



**Tesis para optar al título de Doctor en Biología Molecular y  
Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín**

**Rol de PACAP, PRP y GHRH en  
la regulación neuroendocrina de  
GH en el pejerrey  
(*Odontesthes bonariensis*)**

**Autor: Lic. Mauricio Nestor Kraemer**

**Director: Dr. Luis Fabián Canosa**

**2021**

**Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada**

**Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH)**

## **Agradecimientos:**

A CONICET y ANPCyT por financiar el trabajo.

A mi director, el Dr. Luis Fabián Canosa por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A la comunidad en general del INTECH, por cada momento compartido con cada uno de sus integrantes, tanto becarios, personal de apoyo, administrativos como investigadores que me dejaron momentos imborrables, desde lo académico hasta lo distractivo como mateadas, asados y partidos de futbol por nombrar algunas cosas.

Al laboratorio dirigido por la Dra. Silvia Arranz en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), en especial a Nacho que me ayudó en las determinaciones de GH.

A Fer Pringles y “los Pupi’s” por la hospitalidad que me brindaron en Rosario.

A Emi y su familia por todo el apoyo que me dieron durante la formación de grado y esta tesis. Hubiera sido muy difícil sin su “insistencia”.

A mis compañeros actuales de trabajo, los integrantes del CENEXA, que estuvieron constantemente acompañándome y apoyándome en la etapa final de la tesis.

A mi familia que a la distancia aportaron todo lo que tuvieron a su alcance para que pueda culminar este ciclo.

Y por último a Casiana y su familia, que llegó con todo su amor para acompañarme en cada paso que doy en la vida.

## Índice:

Divulgación de los resultados obtenidos .....	6
Trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales .....	6
Participaciones en otros trabajos y publicaciones .....	6
Nomenclatura de genes, transcritos, proteínas y péptidos .....	7
Resumen .....	8
Lista de abreviaturas.....	11
Lista de figuras .....	13
Lista de tablas .....	15
Capítulo 1 .....	16
Introducción General .....	16
1.1 El pejerrey .....	17
1.1.1 Características generales y distribución .....	17
1.1.2 Cultivo intensivo .....	18
1.1.3 Antecedentes del pejerrey como modelo .....	19
1.2 Regulación endocrina del crecimiento somático .....	19
1.3 Somatotrofina (GH).....	24
1.3.1 Estructura .....	24
1.3.2 Regulación endócrina.....	25
1.4 Factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I, del inglés <i>Insulin-like growth factor I</i> ) .....	26
1.5 Factores hipotalámicos implicados en la liberación de GH .....	29
1.5.1 PACAP, GHRH y PRP .....	29
1.5.2 Receptor de PACAP .....	32
1.5.3 Receptor de GHRH .....	34
1.5.4 Receptor de PRP.....	35
Objetivo general.....	37
Objetivos Específicos.....	38
Capítulo 2 .....	39
Clonado y caracterización de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> en el Pejerrey .....	39
2.1 Introducción .....	40
2.1.1 PACAP .....	40
2.1.2 GHRH.....	44

2.1.3 PRP .....	45
2.2 Materiales y métodos .....	47
2.2.1 Animales y toma de muestras.....	47
2.2.2 Aislamiento de ARN total.....	48
2.2.3 Preparación del ADN copia (ADNc).....	49
2.2.4 Obtención de las secuencias específicas de pejerrey por PCR .....	50
2.2.5 Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.....	50
2.2.6 Clonado de los productos de PCR .....	51
2.2.7 Preparación de Bacterias <i>E. coli</i> (XL1Blue) competentes .....	52
2.2.8 Transformación .....	52
2.2.9 Extracción del ADN plasmídico .....	53
2.2.10 Digestiones con enzimas de restricción.....	53
2.2.11 Análisis filogenético y cálculo de los porcentajes de identidad .....	54
2.2.12 Determinación de la expresión de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> en áreas cerebrales y tejidos periféricos .....	54
2.3 Resultados.....	54
2.3.1 Aislamiento, identificación y análisis filogenético de <i>prp-pacap</i> .....	54
2.3.2 Procesamiento alternativo .....	58
2.3.3 Aislamiento, identificación y análisis filogenético de <i>ghrh</i> .....	59
2.3.4 Expresión de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> en distintos tejidos y áreas cerebrales.....	62
2.4 Discusión .....	63
Capítulo 3 .....	66
Mapeo cerebral de la expresión de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> .....	66
por hibridación <i>in situ</i> .....	66
3.1 Introducción .....	67
3.1.1 PACAP .....	67
3.1.2 GHRH.....	69
3.2 Materiales y métodos .....	71
3.2.1 Animales .....	71
3.2.2-Hibridación <i>In Situ</i> (ISH).....	71
3.3 Resultados.....	74
3.3.1 Distribución cerebral de <i>prp-pacap</i> .....	74

3.3.2 Distribución cerebral de <i>ghrh</i> .....	84
3.4 Discusión .....	86
Capítulo 4 .....	94
Análisis de la Regulación de la expresión génica de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> en contexto de distintas situaciones fisiológicas .....	94
4.1 Introducción .....	95
4.2 Materiales y métodos .....	97
4.2.1 Animales, implantes y disección de tejidos .....	97
4.2.2 Ensayo con dietas experimentales.....	98
4.2.3 Implantes intraperitoneales (ip) con estradiol.....	99
4.2.4 Determinación de los niveles de expresión de <i>prp-pacap</i> , <i>ghrh</i> y <i>gh</i> .....	99
4.2.5 Determinación de GH de pejerrey por ELISA.....	100
4.2.6 Activación o <i>Coating</i> de la placa .....	101
4.2.7 Análisis estadístico.....	101
4.3 Resultados.....	102
4.3.1 Efectos del contenido lipídico de la dieta .....	102
4.3.2 Efectos de implantes de estradiol sobre la expresión de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> .....	103
4.4 Discusión .....	104
4.4.1 Efectos del contenido lipídico de la dieta .....	104
4.4.2 Efectos de implantes de estradiol sobre la expresión de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> .....	106
Capítulo 5 .....	108
Efecto <i>in vitro</i> de los péptidos PACAP, PRP y GHRH sobre la expresión y liberación de GH en cultivos primarios de células hipofisarias .....	108
5.1 Introducción .....	109
5.2 Materiales y métodos .....	110
5.2.1 Animales y disección de la hipófisis .....	110
5.2.2 Cultivos celulares.....	111
5.2.3 Determinación de los niveles de expresión de <i>gh</i> .....	113
5.2.4 Determinación de GH de pejerrey por ELISA.....	113
5.2.5 Análisis estadístico.....	114
5.3 Resultados.....	114
5.3.1 Puesta a punto de los cultivos primarios de células hipofisarias .....	114

5.3.2 Determinación de los efectos de PACAP, PRP y GHRH sobre los niveles de expresión de <i>gh</i> en cultivos primarios de células hipofisarias.....	116
5.3.3 Liberación de GH.....	116
5.4 Discusión .....	117
5.4.1 PACAP .....	117
5.4.2 GHRH.....	119
5.4.3 PRP y SS14.....	120
5.4.3 Resumen conjunto .....	122
Capítulo 6 .....	123
Resumen Final y perspectivas futuras .....	123
6.1 <i>prp-pacap</i> .....	124
6.2 <i>ghrh</i> .....	126
6.3 Perspectivas futuras.....	126
Apéndice .....	128
Bibliografía.....	132

## **Divulgación de los resultados obtenidos**

### **Trabajos publicados en revistas periódicas**

Gómez-Requeni P, Kraemer MN, Canosa LF (2012). Regulation of somatic growth and gene expression of the GH-IGF system and PRP-PACAP by dietary lipid level in early juveniles of a teleost fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *J Comp Physiol B*. 182 (4): 517-30.

### **Trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales**

Kraemer MN, Chavez-Maldonado M, Cárdenas-Reygadas R, Canosa LF. Characterization of PACAP in two Latin American silverside fish (Atherinopsidae). Second Meeting of the NASCE. May 22-25, 2013. Juriquilla, Santiago de Queretaro, Mexico.

Kraemer MN, Gómez-Requeni P, Canosa LF. Characterization of pituitary adenyl cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH) in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). 7th International Symposium on Fish Endocrinology. September 3-6, 2012, Buenos Aires, Argentina.

Gómez-Requeni P, Kraemer MN, Canosa LF. Crecimiento y expresión de genes del eje somatotrófico en alevines de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) alimentados con dietas ricas en lípidos. Second Joint Meeting of Biological Societies of Argentina and XIII Scientific Meeting of Argentinean Society of Biology. August 17-19, 2011, San Juan, Argentina.

Kraemer MN, Canosa LF. Expresión de los factores reguladores hipotalámicos de GH en el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). XI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. December 2-4, 2009. IByME, Buenos Aires, Argentina.

Kraemer MN, Canosa LF. Estudio de la Regulación Neuroendocrina de GH en el Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). 2da Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos. November 3-6 2009. Chascomús, Argentina.

Scharrig ME, Kraemer MN, Sciara A, Canosa LF, Arranz SE, Somoza GM. Desarrollo de un test de ELISA para la detección de GH en el pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. X Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. December 3-5 2008. IByME, Buenos Aires, Argentina.

### **Participaciones en otros trabajos y publicaciones**

Gómez-Requeni P, Kraemer MN, Canosa LF (2019). The Dietary Lipid Content Affects the Tissue Gene Expression of Muscle Growth Biomarkers and the GH/IGF System of Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) Juveniles. *Fishes*, 4: 37.

## **Nomenclatura de genes, transcriptos, proteínas y péptidos**

La nomenclatura de los genes, transcriptos de ARNm y las proteínas, incluido los péptidos, varía de acuerdo al organismo en estudio. Los lineamientos que se siguen actualmente se resumen en la siguiente página web:

<https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

Sin embargo, esta situación obliga a cambiar de estilos a lo largo del texto cuando se hace referencia a especies de peces, mamíferos o humanos. Así, los cambios correspondientes de escritura según la nomenclatura actual, hace difícil la lectura por falta de consistencia. De este modo, para simplificar la lectura, y mantener consistencia en la nomenclatura de la presente tesis, se decidió utilizar una nomenclatura unificada para nombrar los genes y proteínas de todas las especies de vertebrados mencionadas. Así, los genes y transcriptos se escribirán en minúscula cursiva (ej: *ghrh*), mientras que los péptidos y proteínas en mayúsculas (ej: GHRH).

## Resumen:

El pejerrey es una especie muy bien considerada tanto deportiva como gastronómicamente en relación a las cualidades de su carne. Sin embargo, debido a que las tasas de crecimiento y supervivencia del pejerrey son inferiores a las de otros peces cultivados comercialmente, el cultivo intensivo del pejerrey se vuelve económicamente inviable. Así, el conocimiento de la regulación de la expresión y la liberación de hormonas relacionadas con el crecimiento del pejerrey ayudarían a mejorar su potencial en acuicultura. De este modo, el objetivo es estudiar la regulación neuroendocrina de GH y el efecto de los péptidos hipotalámicos sobre las células de la hipófisis de pejerrey.

Al analizar las secuencias de *prp-pacap* y *ghrh* se observó que presentan una estructura muy similar a la de otras especies de peces. Esto se pudo ver especialmente en *prp-pacap* que tiene mayor porcentaje de similitud, incluso se vio la presencia de *splicing* alternativo como ocurre en otras especies. El transcripto corto que así se genera carece de una región que codifica para PRP. También se pudo establecer que la secuencia de *prp-pacap* de pejerrey pertenece a un clado llamado *catfish-like*.

En los estudios de expresión de los mensajeros de ambos genes se vio que *prp-pacap* tiene una distribución amplia en el cerebro, mientras que *ghrh* se detectó solo en el diencéfalo. Esto sugiere que GHRH tendría una función restringida a la regulación hipofisaria en contraposición a PACAP que tendría otras funciones además de la regulación hipofisaria.

En juveniles tempranos de pejerrey alimentados con alto contenido de lípidos en la dieta (21%) desde las primeras etapas larvales, la disminución de la transcripción del ARNm de *ghrII* (posiblemente, de origen extra-hepática) limitaría el papel clave de GH como promotor del crecimiento. Estos resultados, en combinación con la disminución de expresión de *prp-pacap*, señala la necesidad de los peces alimentados con alto contenido de lípidos en la dieta de aumentar su consumo de alimento con el fin de contrarrestar algún desbalance nutricional generado y, por lo tanto, satisfacer sus requisitos nutricionales.

Por otro lado, peces tratados con estradiol mostraron un aumento de liberación de GH y de la expresión de *ghrh* de una manera dependiente de la concentración. Estos resultados son similares a lo observado en otras especies de peces, pero con la

particularidad de que no hubo modificaciones en la expresión de *pacap*, mostrando que los mecanismos de regulación pueden variar entre diferentes especies de peces.

En ensayos *in vitro* con cultivos primarios de celulares hipofisarias PACAP indujo un aumento de la expresión de *gh* como ocurre en muchas otras especies, pero en nuestras condiciones experimentales no fue posible determinar un aumento de la liberación de GH al medio de cultivo. Sin embargo, las condiciones experimentales permitieron mostrar una disminución en la liberación de GH tanto en presencia de somatostatina (SS14), como de PRP. El efecto de SS14 era algo esperado ya que es uno de los principales inhibidores de la liberación de GH en todos los vertebrados, y sirve como control positivo que muestra la viabilidad de las células hipofisarias en las condiciones de cultivo. Sin embargo, el efecto inhibitorio observado con PRP fue inesperado. No hay reportes de dicho efecto para PRP en otras especies. Así, estos resultados abren nuevos enfoques de investigación.

**Palabras Claves:** Pejerrey, Hormona de Crecimiento, Neuroendocrinología, Péptidos hipotalámicos, IGF.

**Abstract:**

Pejerrey silverside (*Odontesthes bonariensis*) is a species highly appreciated both sportingly and gastronomically due to the qualities of its flesh. However, because its growth and survival rates are lower than those of other commercially farmed fish, intensive silverside culture is up today economically unviable. Thus, the knowledge of the regulation of gene expression and release of hormones related to the growth in silverside would help us to improve its potential for aquaculture. Thus, the objective is to study the neuroendocrine regulation of GH and the effect of hypothalamic peptides on the cells of pejerrey pituitary gland.

When analyzing the sequences of *prp-pacap* and *ghrh*, it was observed that they present a very similar structure to that of other species of fish. This could be seen especially in *prp-pacap*, which has a higher percentage of similarity, even the presence of alternative splicing was seen as occurs in other species. The short transcript thus generated lacks a PRP coding region. It was also possible to establish that the *prp-pacap* sequence of silverside belongs to a so-called catfish-like clade.

In the expression studies it was found that *prp-pacap* has a wide distribution in the brain, while *ghrh* was detected only in the diencephalon. This suggests that GHRH would have a function restricted to pituitary regulation as opposed to PACAP which would have other functions in addition to pituitary regulation.

In early juvenile silversides fed high dietary lipids (21%) from early larval stages, decreased transcription of *ghrII* mRNA (possibly of extra-hepatic origin) would limit the key role of GH as a promoter growth. These results, in combination with the decreased expression of *prp-pacap*, indicate the need for fish under high lipid content diet to increase their feed intake to counteract some nutritional imbalance and, thus, meet their nutritional requirements.

On the other hand, fish treated with estradiol showed increased GH release and *ghrh* expression in a concentration-dependent manner. These results are like that observed in other species of fish, but with the particularity that there were no modifications in the expression of *pacap*, showing that the regulation mechanisms can vary between different species of fish.

In in vitro tests with primary pituitary cell cultures, PACAP induced an increase in *gh* expression as occurs in many other species, but in our experimental conditions it was not possible to determine an increase in GH release to the culture medium. However, the experimental conditions allowed showing a decrease in GH release both in the presence of somatostatin (SS14) and PRP. The effect of SS14 was expected since it is one of the main inhibitors of GH release in all vertebrates, and it serves as a positive control showing the viability of pituitary cells under culture conditions. However, the inhibitory effect observed with PRP was unexpected. There are no reports of such an effect for PRP in other species. Thus, these results open new research perspectives.

**Keywords:** Pejerrey, Growth Hormone, Neuroendocrinology, Hypothalamic Peptides, IGF.

## Lista de abreviaturas:

**aa:** Aminoácidos.

**ACTH:** Hormona adrenocorticotrópica (del inglés: *adrenocorticotropic hormone*).

**ADNc:** Ácido desoxiribonucleico complementario.

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.

**Arg:** Arginina.

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.

**ARNt:** Ácido ribonucleico total.

**CP:** Proteína cruda.

**CREB:** Proteína de unión en respuesta al AMPc (del inglés: *cAMP response element binding protein*).

**dNTP:** Desoxiribonucleótido trifosfato (del inglés: *deoxyribonucleotide triphosphate*).

**dpe:** Días post eclosión.

**DTT:** Ditiotreitól (del inglés: *Dithiothreitol*).

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay*).

**FSB:** Solución de almacenaje fría (del inglés: *frozen storage buffer*).

**FSH:** Hormona folículo estimulante (del inglés: *follicle-stimulating hormone*).

**GH:** Somatotrofina u hormona de crecimiento (del inglés: *growth hormone*).

**GHBP:** Proteínas de unión a GH (del inglés: *growth hormone-binding protein*).

**GH-R:** Receptores de GH.

**GHRH:** Hormona liberadora de somatotrofina (del inglés: *growth hormone releasing hormone*).

**Gly:** Glicina.

**GTP:** Guanosina 5'-trifosfato (del inglés: *guanosine triphosphate*).

**ICV:** Intracerebroventricular.

**IGFBP:** Proteínas de unión de IGF (del inglés: *insulin-like growth factor-1 binding protein*).

**IGF-I:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés: *insulin-like growth factor-1*).

**IP:** Intraperitoneal.

**ISH:** Hibridización *in situ* (del inglés: *in situ hybridization*).

**JAK2:** Janus quinasa 2 (del inglés: *janus kinase 2*).

**kDa:** Kilo Dalton.

**LH:** Hormona luteinizante (del inglés: *luteinizing hormone*).

**Lys:** Lisina.

**MAPK:** Proteína quinasa mitogénica activada (del inglés: *mitogen-activated protein kinases*).

**MAPK tipo-ERK:** MAPK regulada por señales extracelulares (del inglés: *extracellular signal-regulated*).

**nM:** Nano molar.

**nt:** Nucleótidos.

**ORF:** Marco abierto de lectura (del inglés: *open reading frame*).

**PACAP:** Péptido activador de la adenilato ciclase hipofisaria (del inglés: *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*).

**PAM:** Monooxigenasa peptidil glicina  $\alpha$ -amidada (del inglés: *peptidyl glycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase*).

**pb:** Pares de bases.

**PC:** Prohormonas convertidas.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *polymerase chain reaction*).

**PHI:** Péptido histidina isoleucina (del inglés: *peptide histidine isoleucine*).

**PHM:** Péptido histidina metionina (del inglés: *peptide histidine methionine*).

**Pit-1:** Factor de transcripción 1 específico de hipófisis (del inglés: *pituitary-specific transcription factor-1*).

**PKA:** Proteína quinasa A (del inglés: *protein kinase A*).

**PRL:** Prolactina.

**PRP:** Péptido relacionado con PACAP (del inglés: *PACAP related peptide*).

**TSH:** Tirotrofina.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SP:** Péptido señal (del inglés: *signal peptide*).

**SS14:** Somatostatina I.

**STAT:** Transductores de señal y activadores de la transcripción (del inglés: *signal transducers and activators of transcription*).

