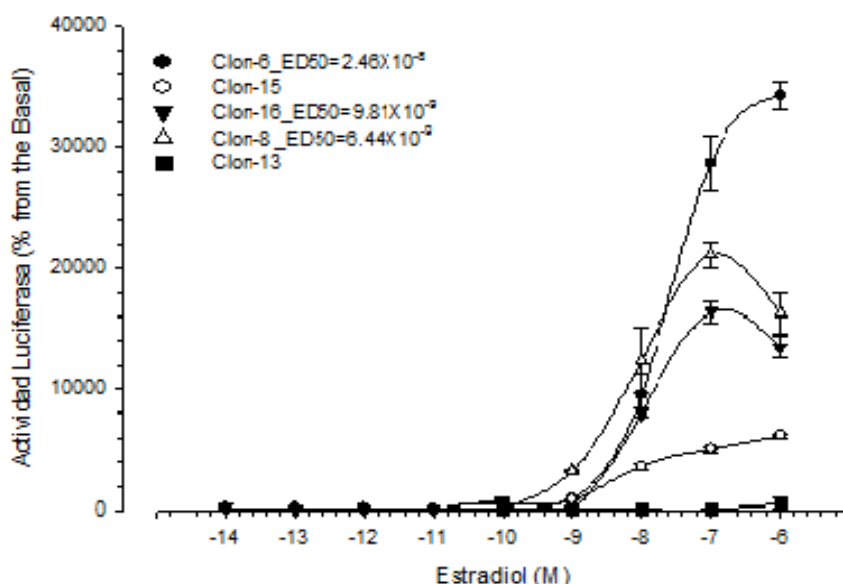


Fig. 31. Curvas dosis-respuesta de los diferentes clones de células HEK 293 expresando de manera estable el gen luciferasa y el ESR1 de la lubina. Bajo este sistema, la activación del ESR1 por el 17 β -estradiol se traduce en un aumento de actividad luciferasa.

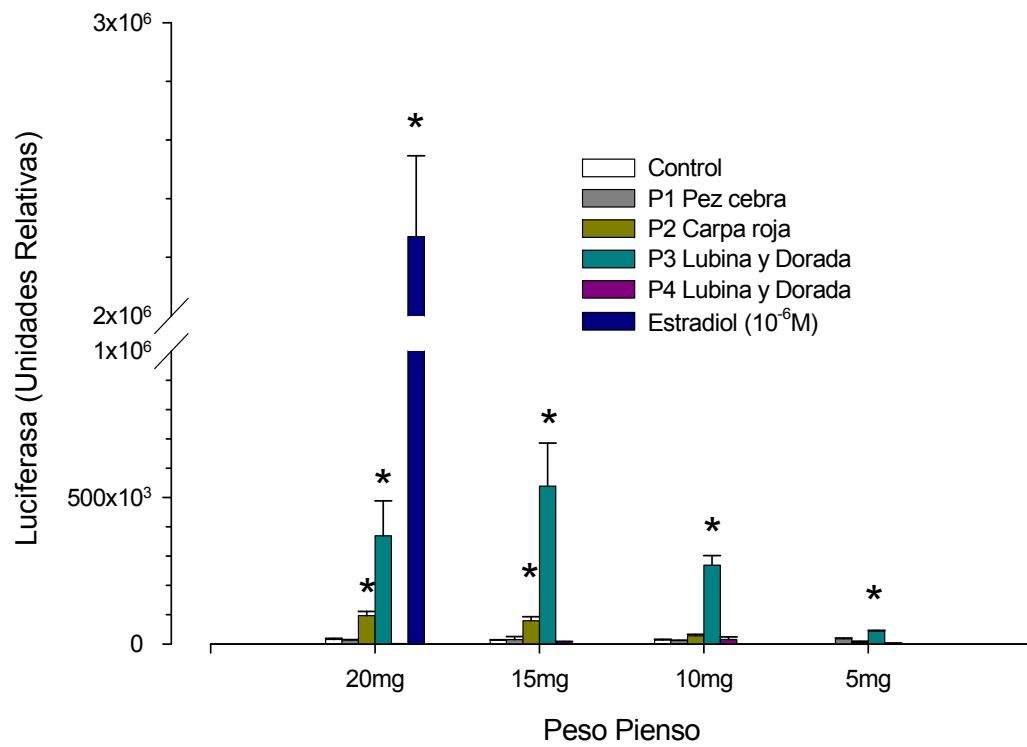


Fig. 32. Detección de actividad estrogénica en piensos comerciales para peces utilizando el sistema celular desarrollado (Fig. 31). Los valores representan la media + S.E.M. * $p < 0.05$ vs. Control.

DISCUSIÓN

1) DISTRIBUCIÓN NEUROANATÓMICA DE LOS ERs.

Estudios previos llevados a cabo en la lubina han permitido caracterizar los tres subtipos de ERs identificados en peces (Halm et al., 2004). En el estudio presente, se ha establecido el patrón de distribución de los tres subtipos en el cerebro y en la pituitaria de la lubina mediante hibridación *in situ*. Los resultados demuestran una expresión diferencial que sugiere funciones no redundantes. La amplitud y diversidad de núcleos y áreas cerebrales en los que aparecen expresados los tres subtipos, indica, que los estrógenos están implicados en numerosos procesos fisiológicos. El Esr2b presenta una distribución mucho más restringida que la observada para el Esr1 y Esr2a. Dicha restricción sugiere que el Esr2b podría tener funciones más específicas. Su expresión en el área preóptica e hipotálamo basal podría indicar un papel principal en la regulación neuroendocrina. Sin embargo, la expresión del Esr2b en las áreas anteriores solapa con la del Esr1 y Esr2a. Por tanto, tampoco sería descartable que el Esr2b ejerciera un papel modulador de la actividad de los otros dos subtipos.

Hasta el descubrimiento en mamíferos del subtipo Esr2, se desconocía cómo los estrógenos podían ejercer efectos en determinadas áreas cerebrales en las que no se detectaba la expresión de ERs. Tras el descubrimiento de este nuevo subtipo, los estudios inmunohistoquímicos permitieron establecer los patrones de distribución del Esr1 y Esr2 en el cerebro de ratón (Mitra et al., 2003). Los resultados indican que el subtipo Esr1 se expresa principalmente en regiones cerebrales implicadas en la función reproductiva, como son: el núcleo medial hipotalámico, núcleo del lecho de la estría terminal, núcleo ventromedial y parte posterodorsal de la amígdala medial. Por el contrario, el subtipo Esr2 se encuentra distribuido de manera más amplia por el hipocampo y la amígdala. Ambas regiones son conocidas por estar relacionadas con la memoria y el aprendizaje (Mitra et al., 2003).

Dilucidar el papel que desempeñan los ERs en aquellas áreas cerebrales en las que se detecta la expresión de más de un subtipo, es complejo. El estudio de las interacciones entre los diferentes subtipos, así como con otras moléculas incluidas en sus rutas de acción, desvela que ambos receptores pueden ejercer efectos opuestos (Rocha et al., 2005, Walf y Fryre, 2007, Sugiyama et al., 2010). Esta acción antagónica hace que los efectos de los estrógenos puedan ser impredecibles. En algunas ocasiones, el fenotipo observado como consecuencia de la pérdida de un subtipo se debe al resultado de la sobreactividad del subtipo que permanece, más que a la ausencia del sustraído, sugiriendo que ambos receptores se modulan entre sí (Sugiyama et al., 2010).

El análisis de los resultados obtenidos en la lubina, comenzando desde la parte más rostral de su cerebro, muestran la ausencia de expresión de los tres subtipos de ERs en los bulbos olfatorios. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otras especies de peces, en los cuales los tres subtipos se expresan de forma intensa (*Astatotilapia burtoni*, Munchrath y Hofmann, 2010). En los hemisferios telencefálicos de la lubina se detecta expresión del Esr1 y Esr2a. La expresión del Esr1 en el Vd, Vv y Vp coincide con la detectada en el pez guardiamarina (*Porichthys notatus*, Forlano et al., 2005) y en el cíclido africano (Munchrath y Hofmann, 2010). De igual forma, la expresión del Esr2a en el Vd y Vv coincide con los datos publicados para el cíclido africano (Munchrath y Hofmann, 2010), aunque en esta última especie también se detecta expresión de los tres subtipos en el Vs y núcleo entopeduncular (E) del área ventral. Estudios de unión específica a receptores, desarrollados en el pez dorado (Kim et al., 1978), “platy” (*Xiphophorus maculatus*, Kim et al., 1979) y la lamprea de río (*Ichthyomizon unicuspis*, Kim et al., 1980), demuestran que el [³H] 17β-estradiol, inyectado intracerebralmente, se une de forma específica a las neuronas de la región telencefálica ventral. El Vv, junto con el Vs y Vp, reciben proyecciones de los bulbos olfatorios y podrían ser homólogos al septo lateral, núcleo del lecho de la estría terminal y la amígdala basal del cerebro de mamíferos, respectivamente (Northcutt, 1995, Forlano et al., 2005). Los experimentos desarrollados en la lubina solo detectan expresión para el Esr1 en la región dorsal telencefálica. En concreto, se localizan transcritos del subtipo anterior en el Dc. Estos resultados coinciden con los hallados en el pez guardia marina (Forlano et al., 2005) y en el cíclido africano, especie en la que también se verifica la presencia de los tres subtipos en las partes dorsal, medial y lateral del telencéfalo dorsal (Munchrath y Hofmann, 2010). En contraste con todos estos resultados, los experimentos realizados en el pez zoárcido o viruela (*Zoarces viviparus*), pez cebra, trucha arcoíris y corvina del Atlántico no muestran expresión de ninguna de las formas del receptor en el área telencefálica (Andreassen et al., 2003, Menuet et al., 2002, 2003, Hawkins et al., 2005).

En mamíferos se ha corroborado la presencia de transcritos de los ERs en los bulbos olfatorios y telencéfalo. En los bulbos olfatorios de la rata se encuentra expresión del Esr2 pero no del Esr1 (Shughrue et al., 1997). Por el contrario, en los bulbos olfatorios del ratón se detecta síntesis tanto del Esr1 como del Esr2 (Merchenthaler et al., 2004). Ambos subtipos solapan también en el hipocampo, el septo lateral y medial, el núcleo del lecho de la estría terminal y en la amígdala de la rata y el

ratón (Shughrue et al., 1998, Shughrue y Merchenthaler, 2001 Merchenthaler et al., 2004). El hipocampo y la amígdala de mamíferos parecen corresponder a los núcleos telencefálicos Dl y Dm en peces, respectivamente (Wullimann y Mueller, 2004, Nieuwenhuys, 2009).

Dentro del área preóptica, se detecta una señal positiva prominente para los tres subtipos de ERs. Los tres solapan su expresión en el NPOpc y NPOav. Estas dos subdivisiones del área preóptica rostral corresponden al núcleo preóptico parvocelular anterior (PPa, Bradford y Northcutt, 1983), donde también se verifica la presencia de transcritos para los tres subtipos en el pez cebra (Menuet et al., 2002), corvina del Atlántico (Hawkins et al., 2005) y cíclido africano (Munchrath y Hofmann, 2010). En la trucha arcoíris y pez guardiamarina el *Esr1* se expresa en el NPOpc y NPOav (Menuet et al., 2003, Forlano et al., 2005), mientras que en el pez zoárcido el subtipo anterior se detecta únicamente en el NPOpc (Andreassen et al., 2003). De manera similar a lo detectado en la corvina del Atlántico, pez guardiamarina y cíclido africano se encuentra expresión del *Esr1* y *Esr2a* en el PM de la lubina. En el “platy”, Kim y coautores demuestran también la presencia de células dependientes de estrógenos en el PM del área preóptica (Kim et al., 1979).

Basándose en la localización y función del *Esr1*, Forlano y coautores sugieren que el NPOpc y NPOav son homólogos al núcleo periventricular anteroventral (AVPV) del área preóptica de mamíferos, mientras que el PM es homólogo del núcleo preóptico medial (MPN, Forlano et al., 2005). Sin embargo, los estudios publicados por Northcutt establecen la homología con los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular, respectivamente (Northcutt, 1995). Los trabajos llevados a cabo en rata y ratón confirman la presencia de los dos subtipos de ERs en el AVPV y en el MPN (Shughrue et al., 1997, Merchenthaler et al., 2004), pero también en el supraóptico y paraventricular (Merchenthaler et al., 2004). Continuando en el área preóptica, el trabajo presente demuestra, por vez primera en peces, la presencia de expresión de los ERs en el NAPv, NPPv y NSC. Si bien, el *Esr1* aparece expresado en los tres núcleos, solo se detectan transcritos para el *Esr2a* en el NAPv y NSC. El NAPv corresponde, según la nomenclatura de Bradford y Northcutt, al núcleo preóptico parvocelular posterior (PPp, Bradford y Northcutt, 1983), donde se corrobora la presencia del subtipo *Esr1* en la corvina del Atlántico, así como la de los subtipos *Esr1* y *Esr2a* en el NSC (Hawkins et al., 2005).

La región hipotalámica presenta gran variabilidad, lo que dificulta establecer homologías de sus diferentes núcleos entre los vertebrados (Northcutt et al., 1995). Esta complejidad se acentúa en peces debido a la gran diversidad de especies existentes dando lugar a diferencias en sus anatomías cerebrales (Tena-Sempere et al., 2012), y a la ausencia de un consenso en la nomenclatura para su designación. En el hipotálamo tuberal, los tres subtipos de ERs se expresan en las áreas dorsal y ventral de su región caudal, coincidiendo con la apertura del receso infundibular. Estas áreas se clasifican como NRLd, NRLv, NRLl y NRP de acuerdo con la nomenclatura cerebral de la lubina (Cerdá-Reverter et al., 2001a). Según la nomenclatura de Bradford y Northcutt (1983), el NRLd corresponde al núcleo tuberal posterior (NTP), el NRLv corresponde a la zona ventral del hipotálamo periventricular (Hv), y el NRLl corresponde a la zona dorsal del hipotálamo periventricular (Hd). La zona rostral del NRP coincide con el Hv mientras que la región caudal del núcleo anterior, junto con el NSV, corresponde a la zona caudal del hipotálamo periventricular (Hc). La expresión del Esr1 en el hipotálamo caudal de la lubina coincide con la detectada en el pez cebra (Menuet et al., 2002) y en la corvina del Atlántico (Hawkins et al., 2005). Sin embargo, en el pez cebra no se detecta expresión del Esr2b en el Hv, y sí en las áreas equivalentes de la lubina y de la corvina del atlántico (Hawkins et al., 2005). Por el contrario, en esta última especie, no se localiza RNAm de los subtipos Esr2 en el NRP, ni del subtipo Esr2a en el NRL (Hawkins et al., 2005).

En la lubina, la presencia de transcritos de los ERs no queda circunscrita únicamente a la zona caudal del hipotálamo tuberal. El Esr1 y Esr2a, solapan su expresión de manera rostral en el NLTd, NLTv y NLTl. El Esr2b se expresa únicamente en la parte inferior del núcleo anterior. Se detecta también RNAm del Esr2a en el NLTm y NLTi, y del Esr1 en el NAT, NSV y en el lóbulo inferior hipotalámico. Dentro de dicho lóbulo, la presencia de este último subtipo queda circunscrita a los núcleos NDLLm, NDLLl y NCLl. Las diferentes zonas del NLT se encuentran incluidas en el Hd y Hv del pez cebra (Wullimann et al., 1996) y en el hipotálamo dorsal (DH), hipotálamo ventral (VH) y núcleo lateral hipotalámico (LHn) del pez cíclido (Fernald y Shelton, 1985). Los resultados obtenidos para la expresión del Esr1 dentro del hipotálamo tuberal en el pez guardiamarina (Forlano et al., 2005) coinciden con los obtenidos en la lubina. Se ha constatado también la presencia de expresión del Esr1 en el NLT del pez zoárcido (Andreassen et al., 2003), trucha arcoíris (Menuet et al., 2001) y pez cebra (Menuet et al., 2002). A diferencia de las especies anteriores, los tres subtipos se

expresan en el NLT, NAT, NDLI y NCLI del cíclido africano (Munchrath y Hofmann, 2010), y en el NLT y NAT de la corvina del Atlántico (Hawkins et al., 2005).

La expresión de los ERs en el cerebro de la lubina no está únicamente restringida a regiones neuroendocrinas. Todos los núcleos del tálamo dorsal y ventral presentan expresión de los ERs en la lubina. Se constata la presencia de señal positiva de hibridación para el *Esr1* en el VM, VL e I del tálamo dorsal, y en el A, CP y DP del tálamo ventral. El subtipo *Esr2a* solapa su expresión con el subtipo *Esr1* en el VM y es, a su vez, el único subtipo presente en el NTe. La expresión de los ERs en los núcleos talámicos coincide parcialmente con la encontrada en el cíclido africano (Munchrath y Hofmann, 2010). Sin embargo, en esta última especie se detectan transcritos de los tres subtipos en el VM, habénula (NHd, NHv) epitalámica, y núcleo pretalámico (PN), el cual es homólogo al NPGa del tubérculo posterior en la lubina.

En el tubérculo posterior se detecta expresión de los subtipos *Esr1* y *Esr2a*. Ambos receptores solapan su expresión en el TLa y CM. El *Esr1* es el que presenta una distribución más amplia en dicha área cerebral. Se localiza su presencia en el NPGl, NPGm, NPGc y NGT, así como, en el NGa, NGp, PT y LT. Por el contrario el *Esr2a* se encuentra exclusivamente en el TPp y NPT. A diferencia de lo hallado en la lubina, el *Esr2b*, pero no el *Esr2a*, se expresa en el NPT del pez cebra (Menuet et al., 2002) y la corvina del Atlántico (Hawkins et al., 2005), mientras que en el pez guardiamarina y en el cíclido africano es el *Esr1*, el subtipo hallado en el TPp (Forlano et al., 2005, Munchrath y Hofmann, 2010). En el cíclido africano, se detecta la presencia de RNAm para los tres subtipos de ERs en el NPGc, NG, TLa y CM (Munchrath y Hofmann, 2010).

El estudio presente demuestra por vez primera la presencia de ERs en el área pretectal de peces, siendo el *Esr1* el único subtipo para el que se hallan transcritos en esta área. En concreto, se localiza su expresión en el NPC, NC, Psi, y PSm. La señal positiva de hibridación es especialmente intensa en éstos tres últimos.

El *Esr1* es el único subtipo presente en el sinencéfalo de la lubina. Éste, aparece expresado en el PPD, PPv y NP, así como, en el nMLF y SCO. Al igual que lo ocurrido en la lubina, en el pez guardiamarina se encuentra RNAm para el subtipo anterior en el nMLF (Forlano et al., 2005), mientras que en el cíclido africano los tres subtipos de ERs se expresan en el PPD y PPv (Munchrath y Hofmann, 2010).

La expresión de los ERs dentro del mesencéfalo de la lubina abarca tanto al techo como al tegmento mesencefálico. En peces, el techo óptico es una estructura

laminada formada por cuatro capas principales. La expresión del Esr1 y Esr2a en el techo óptico de la lubina, queda circunscrita al estrato granular de la PGZ, su capa más interna. La presencia de ERs en la PGZ de la lubina coincide con la previamente encontrada en el pez guardiamarina (Forlano et al., 2005). En el cíclido africano, sin embargo, se verifica señal positiva de hibridación para los tres subtipos en su techo óptico, así como en el toro longitudinal (TLo, Munchrath y Hofmann, 2010). Dentro del tegmento mesencefálico, solo se encuentra solapamiento de la expresión del Esr1 y Esr2a en el NLVa. Mientras que la expresión del Esr2a en el tegmento queda limitada al núcleo anterior, el Esr1 se expresa también en el DT, NLVc y NI, así como en las tres partes del *torus* semicircular (TSl, TSc y TSv) donde previamente se había corroborado ya la presencia de dicho subtipo en el pez guardiamarina (Forlano et al., 2005). De manera similar a lo detectado en su techo óptico, en el cíclido africano, se detecta RNAm para los tres subtipos en el NLV y TS (Munchrath y Hofmann, 2010).

La presencia de ERs en el rombencéfalo de la lubina está marcada, prácticamente en exclusividad, por el Esr1. Únicamente se detecta expresión del Esr2a en el estrato granular de la Vce. Por el contrario, los resultados del estudio realizado en la corvina del Atlántico señalan que el subtipo de ER expresado en esta área, es el Esr2b (Hawkins et al., 2005). Los resultados obtenidos en el cerebelo de la lubina corroboran lo defendido por los autores anteriores los cuales señalan que los subtipos Esr2 podrían estar implicados en el aprendizaje motor y respuestas emocionales.

Fuera del cerebelo, la expresión del subtipo Esr1 en los núcleos rombencefálicos de la lubina es la primera en ser constatada en peces. Sus transcritos se detectan en el SR, así como también, en la formación reticular, incluyendo al RS, RM, RI y RL, y en los núcleos AON, MAG, MON y DON del área octavolateral. De manera más caudal, se verifica una señal positiva de hibridación intensa en neuronas somatomotoras del nIII, nIV, nVIr y nVlc y en los núcleos visceromotores, Vm, VIIIm y IXm. Finalmente, se localiza la expresión del Esr1 en el VLo.

2) BASES ANATÓMICAS DEL CONTROL ESTROGÉNICO DE LA REPRODUCCIÓN

En peces, los esteroides gonadales regulan la disponibilidad de gonadotropinas mediante sistemas de retroalimentación que actúan de manera indirecta a través del SNC, y de manera directa sobre la misma pituitaria (Blázquez et al., 1998, Yaron et al., 2003, Zohar et al., 2010). Los circuitos neuronales centrales transmiten señales

hormonales a la pituitaria. En peces, la pituitaria está inervada directamente desde el cerebro lo cual ha permitido establecer mediante experimentos de marcaje retrógrado las principales áreas cerebrales hipofisiotrópicas. Estudios en varias especies demuestran que los principales cuerpos neuronales que proyectan a la pituitaria son el área preóptica y el hipotálamo tuberal. Sin embargo, el telencéfalo ventral, el tubérculo posterior y la formación reticular contribuyen también, aunque en menor medida a dicho control (revisado por Cerdá-Reverter y Canosa, 2009). Las neuronas del área preóptica e hipotálamo están en contacto con el sistema sanguíneo. Este contacto permite integrar la información periférica que contribuye al control de la pituitaria a través de los sistemas de retroalimentación (Mukuda et al., 2005). Los estrógenos regulan la fisiología de las gonadotropinas a través de dicha vía (Yaron et al., 2003). Además, la actividad aromataasa existente en dichas áreas cerebrales es crucial para la síntesis central de estrógenos (Piferrer y Blázquez, 2005).

Los resultados observados en la lubina y en otras especies, junto con los hallados en aves y mamíferos (Foidart et al., 1999, Shughrue y Merchenthaler, 2001, De Vries y Simerly, 2002, Merchenthaler et al., 2004), señalan al complejo área preóptica-hipotálamo, como una región conservada en vertebrados respecto a la expresión de los ERs. El trabajo presente demuestra que los tres subtipos de ERs se expresan de manera intensa en el área preóptica e hipotálamo de la lubina, suministrando una base neuroanatómica en la regulación mediante estrógenos, de manera indirecta y vía cerebro, de la síntesis y secreción de las gonadotropinas.

Al igual que en mamíferos (Sealfon y Millar, 1995), en peces, la GnRH es un factor clave en la síntesis y liberación de las gonadotropinas (Swanson et al., 2003). En la tilapia, la administración de 17β -estradiol en machos inmaduros castrados provoca un aumento de neuronas GnRH (Parhar et al., 2000). En la anguila, el 17β -estradiol estimula la producción GnRH-1 (Montero et al., 1995). Los mismos efectos se observan en el pez gato tras la administración de testosterona, y no, de andrógenos no aromatizables, sugiriendo que dicho efecto se produce por la aromatización a estrógenos de la testosterona (Dubois et al., 1998). Trabajos desarrollados en la lubina ponen de manifiesto la presencia de neuronas productoras de GnRH-1 en el Vv, NPOpc y NPOav (González-Martínez et al., 2001, 2002). La presencia de expresión de los tres subtipos de ERs en los núcleos anteriores sugiere que los estrógenos podrían estar implicados en la síntesis central de GnRH. Estas áreas dependientes de estrógenos y productoras de GnRH-1 aportarían una base neuroanatómica para el control de las gonadotropinas por

estrógenos, vía cerebro. Por otro lado, los estrógenos pueden también regular las funciones de la GnRH a través de la modulación de sus receptores. Estudios de hibridación *in situ* llevados a cabo en la lubina (González-Martínez et al., 2004) demuestran la presencia del receptor de GnRH (GnRH-R) en el NPOav, núcleo en el que previamente se había verificado la presencia de neuronas dopaminérgicas en la especie anterior (Batten et al., 1993). Estas neuronas dopaminérgicas expresan ERs e inhiben de manera directa la secreción de gonadotropinas en la trucha arcoiris (Linard et al., 1996). Sin embargo en la lubina, la acción de la DA sobre el control de la secreción de gonadotropinas parece ser escasa (Prat et al., 2001). El NPOpc y PM, cuyas neuronas expresan el GnRH-R en la lubina (González-Martínez et al., 2004), son también considerados como centros neuroendocrinos implicados en el control de las funciones hipofisarias (Cerdá-Reverter y Canosa, 2009).

El NLT y NRL hipotalámicos son otros núcleos donde en la lubina se detecta, tanto la presencia del GnRH-R (González-Martínez et al., 2004) como la de ERs. Al igual que con los núcleos neuronales productores de GnRH-1, la presencia de ERs en los núcleos preópticos e hipotalámicos de la lubina en los que se corrobora la expresión del GnRH-R, sugieren una acción de los estrógenos sobre el control de la síntesis y secreción de gonadotropinas a través de los sistemas de retroalimentación vía cerebro. Sin embargo, estudios inmunohistoquímicos demuestran que, en peces, las neuronas GnRH no expresan ERs (Navas et al., 1995, Zohar et al., 2010).