**UTR:** Regiones no traducidas (del inglés: *untranslated region*).

**VIP:** Péptido intestinal vasoactivo (del inglés: *vasoactive intestinal peptide*).

## Lista de figuras:

Fig. 1.1: Pejerrey bonaerense.....	17
Fig. 1.2: Representación esquemática del eje somatotrófico.....	21
Fig. 1.3: Esquema del control dual de la producción IGF-1y el crecimiento de los peces.....	28
Fig. 1.4: Historia evolutiva propuesta para la familia precursora de GHRH/PACAP.....	30
Fig. 1.5: Esquema evolutivo propuesto de GHRH, PRP-PACAP.....	31
Fig. 1.6: Mecanismos intracelulares de la actividad trófica de PACAP en células granulares del cerebelo.....	33
Fig. 1.7: Mecanismo de acción de GHRH para aumentar la síntesis y secreción de GH en los somatotrofos hipofisarios.....	35
Fig. 2.1: Representación esquemática de los precursores humanos de PRP-PACAP y de PHM/VIP.....	42
Fig. 2.2: Procesamiento post-traducciona del precursor de PACAP de rata..	43
Fig. 2.3: Organización del gen humano de PACAP y el ARNm de PACAP....	44
Fig. 2.4: Organización del gen humano de GHRH.....	45
Fig. 2.5: Esquema del cerebro de pejerrey.....	48
Fig. 2.6: Secuencia completa del precursor de PRP-PACAP.....	56
Fig. 2.7: Alineamiento de <i>prp-pacap</i> de diferentes especies de peces.....	57
Fig. 2.8: Análisis filogenético molecular de PACAP.....	58
Fig. 2.9: Expresión de los transcritos corto ( <i>pacap</i> ) y largo ( <i>prp-pacap</i> ) en el cerebro de pejerrey.....	59
Fig. 2.10: Secuencia completa del precursor de GHRH.....	60
Fig. 2.11: Alineamiento de GHRH de diferentes especies de peces.....	61
Fig. 2.12: Análisis filogenético molecular de GHRH.....	62
Fig. 2.13: Expresión de los transcritos ( <i>pacap</i> , <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> ) en diferentes tejidos y áreas cerebrales de pejerrey.....	63
Fig. 3.1: Secciones transversales del cerebro de pejerrey.....	77
Fig. 3.2: ISH de cortes transversales de telencéfalo de pejerrey utilizando sonda anti-sentido para <i>prp-pacap</i> .....	79
Fig. 3.3: ISH de cortes transversales del área preóptica, hipotálamo y tálamo de pejerrey utilizando sonda anti-sentido para <i>prp-pacap</i> .....	81
Fig. 3.4: ISH de cortes transversales del cerebro medio y posterior de pejerrey utilizando sonda anti-sentido para <i>prp-pacap</i> .....	83
Fig. 3.5: ISH de cortes transversales del hipotálamo del cerebro de pejerrey utilizando sonda anti-sentido para <i>ghrh</i> .....	85

<b>Fig. 3.6: Alineamiento de PRP de pejerrey con otros teleósteos y GHRH de pejerrey con humano y <i>zebrafish</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>Fig. 4.1: Nivel de ARNm de <i>gh</i> en cabezas de larvas de pejerrey en una dieta con diferentes porcentajes de lípidos.....</b>	<b>102</b>
<b>Fig. 4.2: Niveles de ARNm de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> en cabezas de larvas de pejerrey en una dieta con diferentes porcentajes de lípidos.....</b>	<b>103</b>
<b>Fig. 4.3: Niveles de ARNm de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i> en hipotálamo, y liberación de GH en plasma, de pejerreyes tratados con diferentes concentraciones de estradiol (E2).....</b>	<b>104</b>
<b>Fig. 5.1: Esquema del experimento de estabilización del cultivo celular.....</b>	<b>112</b>
<b>Fig. 5.2: Esquema del experimento de cultivo celular.....</b>	<b>113</b>
<b>Fig. 5.3: Cantidad de GH liberado en cultivos primarios hipofisarios sin estímulos durante 1 o 2 horas vs. 24 de estabilización.....</b>	<b>115</b>
<b>Fig. 5.4: Nivel de ARNm de <i>gh</i> en cultivos primarios hipofisarios estimulados con PACAP, PRP, GHRH y SS14 durante 3 horas.....</b>	<b>116</b>
<b>Fig. 5.5: Porcentaje de GH liberado en cultivos primarios hipofisarios estimulados con PACAP, PRP, GHRH y SS14 durante 1 y 2 horas.....</b>	<b>117</b>

**Lista de tablas:**

<b>Tabla 2.1: Porcentajes de identidad de PACAP.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 2.2: Porcentajes de identidad de GHRH.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 3.1: Abreviatura de las figuras del capítulo 3.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla A.1: Lista de soluciones utilizadas para el clonado y caracterización de <i>prp-pacap</i> y <i>ghrh</i>.....</b>	<b>128</b>
<b>Tabla A.2: Oligonucleótidos utilizados durante el trabajo de tesis.....</b>	<b>129</b>
<b>Tabla A.3: Lista de soluciones utilizadas para el mapeo cerebral por ISH.....</b>	<b>130</b>
<b>Tabla A.4: Formulación y composición de las 3 dietas experimentales.....</b>	<b>131</b>

## **Capítulo 1**

### **Introducción General**

#### **1.1 El pejerrey**

#### **1.2 Regulación endocrina del crecimiento somático**

#### **1.3 Somatotrofina (GH)**

#### **1.4 Factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I)**

#### **1.5 Factores hipotalámicos implicados en la liberación de GH**

## 1.1 El pejerrey

### 1.1.1 Características generales y distribución

Los pejerreyes son peces que pertenecen al orden Ateriniformes e incluyen varias especies, algunas muy afines entre sí. Poseen un indudable origen marino; son eminentemente eurihalinos, visitantes comunes de aguas salobres de albúferas y estuarios. Se considera que las especies dulceacuícolas *Odontesthes hatcheri* y *Odontesthes bonariensis*, son el producto de especiaciones de poblaciones que emigraron del ámbito marino al de agua dulce, generando grupos distintos a los originarios; al acentuarse las diferencias, se constituyeron en especies distintas (Tejedor 2001). Si tomamos en conjunto a los pejerreyes, constituyen un grupo de especies con particularidades filogenéticas y taxonómicas, con distinto atractivo deportivo, valor por su explotación como recurso pesquero y potencialidad para su cría controlada. *Odontesthes argentinensis* y *Odontesthes bonariensis* constituyen especies gemelas, crípticas, sumamente difíciles de diferenciar por su morfología semejante, e interfértiles entre sí (Tejedor 2001).

El pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis* (Figura 1) posee un cuerpo hidrodinámico y ahusado. Presenta una boca pequeña, la cabeza es cónica y alargada. La línea lateral es doble e irregular y la aleta dorsal doble. Su coloración es plateada. Tiene un peso promedio en adultos de 300 gramos, aunque existen ejemplares que llegan a sobrepasar fácilmente el kilogramo. Su alimentación es básicamente planctófaga, aunque facultativamente se alimentan también de moluscos y ocasionalmente peces (Ringuelet 1942a). La alimentación ictiófaga es más notoria en ejemplares grandes, mayores de 4 años (Ringuelet 1942a) y en ambientes de pobre producción de plancton, presentando gran nivel de canibalismo como fue registrado en el embalse Anzulón de la Rioja (Ringuelet 1942b).



**Fig. 1.1:** Pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis*. Foto tomada de fishbase (<http://www.fishbase.org>)

Su distribución original comprendía las aguas continentales de la Provincia de Buenos Aires y posteriormente fue introducido en otras provincias argentinas y distintos países con propósitos de acuicultura y pesca deportiva (Bonetto y Castello 1985, Grosman 1995, Mituta 2001).

### **1.1.2 Cultivo intensivo**

Los primeros intentos en la cría intensiva del pejerrey en nuestro país se desarrollaron a principios del siglo XX (referencias en Berasain *et al.* 2000), sin embargo, la falta de tradición en la acuicultura, hábitos de alimentación de la población y la abundancia en stocks naturales, limitaron la continuidad de estos intentos pioneros. Con el paso del tiempo la pesca indiscriminada conllevó a la depleción de estos stocks naturales resurgiendo el interés en las técnicas de cría de alevinos para repoblamiento.

Debido a que sus tasas de crecimiento y supervivencia en cultivo intensivo, son muy inferiores a las de otros peces tradicionalmente cultivados como las carpas, tilapias o salmónidos (Strüssmann 1989, Strüssmann *et al.* 1993, Berasain *et al.* 2000, Miranda *et al.* 2006), el cultivo de esta especie es al presente económicamente inviable. Otro de los problemas que afectan el cultivo del pejerrey es la maduración sexual temprana, antes de alcanzar tallas comerciales. En nuestro país, la siembra de alevinos de pejerrey con fines de repoblamiento y pesca deportiva, se realizaba mediante el uso de técnicas de fertilización artificial poco eficientes basadas en una laboriosa selección de ejemplares maduros y una ineficiente e impredecible recolección de sus gametas. Esta metodología presentaba también los siguientes inconvenientes: a) captura de reproductores silvestres en proporciones de sexos fuertemente sesgadas, y en un gran número de individuos inmaduros; b) obtención de escaso volumen de esperma por presión abdominal de los machos. Cabe destacar, que la técnica tradicional requería disponer de 3 ó 4 ejemplares maduros para fertilizar eficientemente los óvulos de una sola hembra (Miranda y Somoza 2001). No obstante, se ha logrado superar estos escollos pudiéndose generar todo el ciclo en cautiverio (Miranda *et al.* 2006).

De este modo, sabiendo que el pejerrey presenta inconvenientes en cuanto a su tasa de crecimiento para su producción comercial, el conocimiento de la regulación de la expresión y la liberación de hormonas relacionadas con el crecimiento del pejerrey podrían ayudar a la generación y evaluación de estrategias biotecnológicas para mejorar su potencial en acuicultura.

### **1.1.3 Antecedentes del pejerrey como modelo**

Con el objeto de conocer mejor la biología de este pez, el pejerrey fue utilizado como modelo animal tanto en investigación fundamental como en investigación aplicada. De este modo, en las dos últimas décadas se han investigado aspectos de la reproducción, la determinación sexual y el cultivo en cautiverio. Así, se caracterizaron tres variantes endógenas de *gnrh* y la distribución neuroanatómica de las mismas (Stéfano *et al.* 2000, Montaner *et al.* 2001, Miranda *et al.* 2003, Guilgur *et al.* 2007); se han caracterizado las dos gonadotrofinas (Gths), así como su distribución hipofisaria y extra-hipofisaria (Miranda *et al.* 2001, 2007; Shinoda *et al.* 2010, Elisio *et al.* 2011) y se conocen algunos aspectos importantes de su desarrollo y reproducción (González *et al.* 2015, 2017, 2019; Chalde *et al.* 2011, Chalde y Miranda 2017; Gárriz *et al.* 2017, 2019, Gárriz y Miranda 2020; Hattori *et al.* 2019; Macoretta y Miranda 2020), así como también las variaciones estacionales de los principales componentes del eje neuroendocrino de la reproducción a lo largo del ciclo reproductivo de machos y hembras (Elisio *et al.* 2014, 2015). Más recientemente se describió el sistema Kisspeptina que controla aspectos del desarrollo gonadal y reproductivo (Tovar Bohórquez *et al.* 2017a, 2017b, Mechaly *et al.* 2018). Además, se observó por primera vez en peces una respuesta diferencial de transcritos de PRP-PACAP en diferentes dietas y se estudió la respuesta a los cambios en la composición de la dieta del sistema GH-IGF, marcadores de desarrollo muscular, enzimas digestivas y del metabolismo lipídico y hormonas que controlan la ingesta (Gómez-Requeni *et al.* 2012, 2013, 2019; Bertucci *et al.* 2018). También se describió que en condiciones de salinidad alta probablemente se promueva el crecimiento somático del pejerrey a largo plazo, debido a que los cambios en la expresión génica observados podrían ayudar a que el pejerrey tenga un mejor rendimiento en salinidad aumentada (Bertucci *et al.* 2017).

### **1.2 Regulación endocrina del crecimiento somático**

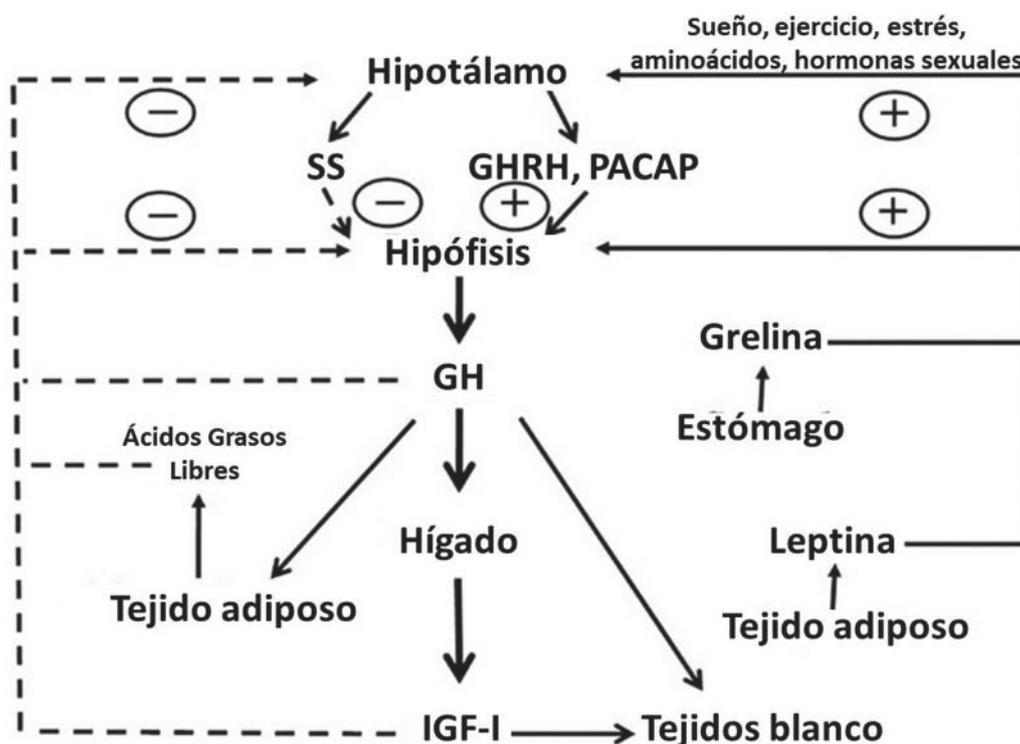
El eje endocrino que regula el crecimiento somático conocido como eje somatotrófico está formado por el hipotálamo, la hipófisis y el hígado. El hipotálamo controla la liberación de la hormona somatotrofica (GH, del inglés *growth hormone*) a través de una variedad de factores tanto estimuladores como inhibidores, como se verá más adelante, entre los que encuentran la hormona liberadora de la somatotrofina

(GHRH, del inglés *growth-hormone-releasing hormone*), el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP del inglés *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) y la SS14. La GH actúa sobre el hígado induciendo la síntesis y liberación de somatomedinas o factores de crecimiento insulino-símiles (IGFs) y son estos los que actúan sobre los tejidos periféricos induciendo el crecimiento somático. Estos factores además ejercen un *feed-back* negativo sobre la secreción de GH por parte de la hipófisis. Además de los factores hipotalámicos estimuladores e inhibidores (GHRH, PACAP y SS14) y endocrinos (IGF-I, GH), otros factores periféricos (metabólicos) influyen en la liberación de GH hipofisaria, entre ellos, los ácidos grasos libres, insulina, glucosa, aminoácidos, leptina, neuropéptido Y, y grelina (Fernández-Pérez *et al.* 2013). Estos factores están principalmente relacionados con la situación metabólica del organismo o derivados de la misma, lo que es consistente con el papel de GH en la regulación del metabolismo de sustratos, la adiposidad y el crecimiento, y parecen coordinar el estado metabólico del organismo con la secreción de GH (Figura 1.2) (Fernández-Pérez *et al.* 2013).

La GH liberada desde la hipófisis estimula la producción y liberación hepática de IGF-I. A su vez la liberación de GH hipofisaria es regulada por el control hipotalámico central y modulada por los insumos nutricionales. Por lo tanto, un mayor consumo y dietas de mayor valor nutricional conducen a un aumento de la producción de IGF-I y del crecimiento (Beckman 2011). El rol de GH tiene relación con el control del crecimiento somático, así como con acciones metabólicas complejas que en gran medida influyen la composición corporal y están relacionadas tanto con la salud humana como con la producción animal. Está cada vez más claro que el crecimiento somático se interconecta fuertemente con la nutrición y el estado reproductivo. Así, en consecuencia, las acciones biológicas de la hormona de crecimiento no están restringidas solamente a la promoción del crecimiento, sino que también incluyen movilización de energía, desarrollo gonadal, apetito y comportamiento social (Gahete *et al.* 2009). En concordancia, la red de regulación de GH es muy compleja, e incluye muchos factores endocrinos y ambientales adecuados para las diversas circunstancias fisiológicas en las que está implicada. Hoy en día es comúnmente aceptado que se produce GH en sitios extra hipofisarios (Luna *et al.* 2004, Untergasser *et al.* 1996, 1997, Harvey *et al.* 2004, Biga *et al.* 2004, Li *et al.* 2005, Sciara *et al.* 2006), donde la

hormona puede ejercer acciones tanto autocrinas como paracrinas, aunque la regulación de la producción de GH en estos sitios no está totalmente clara.

La expresión génica de *gh* y el desarrollo somatotrófico dependen fuertemente del factor de transcripción Pit-1, y aunque se creía que este último únicamente se expresaba en células somatotróficas, también es necesario para PRL y TSH (Gahete *et al.* 2009, Yamamoto *et al.* 2011). El alto grado de conservación estructural y funcional de los componentes del sistema GH subraya la importancia de este sistema endocrino para la regulación del crecimiento a lo largo de la evolución de los vertebrados (Björnsson *et al.* 2002, Wood *et al.* 2005).



**Fig. 1.2:** Representación esquemática del eje somatotrófico. GHRH y SS14, dos hormonas hipotalámicas, controlan la síntesis y liberación de GH desde la hipófisis. GHRH es regulada por retroalimentación negativa (líneas discontinuas) en altas concentraciones de IGF-I y GH en sangre. Los ácidos grasos libres también inhiben, mientras que leptina y grelina estimulan la liberación de GH. Las hormonas sexuales y otros factores también actúan centralmente para estimular la liberación de GH. GH Circulante actúa directamente sobre muchos órganos para estimular la producción de IGF-I. La producción de IGF-I en el hígado proporciona la principal fuente de IGF-I en sangre. GH también tiene efectos directos sobre muchos tejidos blanco que pueden ser independientes de la acción de IGF-I. Figura tomada de Fernández-Pérez *et al.* 2013.

Sin embargo, la regulación de la secreción de GH en peces tiene ciertas diferencias con otros grupos de vertebrados a causa de la organización única del eje

hipotálamo-hipofisario en teleósteos. Las células endocrinas de la hipófisis anterior de los teleósteos muestran una distribución zonal (Doerr-Schott 1980) y son inervadas directamente por fibras nerviosas del hipotálamo (Gorbman 1995). Por consiguiente, una serie de factores neuroendocrinos puede actuar directamente a nivel de la hipófisis para regular la secreción de GH. En otros vertebrados no hay inervación directa, sino que los factores neuroendocrinos se transportan a un sistema circulatorio especializado como son los capilares del sistema porta hipofisario (Gahete *et al.* 2009). Además, en peces, el control de la secreción de GH es multifactorial, con señales estimuladoras e inhibitorias, tanto centrales o hipotalámicas como periféricas, y con un balance entre ellas (Canosa *et al.* 2007). Los principales factores hipotalámicos estimuladores son PACAP y GHRH, mientras que el principal control inhibitorio es ejercido por la SS14 (Canosa *et al.* 2007, Gahete *et al.* 2009). Similarmente a lo encontrado en mamíferos, en peces la secreción de GH ocurre en forma pulsátil (Gahete *et al.* 2009). Así, se describieron variaciones diurnas de la secreción de GH en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), *goldfish* (*Carasius auratus*) y carpa herbívora (*grass carp*, *Ctenopharyngodon idellus*). Estas variaciones circadianas se caracterizan por la existencia de varios picos diarios, siendo mayores durante la noche. Está ampliamente aceptado que estos pulsos son inicialmente controlados por el hipotálamo. Además, estos episodios de secreción pueden ser modulados por diversos factores residentes en los órganos donde actúa, la hipófisis, otras regiones del sistema nervioso central, o factores provenientes de órganos o tejidos periféricos (Gahete *et al.* 2009).

La cascada de eventos por los cuales GH induce sus funciones biológicas comienza cuando GH se une con los receptores de GH en las células blanco. El GH-R identificado en tejidos periféricos, como por ejemplo el hígado, es una proteína transmembrana que pertenece a la súper familia de receptores de citoquinas (Postel-Vinay y Finidori 1995). Se compone de una cadena polipeptídica (620 aminoácidos) con una región transmembrana de conexión, un único dominio extracelular y con un dominio citoplasmático vinculado al sistema efector, según describió Postel-Vinay en 1996. El dominio extracelular, que consta de 246 aminoácidos, está formado de dos subdominios, uno interactúa con la hormona y el otro está asociado con un segundo receptor, que resulta en un homodímero. La activación del GH-R se produce en dos pasos: primero una parte de la molécula de GH se une a una unidad del receptor para

formar un complejo hormona/receptor y segundo, otra molécula de receptor se une entonces a un segundo sitio de la hormona para formar un receptor dímero (homodímero) unido a una molécula de GH según describe Kossiakoff en su trabajo del año 1995. Después de esta dimerización el complejo del receptor se activa y la señal de la hormona puede ser transducida. A altas concentraciones de unión hormona/receptor, ésta es predominantemente monomérica y la respuesta biológica es atenuada (Mustafa *et al.* 1997, Nyberg 2000). En los mamíferos, el GH-R completo es responsable de las acciones que promueven el crecimiento (Herrington y Carter-Su 2001). En los peces, se han descrito dos formas de GH-R completo en el genoma, el GH-R1 y GH-R2. Primeramente, fue descubierto GH-R1, que es el ortólogo del único GH-R de mamífero, mientras GH-R2 fue descubierto más recientemente y se encuentra únicamente en los peces (Pérez-Sánchez *et al.* 2002). Aunque ambos receptores son funcionales y pueden ser activados por GH, los subtipos de GH-R poseen diferencias en sus mecanismos de transducción de señales, GH-R1 es más potente que GH-R2 en la activación de la expresión génica inducida por GH y su unión al receptor (Jiao *et al.* 2006). En los mamíferos, además de GH-R, se identificaron GH-R cortos generados por modificaciones postranscripcionales o postraduccionales, tales como las proteínas séricas de unión a GH (GHBP) y una forma trunca de GH-R. Las GHBP son formas solubles en circulación del GH-R que regulan la biodisponibilidad y la vida media de GH circulante (Edens y Talamantes 1998). Las GH-R trucas, son formas cortas del receptor ancladas a la membrana que les falta un dominio intracelular funcional, por lo tanto, la unión de GH no lleva a la activación intracelular subsiguiente, actuando así, como un dominante negativo de GH-R completo (Dastot *et al.* 1996). En los peces también se describió la existencia de GHBP y del GH-R truncado (Calduch-Giner *et al.* 2001, Nakao *et al.* 2004, Hildahl *et al.* 2007, Zhang y Marchant 1999, Liao *et al.* 2009), aunque se sabe muy poco sobre su papel y la regulación en diferentes condiciones fisiológicas (Hildahl *et al.* 2007, Fuentes *et al.* 2012).

Cuando la GH se une al monómero GH-R completo, induce una homodimerización del receptor, activando posteriormente JAK2 y a continuación otras moléculas, incluida MAPK, dando lugar a efectos mitogénicos a través de los miembros de la familia de los STAT's (Nyberg 2000, Zhu *et al.* 2001). Particularmente, STAT5 es un mediador esencial de la acción de GH, estimulando la transcripción de genes blanco (Herrington y Carter-Su 2001, Zhu *et al.* 2001). Uno de los genes más importantes

estimulados por STAT5 es el IGF-I (Davey *et al.* 2001). IGF-I es una hormona reguladora clave que estimula el crecimiento somático, afectando a diferentes tejidos, en particular al músculo esquelético, estimulando en éste la proliferación celular y la diferenciación de mioblastos (Coolican *et al.* 1997), la promoción de la hipertrofia de miotubos, e inhibiendo la degradación de proteínas (Rommel *et al.* 2001, Latres *et al.* 2005). IGF-I es producida y secretada principalmente en el hígado, lo que representa más del 75% de IGF-I en circulación (Yakar *et al.* 1999, Sjögren *et al.* 1999). Sin embargo, *igf-I* también se expresa localmente en el músculo, y todavía se discute si el IGF-I derivado del hígado o el *igf-I* expresado localmente es el de mayor importancia para estimular el crecimiento muscular en mamíferos, habiendo datos que apoyan ambos puntos de vista (Yakar *et al.* 1999, Sjögren *et al.* 1999, Klover y Hennighausen 2007, Klover *et al.* 2009, Velloso 2008, Williams *et al.* 2011, Ohlsson *et al.* 2009). En los peces, este punto se abordó recientemente, pero sigue sin resolverse (Fox *et al.* 2010, Kuradomi *et al.* 2011, Fuentes *et al.* 2011, Fuentes *et al.* 2015).

El deterioro de cualquiera de los intermediarios en la cadena de reacciones que efectúa GH, un fenómeno denominado resistencia a la GH, pone significativamente en peligro el crecimiento somático y a menudo se observa en virtud diversas condiciones de desnutrición proteico-calórica, como en el caso de ayuno (Beauloye *et al.* 2002, Jenkins y Ross 1996). Primeramente, la resistencia a GH muestra un pobre crecimiento en presencia de secreción normal, o incluso elevada de GH (Zhou *et al.* 1997, Rosenfeld y Hwa 2004, Savage *et al.* 2010). Esta insensibilidad principalmente se ha asociado con defectos en el GH-R, defectos posteriores a los receptores de GH en la señalización, o defectos en la síntesis de IGF-I (Rosenfeld y Hwa 2004, Fuentes *et al.* 2012).

## **1.3 Somatotrofina (GH)**

### **1.3.1 Estructura:**

GH es una hormona proteica multifuncional cuya forma predominante en mamíferos, es una proteína monomérica de 191 aminoácidos (Chêne *et al.* 1989), aunque se han identificados algunas formas poliméricas en los tejidos y fluidos corporales (Nyberg 2000). Es una holoproteína globular con una estructura predominantemente  $\alpha$ -helice, presenta 4  $\alpha$ -helices orientadas de manera que es característica de las citoquinas, paralelas arriba-arriba y abajo-abajo conectadas con un

bucle de conexión largo entre los dos pares de hélices y uno corto entre las hélices 2 y 3 (Kopchick y Andry 2000). Contiene 4 residuos de cisteína, los cuales forman un pequeño bucle en el dominio carboxi-terminal (Cys 182-Cys 189) y uno largo en el dominio amino-terminal (Cys 53-Cys 165), además el final del dominio amino-terminal principalmente contiene residuos de fenilalanina o algunas veces de residuos de alanina (Chêne *et al.* 1989). Los residuos de cisteína y un núcleo central constituido de aminoácidos no polares estabilizan la estructura globular de la molécula (Kopchick y Andry 2000).

El ADNc que codifica para GH de pejerrey fue descrito por Sciara y colaboradores (2006), tiene 965 pb y está formado por un marco de lectura abierto (615 pb), que codifica la hormona de crecimiento y las secuencias no traducidas 5' y 3' (153 nt y 195 nt, respectivamente). El 3'UTR tiene dos secuencias consenso de poliadenilación. La secuencia de aminoácidos que se predijo para GH de pejerrey consiste en 204 residuos aminoacídicos con una masa molecular estimada en 23 kDa correspondiente a la proteína precursora con el péptido señal (17 residuos de aminoácidos). GH de pejerrey tiene un 28% de identidad con GH humana y difiere sólo en dos aminoácidos (uno de ellos en el péptido señal) con respecto a la GH de *O. argentinensis*, una especie de pejerrey marino de Sudamérica (Sciara *et al.* 2006). La secuencia de nucleótidos tiene 94,9% de identidad con *O. argentinensis*, sin embargo, la divergencia más alta se encuentra en el 5'UTR que es más grande en *O. bonariensis* (150 nt contra 110 nt en *O. argentinensis*), mientras que en el marco de lectura abierto el porcentaje de identidad es de 99,2% (Sciara *et al.* 2006).

### **1.3.2 Regulación endócrina:**

GH se sintetiza en células somatotróficas de la hipófisis anterior y se libera en la circulación para llegar a sus órganos blanco en el cuerpo. Como se dijo anteriormente, la secreción de GH es controlada por péptidos hipotalámicos, siendo estimulada por GHRH y PACAP, pero inhibida por la SS14. En los mamíferos, al igual que en peces, ya vimos que GH es secretada episódicamente o por pulsos, lo que es esencial para el crecimiento óptimo, además, también existe un claro patrón de secreción femenino y masculino de la hormona. En ratas machos, GH es secretada en pulsos regulares que ocurren en intervalos de 3 a 4 horas. En las hembras los pulsos son más bajos y los niveles de GH en plasma entre los pulsos son más altos que en los machos (Jansson *et*

al. 1985). Además, el control hipotalámico de la secreción de GH puede ser modulado por esteroides sexuales. La presencia continua de testosterona parece ser necesaria para mantener bajos los niveles de GH basales en ratas machos adultas (Jansson *et al.* 1985). En contraste con la testosterona, los estrógenos elevan los niveles basales de GH en plasma y suprimen los pulsos de GH en algunas condiciones. Los estrógenos pueden estimular la secreción de GH basal actuando directamente sobre la hipófisis (Jansson *et al.* 1985). También se sabe que los opioides endógenos afectan a la liberación de GH al actuar sobre los circuitos hipotalámicos. Además, GH controla su liberación por un mecanismo de retroalimentación negativa, por lo tanto, cuando se administra en dosis fisiológicas la hormona puede interactuar con las catecolaminas hipotalámicas involucradas en la regulación de la liberación de GH o factores de inhibición (Nyberg 2000).

#### **1.4 Factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I, del inglés *Insulin-like growth factor I*)**

El IGF-I es una hormona estructuralmente similar a la insulina y juega un papel importante en el crecimiento. Se expresa en un amplio rango de tejidos, encontrándose en altos niveles en el hígado, donde es el factor de crecimiento principalmente secretado bajo el control de GH.

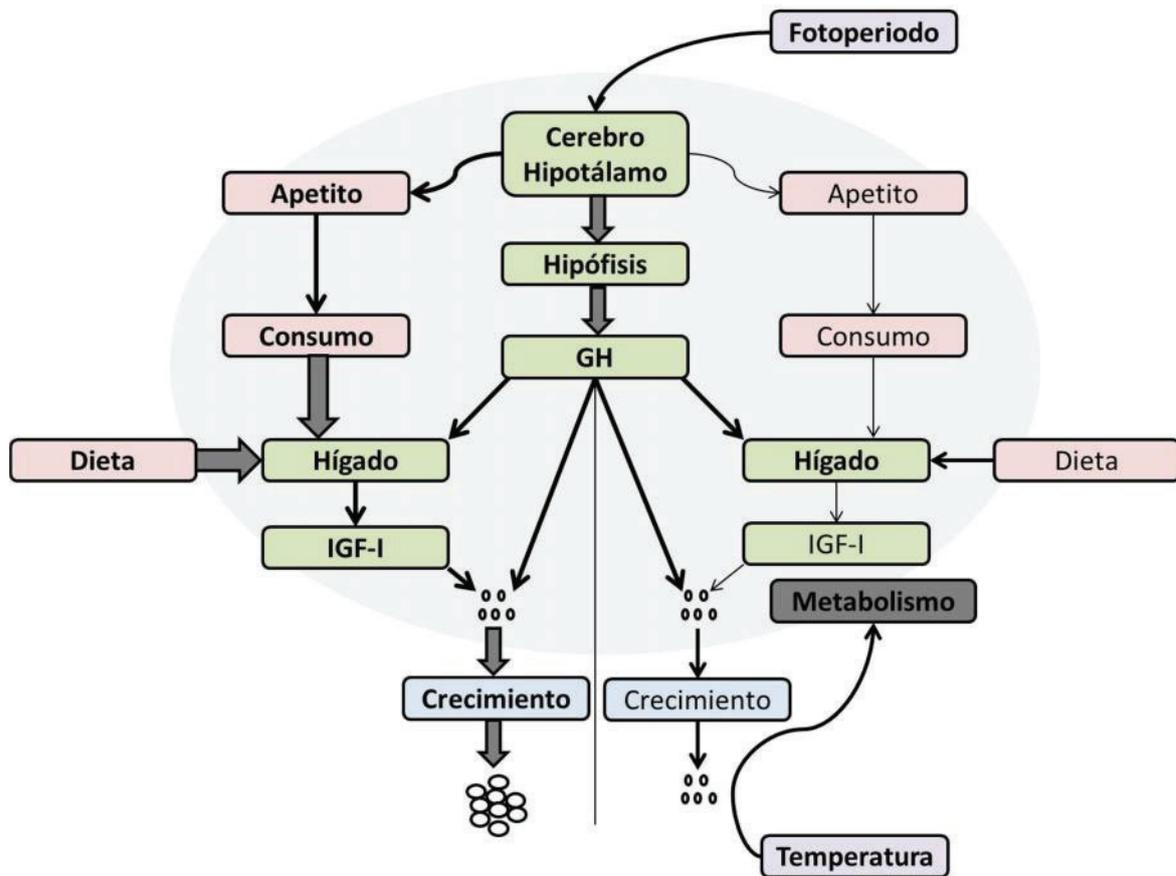
El IGF-I circulante ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de GH, actuando tanto a nivel del hipotálamo como de la hipófisis (Daughaday 2000, Le Roith *et al.* 2001a, 2001b). En teleósteos se observó un efecto inhibitorio directo de IGF-I en la secreción de GH por células somatotróficas (retroalimentación *long-loop*), en anguila europea (*Anguilla anguilla*, Rousseau *et al.* 1998), rodaballo (*turbot*, *Scophthalmus maximus*, Duval *et al.* 2002), y robalo rallado (*striped bass*, *Morone saxatilis*, Fruchtman *et al.* 2002).

A diferencia de la hormona de crecimiento, IGF-I se libera constitutivamente a medida que se produce. Además, la liberación de IGF-I a través de la sangre se retrasa por la acción de una serie de proteínas de unión de IGF o IGFBP (del inglés, *IGF binding protein*) (Degger *et al.* 1999, 2000, 2001, Kelley *et al.* 2002), que permiten un nivel relativamente constante de IGF-I en la sangre en comparación con otras hormonas. Varios estudios sugieren que IGF-I podría ser un índice de crecimiento útil en peces, aunque todavía no está claro si puede servir para todos los peces y como puede interferir

la variación ambiental (Pérez-Sánchez y Le Bail 1999, Beckman *et al.* 2004, Dyer *et al.* 2004, Picha *et al.* 2008a, b).

Los estudios realizados hasta ahora en peces proporcionan una base para entender cómo se regula la producción de IGF-I. La hormona de crecimiento liberada de la hipófisis estimula la producción hepática de IGF-I, a través de la acción de GH sobre los receptores de GH. Sin embargo, la capacidad de los tejidos hepáticos para responder a GH es modulada en conjunto con el estado de nutrición del animal. El tejido hepático en peces en ayuno es insensible a GH y la administración de GH tiene poco efecto en la producción de IGF-I en esta condición (Gray *et al.* 1992, Pérez-Sánchez *et al.* 1994). Por lo tanto, la producción de IGF-I es dependiente tanto de la producción de GH y la liberación como del estado nutricional (el consumo de alimentos y la asimilación de nutrientes). Se podría esperar que los factores y situaciones que afectan la liberación de GH y/o el estado nutricional controlen la producción de IGF-I afectando el nivel del mismo (Figura 1.3).

La producción de la hormona es dependiente de la transcripción del gen *igf-I* en ARNm y la posterior traducción del transcripto de ARNm en una proteína. Así, los cambios en el nivel del ARNm *igf-I* pueden corresponder a los cambios en el nivel de proteína. En peces, se han encontrado diferentes cambios en los niveles del ARNm *igf-I* hepático que corresponden al ayuno y la alimentación (Duan 1997, 1998). Estos resultados sugieren que los niveles del ARNm *igf-I* hepático también podrían servir como un índice de crecimiento en largo o en peso. En efecto, Kajimura *et al.* (2001), Vera Cruz *et al.* (2007) y Vera Cruz y Brown (2009) mostraron que los niveles del ARNm *igf-I* hepático en juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) se correlacionaron con la tasa de crecimiento. IGF-I desempeña claramente un papel en el crecimiento de tejido cartilaginoso y óseo, y del tejido muscular, estas acciones se estudiaron ampliamente en mamíferos (Oksbjerg *et al.* 2004, Giustina *et al.* 2008, Velloso 2008, Ohlsson *et al.* 2009). En salmónidos se observó que IGF-I actúa en el tejido muscular y esquelético de forma tanto endocrina como paracrina (Wargelius *et al.* 2005, Nordgarden *et al.* 2006).



**Fig. 1.3:** Esquema del control dual de la producción IGF-1 y el crecimiento de los peces. La producción de IGF-1 es estimulada por la GH liberada de la hipófisis (modulada por el control cerebro-hipotalámico) y modulada por insumos nutricionales que regulan la producción de IGF por el hígado. Los insumos nutricionales se dividen en consumo (cantidad que el animal come realmente) que está regulada por el apetito (modulado por el control cerebro-hipotalámico) y la dieta (proteínas, lípidos, contenido de carbohidratos de la comida ingerida). Un mayor consumo y dietas de mayor calidad conducen a un aumento de la producción de IGF-1 y al crecimiento. La actividad cerebro-hipotalámica es regulada por señales ambientales (incluido el fotoperíodo). La temperatura, a través de una regulación general del proceso fisiológico (incluyendo el metabolismo), actúa como un reóstato en IGF-1 y el crecimiento. Figura tomada de Beckman 2011.

En el pejerrey, se caracterizó *igf-I* desde el ARNm de hígado, obteniéndose un ADNc de 792 pb con una cola Poli-A y un marco abierto de lectura (ORF). La región codificante de 475 pb es precedida por el 5'UTR de 147 pb y seguida por el 3'UTR de 90 pb que contiene la señal de poliadenilación. La secuencia de la pre-pro-hormona tiene un tamaño de 185 aminoácidos. La proteína IGF-I madura 68 aminoácidos y una masa molecular de 7,4 kDa (Sciara *et al.* 2008). En varios teleósteos, tales como los salmoniformes (Wallis y Devlin 1993; Chen *et al.*, 1994; Duan 1997), pleuronectiformes (Tanaka *et al.*, 1998), siluriformes (Clay *et al.*, 2005), cypriniformes (Liang *et al.*, 1996;

Kermouni *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006) y perciformes (Stahlbom *et al.*, 1999; Jentoft *et al.*, 2004; Vera Cruz *et al.*, 2007), se encontraron diferentes formas de ARNm pro-*igf-I* generadas por *splicing* alternativo, que resultan en transcritos de distintos tamaños del dominio carboxi-terminal. Sin embargo, en hígado de pejerrey tanto adulto como juvenil se encontró un solo transcripto de IGF-I, lo que sugiere que la etapa de desarrollo no está implicada en la manifestación de las diferentes formas (Sciara *et al.* 2008). La expresión de *igf-I* en pejerrey es alta en hígado, intestino posterior y cerebro; baja en el bazo y corazón; y apenas detectable en riñón (Sciara *et al.* 2008). Además, se sabe que la expresión de *igf-I* en hígado depende fuertemente de los niveles de GH y el tiempo. Así, la administración de GH de pejerrey produjo aumentos significativos a las 9 horas posteriores a la inyección y en concentraciones mayores e iguales a 1 µg de GH de pejerrey por gramo de peso del cuerpo (Sciara *et al.* 2008).