En mamíferos, al igual que en peces, se cree que los estrógenos actúan de manera indirecta sobre las neuronas GnRH. Estudios diversos indican la ausencia de ERs en neuronas GnRH (Shivers et al., 1983, Langub et al., 1991, Oakley et al., 2009), sugiriendo la existencia de interneuronas que medien en la acción de estos esteroides sobre el sistema GnRH. Estudios llevados a cabo en el ratón indican que la eliminación del *Esr1* en neuronas POMC del núcleo arcuato altera la retroalimentación negativa producida por estrógenos sobre la GnRH, sugiriendo que estas neuronas podrían ser parte del sistema mediador de los efectos de los estrógenos sobre la GnRH (Xu et al., 2011). Experimentos desarrollados en rata demuestran la presencia de proyecciones de neuronas POMC sobre el área preóptica donde se encuentran las neuronas GnRH (Simonian et al., 1999). Alternativamente al sistema *Esr1*/POMC, las neuronas *KISS1* ofrecen otra ruta a través de la cual los estrógenos pueden ejercer su acción sobre la GnRH. Las neuronas *KISS1* del núcleo arcuato de ratones expresan el *Esr1* (Cravo et al., 2011), y los estrógenos disminuyen su expresión (Smith et al., 2005). Sin embargo,

experimentos adicionales a los anteriores demuestran la presencia del Esr1 y Esr2 en neuronas GnRH de mamíferos (revisado por Wolfe y Wu, 2012). Estos estudios, además de señalar la presencia tanto de RNAm, como de proteína, en dichas neuronas, resaltan la existencia, sobre las mismas, de retroalimentaciones positivas y negativas del 17 β -estradiol mediadas por los ERs *in vivo* e *in vitro*. Wolfe y Wu sugieren que las acciones que el 17 β -estradiol ejerce sobre la GnRH de manera indirecta a través de interneuronas, estarían mediadas por el Esr1. Por el contrario, los efectos estrogénicos producidos de manera directa sobre las neuronas GnRH estarían mediados, principalmente, por el Esr2 (Wolfe y Wu, 2012). La activación del Esr2 desencadena, por un lado, acciones no genómicas rápidas implicadas en los potenciales eléctricos de las neuronas GnRH, y por otro, acciones genómicas clásicas como la expresión de GnRH y su posterior secreción (revisado por Wolfe y Wu, 2012).

A diferencia de lo anterior, como ya se ha mencionado, los resultados existentes hasta el momento, evidencian la ausencia de ERs en neuronas GnRH de peces. Por lo tanto, los efectos de los estrógenos sobre el sistema GnRH deberían ejercerse de manera indirecta a través de otros grupos neuronales. El reciente descubrimiento en peces del sistema KISS permite explicar cómo los estrógenos podrían regular la síntesis y secreción de GnRH. Experimentos de hibridación *in situ* en peces sitúan la expresión de KISS1 y KISS 2 en el área preóptica e hipotálamo tuberal principalmente. En el medaka (Mitani et al., 2010), el KISS1 se expresa en el NPPv y en el NLTv. Por el contrario, el KISS2 se expresa en el NRL (Mitani et al., 2010) al igual que en el pez cebra (Kitahashi et al., 2009). En la lubina, se verifica la presencia de transcritos para el KISS1 en neuronas hipotalámicas del NLTm y NRP, así como en la pituitaria. Por el contrario, el KISS2 se detecta en el NPOav del área preóptica y en el NRL hipotalámico (Escobar et al., 2010).

La administración de KISS en diferentes especies de peces demuestra un aumento de los subtipos de GnRH implicados en la regulación de las gonadotropinas (Tena-Sempere et al., 2012). En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que las neuronas GnRH expresan receptores KISS en peces (Parhar et al., 2004). En la lubina, los receptores KISS se expresan en núcleos del telencéfalo, área preóptica e hipotálamo como el Vv, NPOpc-av, PM y NRL (Escobar et al., 2010), donde previamente se corrobora la presencia de GnRH-1 y GnRH-R (González-Martínez et al., 2001, 2002, 2004). Se desconoce las proyecciones que las neuronas KISS establecen en la lubina. Sin embargo, estudios inmunohistoquímicos en el pez cebra ponen de manifiesto que las

neuronas hipotalámicas KISS2 proyectan al área preóptica, hipotálamo caudal, tálamo y mesencéfalo (Servili et al., 2011). En estos estudios, se demuestra que en el área preóptica dichas proyecciones se establecen sobre neuronas GnRH-3.

Si bien existe certeza de la implicación de las neuronas KISS en la función reproductora, el reciente descubrimiento del KISS2 genera confusión a la hora de establecer qué subtipo ejerce un papel principal en el control del ciclo reproductor. Estudios en diferentes especies de peces, incluida la lubina, señalan al KISS2 como el subtipo principal en la regulación del eje CPG (Kitahashi et al., 2009, Felip et al., 2009, Tena-Sempere et al., 2012). En el pez cebra, el KISS2 genera una mayor expresión de la FSH β y LH β (Kitahashi et al., 2009). En la lubina, además de la presencia del KISS2 en el NPOav, se ha comprobado que la administración de KISS2 induce una mayor liberación de gonadotropinas que la KISS1 (Felip et al., 2009). Por el contrario, la administración de KISS2 no produce ninguna variación en los niveles de GnRH-1 de la especie anterior, tanto en individuos púberes como en impúberes (Felip et al., datos no publicados). Experimentos de hibridación *in situ* simultánea para el KISS1 y KISS2 en individuos de medaka, bajo condiciones que favorecen o inhiben su reproducción, demuestran que es el subtipo KISS1 el implicado de manera central en la reproducción de esta especie mientras que el subtipo KISS2 ejercería un papel secundario sobre el control del eje CPG o incluso podría desempeñar funciones no relacionadas con la fisiología de la reproducción (Mitani et al., 2010). Basándose en consideraciones filogenéticas, Mitani y coautores sugieren que los resultados contradictorios observados en las distintas especies de vertebrados respecto a las funciones reproductivas de las KISS, estribarían en los procesos de neofuncionalización y subfuncionalización génica (Mitani et al., 2010).

Los estrógenos varían los niveles de KISS. En el pez cebra, tratamientos con 17 β -estradiol inducen un aumento de KISS2 en el hipotálamo, así como de sus receptores (Servili et al., 2011). De manera similar, la ovariectomización del medaka disminuye los niveles de KISS1 en el NLTV; y la administración posterior de 17 β -estradiol restaura sus niveles centrales (Kanda et al., 2008, Mitani et al., 2010). Además, experimentos de localización conjunta en la especie anterior demuestran la expresión del Esr1, y en menor medida la de los subtipos Esr2, en las neuronas KISS1 del NLTV. Dichos resultados están en consonancia con los niveles altos de expresión de los tres subtipos de ERs encontrados en los núcleos donde se expresan las KISS y sus receptores en la lubina, así como con los experimentos de localización conjunta de los

ERs y las KISS, donde se demuestra una expresión del *Esr1* y *Esr2a* en neuronas KISS1 del NLTm, y una posible interacción entre neuronas KISS2 y neuronas expresando el *Esr2a* en el NRL de la lubina (Escobar et al., 2011).

Alternativamente al sistema KISS, estudios en peces, incluida la lubina, demuestran que la administración central y periférica de NPY estimula la secreción de LH. Esta acción se produce, tanto, de manera directa sobre las células gonadotrópicas (Kah et al., 1989, Danger et al., 1991, Cerdá-Reverter et al., 1999), como de manera indirecta a través de la estimulación de la secreción de GnRH (Danger et al., 1991, Peng et al., 1993). La presencia de una expresión intensa de NPY en núcleos del área preóptica e hipotálamo tuberal de la lubina (Cerdá-Reverter et al., 2000c) donde también se detecta la expresión de los ERs, permite sugerir una acción de los estrógenos sobre el control de la producción de GnRH mediada por el NPY.

Por otro lado, a pesar de no haberse corroborado la presencia de ERs en neuronas GnRH de peces, sí se localizan EREs en la región promotora de este neuropéptido. En el salmón (*Oncorhynchus nerka*) y en la tilapia se detecta la presencia de EREs y elementos de respuesta relacionados con los ERs en las regiones promotoras de la GnRH-1 y GnRH-2 (Higa et al., 1997, Kitahashi et al., 2005). Esto permite sugerir, que al igual que lo observado recientemente en mamíferos (Wolfe y Wu, 2012), la regulación por estrógenos del sistema GnRH podría estar, en parte, regulada de manera directa sobre las propias neuronas GnRH. Será necesaria la realización de más estudios para dilucidar en profundidad la contribución de los estrógenos sobre el control del sistema GnRH en peces.

Experimentos llevados a cabo en aves han permitido identificar un neuropéptido hipotalámico denominado, hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH, Tsutsui et al., 2007). Al igual que en aves, en mamíferos se ha demostrado un efecto inhibitorio de la GnIH sobre la producción de gonadotropinas (Tsutsui et al., 2010). Dicho efecto se produce tanto a nivel cerebral sobre neuronas GnRH del área preóptica e hipotálamo, como de manera directa sobre la misma pituitaria (Tsutsui et al., 2010). De manera similar, se ha detectado la presencia de ortólogos putativos de la GnIH en peces (Sawada et al., 2002, Osugi et al., 2006, Osugi et al., 2011). Pese a existir controversia sobre el papel de la GnIH en vertebrados inferiores (Tsutsui et al., 2010, Zhang et al., 2010), experimentos en el pez cebra (Zhang et al., 2010) y pez dorado (Moussavi et al., 2012) demuestran que este neuropéptido produce una inhibición en la liberación de la LH.

Los estrógenos modulan los efectos que la GnIH ejerce sobre las gonadotropinas. En aves, tratamientos con 17β -estradiol durante la maduración sexual disminuyen los niveles de expresión del receptor de GnIH en la pituitaria, los cuales se expresan en ambos tipos de gonadotropos (Maddineni et al., 2008). En el pez dorado, las neuronas putativas GnIH del NPPv proyectan al Vv, NLT, techo óptico y pituitaria (Sawada et al., 2002). Los núcleos y áreas anteriores expresan ERs, GnRH o sus receptores en la lubina, suministrando una base neuroanatómica para la posible acción de los estrógenos sobre el control de las gonadotropinas a través del sistema GnIH-GnRH y sobre la acción de la GnIH a nivel de la pituitaria.

La acción de la GnRH sobre la función reproductora no está ceñida únicamente a regular la disponibilidad de gonadotropinas. En varias especies de vertebrados incluidas algunas de peces se han descrito conductas asociadas al fenómeno reproductivo (Remage-Healey y Bass, 2006). La estimulación eléctrica de áreas talámicas en la lubina hermafrodita (*Serranus subligarus*) desencadena respuestas comportamentales reproductivas como cambios en el patrón de coloración y liberación de gametos (Demski y Dulka, 1986). A partir de experimentos desarrollados en el cíclido africano (*Haplochromis burtoni*), especie en la que se han descrito comportamientos asociados al éxito reproductivo, White y coautores proponen que la GnRH-3 estaría implicada en la modulación de los sistemas sensoriales y de motivación, mientras que la GnRH-2 regularía respuestas motoras asociadas a la reproducción (White et al., 1995). En la lubina, se detecta la presencia de fibras GnRH-3 y GnRH-2 en áreas sensoriales y motoras como el tálamo ventral, área pretectal, techo óptico, tegmento mesencefálico y rombencéfalo (González-Martínez et al., 2002). De manera similar, el trabajo presente demuestra la expresión del Esr1 y Esr2a en el nMLF sinencefálico, donde se produce la síntesis de GnRH-2, el VM talámico, el NPC pretectal, la PGZ del techo óptico, el TS en el tegmento mesencefálico, la VCe en el cerebelo y la formación reticular, el área octavolateral, los núcleos somatomotores, los visceromotores y el VLo en el rombencéfalo. Atendiendo a lo anterior, cabe la posibilidad, que los estrógenos puedan actuar sobre las conductas reproductivas en la lubina a través de la regulación de los efectos de la GnRH en dichas áreas.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la regulación del eje CPG mediada por GnRH estaría modulada parcialmente por los estrógenos a través de sus tres subtipos de receptores, mientras que los subtipos Esr1 y Esr2a estarían, más bien, implicados en la regulación de los efectos GnRH sobre el SNC.

Como ya se ha mencionado, el efecto de los esteroides gonadales sobre la regulación de la disponibilidad de gonadotropinas, se produce también de manera directa a nivel de la pituitaria. Los experimentos de localización conjunta en esta glándula de la lubina demuestran que los tres subtipos de ERs se expresan en sus células gonadotropas. Los resultados de la doble hibridación *in situ* señalan una expresión intensa de los tres subtipos de ERs en los gonadotropos de LH, sugiriendo que los tres pueden estar implicados en el control de la expresión de dicha gonadotropina. Los experimentos se realizaron con hembras durante la fase final de la ovulación, cuando los niveles plasmáticos de LH son máximos (Navas et al., 1998), corroborando el papel de los estrógenos en la síntesis/secreción de la LH. Aunque no se realizaron análisis cuantitativos, la expresión de los subtipos Esr2, pero no así la del Esr1, en los gonadotropos de FSH parece ser inferior a la encontrada en los gonadotropos de LH, siendo en ocasiones difícil de detectar.

Los estudios desarrollados en los últimos años para determinar los niveles de gonadotropinas en el plasma sanguíneo y pituitaria de la lubina estaban circunscritos, únicamente, a la LH debido a la falta de ensayos para la detección de FSH (Mateos et al., 2006). Estudios recientes llevados a cabo en la lubina han permitido purificar y caracterizar la FSH (Molés et al., 2008) y validar un ensayo para su detección (Molés et al., 2012). Análisis cuantitativos llevados a cabo en hembras de lubina durante su ciclo reproductivo determinan, que durante el período de ovulación, en la pituitaria, al igual que para la LH, se alcanzan los niveles máximos de expresión y síntesis de FSH (Mateos et al., 2003, Molés et al., 2011). Sin embargo, los niveles en plasma de ambas gonadotropinas son significativamente distintos. Mientras el nivel máximo de LH se detecta durante la ovulación, los niveles máximos de FSH se alcanzan al comienzo de la vitelogénesis y durante el desarrollo de la misma, encontrándose los niveles mínimos durante la ovulación. Al igual que en las hembras, en machos se producen diferencias en el patrón de síntesis y secreción de ambas gonadotropinas. Mientras los niveles de expresión de β -FSH y β LH van aumentando a lo largo de la espermatogénesis, hasta alcanzar sus máximos durante la espermiación (Mateos et al., 2003), los niveles plasmáticos difieren considerablemente. En plasma, la FSH va aumentando progresivamente acorde a los diferentes estados de desarrollo testicular y comienza a declinar con anterioridad al inicio de la espermiación. En cuanto a los niveles plasmáticos de LH, su aumento no es significativo a lo largo de las primeras fases de la espermatogénesis, pero sí al final del crecimiento gonadal y durante la espermiación

(Rocha et al., 2009, Molés et al., 2011, Molés et al., 2012). La similitud encontrada en ambas gonadotropinas en cuanto a su perfil de expresión y síntesis, pero no así en sus perfiles plasmáticos, sugieren un control diferente en su tasa de liberación en sangre (Moles et al., 2011, Molés et al., 2012). Esto explicaría la disminución en plasma de la FSH durante la ovulación/espermiación.

Experimentos llevados a cabo en la lubina han permitido caracterizar los receptores de FSH y LH (FSHR, LHR Rocha et al., 2007). El perfil estacional de expresión de ambos receptores en las gónadas de hembras y machos de la especie anterior, demuestra que la expresión del LHR es correlativa a los niveles máximos de LH presentes en el plasma y la pituitaria durante la espermiación y ovulación. Sin embargo de manera opuesta a los niveles plasmáticos de FSH, la expresión del FSHR es patente durante la espermiación y ovulación (Rocha et al., 2009). La explicación a esta discrepancia podría radicar en el tipo de estrategia reproductiva de la lubina. Esta especie presenta un desarrollo gametogénico sincrónico por grupos, presentando grupos de gametos con diferentes estados de desarrollo. La presencia del FSHR y niveles elevados de FSH en la pituitaria durante la ovulación/espermiación, serían necesarios para aquellos gametos que aun se encontrasen en fase de crecimiento (Rocha et al., 2009, Molés et al., 2011).

El bajo nivel de expresión de los subtipos ESR2 hallado en células gonadotropas productoras de FSH, podría sugerir un papel principal de dichos subtipos en la secreción de la FSH. Cabe la posibilidad de que los niveles de expresión de los subtipos ESR2 en dichos gonadotropos sean más consistentes durante estados más tempranos del ciclo reproductor que los detectados durante el periodo ovulatorio. Sin embargo, la expresión sustancial del ESR1 durante dichos estados finales ovulatorios, plantea incertidumbres sobre el papel fisiológico de los diferentes subtipos de ERs en el control de la síntesis y secreción de la FSH. La presencia de una expresión más patente del subtipo ESR1 en los gonadotropos de FSH podría indicar también, que es este subtipo el implicado en la inhibición de la secreción de dicha hormona durante el periodo ovulatorio. Será necesario la realización de análisis cualitativos y cuantitativos adicionales cubriendo todo el ciclo reproductivo de la lubina, así como experimentos farmacológicos con agonistas/antagonistas específicos, para dilucidar la funcionalidad de los tres subtipos de ERs en el control de la síntesis y liberación de las gonadotropinas.

Los efectos producidos por los esteroides gonadales sobre la síntesis y liberación de las gonadotropinas son ampliamente variables. Dependiendo de la especie, el género,

tipo de ciclo gametogénico, el estado puberal y del momento del ciclo reproductivo adulto, provoca que las retroalimentaciones por esteroides sean positivas o negativas (Yaron et al., 2003, Burger et al., 2004, Klenke, 2006, Zohar et al., 2010). Frecuentemente, la direccionalidad de los sistemas de retroalimentación cortos, que controlan las funciones de la pituitaria, se establece mediante experimentos *in vitro* con cultivos primarios de pituitaria. Sin embargo, los efectos de los esteroides gonadales observados *in vitro* pueden no corresponderse con los observados *in vivo* debido al solapamiento de las acciones producidas por los sistemas de retroalimentación largos, a través del SNC. En la anguila el 17 β -estradiol produce una acción estimulante de la expresión de la β LH *in vivo* y ningún efecto sobre la expresión de la β FSH. Por el contrario, dicho esteroide estimula la expresión de la β FSH y no causa efecto alguno sobre la de la β LH *in vitro* (Aroua et al., 2007). En la tilapia, la administración *in vivo* de 17 β -estradiol produce un descenso de los niveles de RNAm de β FSH y β LH, probablemente debido a una retroalimentación negativa causada sobre el sistema central GnRH. Por el contrario, *in vitro*, se produce un aumento de los niveles de expresión de β LH y ninguna variación en los de β FSH (Levavi-Sivan et al., 2006).

Experimentos *in vivo* realizados con implantes silásticos de 17 β -estradiol, testosterona, y el andrógeno no aromatizable dihidrotestosterona sobre una población mixta de lubinas en época de reposo sexual, demuestran una estimulación de la expresión de la subunidad β LH y una inhibición de la β FSH (Mateos et al., 2002). El estudio anterior no permite discernir si el efecto observado sobre la expresión de ambas gonadotropinas, se produce a nivel de la pituitaria o sí, por el contrario, es el resultado de las retroalimentaciones a nivel cerebral. A partir de experimentos *in vitro* con cultivos primarios de células de pituitaria, el estudio presente determinó el efecto directo que los esteroides sexuales ejercen sobre la síntesis de la FSH en la lubina. Los cultivos primarios se llevaron a cabo con pituitarias de animales macho en época de reposo sexual. Los tratamientos se realizaron con 17 β -estradiol y 11-cetotestosterona, el principal andrógeno no aromatizable en peces. El efecto sobre la producción de FSH se analizó mediante la cuantificación por dot-blot de la expresión de su subunidad β transcurridas 48, 72 y 96 horas desde la adición de ambos esteroides. Los resultados indican que tanto el 17 β -estradiol como la 11-cetotestosterona inhiben significativamente la expresión de dicha subunidad, demostrando que los efectos observados *in vivo* pueden estar mediados a través de una retroalimentación directa de los esteroides gonadales sobre los gonadotropos de FSH.

Experimentos con cultivos *in vitro* de gónadas de hembras de lubina adulta demuestran que la FSH estimula de manera significativa la liberación de 17β -estradiol. Los niveles máximos de estimulación se alcanzan al inicio de la gametogénesis favoreciendo la vitelogénesis en hembras (Molés et al., 2008). Estos resultados junto con los del estudio presente, permiten sugerir que el 17β -estradiol, ejercería una retroalimentación negativa sobre la producción de FSH a nivel de la pituitaria en época de reposo sexual impidiendo el desarrollo de los gametos, y por el contrario, podría producir una retroalimentación positiva sobre la hormona anterior en época de inicio de la gametogénesis.

La similitud encontrada en la direccionalidad de la retroalimentación producida por el 17β -estradiol en la lubina, tanto *in vitro* como *in vivo*, coincide con la hallada en el pez dorado. Sin embargo, a diferencia de lo observado en la lubina, en la especie anterior se detecta una estimulación en la expresión de la β FSH (Huggard-Nelson et al., 2002). En el pez dorado, el 17β -estradiol produce un aumento de la expresión de la β FSH tanto en individuos adultos al comienzo de su ciclo reproductivo, cuyos gametos se encuentran en un estado temprano de desarrollo y sus niveles de estrógenos son bajos, como en individuos maduros con gónadas completamente desarrolladas y niveles de estrógenos elevados (Huggard-Nelson et al., 2002). Al igual que en la lubina (Mateos et al., 2003), en el pez dorado los niveles de expresión de FSH son patentes a lo largo de todo el ciclo reproductivo adulto, aumentando acorde al grado de madurez sexual y disminuyendo al comienzo de la regresión gonadal. Como ya se ha mencionado, la direccionalidad de las retroalimentaciones por los esteroides gonadales varía según la fase del ciclo reproductivo en el adulto. Las diferencias en la direccionalidad de las retroalimentaciones por 17β -estradiol observadas en el pez dorado y la lubina puede deberse a los diferentes estados de madurez sexual de los animales experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*. La direccionalidad de las retroalimentaciones también varía en función del estado puberal del organismo. Al igual que en animales púberes, en los impúberes los esteroides gonadales actúan de manera directa sobre la pituitaria (Querat et al., 1991, Klenke, 2006). Experimentos *in vitro* con cultivos primarios de pituitaria de trucha arcoíris, señalan que el 17β -estradiol produce una estimulación de la β LH en juveniles y ningún efecto en los maduros (Xiong et al., 1994). Estudios *in vivo* con juveniles de lubina americana, indican que el 17β -estradiol produce una inhibición de la expresión de β FSH durante la primavera, cuando los individuos adultos de dicha especie

se encuentran en fase de maduración gonadal, y provoca el efecto opuesto sobre la β FSH (Klenke, 2006).

Para discriminar entre los efectos *per se* de los andrógenos, de los producidos como consecuencia de su aromatización a estrógenos, sobre la producción de gonadotropinas en la lubina, Mateos y colaboradores, realizan estudios *in vivo* con implantes silásticos del andrógeno no aromatizable dihidrotestosterona (Mateos et al., 2002). Los estudios *in vitro* sobre cultivo primario de células de pituitaria, que aquí se presentan, se llevaron a cabo con el andrógeno no aromatizable 11-cetotestosterona. Este esteroide, es el andrógeno principal implicado en el inicio de la espermatogénesis en peces (Schulz y Miura, 2002, Miura y Miura, 2003). Estudios llevados a cabo en la lubina sitúan a la 11-cetotestosterona como uno de los desencadenantes de la aparición de individuos sexualmente precoces en esta especie (Rodríguez et al., 2005). Experimentos con tratamientos de luz continua ponen de manifiesto una inhibición de la precocidad sexual en la lubina, la cual va acompañada de un descenso en los niveles de expresión de β FSH y de los niveles plasmáticos de 11-cetotestosterona (Felip et al., 2008).

Al igual que el 17β -estradiol, la 11-cetotestosterona produce una inhibición de la expresión de β FSH *in vitro* en individuos adultos de lubina en época de reposo sexual. Experimentos *in vitro* con gónadas masculinas de lubina adulta demuestran que la FSH estimula de manera significativa la liberación de 11-cetotestosterona al inicio de la gametogénesis (Molés et al., 2008) corroborando, de manera similar al 17β -estradiol, la existencia de una retroalimentación negativa y positiva durante la época de reposo sexual e inicio de la espermatogénesis, respectivamente. El trabajo presente demuestra que la acción inhibitoria de la 11-cetotestosterona puede ejercerse a nivel de la pituitaria. Experimentos *in vitro* con 11-cetotestosterona sobre cultivo primario de pituitarias de salmón, demuestran que dicho esteroide ejerce una acción directa sobre la pituitaria. La direccionalidad de esta retroalimentación varía según la fase del ciclo reproductivo del animal (Onuma et al., 2007).

El estudio *in vitro* se realizó con dosis farmacológicas (1 μ M) superiores a las dosis fisiológicas utilizadas *in vivo* (37 nM, Mateos et al., 2002). Las concentraciones de esteroides sexuales utilizadas en diferentes estudios *in vitro* para determinar su efecto sobre la regulación de gonadotropinas y factores asociados varían en un rango de 1 nM a 150 μ M (Huggard-Nelson et al., 2002, Ando et al., 2004, Levavi-Sivan et al., 2006, Cheng et al., 2007, Onuma et al., 2007, Lin y Ge, 2009, Lin et al., 2010). Las diferentes

concentraciones utilizadas en los estudios anteriores afectan los niveles de expresión de ambas gonadotropinas pero en ningún caso modifican la direccionalidad de sus efectos. En la mayoría de los casos, está sujeta al estado de desarrollo sexual del animal. En la tilapia, se observa un aumento de los niveles de expresión de β FSH a concentraciones de 350 y 700 nM en animales adultos tanto al comienzo como al final de su ciclo sexual (Huggard-Nelson et al., 2002). En el pez cebra, la adición de 17β -estradiol 1 nM produce un aumento de la expresión β FSH en animales maduros de ambos sexos. Sin embargo, dicho aumento se mantiene constante a dosis de 10 y 100 nM (Lin y Ge, 2009). Los niveles de expresión de la subunidad anterior en hembras de tilapia durante su fase de vitelogénesis no experimentan ninguna variación significativa tras la adición de 17β -estradiol a dosis comprendidas en un rango de 10 nM y 150 μ M (Levavi-Sivan et al., 2006).

La similitud de efectos encontrada *in vivo* e *in vitro* en la lubina sugiere que la acción del 17β -estradiol sobre la producción de FSH se ejerce en parte, de manera directa sobre los gonadotropos. Sin embargo, se desconoce si los efectos observados *in vitro*, se dan a dosis fisiológicas. En la tilapia, la acción estimulante observada *in vitro* por 17β -estradiol en la expresión de β FSH se produce a dosis farmacológicas, pero no a dosis fisiológicas, como si ocurre *in vivo*, sugiriendo que dicho efecto podría deberse a una acción indirecta de los estrógenos, más que a una directa (Huggard-Nelson et al., 2002). Será necesaria la realización de más experimentos en las diferentes fases del ciclo reproductivo, así como, ensayos de dosis respuesta para esclarecer el nivel de actuación y la direccionalidad de las retroalimentaciones por esteroides gonadales sobre el control de las gonadotropinas en la lubina.