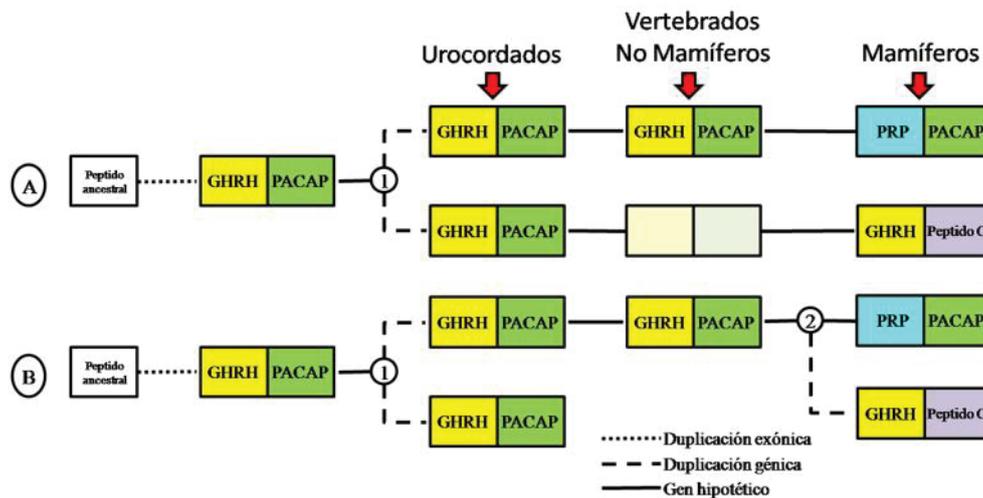
## **1.5 Factores hipotalámicos implicados en la liberación de GH**

### **1.5.1 PACAP, GHRH y PRP**

Como veremos en capítulos posteriores estos péptidos son miembros de la súper familia VIP (*vasoactive intestinal peptide*) / secretina / glucagón / péptido inhibidor gástrico y están altamente conservados a través de la evolución (Montero *et al.* 2000, Vaudry *et al.* 2009).

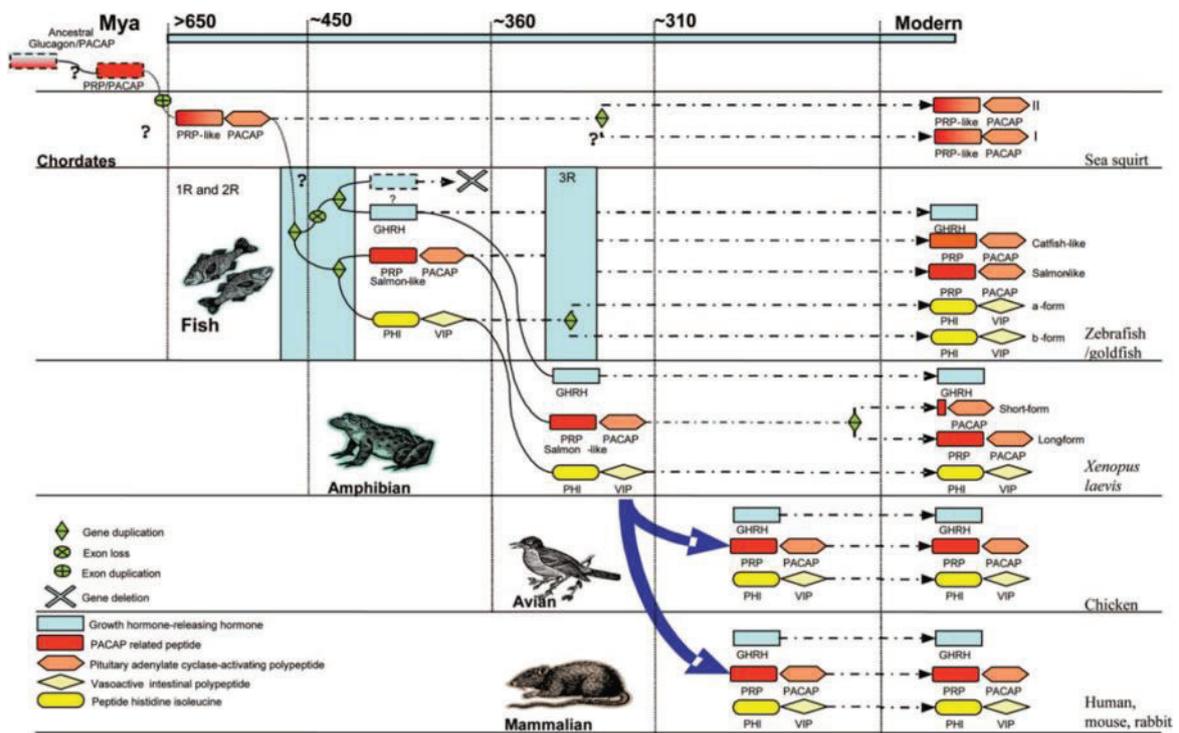
En estudios iniciales, analizando el rol potencial de GHRH en la liberación de GH en peces, no pudieron demostrar una buena acción estimuladora, probablemente debido al hecho de que los péptidos que originalmente se consideraron como GHRH de peces eran de hecho homólogos del péptido relacionado con PACAP (PRP, del inglés *PACAP related peptide*), como ocurrió en carpa herbívora (Sze *et al.* 2007), o incluso cuando se utilizó GHRH humana tampoco vieron cambios en la liberación de GH de la anguila europea (Montero *et al.* 1998). Sin embargo, la posterior identificación de GHRH y sus receptores en *goldfish* mostraron que este péptido es un potente estimulador de la liberación de GH en esta especie (Lee *et al.* 2007). Además, se realizaron experimentos en otras especies que confirmaron un rol general estimulador de GHRH en la secreción de GH en teleosteos. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado su potencia comparada al efecto de PACAP, para poder concluir cuál de los dos es más relevante en términos de control de la secreción de GH.

Anteriormente, se propuso un modelo de la evolución de PRP, PACAP, y GHRH de acuerdo con sus estructuras y organizaciones genómicas (Hoyle 1998, Montero *et al.* 2000, Sherwood *et al.* 2000). En esta hipótesis se propuso que los GHRHs de mamíferos evolucionaron a partir de péptidos GHRH-like no mamíferos con dos escenarios posibles. Primero se habría producido una duplicación del exón de un péptido ancestral dando lugar al gen que presenta en tándem *ghrh* y *pacap* (*ghrh-pacap*). Luego, habría ocurrido una duplicación del gen *ghrh-pacap*, la cual tuvo lugar justo antes de emerger los urocordados (Montero *et al.* 2000). En el primer escenario esa duplicación génica habría dado origen en mamíferos, por un lado, a *prp-pacap* y por el otro a *ghrh-péptido c*. Sin embargo, en vertebrados no mamíferos se habría mantenido uno de los prólogos *ghrh-pacap* mientras que el otro habría desaparecido. El otro escenario posible propuesto supone que podría haber ocurrido una segunda duplicación génica antes de la divergencia de los mamíferos, y que a partir del único parálogo retenido en vertebrados no mamíferos, se originaron los dos genes presentes en mamíferos (Montero *et al.* 2000). Así, en uno de los parálogos la secuencia *ghrh* sufre modificaciones que darían origen a *prp* mientras que *pacap* se habría conservado en tandem (*prp-pacap*). Por otro lado, en el segundo parálogo se habría conservado *ghrh* mientras que la secuencia de *pacap* se habría modificado dando origen al *péptido c* (Figura 1.4).



**Fig. 1.4:** Historia evolutiva propuesta para la familia precursora de *ghrh-pacap*. En ambas hipótesis A y B, se supone que la duplicación de exones, que conduce a la aparición de las secuencias de péptido *ghrh-péptido c* y *prp-pacap*, ocurrió antes de la duplicación génica. Hipótesis A: se habría producido una sola duplicación antes de la aparición de los urocordados. Hipótesis B: dos duplicaciones habrían ocurrido independientemente en los urocordados y en un ancestro común de los mamíferos. Figura tomada de Montero *et al.* 2000.

Sin embargo, posteriormente se obtuvo nueva información sobre la evolución de PRP en vertebrados no mamíferos (Lee *et al.* 2007, Figura 1.5). Se demostró que los péptidos GHRH-like en vertebrados no mamíferos (peces y anfibios) representaban en realidad las contrapartes homólogas de PRPs de mamíferos, mientras que un GHRH “real”, que es capaz de estimular la liberación de la hormona de crecimiento (GH), está claramente presente en otro precursor proteico y, por lo tanto, en otro gen, tal como ocurre en mamíferos. Este cambio conceptual de las identidades de GHRH y PRP en vertebrados no mamíferos aportó nuevos conocimientos para un mejor entendimiento de los modelos evolutivos anteriores (Lee *et al.* 2007). Además, implica que en los trabajos previos al 2007 cuando se trabajó sobre GHRH homólogo en vertebrados no mamíferos es muy probable que en realidad se estuviera estudiando en su lugar PRP, lo que nos obliga a ser cautos en el análisis de esos resultados.



**Fig. 1.5:** Esquema evolutivo propuesto de *ghrh*, *prp-pacap*, y genes *phi-vip* respecto a varias rondas de duplicación del genoma. El marcaje de los péptidos y las organizaciones de los genes se muestran en las llaves. Los eventos de duplicación del genoma se muestran en cajas azules. Las vías desconocidas o poco claras están marcadas con signos de interrogación. Figura tomada de Lee *et al.* 2007.

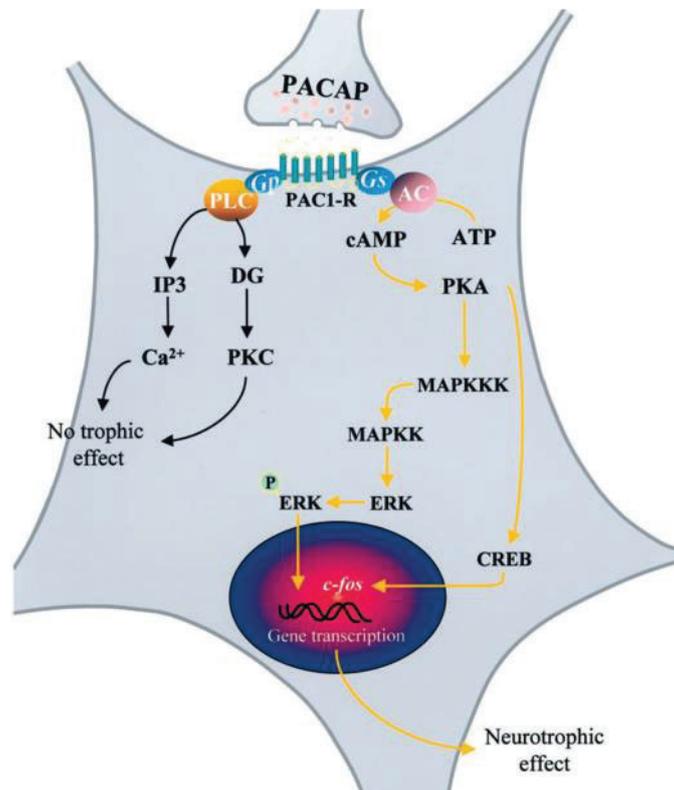
### 1.5.2 Receptor de PACAP

Para que PACAP ejerza su efecto estimulador en la liberación de GH es necesario que las células diana lo puedan reconocer y para ello utilizan moléculas en su superficie llamadas receptores, que tienen sitios de unión con afinidad por PACAP. Se caracterizaron dos clases de sitios de unión para PACAP sobre la base de sus afinidades relativas para PACAP y VIP. Los sitios de unión Tipo I, que se caracterizaron originalmente en la hipófisis anterior y el hipotálamo usando  $^{125}\text{I}$ -PACAP27 como radioligando, muestran una alta afinidad por PACAP38 y PACAP27 ( $K_d \sim 0,5 \text{ nM}$ ) y una afinidad mucho menor para VIP ( $K_d \sim 500 \text{ nM}$ ). Los sitios de unión Tipo II, que son abundantes en varios órganos periféricos incluyendo el pulmón, el duodeno y el timo, poseen afinidad similar por PACAP y VIP ( $K_d \sim 1 \text{ nM}$ ). Diferencias sutiles en la capacidad de PACAP38 y PACAP27 para desplazar  $^{125}\text{I}$ -PACAP27 de sus sitios de reconocimiento en el SNC sugieren la existencia de dos subconjuntos de sitios de unión Tipo I. Del mismo modo, los sitios de unión Tipo II se subdividieron en dos clases, en función de su afinidad por la secretina y helodermina, los sitios de unión clásico VIP presentan una baja afinidad por la secretina, mientras que los sitios de unión que prefieren helodermina poseen una mayor afinidad para helodermina que para VIP o PACAP, y no tienen afinidad por la secretina. Una caracterización cuidadosa de la unión de  $^{125}\text{I}$ -PACAP27 sobre preparaciones de membrana indicó que la expresión de los sitios de unión Tipo I y Tipo II no es específica del tipo de célula y que la mayoría de los tejidos poseen diferentes proporciones de cada subtipo de receptor (Vaudry *et al.* 2000).

La amplia distribución de PACAP y sus receptores sugiere que el péptido puede ejercer funciones fisiológicas pleiotrópicas. De hecho, se vio que PACAP actúa como una hormona, una neurohormona, un neurotransmisor y un factor trófico en numerosos tejidos (Vaudry *et al.* 2000). La capacidad de PACAP para estimular la formación de cAMP en células de la hipófisis proporciona la primera evidencia de que el péptido puede actuar como una neurohormona hipofisiotrófica. Entre los diferentes neuropéptidos hipofisiotróficos identificados hasta ahora, la situación de PACAP es bastante singular ya que los receptores de PACAP se expresan en todos los tipos de células endocrinas y foliculares de la adenohipófisis. Mediante estudios citofluorométricos en células dispersas de adenohipófisis de rata, se demostró que PACAP induce la movilización de calcio citoplasmático en todos los tipos celulares del

sistema endocrino. Esta observación es consistente con el hecho que PACAP estimula la liberación de GH, ACTH, LH, FSH y PRL (Vaudry *et al.* 2000).

La presencia de altas concentraciones de PACAP y de los receptores de PACAP en las áreas germinativas del cerebro en desarrollo indica que el péptido puede ejercer funciones importantes durante la ontogénesis del SNC. De hecho, la incubación con PACAP inhibió la apoptosis de células granulares del cerebelo en cultivo (Cavallaro *et al.* 1996, Chang *et al.* 1996, Campard *et al.* 1997, González *et al.* 1997, Villalba *et al.* 1997) y estimuló la extensión de neuritas (González *et al.* 1997). La actividad neurotrófica de PACAP esta mediada por la fosforilación de MAPK tipo-ERK dependiente de la activación de adenilato ciclasa y aumento de la expresión de gen *c-fos* (Figura 1.6) (Vaudry *et al.* 2000).



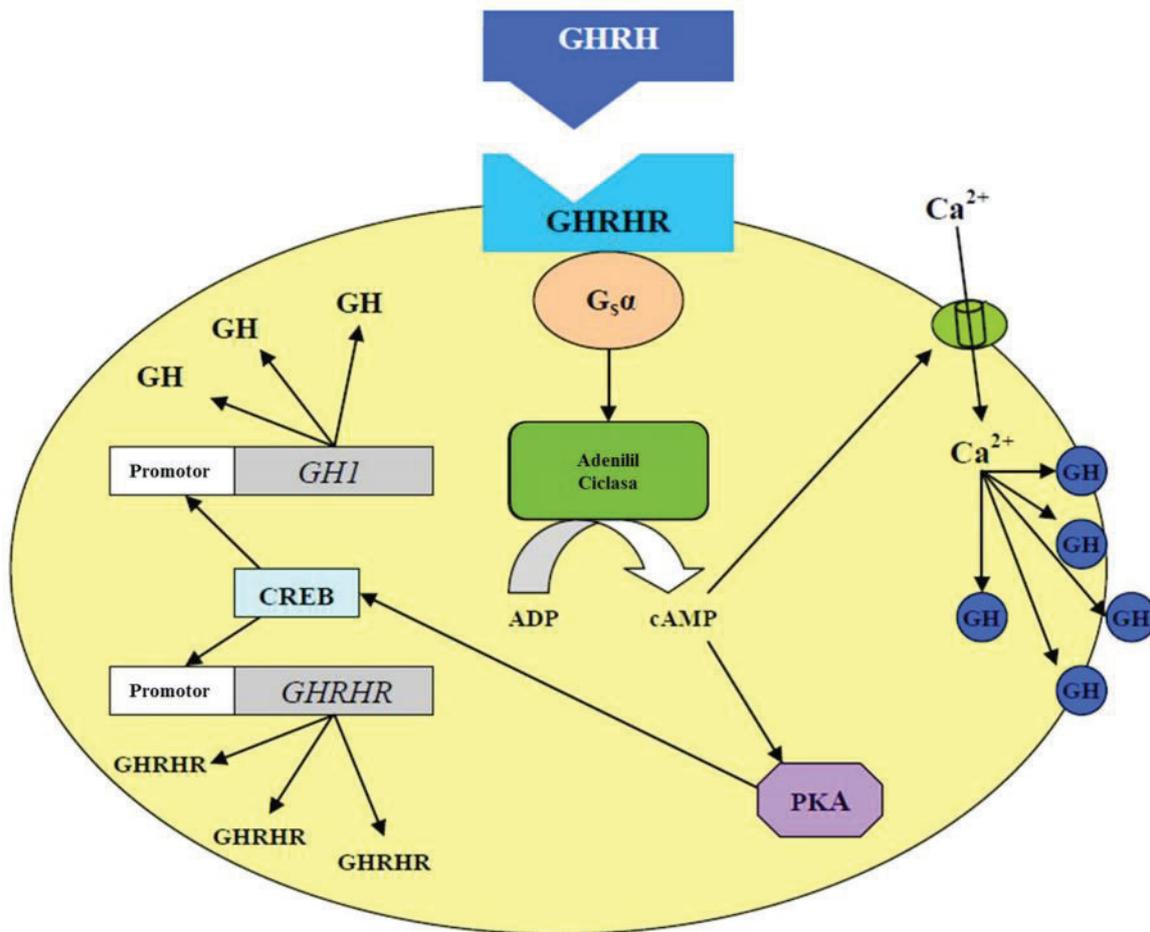
**Fig. 1.6:** Representación esquemática de los mecanismos intracelulares probables que participan en la actividad trófica de PACAP en células granulares del cerebelo. Figura tomada de Vaudry *et al.* 2000.

PACAP aumenta la concentración de calcio intracelular en células somatotrofas de ranas y ratas (Canny *et al.* 1992, Gracia-Navarro *et al.* 1992, Yada *et al.* 1993), y la respuesta del calcio es bloqueada por RpcAMPS, un antagonista de PKA, lo que indica que el efecto de PACAP está mediado por la activación de la vía cAMP/PKA (Rawlings

*et al.* 1993, 1995). El aumento de calcio citosólico juega un papel fundamental en la secreción de GH inducida por PACAP (Martínez-Fuentes *et al.* 1998a, b, c). El efecto máximo de PACAP sobre la liberación de GH se observa después de 15 minutos de tratamiento, mientras que la incubación prolongada o el tratamiento previo con PACAP causan desensibilización de la respuesta secretora (Goth *et al.* 1992, Wei *et al.* 1993).