3) BASES MOLECULARES DEL CONTROL ESTROGÉNICO DE LA REPRODUCCIÓN

Estudios previos llevados a cabo en el hígado de la lubina han permitido caracterizar tres isoformas del Esr1 (Halm et al., 2004). Las tres, difieren en la región 5' del gen, dando como resultado diferencias en el tamaño del dominio A/B de la región N-terminal, la cual contiene la función de transactivación independiente de ligando (AF1). La isoforma larga difiere de la corta en 261 pb adicionales con un codón de inicio de la traducción dentro de la pauta o marco de lectura abierta. La isoforma intermedia contiene un codón putativo de inicio de la traducción al comienzo del intrón I (Halm et al., 2004). A pesar de que no se realizaron ensayos de protección para

ribonucleasa, los resultados obtenidos en la clonación del Esr1 para su posterior caracterización farmacológica sugieren que solo la isoforma corta se expresa en el eje neuroendocrino de la lubina. Estudios en peces, establecen la presencia y expresión diferencial de las isoformas del Esr1 (Pakdel et al., 2000, Patiño et al., 2000, Menuet et al., 2001). Sin embargo, a diferencia de lo detectado en la lubina, tanto la isoforma corta como la larga se expresan en el cerebro de la trucha arcoíris. Por el contrario, solo la corta, es específica del hígado (Menuet et al., 2001). En dichos estudios se sugiere que la isoforma larga, es la forma activa en el cerebro de la especie anterior.

La caracterización farmacológica del Esr1 de lubina se llevó a cabo mediante experimentos de transfección estable en la línea celular HEK 293, la cual no produce ERs de manera endógena (Kuiper et al., 1998, Kahlert et al., 2000). Los resultados de la transfección demuestran la capacidad de la isoforma corta del Esr1 de la lubina para producir una proteína funcional. Las propiedades de transactivación de dicho receptor se estudiaron mediante transfección transitoria de la construcción ERE-TK-LUC. De manera similar a lo detectado en el pez cebra y en la trucha (Menuet et al., 2002, Pakdel et al., 2000), el Esr1 de lubina estimula la actividad luciferasa en presencia de 17 β -estradiol o metabolitos de este, como la estrona o el estriol. Cabe destacar que concentraciones elevadas de testosterona (10^{-5} M), inducen la actividad transcripcional del gen luciferasa, pero no así, concentraciones similares del andrógeno no aromatizable 11-cetotestosterona. La línea celular HEK 293 no metaboliza la testosterona en grado alguno detectable durante seis o más horas de cultivo, ni exhibe actividad aromataasa (Corbin et al., 1999). Experimentos realizados con una línea celular transgénica de *Saccharomyces cerevisiae* para evaluar la actividad estrogénica de dietas de peces, demuestran que dosis elevadas de testosterona también activan el Esr1 de humano (Routledge y Sumpter, 1996, Matsumoto et al., 2004). Sin embargo, a diferencia de lo observado con el Esr1 de lubina, dosis similares de 11-cetotestosterona inducen también la activación de dicho subtipo. De manera similar, la administración de testosterona a bajas concentraciones es incapaz de activar la transcripción génica dependiente del Esr1 en el pez cebra (Menuet et al., 2002) y en la trucha (Pakdel et al., 2000).

Los resultados demuestran que la isoforma corta del Esr1 de la lubina puede mediar en los efectos producidos por los estrógenos sobre la transcripción génica, sugiriendo que concentraciones elevadas de testosterona pueden inducir efectos similares a los estrógenos, sin necesidad de aromatización, en células que expresen el Esr1.

El análisis de la región promotora del gen β FSH de la lubina revela que éste, al igual que muchos otros genes eucariotas, contiene en su región proximal una caja TATA (-42 pb) de reconocimiento para el ensamblaje de la RNA polimerasa. La presencia de una caja TATA en la zona proximal coincide con la encontrada en otros promotores de genes β FSH de mamíferos (Jameson et al., 1988, Guzman et al., 1991, Kumar et al., 1995) y peces (Sohn et al., 1998b, Vischer et al., 2003). Sin embargo, en la tilapia (Rosenfeld et al., 2001) la caja TATA se sitúa en una posición más distal (-97 pb), lo que podría causar una inhibición de la formación del complejo de inicio de la transcripción. Alternativamente, se ha sugerido, que la presencia del elemento de respuesta al factor de transcripción SP1 y la caja GC podrían actuar como secuencias iniciadoras de la transcripción, como se demuestra en promotores que carecen de caja TATA (Faber et al., 1993). Asimismo, se han identificado varios CRE. Las rutas de transducción de señales dependientes de AMPc son importantes en diversas funciones neuroendocrinas, actuando sobre la expresión génica a través de la activación de factores de transcripción dependientes de este nucleótido (CREB/CREM). Las rutas de transducción de señales mediadas por AMPc, van en muchos casos, asociadas a receptores de membrana acoplados a proteína G. Diversas hormonas, entre las que se encuentra la GnRH, utilizan este mecanismo para poder ejercer sus acciones. La activación de CREB/CREM desempeña un papel clave en el desarrollo y fisiología del eje CPG. La unión de la proteína CREB al CRE, activa la transcripción mientras que la unión del represor ICER, una isoforma de CREM, la inhibe (Sassone-Corsi, 1998, Kirshner et al., 2000, Don y Stelzer, 2002).

Estudios *in vitro* con construcciones plasmídicas portadoras del promotor del gen β FSH de pez cebra y tilapia, junto con el gen luciferasa, demuestran que la GnRH induce la actividad transcripcional de dicho gen (Rosenfeld et al., 2001, Chen et al., 2010). La caracterización del promotor de la subunidad β FSH en el pez dorado, pone de manifiesto la presencia de varios elementos de respuesta específicos a GnRH (GnRH-RE, Sohn et al., 2001). Estas secuencias serían reconocidas por factores de transcripción no dependientes de AMPc, sino activados por la proteína quinasa C como respuesta específica a la presencia de GnRH (Schoderbek et al., 1993). A diferencia del pez dorado, en la lubina y tilapia no se encuentran GnRH-RE, pero sí varios sitios de unión para AP-1. Estudios *in vitro* con construcciones plasmídicas delecionadas de la región promotora del gen β FSH de ovino, han permitido demostrar que la GnRH activa la transcripción de la subunidad β FSH a través de AP-1 (Strahl et al., 1998). Por otro lado,

en la rata, la frecuencia con que se producen los pulsos de liberación de GnRH durante el ciclo ovulatorio puede modificar la tasa de secreción de las gonadotropinas, prevaleciendo la presencia de una sobre la otra en función de la fase de dicho ciclo (Marshall et al., 1991). Recientemente, estudios *in vitro* con construcciones portadoras del promotor del gen β FSH de rata y el gen luciferasa, han determinado que una elevada frecuencia pulsátil de GnRH inhibe la transcripción de dicha subunidad, mientras que una frecuencia menor la estimula. Los efectos opuestos observados en la actividad transcripcional en función de la frecuencia pulsátil de la GnRH estarían mediados por el CRE. Cuando la frecuencia del pulso es baja, se activa CREB, el cual tras su unión a CRE induce la transcripción. Por el contrario, cuando la frecuencia del pulso es elevada, la activación de ICER impide la unión de CREB, inhibiéndose en última instancia la expresión génica (Ciccione et al., 2010).

Al igual que en tilapia y pez dorado, se ha encontrado un elemento GSE en el promotor de la subunidad β FSH de la lubina. Dicho elemento de respuesta es reconocido por el factor esteroideogénico 1 (SF-1, Drean et al., 1996). El SF-1 desempeña un papel esencial en la reproducción regulando la expresión de varios genes a todos los niveles del eje CPG (Parker et al., 2002). En la pituitaria, SF-1 regula la expresión de genes específicos de células gonadotropas como las gonadotropinas y el receptor de GnRH (Zhao et al., 2001). Estudios llevados a cabo en el ratón que carecen del gen SF-1 demuestran una disminución severa de la expresión de ambas gonadotropinas (Ingraham et al., 1994, Zhao et al., 2001). Estudios de transactivación desarrollados en el salmón indican que existe un efecto sinérgico entre SF-1 y ER en la inducción de la expresión de la β LH (Drean et al., 1996). El aumento de expresión de dicha subunidad por la acción combinada del SF1-GSE y ER-ERE, es muy superior al promovido únicamente por el SF-1-GSE.

Respecto al control transcripcional por andrógenos, la presencia de medias secuencias de ARE en el promotor de la β FSH de la lubina coincide con la hallada en el pez dorado (Sohn et al., 1998b) y en el pez gato (Vischer et al., 2003). Al igual que en el pez dorado (Sohn et al., 1998a) la administración *in vivo* de testosterona inhibe la expresión de la β FSH en la lubina (Mateos et al., 2002). Cabe mencionar también que se han encontrado varios PRE en el promotor de la β FSH de la lubina. Debido a la proximidad filogenética existente entre AR y PR se sabe que el AR puede reconocer y unirse a PRE (Nelson et al., 1999).

Como ya se ha mencionado, la regulación transcripcional por estrógenos no se circunscribe únicamente a la interacción de los ERs con los EREs. En relación a lo anterior, se ha encontrado un elemento de respuesta para los heterodímeros formados por el PXR/RXR y CAR/RXR en el promotor del gen β FSH de la lubina. Los tres, PXR, CAR y RXR, pertenecen a una familia que incluye también a los REs (Moore et al., 2000, Jacobs et al., 2003). El 9-cis-ácido retinoico, es el ligando natural del RXR (Heyman et al., 1992). Su unión provoca la dimerización característica de los RNs, actuando como un homodímero. Sin embargo, el RXR también regula la expresión génica a través de la formación de heterodímeros con otros factores de transcripción (Gampe et al., 2000). El CAR y el PXR son RNs huérfanos de xenobióticos que median, tanto en respuestas fisiológicas celulares moduladas por hormonas esteroideas endógenas, como por compuestos químicos exógenos. La activación de dichos receptores implica la formación de dímeros, principalmente con el RXR (Handschin y Meyer, 2003, Tolson y Wang, 2010). Diversos estudios demuestran la existencia de una regulación cruzada entre los ERs y estos receptores de xenobióticos, en la cual los ERs modularían, a través de diversos mecanismos moleculares, la actividad transcripcional mediada por CAR y PXR (Min et al., 2002, Min, 2010).

La caracterización de la actividad basal del promotor β FSH de la lubina, se llevó a cabo en las líneas celulares L β T2 y HEK 293. Tanto en mamíferos como en peces el control transcripcional del gen β FSH se ha determinado mediante el uso de cultivos primarios de pituitaria, animales transgénicos y líneas celulares heterólogas (Miller y Miller, 1996, Huang et al., 2001, Rosendfeld et al., 2001, Chen et al., 2010). Experimentos llevados a cabo con cultivos primarios de pituitaria de ovino y las líneas celulares creadas a partir de ovario (CHO), riñón (COS-7, CV-1), cérvix (HeLa), placenta (JAR) y mama (T47-D, BeWo) de mamífero demuestran que dichas células expresan una construcción plasmídica portadora del gen luciferasa bajo el control del promotor β FSH de ovino (Webster et al., 1995, Miller y Miller, 1996). Los resultados obtenidos llevan a sugerir a los autores que la transcripción basal del gen β FSH de ovino, no requiere de un ambiente y factores celulares específicos (Miller y Miller, 1996). Con posterioridad, Pernasetti y coautores, resaltan la importancia de realizar la determinación de la regulación transcripcional de la subunidad β FSH en una línea celular (L β T2) creada a partir de gonadotropos diferenciados (Pernasetti et al., 2001). Los autores señalan que la expresión del promotor β FSH de ovino en L β T2 es especialmente sensible frente a otras líneas celulares homólogas y heterólogas.

La pituitaria contiene una variedad amplia de tipos celulares con funciones endocrinas diferentes (Cerdá-Reverter y Canosa, 2009). Los gonadotropos comprenden solo un 5-10% de las células hipofisarias, lo que dificulta detectar respuestas celulares específicas en experimentos *in vitro* con cultivos primarios. Por otro lado, el uso de líneas celulares heterólogas puede suponer una falta de respuesta por la ausencia del ambiente celular adecuado (Pernasetti et al., 2001).

Para verificar si el promotor β FSH de la lubina requiere de un contexto celular específico para su regulación, las construcciones portadoras de las deleciones de dicha región se transfectaron en L β T2 y en una línea celular heteróloga creada a partir de células renales de embrión humano (HEK 293). Las células L β T2 contienen las características de los gonadotropos maduros tales como, receptor de GnRH, SF-1, PR, ER y las subunidades α y β de las hormonas gonadotrópicas (Alarid et al., 1996). Los resultados indican que el promotor β FSH de la lubina requiere de factores celulares específicos para su activación. Las transfecciones llevadas a cabo en L β T2, reproducen una respuesta diferencial significativa de la actividad transcripcional en función de la construcción transfectada. Estos resultados corroboran los obtenidos por Ge y Lau, en cuanto a la viabilidad del uso de la línea L β T2 para el estudio del control transcripcional de la FSH de peces. Los experimentos llevados a cabo por los autores anteriores para dilucidar el papel de las proteínas Smad sobre la expresión de la β FSH del pez dorado, demuestran que el promotor β FSH de la especie anterior es funcional en L β T2 (Ge et al., 2003, Lau y Ge, 2005). Por el contrario, las transfecciones realizadas en HEK 293 no permiten detectar una actividad transcripcional significativa en ninguna de las construcciones. Los resultados observados en HEK 293, están en contraposición con los estudios de Miller, en los que el promotor β FSH de ovino se expresa en líneas celulares heterólogas (Miller y Miller, 1996). Sin embargo, la expresión de dicho promotor es más intensa en L β T2 que en otras líneas celulares (Pernasetti et al., 2001), lo que lleva a sugerir la existencia de señales específicas en las células gonadotropas que permiten una óptima producción de las gonadotropinas. Si bien, los estudios de Miller indican que la expresión del promotor β FSH de ovino se expresa de manera independiente con respecto al tipo celular en el que se encuentre, también corroboran la existencia de dichas señales específicas. Por lo tanto, no se puede excluir la posibilidad de que la expresión del promotor β FSH de lubina en HEK 293 se produzca a un nivel insuficiente para detectar diferencias significativas de actividad luciferasa.

La expresión de los promotores génicos no solo depende del ambiente celular donde se expresan, sino también de las secuencias que estos contienen (Huang et al., 2001). Los estudios de Miller, Pernasetti y Huang, se realizan con una construcción que contiene 4.7 Kb del promotor β FSH. Los resultados obtenidos sugieren que dicho fragmento contiene las secuencias necesarias para una expresión tanto de manera específica en células gonadotropas como, de manera inespecífica, en células heterólogas. La determinación de la actividad basal del promotor β FSH de la lubina se llevó a cabo a partir de una construcción que contiene 3.5 Kb. Cabe la posibilidad de que la ausencia de actividad transcripcional en HEK 293 sea debido a que dicho fragmento de promotor solo contenga las secuencias que permitan una expresión específica en células gonadotropas.

Para la caracterización de la actividad basal del promotor, se realizaron transfecciones con construcciones delecionadas de 3.5, 2.4, 1.0, 0.5 y 0.15 Kb en el vector pTATA LUC+. La cuantificación de la actividad luciferasa permite determinar que regiones activan o reprimen la actividad transcripcional del gen β FSH de la lubina. Los resultados señalan, que solo las construcciones portadoras de las 0.5 y 0.15 Kb más próximas al inicio del gen estimulan la actividad luciferasa de manera significativa. Estos resultados sugieren la presencia de elementos silenciadores de la transcripción en la región comprendida entre 1.0 y 0.5 Kb. Por el contrario, la disminución significativa de actividad luciferasa observada en todas las transfecciones realizadas con la construcción pTATA 1.0 sugiere la presencia de elementos potenciadores de la actividad transcripcional en la región comprendida entre 2.4 y 1.0 Kb.

Experimentos llevados a cabo con cultivos primarios de pituitaria de tilapia, han permitido determinar la actividad basal de la región promotora del gen β FSH de esta especie (Rosendfeld et al., 2001). En dichos experimentos, se realizaron transfecciones con deleciones a partir de las primeras 1,7 Kb de región promotora. A diferencia de las secuencias génicas, las regiones promotoras están poco conservadas entre las especies. Sin embargo, y a pesar de las diferencias en la región de promotor estudiada, al igual que en la lubina, en la tilapia se encuentra un patrón similar de actividad basal, con la presencia de una región silenciadora y una activadora, respectivamente. El análisis *in silico* de la región promotora de la subunidad β FSH de la lubina muestra diferentes elementos putativos de respuesta, pero no confirma sean funcionales en dicho promotor. No es posible identificar qué secuencias son las causantes de la estimulación e inhibición de la actividad basal encontradas en las regiones comprendidas entre 2.4 y

1.0 Kb y entre 1.0 y 0.5 Kb. En los estudios de Rosenfeld se sugiere que la estimulación e inhibición de la actividad basal podría estar propiciada por la presencia de un CRE que regularía la expresión de la β FSH en ambas direcciones (Rosenfeld et al., 2001). De manera similar, se han identificado varios elementos de respuesta dependientes de AMPc en las regiones situadas entre 2.4 y 0.5 Kb del promotor β FSH de la lubina.

El factor de transcripción AP-1 es un dímero formado por las familias de proteínas Fos y Jun. En función de los componentes del complejo AP-1 y del contexto celular, dicho factor de transcripción puede activar o reprimir la actividad transcripcional (Hess et al., 2004, Milde-Langosch, 2005). Estudios inmunohistoquímicos revelan la presencia de proteínas Fos-Jun en las células gonadotropas de mamíferos (Strahl et al., 1997). En las 4.7 Kb de región promotora β FSH de ovino, utilizada en los estudios de Miller, se identifican cuatro sitios putativos para AP-1 que difieren en mayor o menor medida de su secuencia consenso y cuya funcionalidad puede depender en función de los tipos de proteínas Fos-Jun presentes (Strahl et al., 1997). Experimentos de transfección simultánea de dicho promotor y proteínas Fos-Jun indican que los dos elementos de respuesta a AP-1, más próximos al inicio del gen (-120, -83 pb), son los causantes del aumento de la actividad basal de la β FSH (Miller et al., 1996, Strahl et al., 1997). De manera similar, en la lubina, se han identificado varios sitios putativos de reconocimiento para AP-1, con mayor o menor grado de desviación de su secuencia consenso. Estos elementos de respuesta abarcan la totalidad de las 3.5 Kb de región promotora, permitiendo sugerir un grado diferente de actividad basal en función de la construcción transfectada. Al igual que en ovinos, se han identificado en el promotor proximal de la lubina dos sitios putativos AP-1. Por lo tanto, el aumento de actividad luciferasa observado en las construcciones de 0.5 y 0.15 Kb podría deberse a un efecto positivo provocado por AP-1 en dichas regiones. Cabe también la posibilidad, que este aumento de actividad sea debido a la ausencia de elementos de respuesta a AP-1 o a otros factores en posiciones más distales, que estarían actuando como silenciadores, como también se sugiere para el promotor β FSH de ovino (Strahl et al., 1997).

Será necesaria la realización de experimentos adicionales con geles de retardo, nuevas construcciones plasmídicas y análisis de mutagénesis dirigida para esclarecer la funcionalidad de los elementos de respuesta hallados en el promotor β FSH de la lubina, así como su implicación en el control transcripcional de dicho gen.

Previo a la evaluación de la sensibilidad del promotor β FSH de la lubina a los estrógenos, se realizaron experimentos para determinar si el clon de células L β T2 utilizado en la caracterización de dicha región promotora presenta respuesta a los mismos. Para ello, se realizaron transfecciones de la construcción ERE-TK-LUC con y sin la construcción ESR1-pcDNA.3, tras lo cual, se incubaron las células con 17 β -estradiol durante 72 horas. Los resultados señalan una ausencia de respuesta a los estrógenos del subclón de células L β T2 utilizado. La transfección del ERE-TK-LUC, junto con el ESR1, produce diferencias significativas de actividad luciferasa tras la incubación con 17 β -estradiol. Por el contrario, no existe una respuesta significativa tras la transfección de ERE-TK-LUC.

Los estudios de Miller, llevados a cabo para determinar la regulación por estrógenos de la actividad transcripcional de la β FSH de ovino, tanto en cultivo primario de pituitaria como en líneas celulares heterólogas, demuestran la necesidad de realizar transfecciones simultáneas del promotor β FSH con el ER de humano, para poder observar diferencias promovidas por el 17 β -estradiol (Miller y Miller, 1996). En dichos estudios se sugiere diversas posibilidades que expliquen la necesidad de transfectar el ER. Si bien hasta un 40% de las células de la pituitaria (gonadotropos y lactotropos) expresan ERs *in vivo*, solo los gonadotropos de ovino parecen contener ERs funcionales *in vitro*, dada la ausencia de efectos mediados por el 17 β -estradiol en la producción de prolactina *in vitro* (Miller y Miller, 1996). La realización de transfecciones transitorias con la GFP para determinar qué células son las transfectadas en cultivos primarios de células de pituitaria de ovino, demuestran la ausencia de expresión de dicha proteína en las células gonadotropas algo previsible dado el bajo porcentaje de gonadotropos presente en la pituitaria (Miller y Miller, 1996). Por lo tanto, las células que sí incorporan la construcción portadora del promotor β FSH de ovino, serían células que no contuviesen ERs, como los fibroblastos, no implicados en las funciones secretoras. Alternativamente, podría tratarse de células que presentando ERs, bien no sean funcionales *in vitro* o bien sean funcionales, pero a unos niveles insuficientes, para poder regular de manera perceptible la actividad transcripcional de un gran número de copias de la construcción portadora del promotor β FSH (Miller y Miller, 1996).

Si bien, las células L β T2 producen ERs (Alarid et al., 1996), éstos podrían no ser suficientes para activar la transcripción del vector ERE-TK-LUC utilizado para evaluar su funcionalidad en dichas células. Por otro lado, estudios recientes señalan que la

actividad transcripcional mediada por RNs es funcional en las células L β T2. Tanto el AR, como el GR, median en la expresión génica de la línea celular anterior. Sin embargo, esta línea celular podría no ser adecuada para el estudio *in vitro* de los efectos de los estrógenos sobre los gonadotropos, debido a la falta de funcionalidad de los ERs expresados en ella (Eertmans et al., 2007). En el estudio anterior se demuestra, mediante “Western blot”, la ausencia de proteína para el ER en el subclón L β T2 utilizado. Por el contrario, los resultados obtenidos por otro laboratorio señalan la presencia intensa tanto de RNAm como de proteína del ER en L β T2, así como la funcionalidad de dicho receptor (Schreihofner et al., 2000). Para dilucidar, si la falta de respuesta de las células L β T2 a los estrógenos es debida a la ausencia del ER, Eertmans y colaboradores, transfectaron el ERE-TK-LUC junto el Esr1 de humano. De manera similar a los resultados obtenidos transfectando únicamente el ERE-TK-LUC, no se detecta actividad luciferasa significativa tras la incubación con 17 β -estradiol, pese a haberse encontrado niveles suficientes de proteína Esr1. Debido a ello, los autores sugieren que la falta de respuesta a los estrógenos encontrada en L β T2 podría estar causada por una alteración de la transducción de la señal mediada por los ERs en dicha línea celular (Eertmans et al., 2007).

Los sucesivos pases llevados a cabo con las líneas celulares durante la experimentación, pueden dar lugar a la pérdida de funcionalidad de determinados factores celulares. Este hecho queda demostrado en los estudios llevados a cabo con una línea celular de hepatocitos (Kim et al., 2000), la cual se creó con los mismos factores oncogénicos utilizados para obtener la línea L β T2 (Alarid et al., 1996). Los resultados obtenidos para determinar si el subclón L β T2, utilizado para evaluar la regulación por estrógenos de la subunidad β FSH de lubina, presenta respuesta a los mismos indican la ausencia de ERs en dicho subclón, pero no problemas en la transducción de la señal mediada por éstos.

La regulación por estrógenos de la actividad del promotor β FSH de lubina se determinó transfectando aquellas construcciones que contienen posibles elementos de respuesta a los estrógenos (pTATA 3.5, pTATA 1.0, pTATA 0.15). A pesar de no haberse detectado EREs putativos en las 150 pb más próximas al inicio del gen, se evaluó la sensibilidad a los estrógenos de dicha región por la presencia de un posible elemento de respuesta para PXR, CAR/RXR. Como ya se ha mencionado, se ha demostrado la implicación de dichos elementos en la regulación por estrógenos de determinados promotores génicos. La actividad luciferasa se cuantificó transcurridas 72

horas de la incubación con 17β -estradiol a una concentración de 10^{-6} M. Ninguna de las construcciones transfectadas presentó diferencias significativas de dicha actividad con respecto al control.

Experimentos desarrollados en mamíferos, han demostrado que los estrógenos pueden mediar sus efectos sobre las células gonadotropas, bien a través de la unión de los ERs a EREs en los promotores de las gonadotropinas (Shupnik y Rosenzweig, 1991) o bien mediante su unión a otros factores transcripcionales que controlan la expresión de las mismas (Miller y Miller, 1996, Klinge, 2001, Melamed et al., 2006). Los ERs forman complejos de unión con AP-1, los cuales se unen a los sitios de reconocimiento para dicha proteína activando, en última instancia, la expresión génica (Björnström y Sjöberg, 2005). En el promotor β FSH de ovino se identifican elementos de respuesta a AP-1 alrededor del ERE (Miller y Miller, 1996). De manera análoga, se identifica un sitio putativo de reconocimiento para AP-1 adyacente al medio ERE situado en posición -2402 pb del promotor β FSH de la lubina.

Estudios en peces indican la presencia de EREs o medias secuencias de ERE en los promotores de los genes de la β FSH y β LH (Xiong et al., 1994, Liu et al., 1995, Sohn et al., 1998b, Rosendfeld et al., 2001, Vischer et al., 2003). Pese a no haberse encontrado la secuencia consenso para el ERE, sí se detecta la presencia de dos medias secuencias de ERE en el promotor del gen β FSH de la lubina. Se ha demostrado que es suficiente la presencia de la mitad de la secuencia consenso del ERE para el reconocimiento y unión de los ERs (O'Lone et al., 2004). La presencia de medias secuencias de ERE en el promotor de la β FSH de la lubina da soporte a una acción directa de los estrógenos sobre el control de las gonadotropinas en la especie anterior. Sin embargo, a pesar de identificarse dos medias secuencias de ERE en el promotor β FSH de la lubina, no se aprecia una regulación por 17β -estradiol en ninguna de las construcciones transfectadas. Se ha demostrado que secuencias no consenso de ERE, así como el medio ERE, actúan en la regulación transcripcional mediada por estrógenos (Gruber et al., 2004, Björnström y Sjöberg, 2005, Vega et al., 2006). Sin embargo, las medias secuencias de ERE suelen ser funcionales cuando aparecen dos o más repeticiones de las mismas, separadas por secuencias cortas de nucleótidos del orden de decenas o pocas centenas (Kato et al., 1995, Gruber et al., 2004). Ejemplo de lo anterior son las seis medias secuencias de ERE encontradas en la región promotora del salmón, separadas todas ellas por tan solo varias decenas de nucleótidos (Higa et al., 1997). Por el contrario, los dos medios ERE detectados en el promotor β FSH de la lubina están

separados por 1.4 Kb, sugiriendo que dicha distancia podría ser excesiva para una actuación sinérgica de ambos, y por lo tanto, no serían funcionales.

Alternativamente, los estudios de Eertmans y colaboradores, sugieren que la falta de respuesta a los estrógenos encontrada en L β T2 podría deberse a incompatibilidades interespecie, dado que el Esr1 transfectado es de humano y L β T2 procede de gonadotropos de ratón. Por el contrario, experimentos similares con el mismo ER sobre una línea creada a partir de células de Sertoli de ratón sí produce un incremento de actividad transcripcional del ERE-TK-LUC (Eertmans et al., 2007). Las respuestas génicas dependen en última instancia de la localización e interacción de numerosos factores de transcripción y proteínas reguladoras, los cuales pueden variar considerablemente entre las especies. La distancia evolutiva entre peces y mamíferos es muy superior a la existente entre el ratón y el humano, por lo que no es descartable que la falta de respuesta en la regulación del promotor β FSH de lubina mediada por 17 β -estradiol, encontrada en L β T2, sea debida a diferencias interespecie en los mecanismos de transducción de señales y factores reguladores. Sin embargo, los resultados demuestran que tanto el Esr1 de lubina como su región promotora β FSH son funcionales en L β T2.

Dada la funcionalidad del Esr1 y la región promotora β FSH de lubina en L β T2, cabe sugerir la posibilidad de que la región de dicho promotor, sujeta a una regulación por estrógenos, se encuentre fuera de las 3.5 Kb analizadas, o bien, que la regulación por 17 β -estradiol observada *in vitro* con cultivos primarios de pituitaria de lubina sobre la expresión de la β FSH, no se deba a una acción directa de dicho esteroide sobre el promotor, sino a través de proteínas reguladoras que sí presenten elementos de respuesta al ER (Miller y Miller, 1996) y que estén ausentes en L β T2.

4) BASES ANATÓMICAS DEL CONTROL ESTROGÉNICO DE LA INGESTA

Las conductas alimenticias y por extensión los niveles de ingesta están controlados por el SNC, donde los circuitos neuronales hipotalámicos integran la información visceral y sensorial regulando en última instancia la ingesta. En mamíferos, se ha demostrado que los estrógenos promueven cambios en la sinaptología del núcleo arcuato hipotalámico, área clave en el control de la ingesta y metabolismo energético (Hung et al., 2003). La hiperestrogenemia se usa en ratas como modelo reversible de anorexia, produciendo una disminución de la ingesta considerable (Mystkowski et al., 2000). El uso de agonistas selectivos de los ERs en ratas ovarioectomizadas parece

indicar que los efectos atenuantes de los estrógenos sobre la ingesta y el aumento de peso están mediados por el Esr1 y no por el Esr2 (Roesch, 2006). De manera similar, el uso de antagonistas del Esr1 y no de los del Esr2 previenen la disminución de la ingesta promovida por los estrógenos, concluyendo que la activación del Esr1 es necesaria para la anorexia producida por el 17β -estradiol (Santollo et al., 2010). Al igual que en la rata, experimentos desarrollados en el ratón demuestran que la supresión del Esr1 en el SNC produce hiperfagia y disminución del gasto energético. Estos estudios señalan que los efectos anorexigénicos producidos por los estrógenos se localizan en neuronas POMC del núcleo arcuato que expresan el Esr1, dado que la eliminación exclusiva del Esr1 de estas neuronas desencadena la hiperfagia (Xu et al., 2011). En el humano, los estrógenos están asociados a la anorexia nerviosa mediante la activación del Esr1 (Versini et al., 2010).

Como ya se ha mencionado (ver introducción), los esteroides sexuales influyen en la conducta alimenticia de peces. Estudios desarrollados en varias especies demuestran que los estrógenos incorporados en la dieta o por implantación, disminuyen las tasas de crecimiento como consecuencia de una inhibición en la ingesta (Hendry et al., 2003, Davis y Ludwig, 2004, Mandiki et al., 2004). Ensayos realizados en lubina para determinar la eficiencia en la tasa de liberación de implantes silásticos de testosterona, 11-cetotestosterona y 17β -estradiol permitieron observar que aquellos animales implantados con este último esteroide ingerían menor cantidad de alimento. A partir de estas observaciones, se llevaron a cabo experimentos para confirmar la hipótesis de una posible acción de los esteroides gonadales en la ingesta de la lubina. Para ello se realizaron implantaciones de 11-cetoandrostenediona, precursor de la 11-cetotestosterona, testosterona y 17β -estradiol en una población mixta de animales adultos de lubina en época de reposo sexual. Los resultados demuestran que tanto la testosterona como el 17β -estradiol, producen una disminución de la ingesta dependiente de la dosis, así como, de la eficiencia en la conversión del alimento y de la tasa de crecimiento (Leal et al., 2009). Por el contrario, no se observan diferencias significativas entre los animales implantados con 11-cetoandrostenediona y los animales control, sugiriendo que los efectos causados por la testosterona sobre la ingesta de la lubina estarían mediados por su aromatización a 17β -estradiol. El severo descenso en la demanda de alimento parece ser la causa responsable del retraso observado en el crecimiento de los individuos tratados con las dosis más elevadas de 17β -estradiol (Leal et al., 2009).

A pesar de la dificultad para establecer homologías entre los diferentes núcleos hipotalámicos de vertebrados, se cree que el NLT corresponde al núcleo arcuato de mamíferos (Peng et al., 1994). En peces, no se conoce en profundidad los circuitos neuronales implicados en las conductas relacionadas con la ingesta. De manera general, se acepta que el lóbulo inferior hipotalámico, en particular las áreas próximas al receso lateral, así como el hipotálamo ventroposterior están implicados en dichas conductas (Wullimann y Mueller, 2004, Volkoff et al., 2005). Sin embargo, experimentos de ayuno y estimulación eléctrica, parecen indicar que el telencéfalo ventral, área preóptica y techo óptico también están incluidos en los circuitos neuronales implicados en las conductas alimenticias (Demski y Knigge, 1971, Silverstein et al., 1998).

Experimentos de hibridación *in situ* para el NPY en la lubina corroboran la influencia de las áreas cerebrales anteriores en el control de la ingesta en peces (Cerdá-Reverter et al., 2000c). Se detectan transcritos para este neuropéptido en el telencéfalo ventral (Vd, Vc y Vv), área preóptica (NPOpc, NPOav, NAPv, NPPv y NSC), hipotálamo tuberal (NLT, NRL, NAT, NRP y NDLI) y techo óptico (PGZ). Por otro lado, el receptor de melanocortinas tipo 4 (MC4R) se expresa principalmente en el SNC de vertebrados y su activación produce una inhibición de la ingesta (Cone, 2006). La AgRP y el POMC actúan como antagonista y agonista de MC4R, respectivamente (Schiöth et al., 2005). A pesar de no disponerse de la distribución cerebral en la lubina de los neuropéptidos anteriores, experimentos de hibridación *in situ* han permitido dilucidar la distribución neuroanatómica del MC4R (Sánchez et al., 2009). Los resultados obtenidos en la lubina para este receptor coinciden con los obtenidos en varias especies de peces para fibras inmunoreactivas AgRP y POMC (Olivereau y Olivereau, 1990, Amano et al., 2005, Forlano y Cone, 2007). Atendiendo a las rutas principales relacionadas con la ingesta, su expresión se detecta en el telencéfalo ventral (Vd, Vv), área preóptica (NPOpc, NAPv, PM y NSC), hipotálamo tuberal (NLT, NRL y NDLI) y techo óptico (PGZ, Sánchez et al., 2009). En el pez cebra (Forlano y Cone, 2007) y en el pez dorado (Cerdá-Reverter et al., 2003b,c) la expresión de AgRP y POMC se sitúa en el NLT. Al igual que lo ocurrido en mamíferos, la expresión de manera más patente del subtipo *Esr1* en el NLT y de manera exclusiva en el lóbulo inferior hipotalámico de la lubina, permite sugerir un papel principal para este subtipo en el control de la ingesta de la especie anterior.

La conducta ingestiva no solo se circunscribe a la regulación de los circuitos neuronales que controlan el apetito. El TLa, junto con el lóbulo inferior hipotalámico,

NGT y el VLo rombencefálico están integrados en la topografía de los circuitos gustativos en peces (Rink y Wullimann, 1998). El VLo corresponde a la porción gustativa vagal del núcleo del tracto solitario en mamíferos. En la lubina se detectan transcritos del NPY y PYY en los núcleos y áreas anteriores (Cerdá-Reverter et al., 2000b,c), así como expresión del MC4R en el TLa y lóbulo inferior hipotalámico (Sánchez et al., 2009). La presencia de expresión del *Esr1* y *Esr2a* en los mismos, permite especular con un efecto de los estrógenos sobre la modulación sensorial de la ingesta en la lubina.

La presencia de los tres subtipos de ERs en los núcleos y áreas cerebrales en los que se expresan los principales neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos y/o sus receptores sugiere una implicación de los estrógenos en la regulación del control de la ingesta en la lubina. Los experimentos de Leal y colaboradores no permiten discernir si el efecto inhibitorio observado en los animales implantados con 17β -estradiol está mediado por los ERs. Sin embargo, el tiempo transcurrido entre el tratamiento y la respuesta sugiere que esta acción inhibitoria, está promovida por una actuación de los ERs clásicos a través de rutas genómicas. Además, los niveles de ingesta de los animales implantados con 17β -estradiol, continúan siendo inferiores aun cuando sus niveles de este esteroide en plasma retornan a niveles similares a los de los animales control (Leal et al., 2009). La persistencia en la inhibición de la ingesta podría sugerir un daño temporal o permanente en las rutas neuronales que controlan este comportamiento en la lubina. La presencia de ERs en las áreas cerebrales que controlan la conducta alimenticia en peces, corroboran el efecto inhibitorio prolongado producido por el 17β -estradiol en la lubina.

En vertebrados existe una relación clara entre el balance energético y la reproducción. Como regla general, la disponibilidad de alimento abundante favorece la reproducción, mientras que su escasez inhibe el proceso reproductivo. Por lo tanto, es difícil entender la fisiología del balance energético sin comprender su relación con el proceso reproductivo. Los mecanismos centrales que controlan el sistema reproductivo son inhibidos por la falta de alimento, mientras que cuando la disponibilidad de este es suficiente y las demandas energéticas son bajas, los circuitos centrales que inhiben la ingesta tienden a facilitar la reproducción (Wade et al., 1996, Schneider et al., 2002).

Experimentos en mamíferos, ponen de manifiesto una acción coordinada de la GnRH y el NPY en la regulación de las interacciones entre el proceso reproductivo y el estado energético (Li et al., 1999). Como ya se ha mencionado, experimentos en varias

especies de peces demuestran que el NPY estimula la secreción gonadotrópica de LH (Kah et al., 1989, Breton et al., 1991, Peng et al., 1993, Cerdá-Reverter et al., 1999). En la lubina, se detecta un aumento del GnRH-R en el telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo tuberal al final de su ciclo reproductor y comienzo del periodo de reposo sexual, cuando la ingesta se estimula tras el ayuno acontecido durante la fase final de maduración y puesta (González-Martínez et al., 2004). De manera similar, en *Plecoglossus altivelis* se observa una correlación en la variación estacional de los niveles de NPY del NLT y pituitaria (Chiba et al., 1996). La presencia de los ERs en aquellas áreas donde se detecta una expresión solapada de NPY y GnRH-I, sugiere, que la variación en los niveles de estrógenos a lo largo del ciclo reproductor de la lubina modularía el balance de los estados energético y sexual de esta especie.

5) COMPONENTES ESTROGÉNICOS EN PIENSOS DE ACUICULTURA: IMPLICACIONES EN EL CULTIVO DE PECES

El estudio de los contaminantes ambientales ha adquirido gran importancia en los últimos años como consecuencia de su capacidad para desencadenar disrupciones endocrinas en los animales, incluidos los humanos (Sumpter y Johnson, 2008). Este fenómeno está principalmente asociado a alteraciones en la fisiología de la reproducción (Brian et al., 2005). Muchas de las sustancias químicas identificadas como disruptores endocrinos ejercen sus efectos a través de la activación de los ERs (Payne et al., 2000). Muchos de los compuestos identificados son estrógenos naturales como el 17 β -estradiol y la estrona, o sintéticos como el 17 α -etinilestradiol. Sin embargo, también se han identificado compuestos estrogénicos no esteroideos como los alquilfenoles y los fitoestrógenos (Brian et al., 2005, Sumpter y Johnson, 2008). Los peces de agua dulce son los más afectados por las disrupciones endocrinas dado que la fuente principal de sustancias con actividad disruptora se encuentra en las aguas de los ríos próximos a zonas de actividad industrial. Las anomalías observadas en este grupo de vertebrados como consecuencia de una sobreexposición a compuestos estrogénicos son: diferentes grados de feminización, regresión de las gónadas masculinas, mayor desarrollo de las femeninas, intersexualidad y vitelogénesis (Sumpter y Johnson, 2008).

En la última década se han realizado esfuerzos para encontrar fuentes proteicas y oleicas alternativas. La inclusión de soja en la formulación ha provocado la incorporación de fitoestrógenos, siendo las isoflavonas, como la genisteína, las más abundantes. Los fitoestrógenos son moléculas de origen vegetal estructuralmente

relacionadas con los estrógenos animales. Su relación estructural les permite su unión y activación de los ERs, provocando efectos agonistas o antagonistas dependiendo de la estructura química del fitoestrógeno, los niveles endógenos de estrógenos, el tiempo de exposición y el tipo de tejido y célula en el que actúe (Moutsatsou, 2007).

Numerosos estudios en los últimos años han puesto de manifiesto los efectos beneficiosos de los fitoestrógenos para la salud humana, en particular, como tratamientos preventivos para diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, efectos adversos derivados de la menopausia y neurodegeneración (Pilsakova et al., 2010). Sin embargo, diversos trabajos indican que al tratarse de disruptores endocrinos, los fitoestrógenos pueden producir efectos nocivos para la salud (Moutsatsou, 2007, Patisaul y Jefferson, 2010).

Como ya se ha mencionado, experimentos en peces han demostrado que la presencia de compuestos estrogénicos incluidos los fitoestrógenos pueden inducir cambios fisiológicos, morfológicos y comportamentales. La sustitución de proteínas de origen animal por las de origen vegetal ha incrementado dramáticamente la presencia de sustancias estrogénicas no esteroideas, principalmente fitoestrógenos, en las dietas comerciales para peces (Miyahara et al., 2003, Matsumoto et al., 2004, Davis et al., 2009). Estas sustancias actúan como factores antinutricionales (Francis et al., 2001). Al igual que en mamíferos (Barnes et al., 2000), en peces, las disrupciones endocrinas causadas por los fitoestrógenos están mediadas por los ERs (Tollefsen et al., 2003, Sassi-Messai et al., 2009, Cosnefroy et al., 2009). Sin embargo, los efectos fisiológicos de los fitoestrógenos no están exclusivamente mediados por dichos receptores. En salmónidos, isoflavonas como la genisteína y daidzeína inhiben el metabolismo del 17 β -estradiol. Estos efectos se producen mediante una actuación de los compuestos anteriores como inhibidores competitivos o alostéricos de aquellas enzimas hepáticas y renales que metabolizan el 17 β -estradiol en formas más solubles para su detoxificación y excreción, facilitando de esta manera una mayor actividad estrogénica causada por una mayor disponibilidad de estradiol (Ng et al., 2005).

Experimentos llevados a cabo en mamíferos demuestran que la genisteína inhibe la ingesta y peso corporal (Kim et al., 2006, Cave et al., 2007, Al-Nakkash et al., 2010) e induce cambios en varias hormonas metabólicas, como la insulina, leptina, hormona tiroidea y cortisol (Szkudelska y Nogowski, 2007). En peces, diversos trabajos demuestran el efecto de los fitoestrógenos, particularmente la genisteína, sobre la reproducción y diferenciación sexual, el comportamiento, la regulación del ciclo celular,

el metabolismo y síntesis de vitelogenina (Pollack et al., 2003, Inudo et al., 2004, Kausch et al., 2008, Green y Kelly, 2009). Sin embargo, son escasos los estudios relativos al efecto que tienen los fitoestrógenos sobre el control de la ingesta. La genisteína inhibe, al igual que el 17β -estradiol, el aumento de peso corporal en la perca amarilla (Ko et al., 1999) pero no en la anguila (Tzchori et al., 2004). En el medaka, no se encuentran diferencias de peso y longitud en animales alimentados con dietas ricas en fitoestrógenos o sin ellos (Inudo et al., 2004). La variabilidad de los efectos observados sobre la ingesta y peso corporal, puede deberse, en parte, a diferencias en la actividad estrogénica presente entre las especies (Kawai et al., 2003).

El sistema desarrollado mediante el uso de líneas celulares transfectadas de manera estable con el *Esrl* de la lubina y el gen luciferasa permite detectar de manera sensible la presencia de componentes estrógenicos en los piensos comerciales utilizados para el crecimiento de lubinas y doradas. Los niveles detectados de dichos compuestos son incluso superiores a los encontrados en los piensos de animales herbívoros. Los resultados obtenidos con los piensos utilizados coinciden con los encontrados en los experimentos *in vitro* realizados por Inudo y Matsumoto en los que se detecta también un contenido alto de componentes estrogénicos, principalmente fitoestrógenos, en dietas para peces (Matsumoto et al., 2004, Inudo et al., 2004). De manera similar, los trabajos desarrollados por Pelissero indican la presencia de 17β -estradiol y estrona en las dietas comerciales usadas para el crecimiento de peces (Pelissero et al., 1989).

Respecto a la relevancia que podrían tener estos niveles elevados de componentes estrogénicos en las dietas comerciales para peces, si bien los autores anteriores, señalan una actuación como disruptores endocrinos, los experimentos con implantes de estrógenos desarrollados en la lubina sugieren que la presencia de componentes estrogénicos esteroideos y no esteroideos en sus dietas, podrían tener un efecto negativo sobre la ingesta y crecimiento de las lubinas de talla comercial.

CONCLUSIONES

PRIMERA. Los experimentos de hibridación *in situ* demuestran que los tres subtipos de ERs caracterizados en peces teleósteos, se expresan en el cerebro de la lubina.

SEGUNDA. La amplia variedad de núcleos y áreas cerebrales en la que los ERs aparecen expresados, así como, su localización conjunta en algunas de las anteriores sugiere que éstos desarrollan tanto funciones diferenciales como redundantes.

TERCERA. La presencia de los tres subtipos de ERs en las áreas principales de control hipofisiotrópico sugiere que los tres están implicados en la regulación, a través de los sistemas de retroalimentación largos, de la síntesis y secreción de las gonadotropinas. Asimismo, la expresión diferencial de los tres subtipos en núcleos neuronales de las áreas anteriores sugiere una funcionalidad no redundante de los mismos en dicha regulación.

CUARTA. Los estudios de localización conjunta de los ERs con los gonadotropos de FSH y LH, suministran una base neuroanatómica para una regulación, a través de los sistemas de retroalimentación cortos, de la síntesis y secreción de las gonadotropinas.

QUINTA. La inhibición producida por 17β -estradiol sobre la expresión del gen β FSH en cultivos primarios de células de pituitaria de lubina demuestra que la acción de este esteroide sobre la expresión de la subunidad β FSH, *in vivo*, podría ejercerse de manera directa sobre la pituitaria misma.

SEXTA. Los experimentos de transfección con un vector de expresión portador del Esr1 de lubina demuestran que éste se expresa y es funcional en las líneas celulares de riñón humano embrionario (HEK 293) y de gonadotropos de ratón (L β T2).

SEPTIMA. La caracterización farmacológica del Esr1 de la lubina señala que éste es activado por 17β -estradiol, tanto a dosis fisiológicas como farmacológicas, demostrando que puede mediar en el control por estrógenos de la expresión génica de la especie anterior, *in vivo*. Dosis elevadas de testosterona son capaces de inducir efectos celulares similares a los causados por los estrógenos sin mediación de la aromatización.

OCTAVA. La detección significativa de actividad luciferasa observada a partir de experimentos de transfección con construcciones plasmídicas de la región promotora del gen β FSH de la lubina en L β T2, así como la ausencia de la misma en HEK 293, demuestra que este gen requiere factores celulares específicos para su expresión.

NOVENA. La caracterización de la actividad basal de la región promotora del gen β FSH pone de manifiesto que las primeras 3.5 Kb de promotor contienen, al menos, una región silenciadora y una potenciadora de la actividad transcripcional.

DÉCIMA. Los experimentos realizados para determinar el control transcripcional por estrógenos de la subunidad β FSH de la lubina sugieren que los ERs no reconocen elementos de respuesta dentro de las 3.5 Kb de región promotora analizada, o bien, que necesitan de la interacción con factores celulares específicos de gonadotropos de peces.

DÉCIMOPRIMERA. La presencia de los ERs en las áreas principales de control del comportamiento alimenticio en peces, como son el núcleo lateral tuberal y lóbulo inferior hipotalámico, dan soporte al efecto anorexigénico que los estrógenos ejercen en la lubina.

DÉCIMOSEGUNDA. La obtención de una línea celular expresando de manera estable el Esr1 de lubina y el gen luciferasa, bajo el control de un promotor portador de elementos de respuesta a los estrógenos, ha permitido desarrollar un sistema sensible para la detección y cuantificación de sustancias estrogénicas. El sistema revela la presencia de componentes estrogénicos en los piensos comerciales utilizados para el crecimiento de lubinas y doradas.

La presencia de componentes estrogénicos en dietas para peces de cultivo podría causar disrupciones en su función reproductora y comportamiento alimenticio a través de la activación de los ERs.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham I, Han S, Todman M, Korach K, Herbison A (2003) Estrogen receptor β mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 23, 5771-5777.
- Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalancia A, Visca P, Marino M (2004) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Molecular Biology of the Cell* 16, 231-237.
- Adlercreutz H (2002) phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncology* 3, 364-373.
- Aizen J, Meiri I, Tzchori I, Levavi-Sivan B, Rosendfeld H (2005) Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 142, 212-221.
- Alarid E, Windle J, White D, Mellon P (1996) Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* 122, 3319-3329.
- Al-Nakkash L, Markus B, Batia L, Prozialeck W, Broderick T (2010) Genistein induces estrogen-like effects in ovariectomized rats but fails to increase cardiac Glut4 and oxidative stress. *Journal of Medicinal Food* 13, 1369-1375.
- Altschmied J, Duschl J (1997) Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used cat vectors. *BioTechniques* 23, 436-438.
- Alvarez C, Sutcliffe J (2002) Hypocretin is an early member of the incretin gene family. *Neuroscience Letters* 324, 169-172.
- Amano M, Oka Y, Yamanome T, Okuzawa K, Yamamori K (2002) Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell Tissue Research* 309, 323-329.
- Amano M, Takahashi A, Yamanome T, Oka Y, Amiya N, Kawauchi H, Yamamori K (2005) Immunocytochemical localization and ontogenic development of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) in the brain of a pleuronectiform fish, barfin flounder. *Cell and Tissue Research* 320, 127-134.
- Amero S, Kretsinger R, Moncrief N, Yamamoto K, Pearson W (1992) The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors. *Molecular Endocrinology* 6, 3-7.
- Amiya N, Mizusawa K, Kobayashi Y, Yamanome T, Amano M, Takahashi A (2012) Food deprivation increases the expresión of the prepro-orexin gene in the hypothalamus of the Barfin Flounder, *Verasper moseri*. *Zoology Science* 29, 43-48.
- Amores A, Force A, Yan Y, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho R, Langeland J, Prince V, Wang Y, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait J (1998) Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282, 1711-1714.

An K, Nelson E, Jo P, Habibi H, Shin H, Choi C (2008) Characterization of estrogen receptor beta 2 and expression of the estrogen receptor subtypes alpha, beta 1 and beta 2 in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) during the sex change process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 150, 284-291.

Andersson E, Fjelldal P, Klenke U, Vikingstad E, Taranger G, Zohar Y, Stefansson S (2001) Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*): immunological characterization and seasonal variation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129, 551-558.

Ando H, Swanson P, Kitani T, Koide N, Okada H, Ueda H, Urano A (2004) Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17 β on gonadotropin subunit gene expression and release in masu salmon pituitary cells *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 137, 109-121.

Andreassen T, Skjoedt K, Anglade I, Kah O, Korsgaard B (2003) Molecular cloning, characterization and tissue distribution of oestrogen receptor alpha in eelpout (*Zoarces viviparus*). *General and Comparative Endocrinology* 132, 356-368.

Anglade I, Zandbergen A, Kah O (1993) Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Research* 273, 345-355.

Anglade I, Mazurais D, Douard V, Le Jossic-Corcus C, Mañanos E, Michel D, Kah O (1999) Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by *in situ* hybridization. *The Journal of Comparative Neurology* 10, 277-289.

Antonopoulo E, Swanson P, Mayer I, Borg B (1999) Feedback control of gonadotropins in atlantic salmon *Salmo salar*, male parr II. Aromatase inhibitor and androgen effects. *General and Comparative Endocrinology* 114, 142-150.

Aroua S, Weltzien F, Le Belle N, Dufour S (2007) Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids. *Physiology & Behavior* 83, 329-346.

Asarian L, Geary N (1999) Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous cholecystokinin's satiating action in ovariectomized rats. *Peptides* 1999, 445-450.

Asarian L, Geary N (2002) Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior* 42, 1-12.

Baker M (1997) Steroid receptor phylogeny and vertebrate origins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 135, 101-107.

Baker D, Larsen D, Swanson P, Dickhoff W (2000) Long-term peripheral treatment of immature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with human leptin has no clear physiologic effect. *General and Comparative Endocrinology* 118, 134-138.

Baker B, Bird D (2002) Neuronal organization of the melanin-concentrating hormone system in primitive actinopterygians: evolutionary changes leading to teleosts. *The Journal of Comparative Neurology* 442, 99-114.

Baker M (2011) Origin and diversification of steroids: co-evolution of enzymes and nuclear receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 334, 14-20.

Bagnol D, Lu X, Kaelin C, Day H, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh G, Watson S (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *The Journal of Neuroscience* 19, RC26.

Barnes S, Kim H, Darley-USmar V, Patel R, Xu J, Boersma B, Luo M (2000) Beyond ER α and ER β : estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *Journal of Nutrition* 130, 656S-657S.

Barreiro-Iglesias A, Villar-Cerviño V, Anadón R, Rodicio M (2009) Dopamine and gamma-aminobutyric acid are colocalized in restricted groups of neurons in the sea lamprey brain: insights into the early evolution of neurotransmitter colocalization in vertebrates. *Journal of Anatomy* 215, 601-610.

Batten T, Moons L, Cambre M, Vandesande F (1990) Anatomical distribution of galanin-like immunoreactivity in the brain and pituitary of teleost fishes. *Neuroscience Letters* 111, 12-17.