### **1.5.3 Receptor de GHRH**

El receptor hipofisario de GHRH (GHRH-R), es un receptor acoplado a proteína G de siete dominios transmembrana con alto grado de homología con los receptores de VIP, PACAP, secretina, glucagón, GLP, y calcitonina (Barabutis y Schally 2010; De-Almeida y Mayo 2001). La unión del receptor a GHRH activa la adenililato ciclasa a través de la estimulación de una proteína G estimuladora (Gs). Esto estimula el aumento intracelular de AMPc, que desencadena, por un lado, la apertura de canales de sodio en los somatotrofos, lo que conduce a la despolarización de su membrana y la concomitante apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. La entrada de calcio al citoplasma dispara la secreción de GH. Por otro lado, el aumento intracelular de AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) la cual fosforila y activa el factor de transcripción CREB, estimulando así la síntesis *de novo*, tanto de GH como del GHRH-R. (Figura 1.7) (Lin-Su y Wajnrajch 2002, Barabutis y Schally 2010).



**Fig. 1.7:** Mecanismo de acción de GHRH para aumentar la síntesis y secreción de GH en los somatotropos hipofisarios. La unión de la GHRH a su receptor activa una proteína G estimuladora, que estimula la adenilil ciclasa para aumentar el cAMP. El aumento del AMPc aumenta el calcio intracelular, que estimula la liberación de GH. El aumento del AMPc también estimula la proteína quinasa A (PKA) para activar CREB, que estimula la transcripción de los genes GH1 y GHRHR. Figura tomada de Lin-Su y Wajnrajch 2002.

### 1.5.4 Receptor de PRP

El receptor de PRP, nombrado por los autores como receptor de GHRH-LP, se aisló y caracterizó en peces como *goldfish*, *fugu* y *zebrafish* (Chan *et al.* 1998; Cardoso *et al.* 2003; Wu *et al.* 2008). Consta de siete dominios transmembrana, y está clasificado como un receptor acoplado a proteína G. Los transcritos del receptor se detectaron en el cerebro, hipófisis, branquias, testículo, ovario, intestino inferior, intestino superior, corazón, hígado, músculo esquelético y bazo, pero no en el riñón y la vesícula biliar (Chan *et al.* 1998). Mas adelante, se identificó una secuencia parcial del transcrito del receptor PRP en el cerebro y la hipófisis del *gurami* azul como miembro de la subfamilia B-I de los receptores acoplados a proteína G (Levy y Degani 2011). El

transcripto parcial identificado incluyó varios dominios que proporcionan información crítica necesaria para interacciones específicas con ligandos y señalización intracelular (Harmar 2001). De este modo, podría considerarse que el receptor identificado es funcional, se une a PRP y transmite señales intracelulares, otorgándole relevancia fisiológica a PRP *in vivo* (Levy y Degani 2011).

Mas adelante (Capítulo 2) veremos que en peces existen dos tipos de precursores de PRP, denominados *salmon-like* y *catfish-like* por la especie donde se caracterizó por primera vez. Algunas especies de peces como el *goldfish* expresan ambas formas. Así, en ensayos *in vitro* se reveló que el PRP *salmon-like* de *goldfish* fue aproximadamente de dos a cuatro veces más potente que el otro tipo, PRP *catfish-like*, en estimular el receptor de PRP del *goldfish* (Kee *et al.* 2005). Esta diferencia en la estimulación podría ser explicada por la sustitución de metionina en la posición 36 de PRP *catfish-like*, que desempeña un papel determinante en la interacción específica entre el receptor y su ligando endógeno PRP en *goldfish*. También se observó otras diferencias en cuanto a las cargas de ciertos aminoácidos entre PRP *salmon-like* y *catfish-like* que podrían afectar esta diferencia para estimular el receptor de PRP (Kee *et al.* 2005). Hasta la fecha, no se encontró ningún receptor específico que sea estimulado por el péptido PRP *catfish-like*. Por lo tanto, este péptido podría ser un producto de una duplicación genica específica de PRP en teleósteos, que al menos en *goldfish* después perdió su función. Sin embargo, todavía no se puede excluir la posibilidad de que pueda existir un receptor específico PRP *catfish-like* en teleósteos (Tam *et al.* 2007).

## **Objetivo general:**

Como se mencionó en la introducción (capítulo 1, sección 1.1.2) las tasas de crecimiento y supervivencia del pejerrey en cultivo intensivo hacen que el cultivo de esta especie sea, al presente, económicamente inviable. El rol de GH tiene relación con el control del crecimiento somático, así como en acciones metabólicas complejas que en gran medida influyen la composición corporal y están relacionadas tanto con la salud humana como con la producción animal. En peces, el control de la secreción de GH es multifactorial, con señales estimuladoras e inhibitorias, tanto centrales o hipotalámicas como periféricas. El balance entre ellas se integra en las células somatotrofas hipofisarias (productoras de GH) y se determinan así los niveles de secreción de GH en cada contexto fisiológico. Los principales factores hipotalámicos estimuladores son PACAP y GHRH, mientras que el principal control inhibitorio es ejercido por la SS14. Por otro lado, el factor de crecimiento insulino-simil tipo 1 (IGF-I) es una hormona similar en estructura molecular a la insulina y juega un papel importante en el crecimiento. IGF-I se expresa en un amplio rango de tejidos, encontrándose en altos niveles en el hígado, de donde se secreta bajo el control de GH. Además, el IGF-I circulante ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de GH, actuando tanto a nivel del hipotálamo como de la hipófisis.

El conocimiento de la regulación de la expresión y la liberación de hormonas relacionadas con el crecimiento del pejerrey podrían ayudar a la generación y evaluación de estrategias biotecnológicas para mejorar su potencial en acuicultura. De este modo, en el presente trabajo de tesis nos planteamos como objetivo general estudiar la regulación neuroendocrina de GH en el pejerrey. Para ello fue necesario desarrollar herramientas que nos permitieran determinar la regulación de la expresión génica, los niveles de GH, y el efecto de los péptidos hipotalámicos sobre las células de la hipófisis.

## **Objetivos Específicos:**

Dentro del marco teórico que se presentó anteriormente y con los conocimientos de la especie obtenidos hasta el momento se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar e identificar los genes que codifican para los precursores de PRP-PACAP y GHRH.
2. Estudiar la expresión y distribución de *prp-pacap* y *ghrh* en distintos tejidos.
3. Analizar la distribución de la expresión de los mensajeros *prp-pacap* y *ghrh* en el cerebro del pejerrey.
4. Estudiar como la expresión de *prp-pacap* y *ghrh*, así como los niveles de GH plasmáticos se ven alterados en diferentes condiciones fisiológicas.
5. Estudiar los efectos *in vitro* de los péptidos PACAP, PRP, GHRH y SS14 sobre la expresión y secreción de GH.

## **Capítulo 2**

### **Clonado y caracterización de *prp-pacap* y *ghrh* en el Pejerrey**

#### **2.1 Introducción**

#### **2.2 Materiales y métodos**

#### **2.3 Resultados**

#### **2.4 Discusión**

## 2.1 Introducción

### 2.1.1 PACAP

Este péptido es un miembro de la súper familia VIP (*vasoactive intestinal peptide*) / secretina / glucagón / GHRH / péptido inhibidor gástrico, y está altamente conservado a través de la evolución (Montero *et al.* 2000; Sherwood *et al.* 2000; Vaudry *et al.* 2000; 2009). En mamíferos, PACAP es un polipéptido con dos formas moleculares (PACAP27 y PACAP38) que originalmente se aisló del hipotálamo ovino basado en su capacidad de estimular la actividad adenilato ciclasa en células de la hipófisis de rata (Miyata *et al.* 1989). La secuencia de PACAP38 en humanos, así como en otros mamíferos, aves, anfibios y peces, tiene un sitio interno de clivaje-amidación (Gly28-Lys29-Arg30), lo que sugiere que el precursor PACAP podría generar también un polipéptido de 27 aminoácidos (PACAP27). Consistente con esta hipótesis, Miyata *et al.* (1990) aislaron del hipotálamo ovino otra fracción capaz de estimular la actividad adenilato ciclasa en células adenohipofisarias que correspondió a la secuencia N-terminal de 27 aminoácidos de PACAP38. Por lo tanto, la estructura de la región biológicamente activa de PACAP, correspondiente a la secuencia de PACAP27, está totalmente conservada durante la evolución, desde peces a mamíferos, lo que sugiere que cumple funciones fisiológicas vitales (Sherwood *et al.* 2000; Vaudry *et al.* 2000, 2009). De hecho, PACAP presenta efectos pleiotrópicos que incluyen vasodilatación, broncodilatación (Delgado 2013), modulación de la motilidad intestinal, aumento de la secreción de insulina e histamina (Olsson y Holmgren 2000, 2001; Li *et al.* 2000; Lindström *et al.* 2001; Asnicar *et al.* 2002; Persson y Ahrén 2002; Persson-Sjögren *et al.* 2006), modulación del sistema inmune (Wang *et al.* 2013), estimulación de la proliferación y la diferenciación celular (Matsumoto *et al.* 2016; Xu *et al.* 2016). A este péptido, además, se lo relacionó con el cáncer (Moody *et al.* 2016), la función gonadal, (Rosati *et al.* 2016), las enfermedades neurodegenerativas (Lamine-Ajili *et al.* 2016; Yang *et al.* 2015) y el control de la ingesta (Vu *et al.* 2015; Kocho-Schellenberg *et al.* 2014; Resch *et al.* 2014) entre otras funciones.

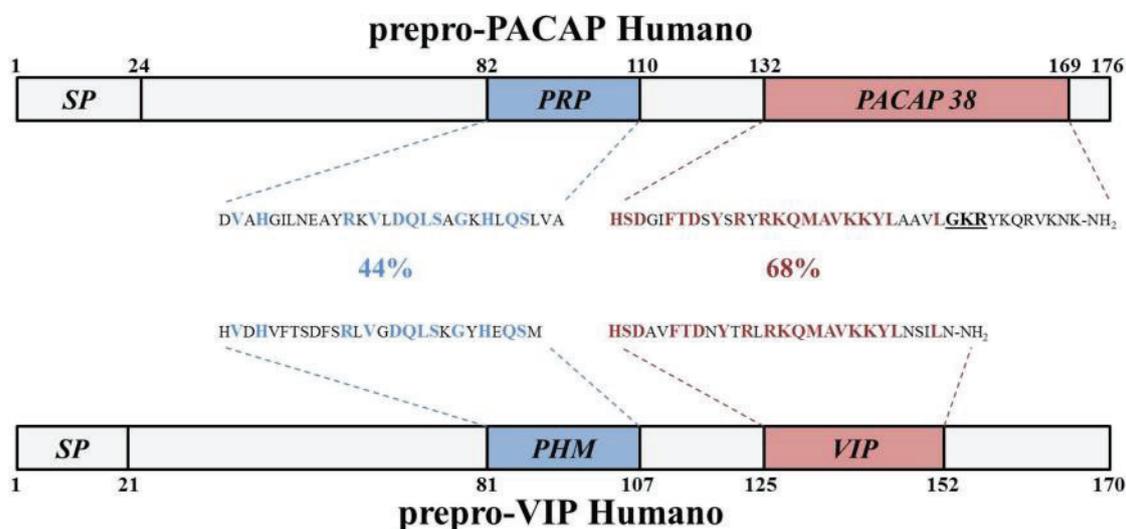
Utilizando resonancia magnética nuclear de dos dimensiones y espectroscopia de dicroísmo circular se demostró que la secuencia N-terminal de 8 aminoácidos de PACAP27 es desordenada. La sigue otra región (9-24 aminoácidos) de 4 dominios diferentes, 9-12 aminoácidos con una conformación plegamiento tipo- $\beta$  y las otras 3 son

diferentes regiones  $\alpha$ -helicoidales (12-14, 15-20 y 22-24) (Inooka *et al.* 1992). La estructura de la región N-terminal de PACAP38 es igual a la de PACAP27. Sin embargo, Wray y colaboradores (1993) no encuentran estructura plegamiento- $\beta$ , sino de  $\alpha$ -hélice en los aminoácidos 9-12. Además, la diferencia entre PACAP 38 y PACAP 27 reside en una corta  $\alpha$ -hélice unida en el segmento C-terminal, en los aminoácidos 29 a 34 (Wray *et al.* 1993). La estructura tridimensional de PACAP tiene una gran similitud con otros miembros de la familia, esto es especialmente cierto cuando se compara PACAP27 con VIP. Se cree que las pequeñas diferencias conformacionales que hay entre ellos contribuyen a la selectividad de los péptidos para sus receptores (Inooka *et al.* 1992; Vaudry *et al.* 2000).

En todas las especies de mamíferos estudiados hasta el momento, la secuencia de PACAP38 se encuentra en el dominio C-terminal del precursor (Figura 2.1). Las secuencias de ADNc de humanos (Ohkubo *et al.* 1992), ovejas (Kimura *et al.* 1990), rata (Ogi *et al.* 1990), y el prepro-PACAP de ratón (Okazaki *et al.* 1995) pusieron de manifiesto la existencia de un péptido de 29 aminoácidos delimitado por residuos básicos en sus extremos N-y C-terminal, situados *upstream* de PACAP38 (Figura 2.1). Este péptido, que exhibe moderada homología estructural con PACAP27, se ha denominado péptido relacionado con PACAP (PRP) (Si *et al.* 2016). En los mamíferos, la organización general del precursor de PACAP exhibe fuertes similitudes con la del precursor de VIP (Figura 2.1). El grado de similitud entre PACAP27 y PRP (22%) o VIP y PHM (37%) es menor que el que existe entre PACAP y VIP (68%) o PRP y PHM (44%), respectivamente. Por lo tanto, se supone que la duplicación intragenómica en tandem de una secuencia ancestral VIP-PACAP se produjo antes de la primera duplicación génica (Vaudry *et al.* 2000).

La estructura primaria de la región 1-27 de PACAP, que es responsable de la actividad biológica del péptido, está totalmente conservada en lagartija, rana, salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), y bagre tailandes (*catfish, Clarias macrocephalus*), mientras que las secuencias de PACAP27 de pollo (*chicken, Gallus domesticus*) y de peces uranoscópidos muestran sólo una sustitución aminoacídica (McRory *et al.* 1997; Matsuda *et al.* 1997b). Por otro lado, la porción C-terminal de PACAP38, que no es necesaria para la actividad biológica del péptido, es más variable. El hecho de que la presión evolutiva haya actuado enérgicamente para preservar la secuencia bioactiva de PACAP indica que el péptido debe ejercer importantes funciones fisiológicas. En apoyo

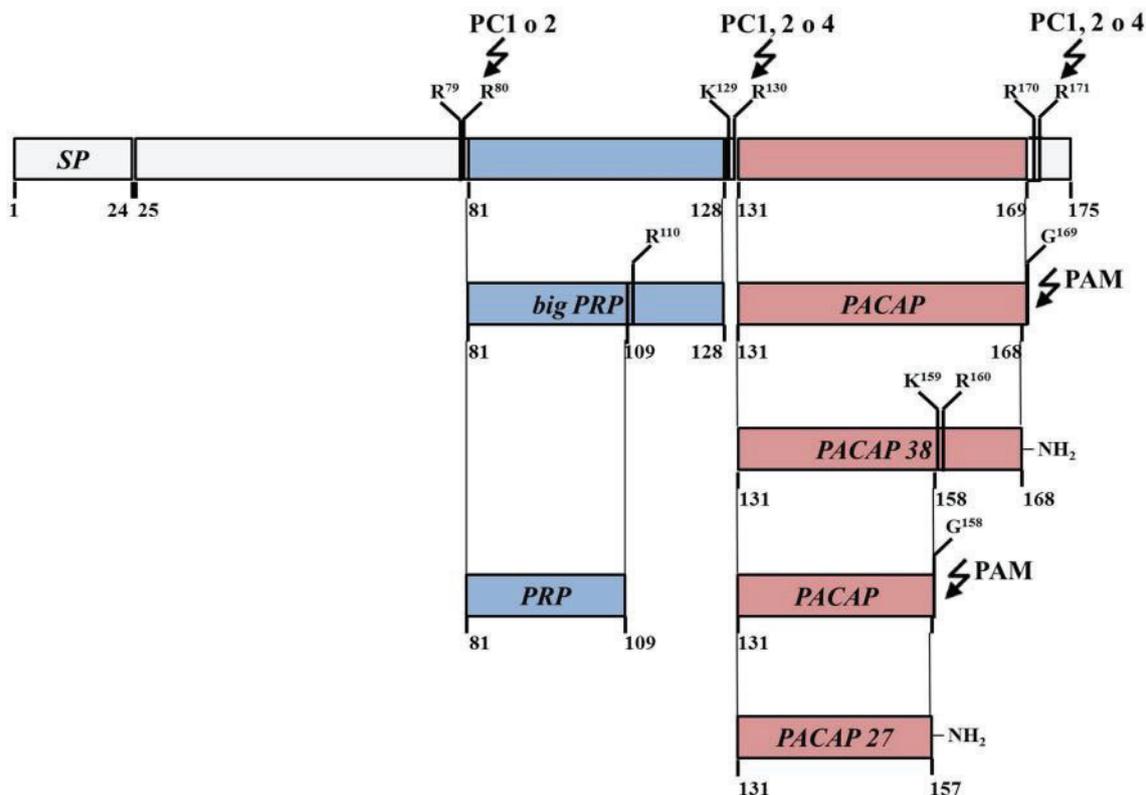
de esta idea, un péptido similar a PACAP fue identificado en el insecto *Drosophila melanogaster* (Feany y Quinn 1995), y se ha encontrado que este péptido modula las conductancias iónicas en la unión neuromuscular (Vaudry *et al.* 2000).



**Fig. 2.1:** Representación esquemática de los precursores humanos de PRP-PACAP y de PHM-VIP. Se presenta la organización general de los dos precursores y las secuencias de PRP y PHM, así como de PACAP y VIP fueron alineadas. Los aminoácidos conservados se indican en negro, y se indica el porcentaje de identidad de aminoácidos entre PRP y PHM, así como de PACAP27 y VIP. **SP:** *signal peptide*. Figura tomada de Vaudry *et al.* 2000.

En los mamíferos, la estructura primaria del precursor de PACAP revela la existencia de siete aminoácidos mono o dibásicos que pueden ser escindidos por diversas enzimas con actividad de prohormonas convertasas (PCs), incluyendo PC1, PC2, PC4, PC5, PC7, furina, y PACE4 (Seidah *et al.* 1994, 1998; Seidah y Chrétien 1999). En ratas, la escisión en tres sitios dibásicos, Arg79-Arg80, Lys129-Arg130, y Arg170-Arg171, genera un gran precursor intermedio de PRP (PRP *big*) y una forma extendida con glicina de PACAP38 (Figura 2.2). La escisión en la Arg110, seguida por la hidrólisis de este residuo Arg C-terminal por carboxipeptidasas E, H, o M, genera PRP. El aminoácido Gly169  $\alpha$ -amidado es usado para la amidación del aminoácido Lys168 en el extremo C-terminal de PACAP38, reacción catalizada por una peptidil glicina monooxigenasa (Eipper *et al.* 1992). Finalmente, el tripéptido Gly158-Lys159-Arg160 puede ser escindido para generar la isoforma PACAP27  $\alpha$ -amidada (Figura 2.2) (Vaudry *et al.* 2009).