Batten T, Berry P, Maqbool A, Moons L, Vandesande F (1993) Immunolocalization of catecholamine enzymes, serotonin, dopamine and L-dopa in the brain of *Dicentrarchus labrax* (Teleostei). *Brain Research Bulletin* 31, 233-252.

Begtashi I, Rodríguez L, Molés G, Zanuy S, Carrillo M (2004) Long-term exposure to continuous Light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Morphological aspects. *Aquaculture* 241, 539-559.

Bergeron J, Gahr M, Horan K, Wibbels T, Crews D (1998) Cloning and *in situ* hybridization analysis of estrogen receptor in the developing gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Development, Growth and Differentiation* 40, 243-254.

Berman J, Skariah G, Maro G, Mignot E, Mourrain P (2009) Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian MCH system. *Journal of comparative Neurology* 51, 695-710.

Bittencourt J, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon J, Vale W, Sawchenko P (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization-histochemical characterization. *Journal of Comparative Neurology* 319, 218-245.

Björnström L, Sjöberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signalling: convergence of genomic and non-genomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology* 19, 833-842.

Blázquez M, Bosma P, Chang J, Docherty K, Trudeau V (1998) Gamma-aminobutyric acid up-regulates the expression of a novel secretogranin-II messenger ribonucleic acid in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 139, 4870-4880.

Blázquez M, Piferrer F (2004) Cloning, sequence analysis, tissue distribution and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular and Cellular Endocrinology* 219, 83-94.

Blázquez M, Piferrer F (2005) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissue-specific expression and mRNA levels during early development and sex differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 237, 37-48.

Blomqvist A, Soderberg C, Lundell I, Milner R, Larhammar D (1992) Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: sequences of chicken, goldfish, and *Torpedo marmorata* DNA clones. *Proceedings of the National Academy of Science* 89, 2350-2354.

Bodo C, Rissman E (2006) New roles for estrogen receptor β in behaviour and neuroendocrinology. *Frontiers in neuroendocrinology* 27, 217-232.

Bookout A, Jeong Y, Downes M, Yu R, Evans R, Mangelsdorf D (2006) Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789-799.

Boon W, Chow J, Simpson E (2010) The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. *Progress in Brain Research* 181, 209-232.

Borg B, Antonopoulou E, Mayer I, Andersson E, Berglund I, Swanson P (1998) Effects of gonadectomy and androgen treatments on pituitary and plasma levels of gonadotropins in mature male Atlantic salmon, *Salmo salar*, parr: positive feedback control of both gonadotropins. *Biology of Reproduction* 58, 814-820.

Bourgnet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer I, Moras D (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375, 377-382.

Bradford J, Northcut R (1983) Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. *Fish Neurobiology* 2, 117-163. University of Michigan Press.

Breton B, Mikolajczyk T, Popek W, Bieniarz K, Epler P (1991) Neuropeptide T stimulates *in vivo* gonadotropin secretion in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 84, 277-283.

Breton B, Sambroni E, Govoroun M, Weil C (1997) Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comptes Rendus de L Academie des Sciences Paris Life Sciences* 320, 783-789.

Breton B, Govoroun M, mikolajczyk T (1998) GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary

responsiveness to GnRH-A stimulation. *General and Comparative Endocrinology* 111, 38-50.

Breton B, Mikolajczyk T, Popek W, Bierniarz K, Epler P (1991) Neuropeptide Y stimulates *in vivo* gonadotropin secretion in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 84, 277-283.

Brian J, Harris C, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, Pojana G, Jonkers N, Runnals T, Bonfà A, Marcomini A, Sumpter J (2005) Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental Health Perspectives* 113, 721-728.

Brian M, Scott A, Li W (2008) Sex steroids and their receptors in lampreys. *Steroids* 73, 1-12.

Bridgham J, Carroll S, Thornton J (2006) Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science* 312, 97-101.

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

Bryan M, Scott A, Li W (2008) Sex steroids and their receptors in lampreys. *Steroids* 73, 1-12.

Bulkley R (1972) Diethylsbestrol in catfish feed. *Transactions of the American Fisheries Society* 101, 537-541.

Burger L, Haisenleder D, Dalkin A, Marshall J (2004) Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *Journal of Molecular Endocrinology* 33, 559-584.

Burzawa-Gerard E (1982) Chemical data on pituitary gonadotropins and their implication to evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 80-91.

Butera P, Beikirch R (1989) Central implants of dilute estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats. *Brain Research* 491, 266-273.

Butera P, Xiong M, Davis R, Platania S (1996) Central implants of dilute estradiol enhance the satiety effect of CCK-8. *Behavioral Neuroscience* 110, 823-830.

Butera P (1996) CNS steroids and the control of feeding. In: Stone T, editor. *CNS neurotransmitters and neuromodulators: neuroactive steroids*. New York: CRC Press, 211-235.

Butera P (2010) Estradiol and the control of food intake. *Physiology & Behavior* 99, 175-180.

Butcher R, Collins W, Fugo N (1974) Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94, 1074-1078.

Carolsfeld J, Powell J, Park M, Fisher W, Craig A, Chang J, Rivier J, Sherwood N (2000) Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology* 141, 505-512.

Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerdá J, Ramos J, Mañanos E Bromage N (1995) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Bromage N, Roberts R (Eds), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, Oxford, pp 138-168.

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

Cave N, Backus R, Marks S, Klasing K (2007) oestradiol and genistein reduce food intake in male and female overweight cats after gonadectomy. *New Zeland Veterinary Journal* 55, 113-119.

Cerdá-Reverter J, Zanuy J, Carrillo M, Kah O (1996) Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marines teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology* 103, 290-300.

Cerdá-Reverter J, Martínez-Rodríguez G, Zanuy S, Carrillo M (1998) Cloning of neuropeptide Y, peptide YY and peptide Y from sea bass (*Dicentrarchus labrax*), a marine teleost. *Ann. New York Acad. Sci.* 839, 493-495.

Cerdá-Reverter J, Sorbera L, Carrillo M, Zanuy S (1999) Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). *American Journal of Physiology* 277, 1627-1634.

Cerdá-Reverter J, Larhammar D (2000a) Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function and molecular evolution. *Biochemistry and Cellular Biology* 78, 371-392.

Cerdá-Reverter J, Martínez-Rodríguez G, Anglade I, Kah O, Zanuy S (2000b) Peptide YY (PYY) and fish pancreatic peptide Y (PY) expression in the brain of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as revealed by *in situ* hybridization. *The Journal of Comparative Neurology* 426, 197-208.

Cerdá-Reverter J, Anglade I, Martínez-Rodríguez G, Mazurais D, Muñoz-Cueto J, Carrillo M, Kah O, Zanuy S (2000c) Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19, 197-210.

- Cerdá-Reverter J, Zanuy S, Muñoz-Cueto J (2001a) Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) II. The diencephalon. *Journal of Morphology* 247, 229-251.
- Cerdá-Reverter J, Zanuy S, Muñoz-Cueto J (2001b) Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) I. The telencephalon. *Journal of Morphology* 247, 217-228.
- Cerdá-Reverter J, Peter R (2003a) Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene. *Endocrinology* 144, 4552-4461.
- Cerdá-Reverter J, Ringholm A, Schiöth H, Peter R (2003b) Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: involvement in the control of food intake. *Endocrinology* 144, 2336-2349.
- Cerdá-Reverter J, Schiöth H, Peter R (2003c) The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regulatory Peptides* 115, 101-113.
- Cerdá-Reverter J, Muriach B, Zanuy S, Muñoz-Cueto J (2008) A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): the midbrain and hindbrain. *acta histochemica* 110, 433-450.
- Cerdá-Reverter J, Canosa L (2009) The GnRH system and the neuroendocrine regulation of reproduction. *Fish Neuroendocrinology. Fish Physiology series*, 28. Edited by Anthony P. Farrell and Colin J. Brauner.
- Chakraborty T, Shibata Y, Zhou L, Katsu Y, Iguchi T, Nagahama Y (2011) Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 333, 47-54.
- Chai B, Neubig R, Millhauser G, Thomson D, Jackson P, Barsh G, Dickinson C, Li J, Lai Y, Gantz I (2003) Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein. *Peptides* 24, 603-609.
- Chan C, Cheng C (2004) Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 214, 81-95.
- Chang J, Yu K, Wong A, Peter R (1990) Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. *Neuroendocrinology* 51, 664-674.
- Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* 7, 2745-2752.

- Chen J, Chiou M, Chen L, Wu J (2010) Molecular cloning and functional analysis of the zebrafish follicle-stimulating hormone (FSH) β promoter. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 155, 155-163.
- Chen M, Celik A, Georgeson K, Harmon C, Yang Y (2006) Molecular basis of melanocortin-4 receptor for AGRP inverse agonism. *Regulatory Peptides* 136, 40-49.
- Chen W, Wang X, Zhou Y, Dong H, Lin H, Li W (2011) Molecular cloning, tissue distribution and the expression in the regulation of food intake of prepro-orexin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zoological Research* 3, 285-292.
- Cheng G, Yuen Ch, Ge W (2007) Evidence for the existence of local activin-follistatin negative feedback loop in the goldfish pituitary and its regulation by activin and gonadal steroids. *Journal of Endocrinology* 195, 373-384.
- Chiba A, Sohn Y, Honma Y (1996) Distribution of neuropeptide Y and gonadotropin-releasing hormone immunoreactivities in the brain and hypophysis of the ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Archives of histology and cytology* 59, 137-148.
- Choi C, Habibi H (2003) Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 204, 169-177.
- Chu S, Fuller P (1997) Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 19, 195-199.
- Chung B, Guo I, Chou S (1997) Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids* 62, 37-42.
- Ciccone N, Xu S, Lacza C, Carroll R, Kaiser U (2010) Frequency-dependent regulation of follicle-stimulating hormone β by pulsatile gonadotropin-releasing hormone is mediated by functional antagonism of bZIP transcription factors. *Molecular and Cellular Biology* 30, 1028-1040.
- Clegg D, Brown L, Zigman J, Kemp C, Strader A, Benoit S (2007) Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes* 56, 1051-1058.
- Colombe L, Fostier A, Bury N, Pakdel F, Guiguen Y (2000) A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: cloning and characterization of its steroid binding domain. *Steroids* 65, 319-328.
- Colledge W (2008) GPR54 and kisspeptins. *Results and Problems in Cell Differentiation* 46, 117-143.
- Cone R (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortins system. *Endocrinology Reviews* 27, 736-749.
- Conde-Sieira M, Agulleiro M, Aguilar A, Míguez J, Cerdá-Reverter J, Soengas J (2010) Effect of different glycaemic conditions on gene expression of neuropeptides involved

- in control of food intake in rainbow trout; interactions with stress. *The Journal of Experimental Biology* 213, 3858-3865.
- Copeland P, Thomas P (1989) Control of gonadotropin release in the atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology* 74, 474-483.
- Corbin C, Trant J, Walters K, Conley A (1999) Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology* 140, 5202-5210.
- Corodimas K, Morrell J (1990) Estradiol-concentrating forebrain and midbrain neurons project directly to the medulla. *The Journal of Comparative Neurology* 291, 609-620.
- Cosnefroy A, Brion F, Guillet B, Laville N, Porcher J, Balaguer P, Aït-Aïssa S (2009) A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicology in Vitro* 23, 1450-1454.
- Cowey C, Pope J, Andron J, Blair A (1973) Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of oral administration of diethylstilboestrol and cyproheptadine on the growth of *Pleuronectes platesa*. *Marine Biology* 19, 1-6.
- Cravo R, Margatho L, Osborne-Lawrence S, Donato J, Atkin S, Bookout A, Rovinsky S, Frazao R, Lee C, Gautron L, et al. (2011) Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience* 173, 37-56.
- Cupples W (2002) Regulation of body weight. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative physiology* 282, 1264-1266.
- Czaja J (1975) Food rejection by female rhesus monkeys during the menstrual cycle and early pregnancy. *Physiology & Behavior* 4, 579-587.
- Czaja J (1978) Ovarian influences on primate food intake: assessment of progesterone actions. *Physiology & Behavior* 21, 923-931.
- Czajka-Oraniec I, Simpson E (2010) Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynologia Polska* 61, 126-134.
- Dalvit-McPhillips S (1983) The effect of the human menstrual cycle on nutrient intake. *Physiology & Behavior* 31, 209-212.
- Danger J, Breton B, Vallarano M, Fournier A, Pelletier G, Vaudry H (1991) Neuropeptide Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization and action on the gonadotropin release. *Endocrinology* 128, 2360-2368.
- Davie A, Porter M, Bromage N, Migaud H (2007) The role of seasonally altering photoperiod in regulating physiology in atlantic cod (*Gadus morhua*). Part I. Sexual maturation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 84-97.

- Davis K, Ludwig G (2004) Hormonal effects on sex differentiation and growth in sunshine bass *Morone chrysops* X *Morone saxatilis*. *Aquaculture* 231, 587-596.
- Davis L, Fox B, Lim C, Hiramatsu N, Sullivan C, Hirano T, Grau E (2009) Induction of vitellogenin production in male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by commercial fish diets. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 154, 249-254.
- De Leeuw R, Wurth Y, Zandbergen M, Peute J, Goos H (1986) The effects of aromatizable androgens, non-aromatizable androgens and estrogens on gonadotropin release in castrated African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). A physiological and ultrastructural study. *Cell and Tissue Research* 243, 587-594.
- Demski L, Knigge K (1971) The telencephalon and hypothalamus of the bluegill (*Leopomis macrochirus*): evoked feeding, aggressive and reproductive behavior with representative frontal sections. *Journal of Comparative Neurology* 143, 1-16.
- Demski L, Dulka J (1986) Thalamic-stimulation evokes sex-color change and gamete release in a vertebrate hermaphrodite. *Experientia* 42, 1285-1287.
- De Pedro N, López-Patino M, Guijarro M, Pinillos M, Delgado M, Alonso-Bedate M (2000) NPY receptors and opiodergic system are involved in NPY-induced feeding in goldfish. *Peptides* 21, 1495-1502.
- De Roux N, Genin E, Carel J, Matsuda F, Chaussain J, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadismo due to loss of function of the kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the Natural Academy of Science* 100, 10972-10976.
- De Vries G, Simerly R (2002) Anatomy, development, and function of sexually dimorphic neural circuits in the mammalian brain. *Hormones, brain and behaviour*. Amsterdam: Elsevier.
- Di Suma A, Abbate F, Germaná G, Naccari F, Dhaskali L, Pssantino G (1993) GABA concentrations in different cerebral areas of bass (*Dicentrarchus labrax*). *Bolletino della Società Italiana di Biologia Experimentale* 69, 711-716.
- Dickey J, Swanson P (1998) Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Molecular Endocrinology* 21, 291-306.
- Don J, Stelzer G (2002) The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187, 115-124.
- Dores R, Lecaude S (2005) Trends in the evolution of the proopiomelanocortins gene. *General and Comparative Endocrinology* 142, 81-93.
- Drean Y, Liu D, Wong A, Xiong F, Hew C (1996) Steroidogenic factor 1 and estradiol receptor act in synergism to regulate the expression of the salmon gonadotropin II β subunit gene. *Molecular Endocrinology* 10, 217-229.

Dubois E, Florijn M, Zandbergen M, Peute J, Goos H (1998) Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). *General and Comparative Endocrinology* 112, 383-393.

Eckel L (2004) Estradiol: a rhythmic, inhibitory, indirect control of meal size. *Physiology & Behavior* 82, 35-41.

Edwards C, Abbot C, Sunter D, Kim M, Dakin C, Murphy K, Taheri S, Rossi M, Bloom S, Abusnana S (2000) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. *Brain Research* 866, 128-134.

Eertmans F, Dhooge W, De Wever O, Vanden Berghe W, Bogaert V, Bracke M, Haegeman G, Comhaire F, Kaufman J (2007) Estrogen receptor signalling is an unstable feature of the gonadotropic L β T2 cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* 273, 16-24.

Eick G, Thornton J (2011) Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 334, 31-38.

Elias C, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima R, Bjorbaek C, Flier J, Saper C, Elmquist J (1999) 23, 775-786.

Escobar S, Servili A, Felip A, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M, Kah O (2010) Neuroanatomical characterization of the kisspeptin systems in the brain of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*), in: 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pécs, Hungary, 2010, p. 90 (Abstract Book).

Escobar S, Servilli A, Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Kah O (2011) Characterization of the Kisspeptin systems in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): relationships with oestrogen receptors. *Indian J. Sci. Technol.*, 9th ISRPF. ISSN: 0974-6846.

Escriva H, Safi R, Hänni C, Langlois M, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proceedings of Natural Academy of Science* 94, 6803-6808.

Escriva H, Delaunay F, Laudet V (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22, 717-27.

Escriva H, Laudet V, Robinson-Rechavi M (2003) Nuclear receptors markers of animal genome evolution. *Journal of Structural and Functional Genomics* 3, 177-184.

Estacio M, Yamada S, Tsukamura H, Hirunagi K, Maeda K (1996) Effect of casting and immobilization stress on estrógeno receptor immunoreactivity in the brain in ovariectomized female rats. *Brain Research* 717, 55-61.

Esterhuysen M, Helbing C, Van Wyk J (2010) Isolation and characterization of three estrogen receptor transcripts in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 119, 26-34.

Faber P, van Rooij H, Schipper H, Brinkmann A, Trapman J (1993) Two different, overlapping pathways of transcription initiations are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 9296-9301.

Fan W, Boston B, Kesterson R, Hraby V, Cone R (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-168.

Fan X, Xu H, Warner M, Gustafsson J (2010) ER β in CNS: new roles in development and function. *Progress in Brain Research* 181, 233-250.

Fekete C, Marks D, Sarkar S, Emerson C, Rand W, Cone R, Lechan R (2004) Effect of agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology* 145, 4816-4821.

Felip A, Zanuy S, Muriach B, Cerdá-Reverter J, Carrillo M (2008) reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture* 275, 347-355.

Felip A, Zanuy S, Pineda R, Pinilla L, Carrillo M, Tena-Sempere M, Gómez A (2009) Evidence for two distinct KISS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312, 61-71.

Ferguson A, Samson W (2003) The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 24, 141-150.

Fernald R, Shelton L (1985) The organization of the diencephalon and the pretectum in the cichlid fish, *Haplochromis burtoni*. *The Journal of Comparative Neurology* 238, 202-217.

Filardo E, Quinn J, Bland K, Frackelton A (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G proteina-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology* 14, 1649-1660.

FilardoE, Quinn J, Frackelton A, Bland K (2002) Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MPAK signaling axis. *Molecular Endocrinology* 16, 70-84.

Filby A, Tyler C (2005) Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biology of Reproduction* 73, 648-662.

Foidart A, Lakaye B, Grisar T, Ball G, Balthazar J (1999) Estrogen receptor-beta in quail: cloning, tissue expression and neuroanatomical distribution. *Journal of Neurobiology* 40, 327-42.

Force A, Lynch M, Pickett F, Amores A, Yan Y, Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531-1545.

- Forlano P, Deitcher D, Bass A (2005) Distribution of estrogen receptor alpha mRNA in the brain and inner ear of a vocal fish with comparisons to sites of aromatase expression. *The Journal of Comparative Neurology* 483, 91-113.
- Forlano P, Cone R (2007) Conserved neurochemical pathways involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *The Journal of Comparative Neurology* 505, 235-248.
- Franceschini I, Lomet D, Cateu M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A (2006) Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters* 401, 225-230.
- Francis G, Makkar H, Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197-227.
- Friend K, Ang L, Shupnik M (1995) Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proceedings of Natural Academy of Science* 92, 4367-4371.
- Fu K, Chen C, Lin C, Chang W (2008) Molecular cloning and tissue distribution of three estrogen receptors from the cyprinid fish *Variocorhinus barbatulus*. *Journal of Comparative Physiology* 178, 189-197.
- Gampe R, Montana V, Lambert M, Wisley G, Milburn M, Xu H (2000) Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by treatment formation and the AF-2 helix. *Genes & Development* 14, 2229-2241.
- García-López A, Pascual E, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G (2006) Disruption of gonadal maturation in cultured senegalese sole *Solea senegalesis* kaup by continuous Light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* 261, 789-798.
- Ge W, Miura T, Kobayashi H, Peter R, Nagahama Y (1997) Cloning of cDNA for goldfish activin beta B subunit and the expression of its mRNA in gonadal and non-gonadal tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* 19, 37-45.
- Ge W, Ko N, Pang F, Chung M, Lin S, Yuen C, Lau M, Liu L, Sohn Y, Kobayashi M, Aida K (2003) Activin stimulates goldfish FSH biosynthesis by enhancing FSH β promoter activity. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 65-71.
- Geary N, Asarian L, Korach K, Pfaff D, Ogawa N (2001) Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology* 142, 4751-4757.
- Gelineau A, Boujard T (2001) Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 58, 716-724.
- Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, Moriyama S, Kagawa H (2000) Unique expression of gonadatropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biology of Reproduction* 63, 308-319.

Gentry R, Wade G (1976) Androgenic control of food intake and body weight in male rats. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 90, 18-25.

Gómez J, Weil C, Ollitrault M, Le Bail P, Breton B, Le Gac F (1999) Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 113, 413-428.

González A, Piferrer F (2003) Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 132, 223-230.

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

González-Martínez D, Zmora N, Mañanos E, Saligaut D, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto J (2002) 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. *Journal of Comparative Neurology* 446, 95-113.

González-Martínez D, Madigou T, Mañanos E, Cerdá-Reverter J, Zanuy S, Kah O, Muñoz-Cueto J (2004) Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an *in situ* hybridization study. *Biology of Reproduction* 70, 1380-1391.

González-Martínez D, Zmora N, Saligaut D, Zanuy S, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto J (2004) New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotropin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 28, 1-15.

Gothlif Y, Muñoz-Cueto J, Sagrillo C, Selmanoff M, Chen T, Kah O, Elizur A, Zohar Y (1996) Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biology of Reproduction* 55, 636-645.

Gothlif Y, Meiri I, Elizur A, Zohar Y (1997) Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin-releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids (mRNAs), gonadotropin beta-subunit mRNAs, plasma gonadotropin and steroids in female gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Biology of Reproduction* 57, 1145-1154.

Gorbman A (1995) Olfactory origins and evolution of the brain-pituitary endocrine system: facts and speculation. *General and Comparative Endocrinology* 97, 171-178.

Gottlicher M, Heck S, Herrlich P (1998) Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *Journal of Molecular Medicine* 76, 480-489.

- Graham F, Smiley J, Russell W, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell-line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 36, 59-72.
- Green C, Kelly A (2009) Effects of the estrogen mimic as a dietary component on sex differentiation and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).
- Greytak S, Callard G (2007) Cloning of three estrogen receptors from killfish (*Fundulus heterochitus*): differences in populations from polluted and reference environments. *General and Comparative Endocrinology* 150, 174-188.
- Gruber C, Gruber D, Gruber I, Wieser F, Huber J (2004) Anatomy of the estrogen response element. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 73-78.
- Guerriero G (2009) Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands and neurodistribution. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals of the New York Academy of Sciences* 1163, 154-168.
- Guligur L, Moncaut N, Canario A, Somoza G (2006) Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Physiology* 144, 272-283.
- Guzman K, Miller C, Philips C, Miller W (1991) The gene encoding ovine follicle-stimulating hormone β : isolation, characterization, and comparison to related ovine genomic sequence. *DNA and Cell Biology* 10, 593-601.
- Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanovic M, Brailoiu G, Gao X, Mueller-Guerre L, Marjon N, Gut A, Minotti R, Meyer M, Amann K, Ammann E, Pérez-Domínguez A, Genoni M, Cleqq D, Dun N, Resta T, Prossnitz E, Barton M (2009) Regulatory role for G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circulation Research* 104, 288-291.
- Halm S, Martínez-Rodríguez G, Rodríguez L, Prat F, Mylonas C, Carrillo M, Zanuy Z (2004) Cloning, characterization, and expresión of three oestrogen receptors (ER α , ER β 1, ER β 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 223, 63-75.
- Handschin C, Meyer U (2003) Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews* 55, 649-663
- Harbott L, Burmeister S, White R, Vagell M, Fernald R (2007) Androgen receptors in a cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*: structure, localization and expression levels. *Journal of Comparative Neurology* 504, 57-73.
- Harris D, Besselink E, Henning S, Go V, Heber D (2005) Phytoestrogens induces differential estrogen receptor alpha- or beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine* 230, 558-568.

- Harris H (2007) Estrogen receptor- β : recent lessons from *in vivo* studies. *Molecular Endocrinology* 21, 1-13.
- Harvey J, Ashford M (2003) Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* 44, 845-854.
- Hassin S, Elizur A, Zohar Y (1995) Molecular cloning and sequence analysis of stripped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropin-I and -II subunits. *Journal of Molecular Endocrinology* 15, 23-25.
- Hassin S (1998) Pubertal development in the striped bass (*Morone saxatilis*, teleostei): ontogeny and regulation of gonadotropin-I and -II gene expression. Ph.D. Thesis, university of Maryland p 188.
- Hawkins M, Thornton J, Crews D, Skipper J, Alyssa Dotte, Thomas P (2000) Identification of a third estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleost. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 97, 10751-10756.
- Hawkins M, Thomas P (2004) The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ER beta a are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology* 145, 2968-2977.
- Hawkins M, Godwin J, Crews D, Thomas P (2005) The distributions of the duplicate oestrogen receptors ER- β a and ER- β b in the forebrain of the atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for subfunctionalization after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society* 272, 633-641.
- Hendry C, Martin-Robichaud D, Benfey T (2003) Hormonal sex reversal of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 219, 769-781.
- Henley D, Korac H (2006) Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology* 147, 25-32.
- Heinzel T, Lavinsky R, Mullen T, Soderstrom M, Laherty C, Torchia J (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387, 43-48.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* 117, 5965-5973.
- Hevroy E, Waagbo R, Tortensen B, Takle H, Stubhaug I, Jorgensen S, Torgersen T, Tvenning L, Susort S, Breck O, Hansen T (2012) Ghrelin is involved in voluntary anorexia in atlantic salmon raised at elevated sea temperatures. *General and Comparative Endocrinology* 175, 118-134.
- Heyman R, Mangelsdorf D, Dyck J, Stein R, Eichele G, Evans R, Thaller C (1992) 9-cis-retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.