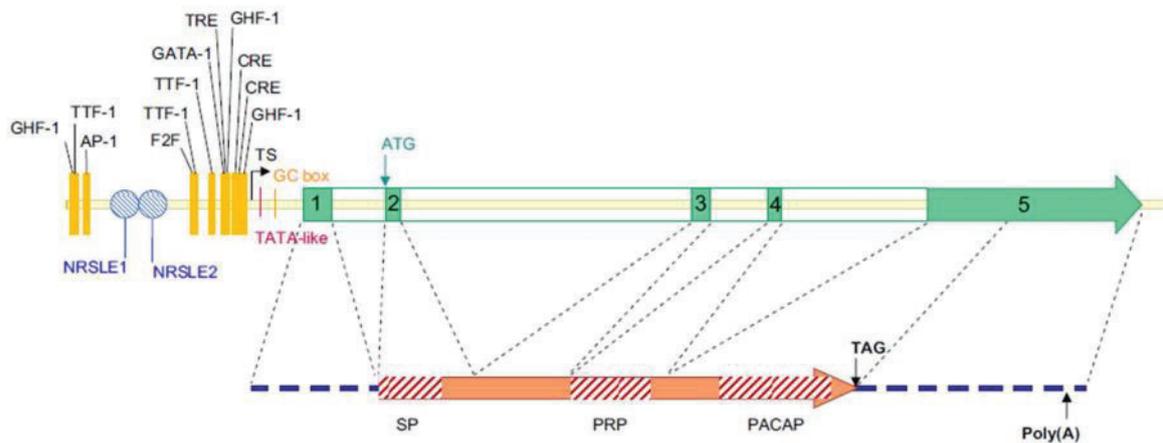
El gen *pacap* humano se compone de cinco exones, la secuencia de *prp* está codificada por el exón 4 y la de *pacap* por el exón 5 (Figura 2.3).



**Fig. 2.2:** Representación esquemática del procesamiento post-traduccional del precursor de PACAP de rata. Se especifica la naturaleza y la asignación de cada sitio de clivaje y amidación. **PAM:** *peptidyl glycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase*. **PC 1, 2 o 4:** prohormona convertasa. **SP:** *signal peptide*. Figura tomada de Vaudry *et al.* 2009.

La secuencia del promotor del gen *pacap* (aproximadamente 400 pb) comprende dos regiones, denominadas P1 y P2, que corresponden, respectivamente, a una secuencia de tipo iniciadora y un dominio rico en CT con cajas GC (Jankowski y Dixon 1987; Ohkubo *et al.* 1994). Sorprendentemente, la región promotora del gen *pacap* humano no parece tener caja TATA o CAAT, que normalmente son requeridos para la iniciación precisa de la transcripción. En contraste, el promotor *pacap* posee dos elementos respuesta a AMPc, un elemento de respuesta a 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato y un par de secuencias homólogas a la secuencia consenso para factores específicos hipofisarios vinculados a sitios del factor 1 de la hormona de crecimiento (Pit-1), que se sabe que juegan un papel en la expresión de *gh* (Bodner *et al.* 1988; Dolle *et al.* 1990; Castrillo *et al.* 1991). Investigaciones sobre la actividad del promotor en células de neuroblastoma humano (IMR-32) y cultivos celulares de ratas (PC12) revelaron que *pacap* se expresa constitutivamente y que la transcripción del gen *pacap* puede ser aumentada por AMPc, 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato, e incluso por

PACAP (Suzuki *et al.* 1994; Hashimoto *et al.* 2000). En los seres humanos, el gen *pacap* se ha localizado en la región P11 del cromosoma 18. Esta región está asociada con holoprosencefalia, el más común defecto de desarrollo hereditario del prosencéfalo en los seres humanos, lo que sugiere que PACAP podría estar implicado en el control del desarrollo del cerebro (Golden 1998; Vaudry *et al.* 2000).

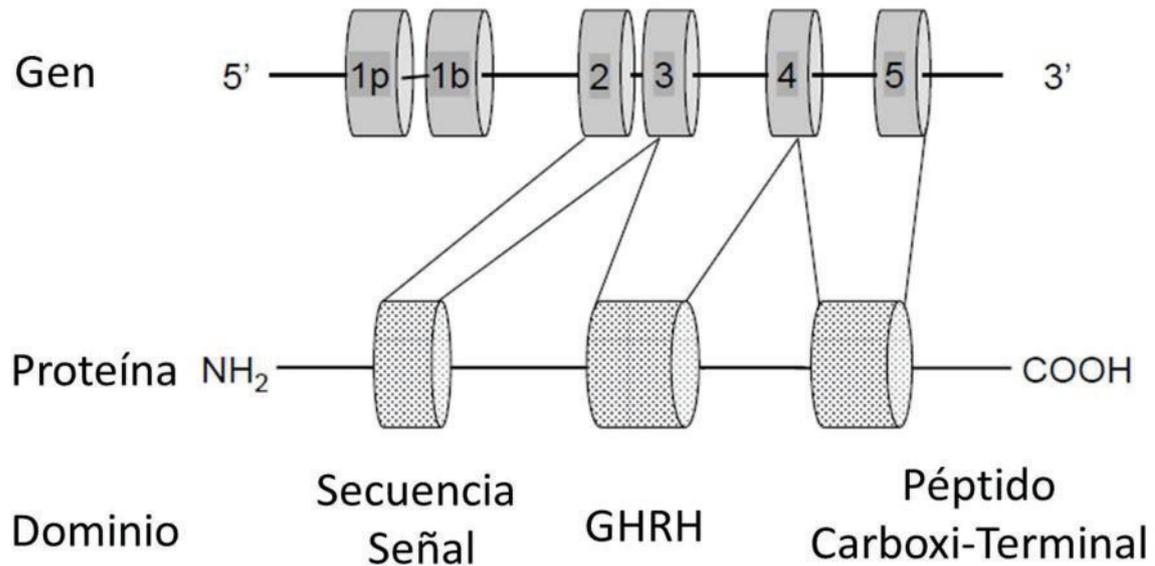


**Fig. 2.3:** Organización del gen humano de *pacap* y el ARNm de *pacap*. Los cinco exones están en las cajas verdes numeradas. Las regiones no traducidas de los exones 1 y 5 se indican con líneas punteadas azules. Los exones que codifican *sp*, *prp* y *pacap* son representados por cajas con líneas diagonales rojas. Se indican en el gen las ubicaciones de los sitios potenciales de unión de factores de transcripción y de poliadenilación. **GHF-1:** *growth hormone factor 1*; **AP-1:** *activator protein-1*; **NRSLE:** *neural-restrictive silencer-like element*; **CRE:** *cAMP response element*; **TRE:** *12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate response element*; **SP:** *signal peptide*; **TS:** *transcription start site*. Figura tomada de Vaudry *et al.* 2009.

## 2.1.2 GHRH

En mamíferos, la existencia de la hormona liberadora de somatotrofina (GHRH) se sugirió por primera vez en 1961 (Reichlin 1961), pero el avance en la identificación de esta hormona fue proporcionado por la demostración de la producción ectópica de GHRH por carcinoides y tumores pancreático (Frohman y Szabo 1981). La forma de 44 aminoácidos de GHRH se aisló y caracterizó por primera vez a partir de tumores pancreáticos humanos que causaban acromegalia (Guillemin *et al.* 1982; Rivier *et al.* 1982) y se identificó posteriormente en hipotálamo de humanos y otros animales (Schally *et al.* 2008). GHRH también pertenece a una familia de péptidos relacionados que incluye a VIP, PACAP, secretina, glucagón, entre otros. Los péptidos de esta familia estimulan la acumulación intracelular de AMPc con la consecuente activación de PKA (Gaylinn 1999; Schally *et al.* 2008). La actividad biológica intrínseca de GHRH es contenida por la secuencia de 29 aminoácidos en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal.

El gen de *ghrh* humano fue localizado en la banda p12 del cromosoma 20 y en ratones en el cromosoma 2. El gen incluye cinco exones que abarcan aproximadamente 10-18 kilobases de ADN genómico (Figura 2.4).



**Fig. 2.4:** Organización del gen humano de *ghrh*. Los cinco exones están en las cajas numeradas de la parte superior de la figura. Figura tomada de Lin-Su y Wajnrajch 2002.

El ADNc de *ghrh* de la placenta y del hipotálamo comparten los exones 2 a 5, pero sus primeros exones son únicos. Los ARNm diferentes en estos dos tejidos se generan por corte y empalme (*splicing*) del exón número 1 específico de cada tejido. Estos ARNm codifican a continuación las proteínas precursoras de GHRH idénticas, lo que sugiere que la diferencia en los promotores tiene como único propósito la regulación de su expresión en distintos tejidos (Muller *et al.* 1999). La proteína precursora de GHRH humana contiene 108 aminoácidos, que se procesa y da el péptido GHRH de 40 o 44 aminoácidos según la especie (Lin-Su y Wajnrajch 2002).

### 2.1.3 PRP

Como ya se mencionó, PRP es codificado en el mismo transcrito que PACAP y el pre-pro-péptido derivado es procesado proteolíticamente, generando los péptidos maduros (Sherwood *et al.* 2000; Vaudry *et al.* 2000). Inicialmente PRP sólo se aisló en especies de mamíferos (Hurley *et al.* 1995; Yamamoto *et al.* 1998; Miyata *et al.* 2000; White *et al.* 2000; Montero *et al.* 2000). En orden cronológico, PRP de peces, anteriormente denominado GHRH o GHRH-like, fue aislado por primera vez en 1992

desde el hipotálamo de la carpa común (*Cyprinus carpio*, Vaughan *et al.* 1992). Tras el paso de los años, el ADNc que codifica PRP y PACAP fue aislado del cerebro de varias especies de peces, tales como salmón rojo (Parker *et al.* 1993), bagre tailandes (McRory *et al.* 1995), salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), salmón real (chinuc o chinook, *Oncorhynchus tshawytscha*), trucha arcoíris, salmón del Atlántico (Parker *et al.* 1997), zebrafish (pez cebra, *Danio rerio*, Fradinger y Sherwood 2000), bagre americano (*Ictalurus punctatus*, Small y Nonneman 2001), esturión blanco (*white sturgeon*, *Acipenser transmontanus*), salmón del Ártico (*Arctic grayling*, *Thymallus arcticus*), corégono (farra o lavareto, *Coregonus clupeaformis*), lenguado de cola amarilla (*yellowtail flounder*, *Pleuronectes ferrugineus*), lenguado del Atlántico (fletán, halibut o pez mantequilla, *Hippoglossus hippoglossus*, Adams *et al.* 2002), mero (*Epinephelus coioides*, Jiang *et al.* 2003), tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*, Chi-Wei *et al.* 2007) y gourami azul (*Trichogaster trichopterus*, Levy *et al.* 2010).

De todos los miembros de la superfamilia de péptidos a la que pertenece, PRP es el único cuya función sigue siendo un enigma (Okazaki *et al.* 1992; McRory *et al.* 1995; Vaudry *et al.* 2000), aunque se sugiere una función de PRP de *goldfish* en la regulación de la reproducción, controlando la expresión de hormonas reproductivas en el cerebro, hipófisis y ovarios (Tam *et al.* 2011).

En la carpa común, PRP tiene 45 aminoácidos de longitud, con los primeros 32 aminoácidos localizados en el exón 4, y los residuos 33-45 en el exón 5. La longitud de PRP se determina por la ubicación de sitios de escisión putativos, así los dos residuos de aminoácidos básicos son frecuentemente sitios de procesamiento proteolítico post-traduccionales de los precursores hormonales. Sin embargo, el péptido PRP está precedido por una arginina sola en el salmón rojo, y una treonina sola en el bagre tailandes y el mero en sus extremos N-terminales. Se sugirió que la escisión en el residuo de treonina es parte de un sitio de procesamiento de 4 aminoácidos. Sin embargo, existe un sitio dibásico tres aminoácidos *upstream* de los sitios de escisión sugeridos, por lo tanto, la autenticidad de los extremos N terminal de PRPs de peces no está clara todavía. A las secuencias de PRP les sigue un sitio de escisión con dos aminoácidos básicos, generando un hidroxilo libre en sus extremos C terminal (Tam *et al.* 2007).

Varias especies de peces tales como *zebrafish*, fugu (*Takifugu rubripes*), pez globo (*Tetradon nigroviridis*), espinoso (*stickelback*, *Gasterosteus aculeatus*) y *goldfish* expresan dos tipos diferentes de precursor cuya diferencia no reside en *pacap*, que es igual para ambos, sino en la parte de la secuencia que codifica para *prp*. Estos dos precursores, tal como se dijo anteriormente (Capítulo 1) son llamados *salmon-like* y *catfish-like* y sus diferencias residen en determinados aminoácidos. Así, ambas formas parálogas del gen habrían surgido como consecuencia de la duplicación genómica específica de teleósteos también llamada 3R. En la actualidad, entre todas las especies de peces mencionadas, sólo en el bagre de canal (*Channel catfish*) se encontró que tiene altos niveles de expresión de *prp-pacap* en grasa y músculo. Sin embargo, el papel de PRP en estos tejidos queda aún por esclarecer (Tam *et al.* 2007).

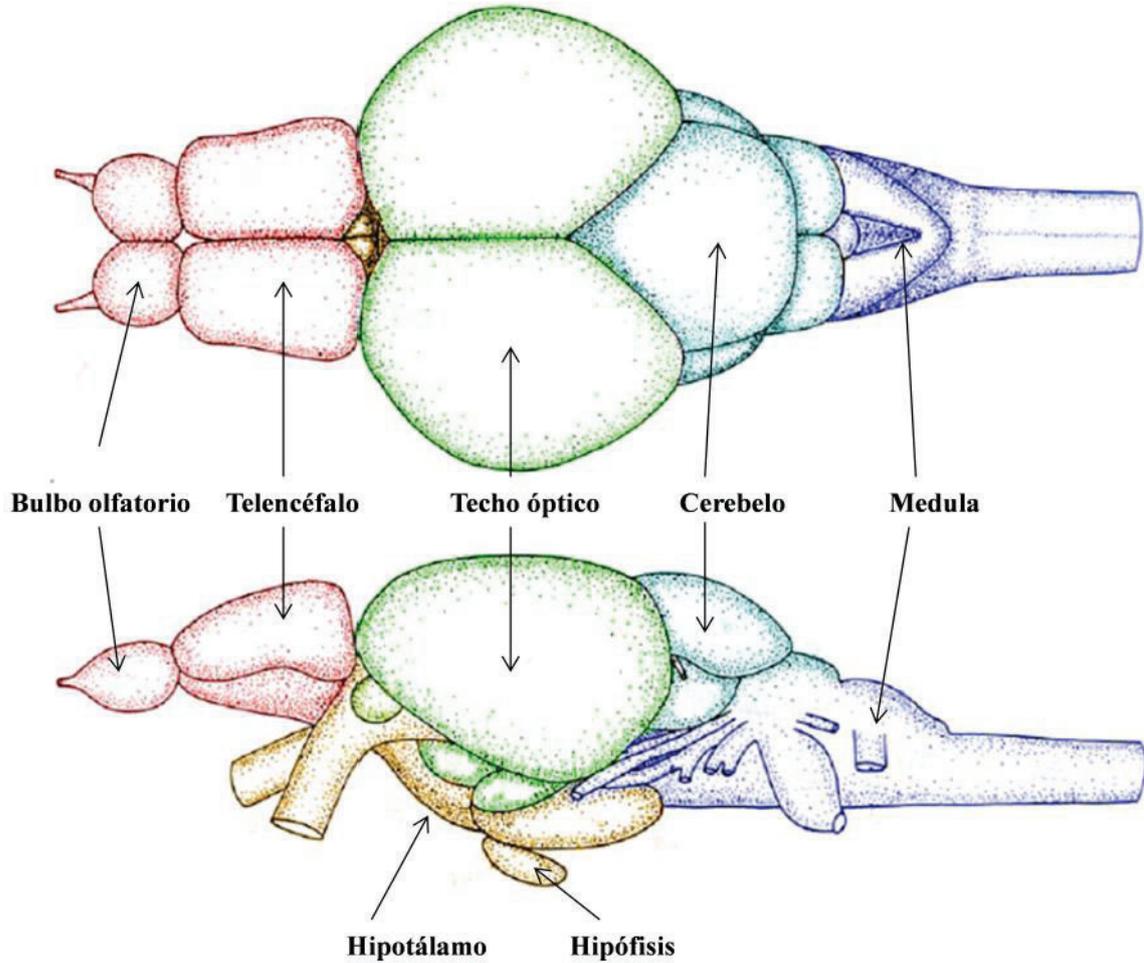
## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Animales y toma de muestras

Los ejemplares de pejerrey utilizados en este trabajo fueron juveniles de aproximadamente 1 año criados en las instalaciones acuícolas del INTECH. Los mismos se seleccionaron de acuerdo a sus tamaños y pesos similares, a partir de un stock de animales mantenidos bajo condiciones naturales de foto-período (8 horas de oscuridad y 16 horas de luz) y temperatura ( $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) según la época del año y como fluctúen los mismos para la latitud donde se encuentran las instalaciones de acuicultura del Instituto ( $35^{\circ}34'13''\text{S}$ ;  $58^{\circ}0'42''\text{O}$ ).

Los peces se capturaron de a uno por vez de los tanques de mantenimiento por medio de redes, se colocaron en recipientes de 20 litros con aireación constante y se anestesiaron con benzocaína 1mg/L en alcohol etílico. Luego se pesaron, midieron y sacrificaron de acuerdo a las normas de manejo de animales de laboratorio (*UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, <http://www.ufaw.org.uk/pubs.htm#Lab>). Los tejidos utilizados para los diferentes experimentos fueron: cerebro completo o diseccionado en áreas cerebrales (Figura 2.5), según el experimento en que se fuera a utilizar, hígado, riñón, gónada, intestino, corazón, músculo, branquia, e hipófisis. Para hacer histología se extrajo el cerebro completo y se procesó como se verá en el capítulo 3, sección 3.2.1, página 71. En cambio, para extraer ARN se colocaron secciones del cerebro u otros tejidos en

*RNAlater (Sigma)* y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento y extracción del ARN total.



**Fig. 2.5:** Esquema del cerebro de pejerrey con sus diferentes áreas, adaptado del atlas de medaka (Ishikawa *et al.* 1999).

### 2.2.2 Aislamiento de ARN total

El ARN total se extrajo con reactivo *TRIzol (Life Technologies)*, para ello se utilizó 1 mL del mismo por cada tejido a procesar (no más de 100 mg), se homogenizaron con un homogenizador eléctrico (*KemaKeur Pro 200*) con cuchillas desmontables y autoclavables las cuales se reemplazaron en cada muestra para evitar contaminación cruzada. Luego, los homogenatos se incubaron a temperatura ambiente durante unos 5 minutos, se les agregó 0,2 mL de cloroformo, se agitaron vigorosamente durante unos 15 segundos y finalmente se incubaron por 3 minutos y se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $12.000 \times g$  por 15 minutos. La fase superior, acuosa (transparente) se colectó en un tubo limpio. En este paso se tomó el cuidado de no colectar contaminaciones de otras

fases para tener una mejor calidad del producto extraído. En la fase acuosa colectada se encuentra el ARN total en solución, el cual se precipitó por el agregado de 0,5 mL de isopropanol, se mezcló y se incubó durante 10 minutos para luego centrifugar a 4°C y 12.000 xg durante 10 minutos. Finalmente se extrajo todo el líquido, tomando sumo cuidado de no arrastrar el precipitado (ARN total) junto con él, ya que al ser casi transparente es difícil verlo. A continuación, se hizo un lavado del precipitado con etanol al 75%, se centrifugó a 4°C y 7.500 xg por 5 minutos y se descartó todo el sobrenadante con sumo cuidado de no perder el precipitado, ya que se desprende con mucha facilidad en este paso. Los tubos se dejaron boca abajo y destapados sobre una servilleta de papel para que se sequen completamente durante unos 10 minutos. En este paso tampoco se excedió mucho el tiempo dado que, si el precipitado se seca en exceso, se dificulta su posterior disolución. Los pellets se disolvieron en 20 µl de agua milli Q libre de RNAsas. Luego se midió la cantidad de ARN total por espectrofotometría y se analizó la integridad del mismo en un gel 1% agarosa-formaldehído desnaturalizante. El ARN total de las muestras se guardó a -80°C hasta su posterior utilización.