- Higa M, Kitahashi T, Sasaki Y, Okada H, Ando H (1997) Distinct promoter sequences of two precursor genes for salmon gonadotropin-releasing hormone in masu salmon. *Journal of Molecular Endocrinology* 19, 149-161.
- Hillebrand J, de Wied D, Adan R (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23, 2283-2306.
- Hillman J, Tong J, Tschop M (2011) Ghrelin biology and its role in weight-related disorders. *Discovery Medicine* 11, 521-528.
- Himick B, Vigna S, Peter R (1996) Characterization of cholecystokinin binding sites in goldfish brain and pituitary. *American Journal of Physiology* 271, 137-143.
- Hiroi H, Inone S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketami Y, Muramatsu M (1999) Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *Journal of Molecular Endocrinology* 22, 37-44.
- Holland M, Hassin S, Zohar Y (1998) Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). *Biology of Reproduction* 59, 1153-1162.
- Holland M, Hassin S, Zohar Y (2001) Seasonal fluctuations in pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (teleostei), during juvenile and pubertal development. *Journal of Endocrinology* 169, 527-538.
- Hordvik I (1998) The impact of ancestral tetraploidy on antibody heterogeneity in salmonid fishes. *Immunological Reviews* 166, 153-157
- Hoskins L, Meiyu X, Volkoff H (2008) Interactions between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and orexin in the regulation of feeding and reproduction in goldfish (*Carassius auratus*). *Hormone and Behavior* 54, 379-385.
- Hrabovszky E, Steinhauser A, Barabas K, Shughrue P, Petersen S, Merchenthaler I, Liposits Z (2001) Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 42, 3261-3264.
- Hsu H, Hsu N, Hu M, Chung B (2006) Steroidogenesis in zebrafish and mouse models. *Molecular and Cellular Endocrinology* 248, 160-163.
- Hu M, Feng-Lin E, Tong S, Lai W, Hsu N, Chi-Kwang L, Chung B (2001) Regulation of steroidogenesis in transgenic mice and zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 171, 9-14.
- Huang H, Sebastian J, Strahl B, Wu J, Miller W (2001) The promoter for the ovine follicle-stimulating hormone- β gene (FSH β) confers FSH β -like expression on luciferase in transgenic mice: regulatory studies *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 142, 2260-2266.

- Huang H, Zhang Y, Huang W, Li S, Zhu P, Liu Y, Yin S, Liu X, Lin H (2009) Molecular characterization of marbled eel (*Angilla marmorata*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during artificially induced gonadal development. *General and Comparative Endocrinology* 162, 192-2002.
- Huggard-Nelson D, Nathwani P, Keremouni A, Habibi H (2002) Molecular characterization of LH-beta and FSH-beta subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 188, 171-193.
- Huesa G, van den Pol A, Finger T (2005) Differential distribution of hypocretin (orexin) and melanin-concentrating hormone in the goldfish brain. *The Journal of Comparative Neurology* 488, 476-491.
- Huising M, Kruiswijk C, Flik G (2006) Phylogeny and evolution of class I helical cytokines. *Journal of Endocrinology* 189, 1-25.
- Hung A, Stanbury M, Shanabrough M, Horvath T, García-Segura L, Naftolin F (2003) Estrogen, synaptic plasticity and hypothalamic reproductive aging. *Experimental Gerontology* 38, 53-59.
- Hunter R, Philpot K, Vicentic A, Domínguez G, Hibert G, Kuhar M (2004) CART in feeding and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 454-459.
- Huszar D, Lynch C, Fairchild-Huntress V, Dunmore J, Fanq Q, Berkemeier L, Gu W, Keterson R, Boston B, Cone R, Smith F, Campfield L, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.
- Inudo M, Ishibashi H, Matsumura N, Matsuoka M, Mori T, Taniyama S, Kadokami K, Koga M, Shinohara R, Hutchinson T, Iguchi T, Arizono K (2004) Effect of estrogenic activity and phytoestrogen and organochlorine pesticide contents in an experimental fish diet on reproduction and hepatic vitellogenin production in medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Medicine* 54, 673-680.
- Ingraham H, Lala D, Ikeda Y, Luo X, Shen W, Nachtigal M, Abbud R, Nilson J, Parker K (1994) The nuclear receptor SF-1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes & Development* 8, 2302-2312.
- Inui A, Asakawa A, Bowers C, Mantovani G, Laviano A, Meguid M, Fujimiya M (2004) Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of stomach as an endocrine organ. *The federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 18, 439-456.
- Jacobs M, Dickins M, Lewis D (2003) Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hER β), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hER α) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) ligand binding domain from the human PPAR γ crystal structure. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 84, 117-132.

Jameson J, Bercker C, Lindell C, Habener J (1988) Human follicle-stimulating hormone β -subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Molecular Endocrinology* 2, 806-815.

Jensen J, Conlon J (1992) Characterization of peptides related to neuropeptide tyrosine and peptide tyrosine-tyrosine from the brain and gastrointestinal tract of teleost fish. *European Journal of Biochemistry* 210, 405-410.

Jensen I, Rourke I, Moller M, Jonson L, Johnsen A (2001) Identification and distribution of CCK-related peptides and mRNA in the rainbow trout. *Biochimica et Biophysica Acta* 1517, 190-201.

Jockenhovel F, Blum W, Vogel E, Englaro P, Müller-Wieland D, Reinwein D, Rascher W, Krone W (1997) Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82, 2510-2513.

Johnston S, Maler L (1992) Anatomical organization of the hypophysiotrophic systems in the electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Journal of Comparative Neurology* 317, 421-437.

Kah O, Dubourg P, Onteniente B, Geffard M, Calas A (1986) The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary. An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell and Tissue Research* 244, 577-582.

Kah O, Dubourg P, Martinoli M, Rabhi M, Gonnet F, Geffard M, Calas A (1987) Central GABAergic innervation of the pituitary in goldfish: a radioautographic and immunocytochemical study at the electron microscope level. *General and Comparative Endocrinology* 67, 324-332.

Kah O, Pontet A, Danger J, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, Callas A (1989) Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 69-76.

Kah O, Anglade I, Lepretre E, Dubourg P, Monbrison D (1993) The reproductive brain in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 11, 85-98.

Kah O, Trudeau V, Sloley B, Chang J, Dubourg P, Yu K, Peter R (1992) Influence of GABA on gonadotropin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 55, 396-404.

Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guligur L, Vaillant C, Lareyre J (2007) GnRH and GnRH receptors in metazoan: a historical, comparative, and evolutive perspective. *General and Comparative Endocrinology* 153, 346-364.

Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C (2000) estrogen receptor alfa rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *The Journal of Biological Biochemistry* 275, 18447-18453.

Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawauchi H, Kangawa K (2003) Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic

DNA cloning and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology* 144, 5215-5226.

Kajimura s, Yoshiura Y, Juzaki M, Aida K (2001) cDNA cloning of two gonadotropin β subunits (GTH-I β and -II β) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *General and Comparative Endocrinology* 122, 117-129.

Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda k, Oka Y (2008) Identification of KISS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149, 2467-2476.

Kang K, Yahashi S, Matsuda K (2011) The effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: an overview. *International Journal of peptides* 2011:171034 Epub.

Karas R, Hodgin J, Known M, Kregge J, Aronovitz M, Mackey W, Gustafsson J, Korach K, Smithies O, Mendelsohn M (1999) Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 96 1533-15136.

Kaslin J, Nystedt J, Ostergard M, Peitsaro N, Panula P (2004) The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *Journal of Neuroscience* 24, 2678-2689.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.

Katzenellenbogen J, Muthyala R (2003) Interactions of exogenous endocrine active substances with nuclear receptors. *Pure and Applied Chemistry* 75, 1797-1817.

Kauffman A, Rissman E (2004) The evolutionary conserved gonadotropin-releasing hormone II modifies food intake. *Endocrinology* 145, 686-691.

Kausch U, Alberti M, Haindl S, Budczies J, Hock B (2008) Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 23, 15-24.

Kawai S, Kobayashi M, Kaneko H (2003) effect of endogenous active substances in wild life species: genetic, biochemical, and physiological factors in variable susceptibility to endocrine disruptors. *Pure and Applied Chemistry* 75, 2335-2341.

Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker B (1983) Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* 305, 321-323.

Kawauchi H, Suzuki K, Itoh H, Swanson P, Naito N, Nagahama Y, Nozaki M, Kakai Y, Itoh S (1989) The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 29-38.

Keay J, Bridgham J, Thornton J (2006) The *Octopus vulgaris* estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. *Endocrinology* 147, 3861-3869.

Kehoe A, Volkoff H (2007) Cloning and characterization of neuropeptide Y (NPY) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in atlantic salmon cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular & integrative Physiology* 146, 451-461.

Kim H, Nelson-Dooley C, Della-Ferra M, Yang J, Zhang W, Duan J, Hartzell D, Hamrick M, Baile C (2006) Genistein decreases food intake, body weight and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *Journal of Nutrition* 136, 409-414.

Kim Y, Stumpf W, Sar M (1978) Topography of estrogen target cells in the forebrain of goldfish, *Carassius auratus*. *The Journal of Comparative Neurology* 182, 611-620.

Kim Y, Stumpf W, Sar M (1979) Topographic distribution of the estrogen target cells in the forebrain of platyfish, *Xiphophorus maculatus*, studied by autoradiography. *Brain Research* 170, 43-59.

Kim Y, Stumpf W, Reid F, Sar M, Selzer M (1980) Estrogen target cells in the forebrain of river lamprey *Ichthyomyzon unicuspis*. *The Journal of Comparative Neurology* 191, 607-620.

Kim B, Sung S, Choi E, Kim Y, Kim K, Dong S, Kim H, Chang Y, Lee J, Chang R (2000) Dedifferentiation of conditionally immortalized hepatocytes with long-term *in vitro* passage. *Experimental and Molecular Medicine* 32, 29-37.

Kinoshita M, Morita T, Toyohara H, Hirata T, Sakaguchi M, Ono M, Inoue K, Wakamatsu Y, Ozato K (2001) Transgenic medaka overexpressing a melanin-concentrating hormone exhibit lightened body color but no remarkable abnormality. *Marine Biotechnology* 3, 536-543.

Kirchgessner A, Sclafani A (1988) PVN-hindbrain pathway involved in the hypothalamic hyperphagia-obesity syndrome. *Physiology & Behavior* 42, 517-528.

Kirchgessner A (2002) Orexins in the brain-gut axis. *Endocrinology Reviews* 23, 1-15.

Kirshner S, Palmer L, Bodor J, Saji M, Kohn L, Singer D (2000) Major histocompatibility class I gene transcription in thyrocytes: a series of interacting regulatory DNA sequence elements mediate thyrotropin/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate repression. *Molecular Endocrinology* 14, 82-98.

Kitahashi T, Sato H, Sakuma Y, Parhar I (2005) Cloning and functional analysis of promoters of three GnRH genes in a cichlid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 536-543.

Kitahashi T, Ogawa S, Parhar I (2008) Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150, 821-831.

- Kitahashi T, Ogawa S, Parhar I (2009) Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150, 821-831.
- Klebig M, Wilkinson J, Geisler J, Woychik R (1995) Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes and yellow fur, *Proceedings of the Natural Academy of Science* 92, 4728-4732.
- Klenke U (2006) Gonadal and steroid feedback regulation of the hypothalamus-pituitary axis in striped bass (*Morone saxatilis*). Ph.D. Dissertation, University of Maryland, College Park.
- Klinge C (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen responsive elements. *Nucleic Acids Research* 29, 2905-2919.
- Ko K, Malison J, Reed J (1999) Effect of genistein on the growth and reproductive function of male and female yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of the World Academy Society* 30, 73-79.
- Kobayashi M, Stacey N (1990) Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zoo Science* 7, 715-721.
- Kobayashi Y, Peterson B, Waldbieser G (2008) Association of cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) messenger RNA level, food intake and growth in channel catfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular & integrative Physiology* 151, 219-225.
- Koike S, Sakai M, Muramatsu M (1987) Molecular cloning and characterization of the rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Research* 15, 2499-2513.
- Kojima K, Kamijo M, Kageyama H, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K (2009) Neuronal relationship between orexin-A and neuropeptide Y-induced orexigenic actions in goldfish. *Neuropeptides* 43, 63-71.
- Korczynski W, Ceregrzyn M, Matyjek R, Kato I, Kuwahara A, Wolinski J, Zabielski R (2006) Central and local (enteric) action of orexins. *Journal of physiology and pharmacology* 57, 17-42.
- Kristensen P, Judge M, Thim L, Ribel U, Christjansen K, Wulff B, Clausen J, Jensen P, Madsen O, Vrang N, Larsen P, Hastrup S (1999) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72-76.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert J, Chambon P (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erb A and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO Journal* 5, 891-897.
- Kuhar M, Dall Vechia S (1999) CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends in Neurosciences* 22, 316-320.

- Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Science* 93, 5925-5930.
- Kuiper G, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad S, Nilsson S, Gustafsson J (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870.
- Kuiper G, Lemmen J, Carlsson B, Corton J, Safe S, Van Der Saag P, Van Der Burg B, Gustafsson J (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor b. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kumar T, Kelly M, Mortrud M, Low M, Matzuk M (1995) Cloning of the mouse gonadotropin β -subunit encoding genes I. Structure of the follicle-stimulating hormone β -subunit-encoding gene. *Gene* 166, 333-334.
- Kurokawa T, Suzuki T (2002) Development of neuropeptide Y-related peptides in the digestive organs during the larval stage of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *General and Comparative Endocrinology* 126, 30-38.
- Kurokawa T, Suzuki T, Hashimoto H (2003) Identification of gastrin and multiple cholecystokinin genes in teleost. *Peptides* 24, 227-235.
- Kurokawa T, Uji S, Suzuki T (2005) Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides* 26, 745-750.
- Kurokawa T, Murashita K (2009) Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Orizias latipes*. *General and Comparative Endocrinology* 161, 229-237.
- Langub M, Maley B, Watson R (1991) Ultrastructural evidence for luteinizing hormone-releasing hormone neural control of estrogen responsive neurons in the preoptic area. *Endocrinology* 128, 27-36.
- Larhammar D, Wraith A, Berglund M, Holmberg S, Lundell I (2001) Origins of the many NPY-family receptors in mammals. *Peptides* 22, 295-307.
- Larhammar D, Salaneck E (2004) Molecular evolution of NPY receptor subtypes. *Neuropeptides* 38, 141-151.
- Larsen D, Swanson P (1997) Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 108, 152-160.
- Larsson T, Olsson F, Sundström G, Lundin L, Brenner S, Venkatesh B, Larhammar D (2008) Early vertebrate chromosome duplications and evolution of the neuropeptide Y receptor gene regions. *BMC evolutionary biology* 8, 184.
- Lassiter C, Kelley B, Linney E (2002) Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta a (ER beta a) in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene* 299, 141-151.

- Latonnelle K, Fostier A, Le Menn F, Bennetau-Pelissero C (2002) Binding affinities of hepatic nuclear estrogen receptors for phytoestrogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *General and Comparative Endocrinology* 129, 69-79.
- Lau M, Ge W (2005) Cloning of Smad2, Smad3, Smad4 and Smad7 from the goldfish pituitary and evidence for their involvement in activin regulation of goldfish FSH β promoter activity. *General and Comparative Endocrinology* 141, 22-38.
- Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Steheun D (1992) Evolution of the nuclear receptor gene. *The EMBO Journal* 11, 1003-1013.
- Laudet V (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* 19, 207-226.
- Leal E, Sánchez E, Muriach B, Cerdá-Reverter J (2009) Sex steroid-induced inhibition of food intake in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Comparative physiology B* 179, 77-86.
- Lee S, Soltesz I (2011) Cholecystokinin: a multi-functional molecular switch of neuronal circuits. *Developmental Neurobiology* 71, 83-91.
- Leid M, Kastner P, Chambon P (1992) Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends in Biochemical Sciences* 17, 427-433.
- Le Jossic C, Michel D (1998) Striking evolutionary conservation of a cis-element related to nuclear receptor target sites and present in TR2 orphan receptor genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245, 64-69.
- Lemond B, Freedman L (1999) Nuclear receptor cofactors as chromatin remodelers. *Current Opinion in Genetics and Development* 9, 499-504.
- Leonard J, Waldbieser G, Silverstein J (2001) Neuropeptide Y sequence and messenger RNA distribution in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Biotechnology* 3, 111-118.
- Le Page Y, Scholze M, Kah O, Pakdel F (2006) Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environmental Health Perspectives* 114, 752-758.
- Levavi-Sivan B, Biran J, Fireman E (2006) Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. *Biology of Reproduction* 75, 642-650.
- Li C, Chen P, Smith M (1999) Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140, 5382-5390.

- Li H, Wade G, Blaustein J (1994) Manipulations of metabolic fuel availability alter estrous behaviour and neural estrogen-receptor immunoreactivity in Siriam hamsters. *Endocrinology* 135, 240-247.
- Li G, Liang X, Xie Q, Li G, Yu Y, Lai K (2010) Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin. *General and Comparative Endocrinology* 166, 117-127.
- Lin Ch, Wu G, Lee M, Lau E, Dufour S, Chang Ch (2010) Regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in the protandrus black porgy fish, *Acanthopagrus schlegeli*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 323, 137-146.
- Lin S, Ge W (2009) Differential regulation of gonadotropins (FSH and LH) and growth hormone (GH) by neuroendocrine, endocrine, and paracrine factors in the zebrafish-An *in vitro* approach. *General and Comparative Endocrinology* 160, 183-193.
- Linard B, Bennani S, Saligaut C (1995) Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 99, 192-196.
- Linard B, Anglade I, Corio M, Navas J, Pakdel F, Saligaut C, Kah O (1996) Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. *Neuroendocrinology* 63, 156-165.
- Liu D, Xiong F, Hew C (1995) Functional analysis of estrogen-responsive elements in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) gonadotropin II beta subunit gene. *Endocrinology* 136, 3486-3493.
- Londrville R, Duvall C (2002) Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Leopomis cyanellus*). *General and Comparative Endocrinology* 129, 56-62.
- Lone K (1989) The effect of feeding three anabolic steroids in different combinations on the growth, food conversion efficiency and protein and nucleic acid levels of liver, kidney, brain and muscle of mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 6, 149-156.
- López J, Domínguez L, Moreno N, Morona R, Joven A, González A (2009) Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of the lung-fishes *Protopterus dolloi* and *Neoceratodus forsteri*. *Brain Behavior Evolution* 74, 302-322.
- Losel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 46-56.
- Ludwig D, Tritos N, Mastaitis J, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier J, Maratos-Flier E (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 107, 379-386.

- Lynn S, Brige W, Shepherd B (2007) Molecular characterization and sex-specific tissue expression of estrogen receptor alpha (Esr1), estrogen receptor beta a (Esr2a) and ovarian aromatase (cyp 19a1a) in yellow perch (*Perca flavescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 147, 412-427.
- Ma CH, Dong K, Yu K (2000) cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1490 145-152.
- MacDonald E, Volkoff H (2009a) neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystinin (CCK) in winter skate (*Raja ocellata*): cDNA cloning tissue distribution and mRNA expression responses to fasting. *General and Comparative Endocrinology* 161, 252-261.
- MacDonald E, Volkoff H (2009b) Cloning distribution and effects of season and nutritional status on the expression of neuropeptide Y (NPY), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and cholecystinin (CCK) in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Hormone Behavior* 56, 58-65.
- MacNeil D, Howard A, Guan X, Fong T, Nargund R, Bednarek M, Goulet M, Weinberg D, Strack A, Marsh D, Chen H, Shen C, Chen A, Rosenblum C, MacNeil T, Tota M, MacIntyre E, Van d P (2002) The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *European Journal of Pharmacology* 450, 93-109.
- Maddineni S, Ocon-Grove O, Krzysik-Walker S, Hendricks G, Ramachandran R (2008) Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) receptor gene is expressed in the chicken ovary: potential role of GnIH in follicular maturation. *Reproduction* 135, 267-274.
- Mandiki S, Houbart M, Babial I, Vandeloise E, Gardeur J, Kestemont P (2004) Are sex steroids involved in the sexual growth dimorphism in Eurasian perch juveniles. *Physiology & Behavior* 80, 603-609.
- Mangelsdorf D, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg P, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans R (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Mañanos E, Anglade I, Chyb J, Saligaut C, Breton B, Kah O (1999) Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinology* 69, 269-280.
- Marsh D, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff K, Fisher S, Burn P, Palmiter R (1999) Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nature Genetics* 21, 119-122.
- Marshall J, Dalkin A, Haisenleder D, Paul S, Ortolano G, Kelch (1991) Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Progress in Hormone Research* 47, 155-187.

Martensson U, Salehi S, Windahl S, Gómez M, Sward K, Daskiewicz-Nilsson J (2009) Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology* 150, 687-698.

Martyniuk C, Award R, Hurley R, Finger T, Trudeau V (2007) Glutamic acid decarboxylase 65, 67, and GABA-transaminase mRNA expression and total enzyme activity in the goldfish (*Carassius auratus*) brain. *Brain Research* 1147, 154-156.

Mateos J, Mañanos E, Carrillo M, Zanuy S (2002) Regulation of follicle-stimulating (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132, 75-86.

Mateos J, Mañanos E, Martínez-Rodríguez G, Carrillo M, Querat B, Zanuy S (2003) Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 133, 216-232.

Mateos J, Mañanos E, Swanson P, Carrillo M, Zanuy S (2006) Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay. *Ciencias Marinas* 32, 271-283.

Matsuda K, Shimakura S, Miura T, Maruyama K, Uchiyama M, Kawauchi H, Shioda S, Takahashi A (2007) Feeding-induced changes of melanin-concentrating hormone (MCH)-like immunoreactivity in goldfish brain. *Cell and Tissue Research* 328, 375-382.

Matsuda K (2009) Recent advances in the regulation of feeding behaviour by neuropeptides in fish. *Trends in Comparative Endocrinology and Biology: Annals of the New York Academy of Sciences* 1163, 241-250.

Matsuda K, Kojima K, Shimakura S, Takahashi A (2009) Regulation of food intake by melanin-concentrating hormone in goldfish. *Peptides* 11, 2060-2065.

Matsumoto T, Makito K, Moriwaki T, Kawai S, Watabe S (2004) Survey of estrogenic activity in fish feed by yeast estrogen-screen assay. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139, 147-152.

Matsuo H, Baba Y, Nair R, Arimura A, Schally A (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-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* 64, 320-328.

Matty A, Cheema I (1978) The effect of some steroid hormones on the growth and protein metabolism of rainbow trout. *Aquaculture* 14, 163-178.

McBride J, Higgs D, Fagerlund U, Buckley J (1982) Thyroid and steroid hormones: potential for control of growth and smoltification of salmonids. *Aquaculture* 28, 201-209.

- Meizel S, Turner K, Nuccitelli R (1997) Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Developmental Biology* 182, 67-75.
- Melamed P, Gur G, Rosendfeld H, Elizur A, Yaron Z (1997) Reproductive development of male and female tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus*X*O. Aureus*) GtH II β subunits. *Journal of Experimental Zoology* 286, 64-75.
- Melamed P, Gur G, Rosendfeld H, Elizur A, Schulz RW, Yaron Z (2000) Reproductive development of male and female tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus*X*O. Aureus*) and changes in mRNA levels of gonadotropin (GtH) I β and II β subunits. *The Journal of Experimental Zoology* 286, 64-75.
- Melamed P, Kadir M., Wijeweera A, Seah S (2006) Transcription of gonadotropin beta subunit genes involves cross-talk between the transcription factors and co-regulators that mediate actions of the regulatory hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 27, 167-183.
- Menuet A, Anglade I, Flouriot G, Pakdel F, Kah O (2001) Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout. *Biology of Reproduction* 65, 1548-1557.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F (2002) Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties and tissue distributions. *Biology of Reproduction* 66, 1881-1882.
- Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O (2003) Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: comparison with estrogen receptor alpha. *Journal of Comparative Neurology* 462, 180-193.
- Menuet A, Le Page Y, Torres O, Keru L, Kah O, Pakdel F (2004) Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ER α , ER β 1 and ER β 2. *Journal of Molecular Endocrinology* 32, 975-986.
- Merchenthaler I, Lane M, Numan S, Dellovade T (2004) Distribution of estrogen receptor α and β in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *The Journal of Comparative Neurology* 473, 270-291.
- Métivier R, Petit F, Valotaire Y, Pakdel F (2000) Function of N-terminal transactivation domain of the estrogen receptor requires a potential α -helical structure and is negatively regulated by the A domain. *Molecular Endocrinology* 14, 1849-1871.
- Micevych P, Sinchak K (2008) Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology* 290, 44-50.
- Mighell A, Smith N, Robinson P, Markham A (2000) Vertebrates pseudogenes. *FEBS Letters* 468, 109-114.

- Milde-Langosch K (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *European Journal of Cancer* 41, 2449-2461.
- Miller C, Miller W (1996) Transcriptional repression of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene by 17 β -estradiol. *Endocrinology* 137, 3437-3446.
- Miller W (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrinology Reviews* 9, 295-318.
- Min G, Kim H, Bae Y, Petz L, Kemper J (2002) Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). *The Journal of Biological Chemistry* 277, 34626-34633.
- Min G (2010) Estrogen modulates transactivations of SXR-mediated liver X receptor response element and CAR-mediated phenobarbital response element in HepG2 cells. *Experimental and Molecular Medicine* 42, 731-738.
- Mircea C, Lujan M, Pierson R (2007) Metabolic fuel and chemical implications for female reproduction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 29, 887-902.
- Mitani Y, Kanda S, Akazome Y, Zempo B, Oka Y (2010) Hypothalamic KISS1 but not KISS2 neurons are involved in estrogen feedback in Medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 151, 1751-1759.
- Mitra S (2003) Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144, 2055-2067.
- Miura T, Miura C (2003) Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 181-186.
- Miyahara M, Ishibashi H, Inudo M, Nishijima H, Iguchi T, Guillette L, Arizono K (2003) Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors $-\alpha$ and $-\beta$ in an experimental animal. *Journal of Health Science* 49, 1-11.
- Mohamed J, Khan I (2006) Molecular cloning and differential expression of three GnRH mRNAs in discrete brain areas and lymphocytes in red drum. *Journal of Endocrinology* 188, 407-416.
- Molés G, Carrillo M, Mañanos E, Mylonas C, Zanuy S (2007) Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* 150, 75-86.
- Molés G, Gómez A, Rocha A, Carrillo M, Zanuy S (2008) Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* 158, 68-76.
- Molés G, Gómez A, Carrillo M, Rocha A, Mylonas C, Zanuy S (2011) Determination of FSH quantity and bioactivity during sex differentiation and oogenesis in European sea bass. *Biology of Reproduction* 85, 848-857.

- Molés G, Gómez A, Carrillo M, Zanuy S (2012). 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. *General and Comparative Endocrinology* 176, 70-78
- Montano M, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen B (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonist. *Molecular and Cellular Biology* 19, 6509-6522.
- Montero M, Le Belle N, King J, millar R, Dufour S (1995) Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla Anguilla*). *Neuroendocrinology* 61, 525-535.
- Montero M, Dufour S (1996) Gonadotropin-releasin hormones (GnRH) in fishes: evolutionary data on their structure, localization, regulation and function. *Zoology Studies* 35, 149-160.
- Moons L, Batten T, Vandesande F (1992) Comparative distribution of substance P (SP) and cholecystokinin (CCK) binding sites and immunoreactivity in the brain of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Peptides* 13, 37-46.
- Moore L, Parks D, Jones S, Bledsoe R, Consler T, Stimmel J, Goodwin B, Liddle C, Blanchard S, Willson T, Collins J, Kliewer S (2000). *The Journal of Biological Chemistry* 275, 15122-15127.
- Moran T, Kinzig K (2004) Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal. Liver Physiology* 286, 183-188.
- Mori T, Matsumoto H, Yokota H (1998) Androgen-induced vitellogenin gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 67, 133-141.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 392, 49-53.
- Moussavi M, Wlasichuk M, Chang J, Habibi H (2012) Seasonal effect of GnIH on gonadotrope functions in the pituitary of goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 350, 53-60.
- Moutsatsou P (2007) The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones* 6, 173-193.
- Mukuda T, Matsunaga Y, Kawamoto K, Yamaguchi K, Ando M (2005) Blood-contacting neurons in the brain of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Zoology* 303A, 366-376.
- Munchrath L, Hofmann H (2010) Distribution of sex steroid hormone receptors in the brain of an African cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 3302-3326.