### **2.2.3 Preparación del ADN copia (ADNc)**

Las muestras de ARN total de cerebro anterior se retrotranscribieron utilizando el *kit* comercial *SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech)* para obtener los 5'-*RACE-Ready cDNA* y 3'-*RACE-Ready cDNA*. Ambas reacciones se realizaron en paralelo, en un tubo se preparó el 5'-*RACE-Ready cDNA*, en el cual se agregó 1 µg de ARN total, 1 µl de 5'-*RACE CDS primer A* (Apéndice-Tabla A.2) y 1 µl de *SMART II A Oligonucleotide*. Mientras que en otro tubo se preparó el 3'-*RACE-Ready cDNA*, en el cual se agregó 1 µg de ARN total y 1 µl de 3'-*RACE CDS primer A* (Apéndice-Tabla A.2). A ambas reacciones se les agregó agua estéril hasta completar los 5 µl, se agitaron y se colectaron por centrifugación rápida para luego incubarlas por 2 minutos a 70°C con el fin de eliminar las estructuras secundarias en el ARN y los *primers*. Luego se colocaron en hielo y se colectó todo el volumen por centrifugación. A continuación, se les agregó a cada una 2 µl de *5X First-Strand Buffer*, 1 µl de *DTT* (20 mM), 1 µl de *dNTP Mix* (10 mM) y 1 µl de *PowerScript Reverse Transcriptase*, se mezcló suavemente con la pipeta, se los centrifugó brevemente y se incubaron por 1 hora y 30 minutos a 42°C para sintetizar la copia de ADN (ADNc). Finalmente se diluyeron con 100 µl de *Buffer TE* (ver Apéndice-Tabla A.1) y se incubaron por 7 minutos a 72°C para

inactivar la enzima. Los tubos de reacción se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

#### **2.2.4 Obtención de las secuencias específicas de pejerrey por PCR**

Los oligonucleótidos consenso y específicos utilizados para amplificar por PCR los distintos fragmentos de los genes de interés están resumidos en el Apéndice-Tabla A.2. Los oligonucleótidos consenso se diseñaron en base a las secuencias nucleotídicas de las regiones altamente conservadas de diferentes especies de peces conocidas hasta el momento. En aquellos casos que se verifican posibles variaciones en algún nucleótido se tomó la secuencia de medaka (*Oryzias latipes*), otro Atherinimorphae como pejerrey, por ser filogenéticamente más cercanos (Betancur *et al.* 2017). Con estos oligonucleótidos se clonaron fragmentos parciales de las secuencias de *prp-pacap* y *ghrh*. Las secuencias obtenidas en pejerrey se analizaron por programas de alineamiento múltiple comparándolas con secuencias ya conocidas en otras especies (*Genbank*) para confirmar que correspondieran a los genes buscados. En base a estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos tanto directos (*forward*) como reversos (*reverse*) (ver Apéndice-Tabla A.2) con los que se clonaron los extremos 5' y 3' de las secuencias de cada uno de los genes.

Para amplificar y clonar los fragmentos se realizó PCRs en un volumen final de 15 µl conteniendo: 1,5 µl de *buffer* de reacción 10X, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1,2 µl de *dNTPmix* 10 mM, 0,3 µl de cada oligonucleótido 10 µM, 0,1 µl de *GoTaq DNA polimerasa* (*Promega*) y 1 µl de ADNc de cerebro anterior, ya sea *5'-RACE-Ready cDNA* o *3'- RACE-Ready cDNA*, según la reacción, en una dilución 1:100. Después de desnaturalizar al ADNc durante 2 minutos a 94°C, se realizaron 40 ciclos de amplificación que incluían las siguientes condiciones: 94°C por 20 segundos, 55-60°C (según el par de oligonucleótidos utilizado) por 20 segundos y 72°C por 30 segundos. Luego del último ciclo se efectuó un paso de elongación final a 72°C por 2 minutos.

#### **2.2.5 Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa**

Se hicieron en geles de agarosa al 1% conteniendo 0,5 mg/mL de bromuro de etidio. El *buffer* utilizado fue *TAE* (Apéndice-Tabla A.1). Las corridas electroforéticas

se realizaron a 5-10 V/cm y a temperatura ambiente. Los geles se fotografiaron en un transiluminador (*Fotodyne Incorporated*).

Los fragmentos separados se cortaron y se extrajeron del gel utilizando el *kit* comercial *QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN)* según se describe a continuación:

Se extrajo la banda de ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio y afilado. Se pesó el gel en un tubo incoloro y se agregó buffer QX1 según el tamaño del fragmento de ADN: 6 volúmenes para <100 pb; 3 volúmenes para 100 bp - 4 kb; 3 volúmenes con 2 volúmenes de agua para >4 kb. Se resuspendió el QIAEX II con el vórtex durante 30 segundos, se agregó a la muestra y se mezcló (usando 10 µl de QIAEX II para ≤2 µg de ADN; 30 µl para 2–10 µg de ADN; y 30 µl adicionales por cada 10 µg de ADN adicional). Luego se incubó a 50°C durante 10 minutos para solubilizar la agarosa y unir el ADN. Se mezcló con vórtex cada 2 minutos para mantener el QIAEX II en suspensión. La incubación se continuó durante al menos 5 minutos. Luego se centrifugó la muestra durante 30 segundos y retiró cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. Se lavó el precipitado con 500 µl de buffer QX1. Luego, se resuspendió el precipitado mediante agitación con vórtex y se centrifugó la muestra durante 30 segundos para eliminar todas las trazas de sobrenadante con una pipeta y así eliminar los contaminantes residuales de agarosa. El precipitado se lavó dos veces con 500 µl de buffer PE y se resuspendió mediante agitación con vórtex, después se centrifugó la muestra durante 30 segundos y se eliminaron cuidadosamente todos los restos de sobrenadante con una pipeta para eliminar los contaminantes residuales de las sales. Finalmente, el precipitado se secó al aire durante 10–15 minutos o hasta que se tornó blanco. Para eluir el ADN se agregó 20 µl de agua y se volvió a resuspender el sedimento mediante agitación con vórtex. Se incubó de acuerdo con el tamaño del fragmento ADN: durante 5 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C) para ≤4 kb; 5 minutos a 50 °C para 4 a 10 kb; o 10 minutos a 50°C para >10 kb. Finalmente se centrifugó durante 30 segundos y se pipeteó cuidadosamente el sobrenadante en un tubo limpio para obtener el ADN purificado.

### **2.2.6 Clonado de los productos de PCR**

Para amplificar y secuenciar los fragmentos obtenidos, los productos de PCR se insertaron en un plásmido comercial (*pGEM®-T Easy Vector*, Promega). Brevemente, la reacción de ligación se realizó combinando 5 µl de *Rapid Ligation Buffer*, *T4 DNA*

*ligase* 2X (o 1 µl del mismo en concentración 10X), 1 µl de *pGEM®-T Easy Vector* (50 ng), 1 µl de *T<sub>4</sub> DNA Ligase* (Promega), los microlitros necesarios de producto de PCR (50 ng aproximadamente) y agua ultra pura para completar un volumen final de 10 µl. Se mezcló suavemente con una pipeta y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en heladera.

### **2.2.7 Preparación de Bacterias *E. coli* (XL1Blue) competentes**

Se inocularon 3 mL de medio LB (Apéndice-Tabla A.1) conteniendo 5 µg/mL de tetraciclina con bacterias *stock* congeladas y se cultivó toda la noche a 37°C con una agitación moderada. Se diluyó 1/100 el cultivo con medio LB conteniendo 5 µg/mL de tetraciclina en un erlenmeyer de 500 mL y se crecieron a 37°C con agitación hasta llegar a un OD<sub>600</sub> de 0,35-0,4. Se transfirieron las células a tubos Falcon de 50 mL y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Después se centrifugaron a 2.700 xg durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células muy suavemente con 20 mL de solución *FSB* fría. Se centrifugó nuevamente a 2.700 xg por 10 minutos a 4°C y se resuspendió suavemente con 4 mL de solución *FSB* fría. Luego se fraccionó un volumen de 0,1 mL en tubos estériles que se congelaron rápidamente por inmersión en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

### **2.2.8 Transformación**

Se descongelaron las bacterias *E. coli* (XL1Blue) competentes (0,1 mL) fueron descongeladas en hielo y se les agregó 5 µl el producto de ligación, manteniéndose durante 30 minutos en hielo y luego incubándose 1 minuto a 42°C y 1 minuto en hielo para facilitar el ingreso de los plásmidos en las células. Finalmente se agregó medio de cultivo LB hasta llegar a 1 mL y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación.

Se tomaron 100 µl y se sembraron en placas de Petri conteniendo 15 mL de LB-agar (Apéndice-Tabla A.1), 100 µg/mL de Ampicilina, 24 mg/mL de IPTG y 20 mg/mL de X-Gal. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y se seleccionaron las colonias blancas, las cuales se cultivaron en 3 mL de medio LB conteniendo 100 mg/mL de Ampicilina durante toda la noche a 37°C.

### **2.2.9 Extracción del ADN plasmídico**

El ADN plasmídico se extrajo de las bacterias utilizando el método de lisis alcalina. Brevemente, los cultivos de bacterias transformadas se centrifugaron 2 minutos a 13.000 rpm. El precipitado bacteriano se resuspendió en 250 µl de *buffer* de resuspensión (*Buffer R*) (Apéndice-Tabla A.1) al que se le agregó 250 µl de *buffer* de lisis (*Buffer L*) (Apéndice-Tabla A.1) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 350 µl de *buffer* de neutralización (*Buffer N*) (Apéndice-Tabla A.1) y se centrifugó 15 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante (aproximadamente 800 µl) se trasvasó a otro tubo, se agregaron 400 µl de cloroformo y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. La fase acuosa, conteniendo el ADN plasmídico, se pasó a otro tubo y se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol. Luego de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó 15 minutos a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 25 µl de agua destilada estéril. Luego se cuantificó la concentración de ADN tomando 1 µl diluyéndolo 1/50 con 49 µl de agua y se midió la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro (*Eppendorf Biophotometer*). Además, se corroboró la presencia del inserto esperado por medio de una restricción enzimática, como se explica en la sección siguiente y se realizó una electroforesis como se explicó anteriormente en el punto 2.2.6.

### **2.2.10 Digestiones con enzimas de restricción**

Para las digestiones con enzimas de restricción de los plásmidos se utilizó la enzima EcoR I (*Invitrogen*), la cual corta el plásmido en el sitio de clonado múltiple a ambos lados de la posición del inserto, escindiendo así el inserto completo del plásmido. La reacción se realizó en las siguientes condiciones: 0,5 µl de enzima de restricción, 1 µl de *Buffer REact 10X* (*Invitrogen*), 3 µl de plásmido y se completó con agua ultra pura hasta un volumen final de 10 µl. Se incubó por 2 horas a 37°C y se separaron los fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los clones que dieron bandas del tamaño esperado fueron enviados a secuenciar por el método de capilaridad utilizando oligonucleótidos con las secuencias de los promotores de las ARN polimerasas (T3, T7 o SP6) incluidos en el plásmido como iniciadores.

### **2.2.11 Análisis filogenético y cálculo de los porcentajes de identidad**

Con las secuencias completas de los genes de *prp-pacap* y *ghrh* obtenidas, se realizó un análisis filogenético por el método de *Neighbor Joining* y se observó las distancias evolutivas de dichas secuencias comparadas con otras ya conocidas, tomadas de la base de datos del “*Genbank*”, utilizando el programa *MEGA5*. Las secuencias utilizadas, cuyos números de acceso se encuentran en el Apéndice, son mayoritariamente de peces y también de un grupo de tetrápodos en los que se incluyó a los humanos, ratón, rana y aves. Como representante de un grupo externo (*out group*) se utilizó la secuencia humana de glucagón, un péptido también miembro de la familia de *prp-pacap* y *ghrh*. Los porcentajes de identidad se realizaron con el *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW* del programa *DNASTAR*, utilizado para realizar alineamientos de múltiples secuencias.

### **2.2.12 Determinación de la expresión de *prp-pacap* y *ghrh* en áreas cerebrales y tejidos periféricos**

Se retrotranscribió 1 µg del ARN total de hipófisis, bulbo olfatorio, telencéfalo, hipotálamo, cerebelo, medula, hígado, riñón, gónada, intestino, corazón, músculo y branquia a ADNc utilizando la enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen, Life Technologies*) y un oligo (dT)12-18 según las instrucciones de uso.

Las amplificaciones se realizaron por *PCR* se realizaron en un volumen final de 15 µl de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.4. El volumen total de los productos de *PCR* se separó en una electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y las bandas obtenidas se compararon con los marcadores de peso molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder; Invitrogen*) para estimar los respectivos tamaños de las bandas.

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Aislamiento, identificación y análisis filogenético de *prp-pacap***

Se aisló y caracterizó una molécula de ADNc que codifica para el precursor de *prp-pacap* en el pejerrey bonaerense, la cual presenta una extensión de 971 pares de bases (pb), sin considerar la cola de poliadenina (Figura 2.6). La secuencia de nucleótidos obtenida muestra el codón de inicio de la traducción (ATG) en la posición 289, consecuentemente el precursor de *prp-pacap* en el pejerrey comprende una región

5' UTR de 288 pb, un marco abierto de lectura de 528 pb que codifica para 175 aa incluyendo el péptido señal (24 aa), los péptidos PRP y PACAP propiamente dicho, y una región 3'UTR de 155 pb que contiene la correspondiente señal de poliadenilación (Figura 2.6). PRP, de 45 aminoácidos de longitud, está entre dos sitios de clivaje, uno monobásico (R<sup>83</sup>) y uno dibásico (K<sup>129</sup>-R<sup>130</sup>). Mientras que PACAP puede procesarse como un péptido de 38 residuos utilizando el sitio de clivaje dibásico R<sup>170</sup>-R<sup>171</sup>, o clivarse en las posiciones R<sup>159</sup>-R<sup>160</sup>, generando un péptido más corto de 27 aminoácidos de longitud. Los residuos de glicina en las posiciones 169 y 158 serían los donantes del grupo amida de PACAP-38 y PACAP-27 respectivamente. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente al precursor PRP-PACAP del pejerrey fue depositada en el banco de datos (*NCBI/GenBank*) con el siguiente número de acceso JN228384.

Con las secuencias se realizó un análisis por alineamiento con genes ortólogos de diferentes especies depositadas en el *NCBI GenBank*. Todos los ORF analizados tienen una longitud que va de los 477 a los 534 pb, así mismo la secuencia peptídica del ORF de pejerrey tiene 175 aminoácidos, la misma longitud que la mayoría de los demás peces con los que comparte clado (véase Figura 2.7), además se pudo ver que tiene un 91,4% de aminoácidos conservados (160/175), donde la mayor variación se produce en las partes que no comprenden al péptido PACAP, ya que allí los aminoácidos se conservan o tienen un porcentaje de identidad del 96,3% (26/27). Además de estos tres aminoácidos en los que difieren las secuencias de PACAP, en la figura 2.7 se puede ver el sitio de clivaje dibásico (KR) presente en todos los casos, donde se escinde PRP de PACAP. También se pudo ver que la secuencia peptídica de PACAP es idéntica a las de *Astatotilapia burtoni*, *Tetraodon nigroviridis* 2 y *Takifugu rubripes* 2.

```

-288                               acgcggggacaaaagttt
-270 ggagcagcgatatgtagacgagcatacagcgcactttcccgcgca
-225 gtttttgtttgcccccgactggttgggtcatcttaattgtgtt
-180 taaaagtgagataggctgcgctgagaggaacataaggagacgacg
-135 gaggcgcttcagccaggggaagaagtgccgcgagaaagatacggtt
-90  tctctctcacatacacacacacgcacagcaccacagccgcgcccc
-45  gatcacgtcctacagcacagcgctcttctctgcttccctgctatac

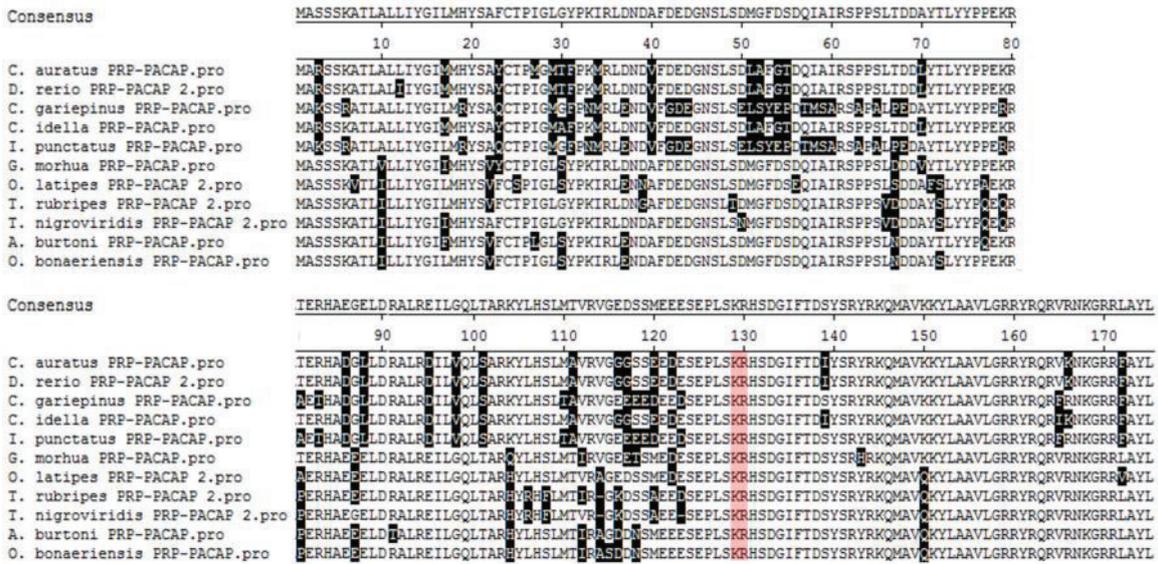
1  atggccagttcgagtaaagcgactttaatcttgctcatctacgga
1  M A S S S K A T L I L L I Y G
46  atcttaatgcactacagcgtcttctgacacctatcggactaagt
16  I L M H Y S V F C T P I G L S
91  taccctaagatcagacttgaaaaacgacgccttcgatgaggatggg
31  Y P K I R L E N D A F D E D G
136 aattctctgtccgacatgggttttgatagcgaccagattgctata
46  N S L S D M G F D S D Q I A I
181 cgaagccccccatcactgaacgacgacgcgtactctctgtactac
61  R S P P S L N D D A Y S L Y Y
226 ccaccagagaagagtccagaaaggcattgctgaggaagaattagat
76  P P E K S P E R H A E E E L D
271 agagccttgaggggatcctgggtcagttaacagcgcgagacattat
91  R A L R E I L G Q L T A R H Y
316 ctacattctctgatgactattcgtgcaggtgacgacaacagcatg
106 L H S L M T I R A G D D N S M
361 gaggaagagtcagagcccttatccaaaagacattcagatgggatc
121 E E E S E P L S K R H S D G I
406 ttcactgacagctacagccgctatagaaagcagatggccgtgcag
136 F T D S Y S R Y R K Q M A V Q
451 aaatacctggcagcggttctgggtagaaggtacagacagagagtt
151 K Y L A A V L G R R Y R Q R V
496 aggaacaaaggacgccgacttgccattttgtag
166 R N K G R R L A Y L *

529 cgttgttaaagcgcccaaactgccgtcctgtgtatatacatccag
574 tcgttaaatacaaagtcattcagatataatctgaccaaccagtggtg
619 tgcgcctgtgttctttcaacatgtatttatgtatgaagtaaagcc
664 atataaatgaatattttaat

```

**Fig. 2.6:** Secuencia completa del precursor de *prp-pacap*. Dentro del marco abierto de lectura se puede identificar subrayado y en negrita el péptido señal de 24 aminoácidos, en azul PRP de 45 aminoácidos, en rojo PACAP de 27 aminoácidos, en verde la secuencia de 105 nucleótidos que se escinde por *splicing* alternativo y en el 3'UTR, en celeste, los 6 nucleótidos correspondientes a la señal de poliadenilación.