- Muñoz I, Carrillo M, Zanuy S, Gómez A (2005) Regulation of exogenous gene expression in fish cells: An evaluation of different versions of tetracycline-regulated system. *Gene* 363, 173-182.
- Muñoz-Cueto J, Burzawa-Gerard E, Kah O, Valotaire Y, Pakdel F (1999) Cloning and Sequencing of the gilthead sea bream estrogen receptor cDNA. *DNA sequence* 10, 75-84.
- Murashita K, Kurokawa T, Ebbesson L, Stefansson S, Rønnestad I (2009) Characterization, tissue distribution and regulation of agouti-related protein (AgRP), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and neuropeptide Y (NPY) in atlantic salmon (*Salmo salar*). *General and Comparative Endocrinology* 162, 160-171.
- Muriach B, Carrillo M, Zanuy S, Cerdá-Reverter J (2008a) Distribution of estrogen receptor 2 mRNAs (Esr2a and Esr2b) in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Brain Research* 1210, 126-141.
- Muriach B, Cerdá-Reverter J, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M (2008b) Molecular characterization and central distribution of the estradiol receptor alpha (ER α) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 35, 33-48.
- Mystkowski P, Schwartz M (2000) Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era. *Nutrition* 16, 937-946.
- Nagatani S, Tsukamura H, Maeda K (1994) Estrogen feedback needed at the paraventricular nucleus or A2 to suppress pulsatile luteinizing hormone release in fasting female rats. *Endocrinology* 135, 870-875.
- Nagler J, Cavileer T, Sullivan J, Cyr D, Rexroad C 3rd (2007) The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ERalpha2 and both ERbeta isoforms. *Gene* 392 164-173.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-198.
- Narnaware Y, Peyon P, Lin X, Peter R (2000) Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279, 1025-1034.
- Narnaware Y, Peter R (2001) Effects of food deprivation and refeeding on neuropeptide Y (NPY) mRNA levels in goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129, 633-637.
- Navas J, Anglade I, Bailhache T, Pakdel F, Breton B, Jego P, Kah O (1995) Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology* 363, 461-474.
- Navas J, Mañanos E, Thrush M, Ramos J, Zanuy S, Carrillo M, Zohar S, Bromage N (1998) Effect of lipid composition on vitellogenin, 17 β -estradiol and gonadotrophin

plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 165, 65-79.

Neary N, Goldstone A, Bloom S (2004) Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clinical Endocrinology* 60, 153-160.

Nelson C, Hendy S, Shukin R, Cheng H, Bruchovsky N, Koop B, Rennie P (1999) Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Molecular Endocrinology* 12, 2090-2107

Nelson E, Habibi H (2010) Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology* 151, 1668-1676.

Nieuwenhuys R (2009) The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain, Behavior and Evolution* 73, 229-252.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 81, 1535-1565.

Ng Y, Hanson S, Malison J, Wentworth B, Barry T (2005) Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. *Aquaculture* 254, 658-665.

Noel S, Keen K, Baumann D, Filardo E, Teresawa E (2009) Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in the rapid effects of estrogens on LHRH neurons. *Molecular Endocrinology* 23, 349-359.

Norman A, Mizwicki M, Norman D (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Reviews* 3, 27-41.

Northcutt R (1995) The forebrain of gnathostomes: in search of a morphotype. *Brain, Behavior and Evolution* 46, 275-318.

Norris D (1997) *Vertebrate Endocrinology*. Third ed. Academic Press, San Diego.

Novak C, Jiang X, Wang C, Teske J, Kotz C, Levine J (2005) Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroscience Letters* 383, 99-104.

Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y, Suzuki K, Kawauchi H (1990) Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distribution of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *General and Comparative Endocrinology* 77, 348-357.

Oakley A, Clifton D, Steiner R (2009) Kisspeptin signalling in the brain. *Endocrine Reviews* 30, 713-743.

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Research* 26, 3505-3512.

Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. Berlin: Springer Verlag.

Okuzawa K, Gen K, Bruysters M, Bogerd J, Gothilf Y, Zohar Y, Kagawa H (2003) Seasonal variation of the three native gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acids levels in the brain of female red seabream. *General and Comparative Endocrinology* 130, 324-332.

Olivereau M, Ball J (1964) Contribution to the histophysiology of the pituitary gland of teleost, particularly those of the *Poecillia* species. *General and Comparative Endocrinology* 47, 523-532.

Olivereau M, Olivereau J (1990) Corticotropin-like immunoreactive in the brain and pituitary of three teleost species (goldfish, trout and eel). *Cell and Tissue Research* 262, 115-123.

Ollmann M, Wilson B, Yang Y, Kerns J, Chen Y, Gantz I, Barsh G (1997) Antagonism of central melanocortin receptors *in vitro* and *in vivo* by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.

O'Lone R, Frith M, Karlsson E, Hansen U (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology* 18, 1859-1875.

Onuma T, Ando H, Koide N, Okada H, Urano A (2007) Reproductive stage-related effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding *Fushi tarazu* factor 1 homolog and estrogen receptor α in masu salmon pituitary cells *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* 152, 64-72.

Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen B, Sakuma Y (2002) Sexually dimorphic expression of estrogen receptor b in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proceedings of National Academy of Science* 99, 3306-3311.

Osugi T, Ukena K, Sower S, Kawauchi H, Tsutsui K (2006) Evolutionary origin and divergence of PQRamide peptides and LPXRamide in the RFamide peptide family. Insights from novel lamprey RFamide peptides. *FEBS Journal* 273, 1731-1743.

Osugi T, Uchida K, Nozaki M, Tsutsui K (2011) Characterization of novel RFamide peptides in the central nervous system of the brown hagfish: isolation, localization, and functional analysis. *Endocrinology* 152, 4252-4264.

Owen G, Zelent A (2000) Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 809-827.

Paech K, Webb P, Kuiper G, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner P, Scanlan T (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and Beta at AP sites. *Science* 277, 1508-1510.

- Pakdel F, Le Gac F, Le Goff P, Valotaire Y (1990) Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. *Molecular Cell Endocrinology* 71, 195-204.
- Pakdel F, Metivier R, Flouriot G, Valotaire Y (2000) Two estrogen receptor (ER) isoforms with different estrogen dependencies are generated from the trout ER gene. *Endocrinology* 141, 571-580.
- Pang Y, Dong J, Thomas P (2008) Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. *Endocrinology* 149, 3410-3426.
- Pankhurst N, Stacey N, Peter R (1986) An evaluation of techniques for the administration of 17 β -estradiol to teleost. *Aquaculture* 52: 145-155.
- Papkoff H, Gospadarowicz D, Li C (1967) Purification and properties of ovine follicle-stimulating hormone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 120, 434-439.
- Parhar I, Soga T, Sakuma Y (2000) Thyroid hormone and estrógen regulate brain region-specific messenger ribonucleic acids encoding three gonadotropin-releasing hormone genes in sexually immature male fish, *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology* 141, 1618-1626.
- Parhar I, Soga T, Ogawa S, Sakuma Y (2003a) FSH and LH- β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. *General and Comparative Endocrinology* 132, 369-378.
- Parhar I, Sato H, Sakuma Y (2003b) Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, 169-175.
- Parhar I, Ogawa S, Sakuma Y (2004) Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145, 3613-3618.
- Park A, Bloom S (2005) Neuroendocrine control of food intake. *Current Opinion in Gastroenterology* 21, 228-233.
- Parker K, Rice D, Ikeda Y, Luo X, Wong M, Bakke M, Zhao L, Frigeri C, Hanley N, Stallings N, Schimmer B (2002) Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Progress in Hormone Research* 57, 19-36.
- Patiño R, Xia Z, Gale W, Wu C, Maule A, Chang X (2000) Novel transcripts of the estrogen receptor α gene in channel catfish. *General and Comparative Endocrinology* 120, 314-325.
- Patisaul H, Jefferson W (2010) The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 400-419.

- Patten C, Daniels D, Suzuki A, Fluharty S, Yee D (2007) Structural and signalling requirements of the human melanocortin 4 receptor for MAP kinase activation. *Regulatory Peptides* 142, 111-122.
- Payne A, Hales D (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* 25, 947-970.
- Payne J, Rajapaske N, Wilkins M, Kortenkamp A (2000) Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* 108, 983-987.
- Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, adrio F, Gueguen M, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O (2005) Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 142, 60-66.
- Pelissero C, Cuisset B, LeMenn F (1989) The influence of sex steroids in commercial meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon *Acipense baeri*. *Aquatic Living Resources* 2, 161-168.
- Pelissero C, Sumpter J (1992) Steroid and steroid-like substances in fish diets. *Aquaculture* 107, 283-301.
- Peng C, Chang J, Yu K, Wong A, Van Goor F, Peter R, Rivier J (1993) Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary: involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. *Endocrinology* 132, 1820-1829.
- Peng C, Gallin W, Peter R, Blomqvist A, Larhammar D (1994) Neuropeptide Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology* 134, 1095-1103.
- Pernasetti F, Vasilyev V, Rosenberg S, Bailey J, Huang H, Miller W, Mellon P (2001) Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 142, 2284-2295.
- Peter R (1979) The brain and feeding behaviour. *Fish Physiology* vol III. Academic Press, New York 121-159.
- Peter R, Crim L (1979) Reproductive endocrinology of fishes: gonadal cycles and gonadotropin in teleosts. *Annual Review of Physiology* 41, 323-335.
- Pettersson k, Grandien K, Kuiper G, Gustaffsson J (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Molecular Endocrinology* 11, 1486-1496.
- Peyon P, Lin X, Himick B, Peter R (1998) Molecular cloning and expression of cDNA encoding brain preprocholecystokinin in goldfish. *Peptides* 19, 199-210.

- Peyon P, Saled H, Lin X, Peter R (1999) Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. *Brain Research. Molecular Brain Research* 74, 190-196.
- Pfundt B, Sanerwein H, Mielenz M (2009) Leptin mRNA and protein immunoreactivity in adipose tissue and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and immunohistochemical localization in liver. *Anat. Histol. Embriol.* 38, 406-410.
- Picha M, Strom C, Riley L, Walker A, Won E, Johnstone W, Borski R (2009) Plasma ghrelin and growth hormone regulation in response to metabolic state in hybrid striped bass: effects of feeding, ghrelin and insulin-like growth factor-I on *in vivo* and *in vitro* GH secretion. *General and Comparative Endocrinology* 161, 365-372.
- Pierce J (1988) Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, 135-1348.
- Piferrer F, Blazquez M (2005) Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 31, 215-226.
- Pilsáková L, Riečanský I, Jagla F (2010) The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiological Research* 59, 651-664.
- Pinto P, Passos A, Power D, Canario A (2005) Sea bream (*Sparus aurata*) estrogen receptors: phylogeny and tissue distribution. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040, 436-438.
- Pirone A, Lenzi C, Betti L, Giannaccini G, Lucacchini A, Marroni P, Fabiani O (2004) Immunohistochemical distribution of neuropeptide Y in the mesencephalon and rombencephalon of carp, *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 138, 175-185.
- Pissios P, Bradley R, Maratos-Flier (2006) Expanding the scales: the multiple roles of MCH in regulating energy balance and biological functions. *Endocrine Reviews* 27, 606-620.
- Planas J, Swanson P (1995) Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GtH-I and GtH-II) *in vitro*. *Biology of Reproduction* 52, 697-704.
- Pollack S, Ottinger M, Sullivan C, Woods L (2003) The effects of the soy isoflavone genistein on the reproductive development of striped bass. *North American Journal of Aquaculture* 65, 226-234.
- Popesku J, Martyniuk C, Denslow N, Trudeau V (2010) Rapid dopaminergic modulation of the fish hypothalamic transcriptome and proteome. *Plos One* 5, e12338.
- Powell J, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer W, Craig A, Rivier J, Lovejoy D, Sherwood N (1994) Three forms of gonadotropin-releasing hormone from brains of one species. *Proceedings of Natural Academy of Science* 91, 12081-12085.

- Prat F, Sumpter J, Tyler C (1996) Validation of radioimmunoassay 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*). *Biology of Reproduction* 1375-1382.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M (2001) Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 198, 325-338.
- Puelles L, Rubenstein J (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends in Biochemical Sciences* 16, 472-479.
- Qu D, Ludwig D, Gammeltoft S, Piper M, Pellemounter M, Cullen M, Mathes W, Przypeck R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243-247.
- Querat B, Hardy A, Fontaine Y (1991) Regulation of the type-II gonadotrophin α and β subunit mRNAs by oestradiol and testosterone in the European eel. *Journal of Molecular Endocrinology* 7, 81-86.
- Querat B (1994) Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. *Perspectives in Comparative Endocrinology* 27-35.
- Ramirez V, McCann S (1965) Inhibitory effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats. *Endocrinology* 142, 1737-1743.
- Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene G, Levin E (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Molecular Endocrinology* 18, 2854-2865.
- Revel F, Saboureau M, Masson-Pevet M, Pevet P, Mikkelsen J, Simoneaux V (2006) Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Current Biology* 16, 1730-1735.
- Remage-Healey L, Bass A (2006) A rapid neuromodulatory role for steroid hormones in the control of reproductive behavior. *Brain Research* 1126, 27-35.
- Rink E, Wullimann M (1998) Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to The hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *The Journal of Comparative Neurology* 4, 152-170.
- Roa J, Tena-Sempere M (2007) Kiss-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *General and Comparative Endocrinology* 153, 132-140.
- Roa J, Castellano J, Navarro V, Handelsman D, Pinilla L, Tena-Sempere M (2008a) Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* 30, 57-66.

- Roa J, Vigo E, Castellano J, Gaytan F, García-Galiano D, Navarro V, Aguilar E, Dijcks F, Ederveen A, Pinilla L, Van Noort P, Tena-Sempere M (2008b) Follicle-stimulating hormone responses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogens and progesterone receptors. *Endocrinology* 149, 5783-5790.
- Robinson-Rechavi M, Marchand O, Escriva H, Bardet P, Zehis D, Hughes S, Laudet V (2001) Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. *Genome Research* 11, 781-788.
- Rocha B, Fleischer R, Schaeffer J, Rohrer S, Hickey G (2005) 17 Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology* 179, 637-643.
- Rocha A, Gómez A, Zanuy S, Cerdá-Reverter J, Carrillo M (2007) Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis and functional activity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 272, 63-76.
- Rocha A, Zanuy S, Carrillo M, Gómez A (2009) Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *General and Comparative Endocrinology* 2009, 265-275.
- Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly J, Chambon P (1997) Stimulation of RAR alpha activation function AF1 through binding to the general transcription factor TFIIII and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90, 97-107.
- Rodgers R, Ishii Y, Halford J, Blundell J (2002) Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36, 303-325.
- Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera L, Soubrier M, Mañanos E, Holland M, Zohar Y, Zanuy S (2000) Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during sex differentiation and the first spawning season. *General and Comparative Endocrinology* 120, 67-74.
- Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera L, Zohar Y, Zanuy S (2004) Effects of photoperiod on pituitary levels of three forms of GnRH and reproductive hormones in the male sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during testicular differentiation and first testicular recrudescence. *General and Comparative Endocrinology* 136, 37-48.
- Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M (2005) Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). II. Hormonal aspects. *General and Comparative Endocrinology* 140, 116-125.
- Roesch D (2006) Effects of selective estrogen receptor agonist on food intake and body weight gain in rats. *Physiology & Behavior* 87, 39-44.
- Rogers S, Llewellyn L, Wigham T, Sweeney G (2000) Cloning of the atlantic salmon (*Salmo salar*) estrogen receptor-alpha gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 125, 379-385.

Rønnestad I, Nilsen T, Murashita K, Angotzi A, Gamst Moen A, Stefansson S, Kling P, Thrandur B, Kurokawa T (2010) Leptin and leptin receptor genes in atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. *General and Comparative Endocrinology* 168, 55-70.

Roos P (1968) Human follicle-stimulating hormone. Its isolation from the pituitary gland and from postmenopausal urine and a study of some chemical, physical, immunological and biological properties of the hormone from these two sources. *Acta Endocrinológica* 59, 1-93.

Rosendfeld H, Levavi-Sivan B, Gur G, Melamed P, Meiri I, Yaron Z, Elizur A (2001) Characterization of tilapia FSH beta gene and analysis of its 5' flanking region. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129B, 389-398.

Rosendfeld M, Glass C (2001) Coregulators codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 36865-36868.

Routledge E, Sumpter J (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology & Chemistry* 15, 241-248.

Rubio V, Sánchez-Vázquez F, Madrid J (2008) Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in european sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *Physiology & Behavior* 93, 862-869.

Sahu A (2004) Minireview: a hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145, 2613-2620.

Saligaut C, Garnier D, Bennani S, Salbert G, Bailhache T, Jégo P (1992) Effects of estradiol on brain aminergic turnover of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at the beginning of vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 88, 209-216.

Saligaut C, Linard B, Mañanos E, Kah O, Breton B, Govoroun M (1998) Release of pituitary gonadotrophins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): modulation by estradiol and catecholamines. *General and Comparative Endocrinology* 109, 302-309.

Sánchez E, Rubio V, Thompson D, Metz J, Flik G, Millhauser L, Cerdá-Reverter J (2009) Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296, 1293-1306.

Santollo J, Wiley M, Eckel L (2007) Acute activation of $Er\alpha$ decreases food intake, meal size and body weight in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology* 293, 194-201.

Santen R, Brodie H, Simpson E, Siiteri P, Brodie A (2009) History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrine Reviews* 30, 343-375.

- Santollo J, Eckel L (2008) Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein in ovariectomized rats. *Physiology & Behavior* 191, 173-177.
- Santollo J, Katzenellenbogen B, Katzenellenbogen J, Eckel L (2010) Activation of ER α is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. *Hormones and Behavior* 58, 872-877.
- Santollo J, Torregrossa A, Eckel L (2011) Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior* 60, 86-93.
- Sassi-Messai S, Gilbert Y, Bernard L, Nishio S, Ferri Lagneau K, Molina J, Andersson-Lendahl M, Benoit G, Balaquer P, Laudet V (2009). The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. *Public Library of Science* 4(3):e4935.
- Sassone-Corsi P (1998) Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30, 27-38.
- Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustaffsson J, Safe S (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 5379-5387.
- Sawada K, Ukena K, Satake H, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K (2002) Novel fish hypothalamic neuropeptide. *European Journal of Biochemistry* 269, 6000-6008.
- Schiöth H, Raudsepp T, Ringholm A, Fredriksson R, Takeuchi S, Larhammar D, Chowdhary B (2003) Remarkable synteny conservation of melanocortin receptors in chicken, human and other vertebrates. *Genomics* 81, 504-509.
- Schiöth H, Haitina T, Ling M, Ringholm A, Fredriksson R, Cerdá-Reverter J, Klovins J (2005) Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes. *Peptides* 10, 1886-1900.
- Schirman-Hildesheim T, Bar T, Ben-Aroya N, Kock Y (2005) Differential gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acid expression patterns in different tissues of the female rat across the estrous cycle. *Endocrinology* 146, 3401-3408.
- Schjolden J, Schiöt H, Larhammar D, Winberg S, Larson E (2009) melanocortin peptides affect the motivation to feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 160, 134-138.
- Schneider J, Buckley C, Blum R, Zhou D, Szymanski L, Day D, Bartness T (2002) Metabolic signals, hormones and neuropeptides involved in control of energy balance and reproductive success in hamsters. *European Journal of Neuroscience* 16, 377-379.

Schneider J (2004) Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior* 81, 289-317.

Schneider J (2006) metabolic and hormonal control of the desire for food and sex: implications for obesity and eating disorders. *Hormone Behavior* 50, 562-571.

Schoderbek W, Roberson M, Maurer R (1993) Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 3903-3910.

Schreihofler D, Resnick E, Soh A, Shupnik M (1999) Transcriptional regulation by a naturally occurring truncated rat estrogen receptor (ER), truncated ER product 1 (TERP-1). *Molecular Endocrinology* 13, 320-329.

Schreihofler D, Stoler M, Shupnik M (2000) Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ER alpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* 141, 2174-2184.

Schultz J, Loven M, Jenkins V, Edwards D, Nardulli A (2002) Differential modulation of DNA conformation by estrogen receptors α and β . *The Journal of Biological Chemistry* 277, 8702-8707.

Shulz R, Miura T (2002) Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 43-56.

Sealfon S, Millar R (1995) Functional domains of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Cellular and Molecular Neurobiology* 15, 25-42.

Seminara S, Messager S, Chatzidaki E, Tresher R, Acierno J, Shagoury J, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino K, Hendrick A, Zahn D, Dixon J, Kaiser U, Slaugenhaupt S, Gusella J, O'Rahilly S, Carlton M, Crowley J, Aparicio A, Colledge W (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal Of Medicine* 349, 1614-162.

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

Servili A, Le Page Y, Leprince J, Caraty A, Escobar S, Parhar I, Seong J, Vaudry H, Kah O (2011) Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology* 151, 2265-2275.

Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W (1983) Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 80, 2794-2798.

Shimakura S, Kojima K, Nakamachi T, Kageyama H, Uchiyama M, Shioda S, Takahashi A, Matsuda K (2008a) Neuronal interaction between melanin-containing neurons in the goldfish hypothalamus. *Peptides* 29, 1432-1440.

Shimakura S, Miura T, Maruyama K, Nakamachi T, Uchiyama M, Kageyama H, Shioda S, Takahashi A, Matsuda K (2008b) Alpha-melanocyte-stimulating hormone mediates melanin-concentrating hormone-induced anorexigenic action in goldfish. *Hormone Behavior* 53, 323-328.

Shimizu A, Tanaka H, Kagawa H (2003) Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GTH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygians fishes. *General and Comparative Endocrinology* 132, 35-45.

Shivers B, Harian R, Morrell J, Pfaff D (1983) Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304, 345-347.

Shughrue P, Lane M, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 388, 507-525.

Shughrue P, Scrimo P, Merchenthaler I (1998) Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the neurons of the rat forebrain. *Endocrinology* 139, 5267-70.

Shughrue P, Merchenthaler I (2001) Distribution of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 436, 64-81.

Shupnik M, Rosenzweig B (1991) Identification of an estrogen-responsive element in the rat LH beta gene. DNA-estrogen receptor interactions and functional analysis. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 17084-17091.

Silverstein J, Breininger J, Baskin D, Plisetskaya E (1998) Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *General and Comparative Endocrinology* 110, 157-165.

Silverstein J, Wolters W, Holland M (1999a) Brain regulation of feeding behaviour and food intake in fish. *Journal of Fish Biology* 54, 607-615.

Silverstein J, Shearer K, Dickhoff W, Plisetskaya E (1999b) Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. *Aquaculture* 177, 161-169.

Silverstein J, Plisetskaya E (2000) The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *American Zoologist* 40, 296-308.

Simone D (1990) The effects of synthetic steroid 17- α -methyltestosterone on the growth and organ morphology of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 84, 81-93.

Simonian S, Spratt D, Herbison A (1999) Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-

releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 411, 346-358.

Simpson E, Waterman M (1988) Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annual Review of Physiology* 50, 427-440.

Sinchak K, Mills R, Tao L, LaPolt P, Lu J, Micecyh P (2003) Estrogens induces de novo progesterone synthesis in astrocytes. *Developmental Neuroscience* 25, 343-348.

Singh P, Krishna A, Sridaran R (2007) Localization of gonadotropin-releasing hormone I, bradykinin and their receptors in the ovaries of non-mammalian vertebrates. *Reproduction* 133, 969-981.

Sloley B, kah O Trudeau V, Dulka J, Peter R (1992) Amino acid neurotransmitters and dopamine in the brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *Journal of Neurochemistry* 58, 2254-2262.

Smith J, Cunningham M, Rissman E, Clifton D, Steiner R (2005) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146, 3686-3692.
Smith J, (2008) Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Research Reviews* 57, 288-298.

So W, Kwok H, Ge W (2005) Zebrafish gonadotropins and their receptors. II. Cloning and characterization of zebrafish follicle stimulating hormone and luteinizing hormone subunits-their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biology of Reproduction* 72, 1382-1396.

Socorro S, Power D, Olsson P, Canario A (2000) Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *Journal of Endocrinology* 166, 293-306.

Soderberg C, Wraith A, Ringwall M, Yan Y, Postlethwait J, Brodin L, Larhammar D (2000) Zebrafish genes for neuropeptide Y and peptide YY reveal origin by chromosome duplication from an ancestral gene linked to the homeobox cluster. *Journal of Neurochemistry* 75, 908-918.

Sohn Y, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K (1998a) Effect of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin I and II subunit in the goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Science* 64, 715-721.

Sohn Y, Suetake H, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K (1998b) Structural and expression analyses of gonadotropin I β subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene* 222, 257-267.

Sohn Y, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K (1999) Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 113, 436-444.

Sohn Y, Kobayashi M, Aida K (2001) Regulation of gonadotropin β subunit gene expression by testosterone and gonadotropin-releasing hormones in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129, 419-426.

Song Y, Cone R (2007) Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 21, 2042-2049.

Sperry T, Thomas P (2000) Androgen binding profiles of two distinct nuclear androgen receptors in atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 73, 93-103.

Squire P, Li C (1959) Purification and properties of interstitial cell-stimulating hormone from sheep pituitary glands. *The Journal of Biological Chemistry* 234, 520-525.

Srinivasan S, Lubrano-Berthelier C, Govaerts C, Picard F, Santiago P, Conklin B, Vaisse C (2004) Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *The Journal of Clinical Investigation* 114, 1158-1164.

Stacey N, Cook A, Peter R (1979) Ovulatory surge of gonadotropin in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology* 37, 246-249.

Stacey N, Kyle A (1983) Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behaviour in the goldfish. *Physiology & Behavior* 30, 621-628.

Strahl B, Huang H, Sebastian J, Ghosh B, Miller W (1998) Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating hormone β -subunit gene by gonadotropin-releasing hormone: involvement of two activating protein-1 binding sites and protein kinase C. *Endocrinology* 139, 4455-4465.

Strahl B, Huang H, Pedersen N, Wu J, Ghosh B, Miller W (1997) Two proximal activating protein-1-binding sites are sufficient to stimulate transcription of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene. *Endocrinology* 138, 2621-2631.

Strobl-Mazzulla P, Lethimonier C, Gueguen M, Karube M, Fernandino J, Yoshizaki G, Patiño R, Strüssmann C, Kah O, Somoza G (2008) Brain aromatase (Cyp 19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: Neuroanatomical and functional relations. *General and Comparative Endocrinology* 158 191-201.

Styne D (1994) Physiology of puberty. *Hormone Research* 41, 3-6.

Subhedar N, Barsagade V, Singru P, Thim L, Clausen J (2011) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the telencephalon of the catfish, *Clarias gariepinus*: distribution and response to fasting, 2-deoxy-D-glucose, glucose, insulin and leptin treatments. *The Journal of Comparative neurology* 519, 1281-1300.

Sugiyama N, Barros R, Warner M, Gustafsson J (2010) ER β : recent understanding of estrogen signalling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21, 545-552.

- Sullivan E, Daniels A, Cameron J (2003) Ovariectomy leads to rapid changes in food intake, body weight and metabolic regulation in female rhesus monkeys. Society for Neuroscience Abstracts 803, 19.
- Sumpter J (2005) Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica 33, 9-16.
- Sumpter J, Johnson A (2008) 10th Anniversary perspective: reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: from known knowns to unknown unknowns (and many things in between). Journal of Environmental Monitoring 10, 1476-1485.
- Swanson P (1991) Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Fish-Symp91, Seffield, 2-7.
- Swanson P, Dickey J, Campbell B (2003) Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. Fish Physiology and Biochemistry 28, 53-59.
- Szymanski L, Schneider J, Rao A, Clarke I (2003) Rapid restoration of luteinizing hormone pulses in refed chronically undernourished ewes occurs without alterations in plasma leptin concentrations. Society for Neuroscience Abstracts.
- Szkudelska K, Nogowski L (2007) Genistein a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. Journal of Steroid Biochemistry 105, 37-45.
- Tachibana T, Takagi T, Tomonaga S, Ohgushi A, Ando R, Denbow D, Furuse M (2003) Central administration of cocaine- and amphetamine regulated transcript inhibits food intake in chicks. Neuroscience Letters 337, 131-134.
- Tada T, Hirono I, Aoki T, Takashima F (1998) Structure and expression of activin genes in rainbow trout. Molecular Marine Biology and Biotechnology 7, 72-77.
- Tan N, Lamm T, Ding J (1996) The first continuous estrogen receptor gene from a fish, *Oreochromis aureus*: evidence for multiple transcripts. Molecular and Cellular Endocrinology 120, 177-192.
- Taneja R, Rochette-Egly C, Plassat J, Penna L, Grasib M, Chambon P (1997) Phosphorylation of activation functions AF1 and AF2 of RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. EMBO Journal 16, 6425-6465.
- Taranger G, Haux C, Stefansson S, Björnsson B, Walther B, Hansen T (1998) Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol-17 β profiles in atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 162, 85-98.
- Tarttelin M (1968) Cyclical variations in food and water intake in ewes. The Journal of Physiology, 195, 29.

Tarttelin M, Gorski R (1973) The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. *Acta Endocrinológica (Copenhagen)*, 72, 551-557.

Tchoudakova A, Pathak S, Callard G (1999) Molecular cloning of an estrogen receptor beta subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *General Comparative Endocrinology* 113, 388-400.

Tena-Sempere M, Felip A, Gómez A, Zanuy S, Carrillo M (2012) Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. (*General and Comparative Endocrinology* 175, 234-243).

Terova G, Rimoldi S, Bernardini G, Gornati R, Saroglia M (2008) Sea bass ghrelin: molecular cloning and mRNA quantification during fasting and refeeding. *General and Comparative Endocrinology* 155, 341-351.

Thammachaoren S, Lutz T, Geary N, Asarian L (2008) Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor- α -expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. *Endocrinology* 149, 1609-1617.

Thomas P, Dressing G, Pang Y, Berg H, Tubbs C, Benninghoff A, Doughty K (2006) Progesterone, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads. *Steroids* 71, 310-316.

Thomas P, Alyea R, Pang Y, Peyton C, Dong J, Berg A (2010) Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids* 75, 595-602.

Thornton J, DeSalle R (2000) A new method to localize and test the significance of incongruence: detecting domain shuffling in nuclear receptor superfamily. *Systematic Biology* 49, 183-201.

Thornton J (2001) Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proceedings of the National Academy of Science* 98, 5671-5676.

Thornton J, Need E, Crews D (2003) Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signalling. *Science* 301, 1714-1717.

Timers R, Lambert J, Peute J, Vullings H, van Oordt P (1987) Localization of aromatase in the brain of the male African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) by microdissection and biochemical identification. *Journal of Comparative Neurology* 258, 368-377.

Todo T, Adochi S, Yamauchi K (1996) Molecular cloning and characterization of Japanese eel estrogen receptor cDNA. *Molecular and Cell Endocrinology* 119, 37-45.

Toguyeni A, Fauconneau B, Boujard T, Fostier A, Kuhn E, Mol K, Baroiller J (1997) Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. *Physiology & Behavior* 62, 273-279.

- Tolson A, Wang H (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 1238-1249.
- Tolle V, Low M (2008) *In vivo* evidence for inverse agonism of agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice. 57, 86-94.
- Tollefsen K, Mathisen R, Stenersen J (2003) Induction of vitellogenin synthesis in an atlantic salmon hepatocyte culture: a sensitive *in vitro* bioassay for the oestrogenic and anti-oestrogenic activity of chemicals. *Biomarkers* 8, 394-407.
- Tong S, Chung B (2003) Analysis of zebrafish cyp19 promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86, 381-386.
- Tritos N, Maratos-Flier E (1999) Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides* 33, 339-349.
- Trudeau V, Sloley B, Wong A, Peter R (1993) Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin-II secretion in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 89, 39-50.
- Trudeau V (1997) Neuroendocrine regulation of gonadotropin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reviews of Reproduction* 2, 55-68.
- Trudeau V, Spanswick D, Fraser E, Lariviere K, Crump D, Chiu S, MacMillan M, Schulz R (2000) The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish. *Biochemistry and Cellular Biology* 78, 241-259.
- Tsutsui K, Bentley G, Ubuka T, Saigoh E, Yin H, Osugi T, Inoue K, Chowdhury V, Ukena K, Ciccone N, Sharp P, Wingfield J (2007) The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *General and Comparative Endocrinology* 153, 365-370.
- Tsutsui K, Bentley G, Kriegsfeld L, Osugi T, Seong J, Vaudry H (2010) Discovery and evolutionary history of GnIH and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 716-727.
- Tuziak S, Volkoff H (2012) A preliminary investigation of the role of melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptors in appetite regulation of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 281-296.
- Tzchori I, Degani G, Elisha R, Eliyahu R, Hurvitz A, Vaya J, Moav B (2004) The influence of phytoestrogen and estradiol-17b on growth and sex determination in the European eel (*Angilla anguilla*). *Aquaculture Research* 35, 1213-1219.
- Unniappan S, Lin X, Cervini L, Rivier J, Kaiya H, Kangawa K, Peter R (2002) Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology* 143, 4143-4146.

- Unniappan S, Canosa L, Peter R (2004) Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology* 79, 100-108.
- Urban J, Bauer-Dantoin A, Levine J (1993) Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. *Endocrinology* 132, 139-145.
- Urushitani H, Nakai M, Inaga H, Shimohigashi Y, Shimizu A, Katsu Y, Iguchi T (2003) Cloning and characterization of estrogen receptor alpha in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 203, 41-50.
- Vacher C, Mananos E, Breton B, Marmignon M, Saligaut C (2000) Modulation of pituitary dopamine D1 or D2 receptors and secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *Journal of Neuroendocrinology* 12, 1219-1226.
- Vacher C, Ferriere F, Marmignon M, Pellegrini E, Saligaut C (2002) Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 127, 198-206.
- Vacher C, Pellegrini E, Anglade I, Ferrière F, Saligaut C, Kah O (2003) Distribution of dopamine D2 receptor mRNAs in the brain and the pituitary of female rainbow trout: an *in situ* hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology* 458, 32-45.
- Van Aerle R, Kille P, Lange A, Tyler C (2008) Evidence for the existence of a functional kiss1/kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29, 57-64.
- Van de Peer Y, Maere S, Meyer A (2009) The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics* 10, 725-732.
- Vega V, Lin CH, Lai K, Kong S, Xie M, Su X, Teh H, Thomsen J, Yeo A, Sung W, Bourque G, Liu E (2006) Multiplatform genome-wide identification and modelling of functional human estrogen receptor binding sites. *Genome Biology* 7, R82.1-R82.13.
- Versini A, Ramoz N, Le Strat Y, Scheraq S, Ehrlich S, Boni C, Hinney A, Hebebrand J, Romo L, Guelfi J, Gorwood P (2010) Estrogen receptor 1 gene (ESR1) is associated with restrictive anorexia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 35, 1818-1825.
- Vetillard A, Benanni S, Saligaut C, Jegou P, Bailhache T (2002) Localization of tyrosine hydroxylase and its messenger RNA in the brain of rainbow trout by immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *The Journal of Comparative Neurology* 449, 374-389.
- Vetillard A, Ferriere F, Jegou P, Bailhache T (2006) Regulation of salmon gonadotrophin-releasing hormone gene expression by sex steroids in rainbow trout brain. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 445-453.

- Vicentic A, Jones D (2007) The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320, 499-506.
- Vischer H, Teves A, Ackermans J, Van Dijk W, Schulz R, Bogerd J (2003) Cloning and spatiotemporal expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit complementary DNA in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of Reproduction* 68, 1324-1332.
- Volkoff H, Peter R (2000) Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding. *Brain Research* 887, 125-133.
- Volkoff H, Peter R (2001a) Characterization of two isoforms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish: molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin. *Endocrinology* 142, 5076-5088.
- Volkoff H, Peter R (2001b) Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regulatory Peptides* 101, 59-72.
- Volkoff H, Eykelbosh A, Peter R (2003) Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Research* 972, 90-109.
- Volkoff H, Canosa L, Unniappan S, Cerdá-Reverter J, Bernier N, Kelly S, Peter R (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and Comparative Endocrinology* 142, 3-19.
- Vrang N, Larsen P, Clausen J, Kristensen P (1999) Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons. *The Journal of Neuroscience* 19, RC5.
- Wade G (1975) Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. *Journal of Comparative & Physiology Psychology* 88, 183-191.
- Wade G, Schneider J (1992) Metabolic fuels and reproduction in female mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 16, 235-272.
- Wade G, Schneider J, Li (1996) Control of fertility by metabolic cues. *American Journal of Physiology* 270, 1-19.
- Walf A, Frye C (2007) Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behaviour of ovariectomized rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86, 407-414.

Walter P, Green S, Greenet G, Andrte K, Bornert J, Jeltsch J, Staub A, Jense E, Scrases G, Waterfields M, Chambon P (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 7889-7893.

Walters M, Hunziker W, Norman A (1981) A mathematical model describing the subcellular localization of non-membrane bound steroid, seco-steroid, and thyronine receptors. *The Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology* 15, 491-495.

Walther N, Lioutas C, Tillmann G, Ivell R (1999) Cloning of bovine estrogen receptor beta (ER): expression of novel deleted isoform in reproductive tissues. *Molecular and cellular Endocrinology* 152, 37-45.

Webster J, Pedersen N, Edwards D, Beck C, Miller W (1995) The 5'-flanking region of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene contains six progesterone response elements: three proximal elements are sufficient to increase transcription in the presence of progesterone. *Endocrinology* 136, 1049-1058.

Weiler I, Lew D, Shapiro D (1987) The *Xenopus laevis* oestrogen receptor: sequence homology with human and avian receptors and identification of multiple oestrogen receptor messenger ribonucleic acids. *Molecular Endocrinology* 1, 355-362.

Weltzien F, Kobayashi T, Andersson E, Norberg B, Andersen Ø (2003) Molecular characterization and expression of FSH beta, LH beta and common alpha-subunit in male atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus*). *General and Comparative Endocrinology* 131, 87-96.

Weltzien F, Andersson E, Andersen Ø, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 137, 447-477.

White S, Kasten T, Bondt CH, Adelmant J, Fernald R (1995) Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA* 92, 8363-8367.

Wolfe A, Wu S (2012) Estrogen receptor- β in the gonadotropin-releasin hormone neuron. *Seminars in Reproductive Medicine* 30, 23-31.

Wong T, Zohar Y (2004) Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Endocrinology* 145, 5210-5220.

Woo N, Chung A, Ng T (1993) Influence of oral administration of estradiol-17b and testosterone on growth, digestion, food conversion and metabolism in the underlying red sea bream, *Chrysophrys major*. *Fish Physiology and Biochemistry* 10, 377-387.

Wu F, Zhang X, Zhang W, Huang B, Liu Z, Hu C, Wang D (2009) Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. doi:10.1016/j.cbpa.2008.12.013.

Wu T, Patel H, Mukai S, Melino C, Garg R, Ni X, Chang J, Peng C (2000) Activin, inhibin and follistatin in zebrafish ovary: expression and role in oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 62, 1585-1592.

Wullimann M, Northcutt R (1990) Visual and electrosensory circuits of the diencephalon in mormyrids: an evolutionary perspective. *The Journal of Comparative Neurology* 297, 537-552.

Wullimann M, Rupp B, Reicher H (1996) *Neuroanatomy of zebrafish brain: a topological atlas*. Birkenhauser Verlag, Switzerland.

Wullimann M, Mueller T (2004) Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behaviour. *Journal of Comparative Neuroendocrinology* 475, 143-162.

Xia Z, Gale W, Chang X, Langenau D, Patiño R, Maule A, Densmore L (2000) Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor beta. *General and Comparative Endocrinology* 118, 139-149.

Xiong F, Liu D, Le Drean Y, Elsholtz H, Hew C (1994) Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II beta subunit gene during salmon maturation. *Molecular Endocrinology* 6, 782-793.

Xu H, Qin S, Carrasco G, Dai Y, Filardo E, Prossnitz E, Battaglia G, DonCarlos L, Muma N (2009) Extra-nuclear estrógeno receptor GPR30 regulates serotonin function in rat hypothalamus. *Neuroscience* 158, 1599-607.

Xu Y, Nedungadi T, Zhu L, Sobhani N, Irani B, Davis K, Zhang X, Zou F, Gent L, Hahner L, Khan S, Elias C, Elmquist J, Clegg D (2011) Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metabolism* 14, 453-465.

Yada T, Moriyama S, Suzuki Y, Azuma T, Takahashi A, Hirose S, Naito N (2002) Relationships between obesity and metabolic hormones in the “cobalt” variant of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 128, 36-43.

Yamamoto R (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annual Review of Genetics* 19, 209-252.

Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Levavi-Sivan B (2003) Regulation of fish gonadotropins. *International Review of Cytology* 225, 131-185.

Yi P (2002) The effects of estrogen-responsive element-and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ERa and ERb. *Molecular Endocrinology* 16, 674-693.

- Yu K, Rosenblum P (1991) *In vitro* release of gonadotropin-releasing hormone from the barin preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 81, 256-267.
- Zenthilkumaran B, Okuzawa K, Gen K, Ookura T, Kagawa H (1999) Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *Journal of Neuroendocrinology* 11, 181-186.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhang Y, Li S, Liu Y, Lu D, Chen H, Huang X, Liu X, Meng Z, Lin H, Cheng C (2010) Structural diversity of the GnIH/GnIH receptor system in teleost: its involvement in early development and the negative control of LH release. *Peptide* 31, 1034-1043.
- Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y, Cushman L, Parlow A, Camper S, Parker K (2001) Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* 128, 147-154.
- Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J, Wright A (1994) Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 91, 4175-4179.
- Zohar Y, Muñoz-Cueto J, Elizur A, Kah O (2010) Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 438-455.
- Zwain I, Yen S (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140, 3843-3852.

APÉNDICES

Nomenclatura de núcleos cerebrales de la lubina (Cerdá-Reverter et al., 2001a, b, 2008)

A	Núcleo talámico anterior
AON	Núcleo octavo anterior
C	Núcleo octavo caudal
CC	Cresta cerebelar
CCe	Cuerpo cerebelar
CM	Cuerpo mamilar
CP	Núcleo central posterior talámico
CZ	Zona central del techo óptico
DAO	Núcleo óptico accesorio dorsal
Dc1	Parte central del telencéfalo dorsal, subdivisión 1
Dc2	Parte central del telencéfalo dorsal, subdivisión 2
Dd	Parte dorsal del telencéfalo dorsal
Dld	División dorsal de la parte lateral del telencéfalo dorsal
Dlp	División posterior de la parte lateral del telencéfalo dorsal
Dlv2	División ventral de la parte lateral del telencéfalo dorsal
Dm2	Parte medial del telencéfalo dorsal, subdivisión 2
Dm3	Parte medial del telencéfalo dorsal, subdivisión 3
Dm4	Parte medial del telencéfalo dorsal, subdivisión 4
DMON	Decusación del área octavolateral
DON	Núcleo octavo descendiente
DP	Núcleo talámico posterior dorsal
DT	Núcleo tegmental dorsal
DWZ	Zona blanca profunda del techo óptico
E	Núcleo entopeduncular
EG	Eminencia granular
EW	Núcleo Edinger-Westphal
FR	Fascículo retroflexo
G	Estrato granular del cerebelo
HCo	Comisura horizontal
I	Núcleo talámico intermedio
IO	Oliva inferior
IP	Núcleo interpeduncular
IR	Núcleo del raphe inferior
LFB	Haz nervioso lateral del cerebro anterior
LT	Núcleo talámico lateral
M	Estrato molecular del cerebelo
MAG	Núcleo octavo magnocelular
MON	Núcleo octavolateral media

Nomenclatura de núcleos cerebrales (continuación)

NAPv	Núcleo periventricular anterior
NAT	Núcleo tuberal anterior
NC	Núcleo cortical
NCLI	Núcleo central del lóbulo inferior
NDLlc	Parte caudal del núcleo difuso del lóbulo inferior
NDLlI	Parte lateral del núcleo difuso del lóbulo inferior
NDLIm	Parte medial del núcleo difuso del lóbulo inferior
NGa	Parte anterior del núcleo glomerular
NGp	Parte posterior del núcleo glomerular
NGS	Núcleo gustativo secundario
NGT	Núcleo gustativo terciario
NI	Núcleo isthmi
nIII	Núcleo oculomotor
nIV	Núcleo troclear
nIXm	Núcleo motor glossofaríngeo
NLTd	Parte dorsal del núcleo tuberal lateral
NLTi	Parte inferior del núcleo tuberal lateral
NLTI	Parte lateral del núcleo tuberal lateral
NLTm	Parte medial del núcleo tuberal lateral
NLTv	Parte ventral del núcleo tuberal lateral
NLVa	Parte anterior del núcleo lateral de la válvula
NLVc	Parte central del núcleo lateral de la válvula
NLVp	Parte posterior del núcleo lateral de la válvula
nMLF	Núcleo del fascículo longitudinal medial
NMLI	Núcleo medial del lóbulo inferior
NP	Núcleo paracomisural
NPC	Núcleo pretectal central
NPGa	Parte anterior del núcleo preglomerular
NPGc	Parte comisural del núcleo preglomerular
NPGl	Parte lateral del núcleo preglomerular
NPGm	Parte medial del núcleo preglomerular
NPOav	Parte anteroventral del núcleo preóptico parvocelular
NPOpc	Parte parvocelular del núcleo preóptico parvocelular
NPPv	Núcleo periventricular posterior
NPT	Núcleo tuberal posterior
nPVO	Núcleo del órgano paraventricular
NRLd	Parte dorsal del núcleo del receso lateral
NRLv	Parte ventral del núcleo del receso lateral

Nomenclatura de núcleos cerebrales (continuación)

NRLI	Parte lateral del núcleo del receso lateral
NRP	Núcleo del receso posterior
NSV	Núcleo del saco vasculoso
NT	Núcleo taenia
NTe	Núcleo de la eminencia talámica
nTPI	Núcleo del tracto pretecto-isthmico
nVlc	Parte caudal del núcleo del nervio abducens
nVlr	Parte rostral del núcleo del nervio abducens
OT	Techo óptico
OC	Quiasma óptico
P	Pituitaria
PCo	Comisura posterior
PG	Lóbulo vestibulolateral
pgd	Núcleo periglomerular dorsal
PGZ	Zona gris periventricular del techo óptico
PI	<i>Pars intermedia</i>
PLI	Parte lateral del núcleo perilemniscular
PLm	Parte medial del núcleo perilemniscular
PMgc	Parte gigantocelular del núcleo preóptico magnocelular
PMmc	Parte magnocelular del núcleo preóptico magnocelular
PMpc	Parte parvocelular del núcleo preóptico magnocelular
PO	Núcleo octavo posterior
PPD	<i>Pars distalis proximal</i>
PPd	Núcleo pretectal periventricular dorsal
PPv	Núcleo pretectal periventricular ventral
PSi	Núcleo pretectal superficial intermedio
PSm	Núcleo pretectal superficial magnocelular
PSp	Núcleo pretectal superficial parvocelular
PT	Núcleo talámico posterior
PVO	Órgano paraventricular
RI	Núcleo reticular inferior
RL	Núcleo reticular lateral
RM	Núcleo reticular medial
RPP	<i>Pars distalis rostral</i>
RS	Núcleo reticular superior
S	Raíz sensorial del nervio facial
SCO	Órgano subcomisural
SR	Núcleo del rafe superior
SV	Saco vasculoso

Nomenclatura de núcleos cerebrales (continuación)

SWGZ	Zona gris y blanca superficial del techo óptico
TEG	Tegmento
TEL	Telencéfalo
TLo	Toro longitudinal
TLa	Núcleo del toro lateral
TPp	Núcleo periventricular del tubérculo posterior
TSc	Parte central del toro semicircular
TSI	Parte lateral del toro semicircular
TSv	Parte ventral del toro semicircular
V	Nervio trigémino
Vc	Núcleo central del telencéfalo ventral
Vd	Núcleo dorsal del telencéfalo ventral
VI	Núcleo lateral del telencéfalo ventral
Vp	Núcleo postcomisural del telencéfalo ventral
Vs	Núcleo supracomisural del telencéfalo ventral
Vv	Núcleo ventral del telencéfalo ventral
VCe	Válvula del cerebelo
VII_m	Núcleo motor facial
VL	Núcleo talámico ventrolateral
VLo	Lóbulo vagal
VM	Núcleo talámico ventromedial
Vm	Núcleo motor trigeminal
VOT	Tracto óptico ventral
VT	Núcleo tegmental ventral
Xm	Núcleo motor vagal

Comparación de la distribución neuroanatómica de los ERs en peces

	Lubina			Cíclido africano			Pez guardiamarina			Corvina del Atlántico			Trucha arcoíris			Pez cebra			Pez zoárcido		
Subtipo	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b
Área cerebral																					
Telencéfalo																					
DC	+	-	-	+	+	+	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Vd	+	+	-	+	+	+	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Vv	+	+	-	+	+	+	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Vc	+	-	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Vp	+	-	-	+	-	-	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Diencéfalo																					
Área preóptica																					
NPOpc	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	?	?
NPOav	+	+	+	+	+	+	-	?	?	+	+	+	+	?	?	+	+	+	-	?	?
PM	+	+	-	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	?	?	-	-	-	-	?	?
NAPv	+	+	-	-	-	-	-	?	?	+	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NPPv	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?

Comparación de la distribución neuroanatómica de los ERs en peces

Subtipo	Lubina			Cíclido africano			Pez guardiamarina			Corvina del Atlántico			Trucha arcoíris			Pez cebra			Pez zoárcido		
	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b
Área cerebral																					
Diencéfalo																					
Área preóptica (cont.)																					
NSC	+	+	-	-	-	-	-	?	?	+	+	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Tálamo																					
VM	+	+	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
VL	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
I	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
A	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
DP	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
CP	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NTe	-	+	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Hipotálamo																					
NLT	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	?	?	+	+	-	+	?	?

Comparación de la distribución neuroanatómica de los ERs en peces

Subtipo	Lubina			Cíclido africano			Pez guardiamarina			Corvina del Atlántico			Trucha arcoíris			Pez cebra			Pez zoárcido		
	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b
Área cerebral																					
Diencéfalo																					
Hipotálamo (cont.)																					
NAT	+	-	-	+	+	+	+	?	?	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NRL	+	+	+	-	-	-	-	?	?	+	-	+	-	?	?	+	+	-	-	?	?
NRP	+	+	+	-	-	-	-	?	?	+	-	-	-	?	?	+	+	-	-	?	?
NSV	+	+	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NDLI	+	-	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NCLI	+	-	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Tubérculo posterior																					
TPp	-	+	-	+	-	-	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NPG	+	-	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NG	+	-	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NGT	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?

Comparación de la distribución neuroanatómica de los ERs en peces

	Lubina			Cíclido africano			Pez guardiamarina			Corvina del Atlántico			Trucha arcoíris			Pez cebra			Pez zoárcido		
Subtipo	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b
Área cerebral																					
Diencéfalo																					
Tubérculo posterior (cont.)																					
PT	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
LT	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
TLa	-	+	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
CM	+	+	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Área pretectal																					
NPC	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NC	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
PSm	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Psi	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Sinencéfalo																					
PP	+	-	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?

Comparación de la distribución neuroanatómica de los ERs en peces

Subtipo	Lubina			Cíclido africano			Pez guardiamarina			Corvina del Atlántico			Trucha arcoíris			Pez cebra			Pez zoárcido		
	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b
Área cerebral																					
Sinencéfalo (cont.)																					
NP	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
nMLF	+	-	-	-	-	-	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
SCO	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Mesencéfalo																					
Techo óptico																					
PGZ	+	+	-	+	+	+	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Tegmento																					
DT	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NLV	+	+	-	+	+	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
NI	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
TS	+	+	-	+	+	+	+	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?

Comparación de la distribución neuroanatómica de los ERs en peces

	Lubina			Cíclido africano			Pez guardiamarina			Corvina del Atlántico			Trucha arcoíris			Pez cebra			Pez zoárcido		
Subtipo	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b
Área cerebral																					
Rombencéfalo																					
Cerebelo																					
Vce	-	+	-	-	-	-	-	?	?	-	-	+	-	?	?	-	-	-	-	?	?
SR	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Formación reticular																					
RS	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
RM	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
RI	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
RL	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Área octavolateral																					
AON	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
MAG	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
MON	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?

Comparación de la distribución neuroanatómica de los ERs en peces

Subtipo	Lubina			Cíclido africano			Pez guardiamarina			Corvina del Atlántico			Trucha arcoíris			Pez cebra			Pez zoárcido		
	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b	1	2a	2b
Área cerebral																					
Rombencéfalo (cont.)																					
Núcleos somatomotores																					
nIII	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
nIV	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
nVI	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Núcleos visceromotores																					
Vm	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
VIIIm	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
IX	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
Xm	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?
VLo	+	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?

(+) presencia; (-) ausencia; (?) sin estudio