Los porcentajes de identidad (Tabla 2.1) de las secuencias de aminoácidos del precursor y de nucleótidos del ORF de pejerrey, comparados con las de un grupo de especies de peces y la de humano, permitieron ver una mayor identidad del pejerrey con las especies *Takifugu rubripes* y *Epinephelus coloides*. Los porcentajes de identidad fueron menores en el caso de las otras especies de peces y menor aun el valor para el humano.

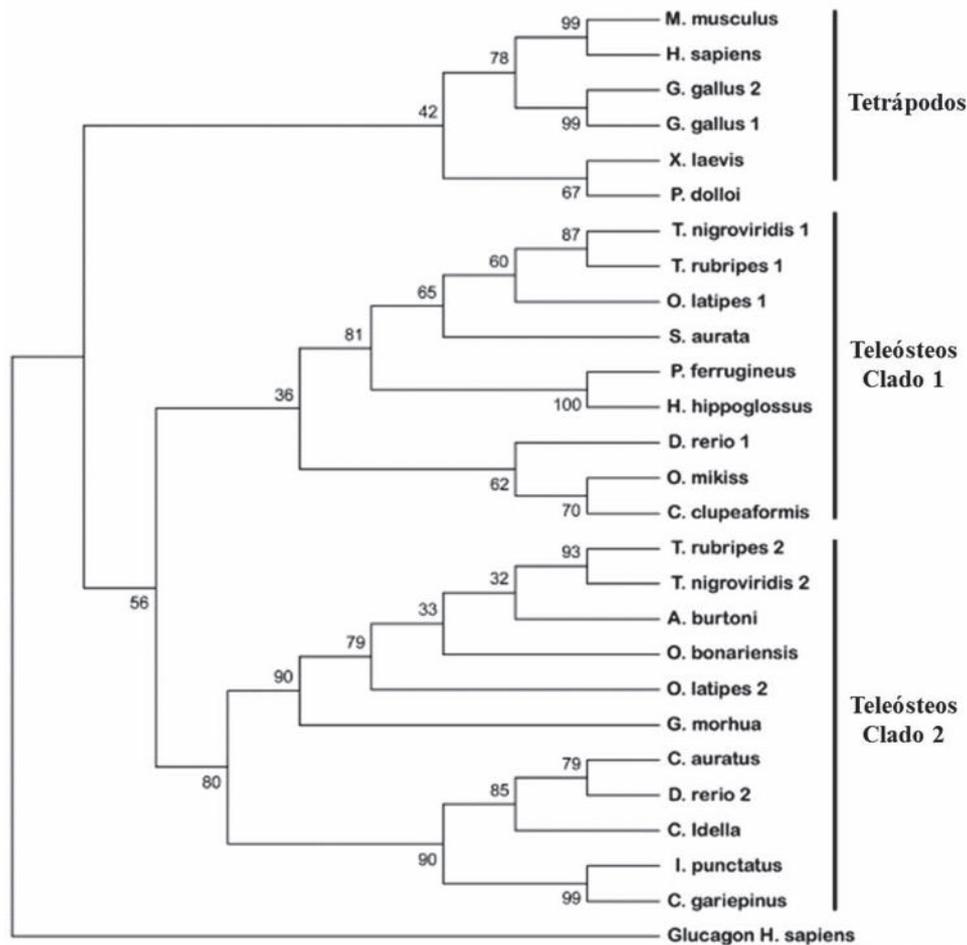


**Fig. 2.7:** Alineamiento de PRP-PACAP de las especies de peces con los que comparte clado en el árbol filogenético (Figura 2.8). Los primeros 45 aminoácidos pertenecen a PRP y los últimos 27 aminoácidos a PACAP. En medio de dichas secuencias está el sitio de clivaje dibásico (recuadro rosa). La flecha roja indica el único aminoácido que no se conserva en la secuencia de pejerrey respecto a la secuencia consenso.

**Tabla 2.1:** Porcentajes de identidad de los ORF de PRP-PACAP.

	<i>Takifugu rubripes</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Carassius auratus</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Homo sapiens</i>
PACAP Aminoácidos	90.2	80.3	60.7	76.9	63	72.8	61.8	52
PACAP ADNc	89.2	94	70.7	77.1	66.7	77.5	70.3	61.1

Por último, el análisis filogenético (Figura 2.8) del precursor proteico de PRP-PACAP mostró la existencia de dos grandes clados: un grupo de secuencias de tetrápodos, que también incluye la secuencia de un pez pulmonado (*Protopterus dolloi*), y el otro grupo de secuencias aminoacídicas de especies de teleósteos. Además, este último clado, se divide en dos sub-clados: uno que representa los precursores de proteínas que contienen un péptido PRP similar al de salmónes (PRP *salmon-like*, clado 1), y el otro, clado 2, que contiene secuencias del péptido similar al de bagre (PRP *catfish-like*, Tam *et al.* 2007). Este análisis filogenético reveló que la secuencia de *O. bonariensis* se agrupó dentro del clado 2, junto con secuencias de especies pertenecientes a diferentes órdenes como gadiformes (*G. morhua*), beloniformes (*O. latipes*) perciformes (*A. burtoni*) y tetradontiformes, (*T. nigroviridis* y *T. rubripes*), como era esperado, señalando además que la secuencia de *O. bonariensis* pertenece al tipo PRP-*catfish like*.



**Fig. 2.8:** Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud llevado a cabo con la secuencia completa de aminoácidos del marco abierto de lectura (ORF) de PACAP con el programa Mega5 (Tamura *et al.* 2011) considerando 500 iteraciones. El porcentaje de las réplicas (iteraciones) en las cuales los taxones relacionados se agrupan, se muestra junto a las ramificaciones. Se utilizó el precursor de glucagón humano como fuera de grupo (*out-group*). Los números de acceso de las secuencias de PACAP se encuentran en el Apéndice.

### 2.3.2 Procesamiento alternativo

Durante el aislamiento y caracterización de los fragmentos parciales del precursor de *prp-pacap* de pejerrey se hizo evidente la presencia de dos productos de amplificación por PCR que se separaron claramente con electroforesis en gel de agarosa (Figura 2.9). La secuenciación de estos productos dio por resultado secuencias casi idénticas que diferían en la inclusión o no de un fragmento de 105 nucleótidos (Figura 2.6), lo que sugiere que el ARNm del precursor de *prp-pacap* sufriría *splicing* alternativo, similarmente a lo que ocurre en otras especies tales como pollo, salmón rojo, bagre barba negra (*Pelteobagrus vachelli*), bacalao (*Gadus morhua*), peces pulmonados, carpa herbívora, lenguado verde oliva (*halibut* bastardo o el *halibut*

japonés, *Paralichthys olivaceus*) (Parker *et al.* 1993; McRory *et al.* 1995, 1997; Sze *et al.* 2007; Xu y Volkoff 2009; Lee *et al.* 2009; Xu, *et al.* 2012; Nam *et al.* 2013) y *goldfish* (Wong AOL, comunicación personal).



**Fig. 2.9:** Expresión de los transcritos corto (*pacap* de 330 pb) y largo (*prp-pacap* de 435 pb) en tejido cerebral de pejerrey. **MW:** Marcador de peso molecular, **B:** Cerebro.

### 2.3.3 Aislamiento, identificación y análisis filogenético de *ghrh*

También se aisló y caracterizó una molécula de ADNc que codifica para el precursor de *ghrh* del pejerrey bonaerense. Este ADNc tiene 754 pb, sin incluir la cola de poliadenina. La secuencia de nucleótidos obtenida incluye un sitio de inicio de la traducción (ATG), en la posición 150. Así, el precursor de *ghrh* en el pejerrey comprende: 149 pb de la región 5' *UTR*, un marco abierto de lectura de 441 pb que codifica para 146 aa incluyendo el péptido señal (19 aa), el GHRH propiamente dicho (27 aa), flanqueado por dos sitios de clivaje proteolítico, uno monobásico (R<sup>69</sup>) y otro dibásico (K<sup>98</sup>-R<sup>99</sup>), y 164 pb de la región 3' *UTR* con la correspondiente señal de poliadenilación (Figura 2.10). La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que pertenecen al precursor GHRH del pejerrey fue depositada en el banco de datos (*NCBI/GenBank*) con el siguiente número de acceso JN228385.

```

-149                                     gacagtagtctgttcc
-135 agtgtctcttttgtccagtttttctctggcagtgagggacgatgag
-90 agtggaaagcgccgagtaggggacagcagggacactcaaaattc
-45 acataaaaagaaaaaatagtcactcttctccaggactagctgtg
  1 atgatggagaaagctgcgctgctgctgttctgttgctggtcatt
  1 M M E K A A L L L F C C L V I
  46 tctttatcaggctccccactctacccatccattagacattatcac
  16 S L S G S P L Y P S I R H Y H
  91 aggtttggccagagggatacatctatcctgatgacatcttctata
  31 R F G Q R D T S I L M T S S I
  136 aagtatccagcagagaagctggaagaagacacacgtcctccaagg
  46 K Y P A E K L E E D T R P P R
  181 gagcgcagcagaactgcgctcagaacgccacgctgatgccatcttt
  61 E R A E L R S E R H A D A I F
  226 accaacagttacaggaaagtcctgggccaatctctgccaggaag
  76 T N S Y R K V L G Q I S A R K
  271 ttccttcagacaatcatgggaaagcggctgggagatgaaagtgag
  91 F L Q T I M G K R L G D E S E
  316 agctacatgaaacgtcaatcagatatctatgaaggacctttaa
  106 S Y M K R Q S D I Y E G T F K
  361 gaggatccttacatccatccagagggaccagcgatacagagggctg
  121 E D L T S I Q R D Q R Y R G L
  406 catgggaatgtcatgagaccagactgatcagttga
  136 H G N V M R P R L I S *

  442 ggacaaagtgaagactagagcgcctcccttcatgttcattgtagc
  487 ttgttttcatttacttctctcagacatgtagttgtaagtgaaaat
  532 cacaacctgtctttagttccaattattattaaagtctctgctgtg
  577 tattcattggtt attaaaagttgtgaagac

```

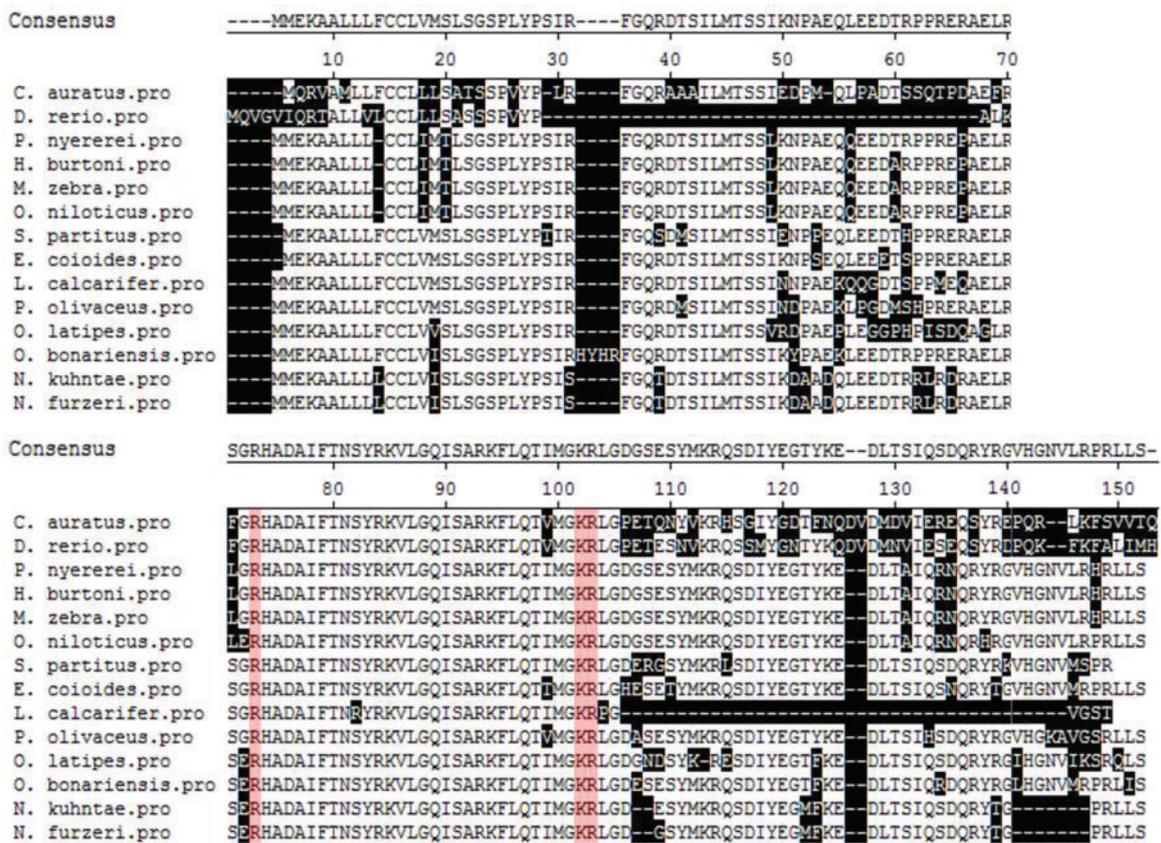
**Fig. 2.10:** Secuencia completa del precursor de *ghrh*. Dentro del marco abierto de lectura se puede identificar subrayado y en negrita el péptido señal de 19 aminoácidos, en rojo GHRH de 27 aminoácidos y en el 3'UTR, en celeste, los 6 nucleótidos correspondientes a la señal de poliadenilación.

La secuencia de aminoácidos que se muestra en la figura 2.10 se comparó por alineamiento con la de otras especies depositadas en el *NCBI GenBank*. Los ORF analizados tienen una longitud que va de los 104 a 146 aminoácidos, y en particular la secuencia peptídica del ORF de pejerrey tiene 146 aminoácidos (Figura 2.11), además se pudo ver que tiene un 91% de aminoácidos conservados (133/146), donde la variación se produce en las partes que no comprenden al péptido GHRH, ya que allí los aminoácidos se conservan en un 100% (27/27). Además, se pueden ver los sitios de clivaje básico (R) y dibásico (KR) presentes en todos los casos, donde se escinde GHRH. El residuo de glicina en la posición 96, presente en todas las secuencias conocidas de otras especies, sería el donante del grupo amida. También se pudo ver que la secuencia peptídica de GHRH de 27 aminoácidos comprendida entre los sitios de clivaje (Figura 2.11) es idéntica a la mayoría de los peces analizados, entre ellos *Oryzias latipes*. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos del *ORF* de pejerrey tienen un mayor porcentaje de identidad con las de *Oryzias latipes* y *Epinephelus coioides*, un

poco menor con las de otros peces y menor aun del humano (Tabla 2.2). Además, se podría decir que GHRH esta tan conservada como PRP-PACAP ya que los porcentajes de identidad que presenta con otras especies de peces son muy similares.

**Tabla 2.2:** Porcentajes de identidad de los ORF de GHRH.

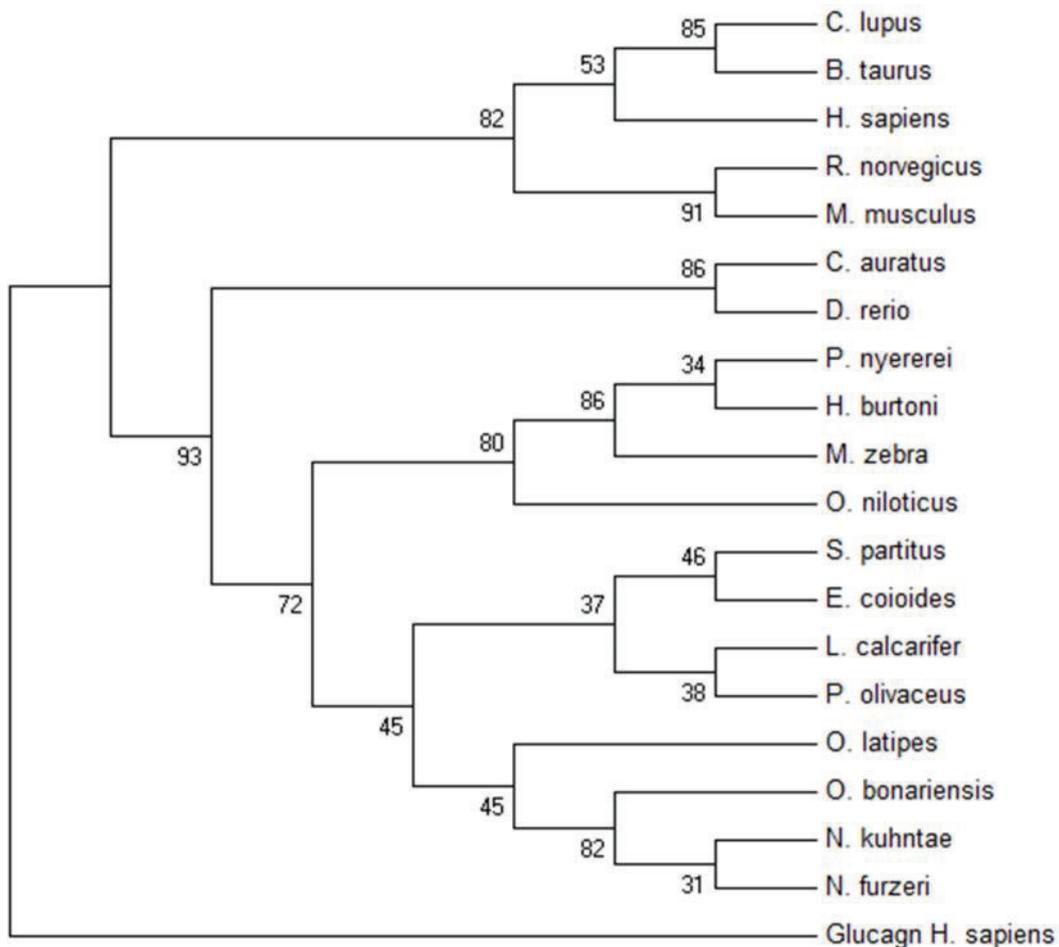
	<i>Epinephelus coioides</i>	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Carassius auratus</i>	<i>Homo sapiens</i>
GHRH Aminoácidos	88.7	82.3	59	57.7	33.3
GHRH ADNc	89.4	81.5	58.9	62.1	48.6



**Fig. 2.11:** Alineamiento de GHRH de las especies de peces incluidas en el árbol filogenético (Figura 2.12). Los 27 aminoácidos de GHRH están entre los sitios de clivaje en recuadros rosa.

El análisis filogenético (Figura 2.12) de la secuencia aminoacídica del ORF de GHRH mostró un clado, formado por las secuencias de peces, con muchas relaciones no bien resueltas, que muestran un bajo porcentaje de iteraciones o Bootstrap. También se pudo ver otro clado, mejor resuelto, correspondiente a las secuencias de tetrápodos. Dentro del clado de peces, la secuencia de pejerrey se agrupa con las de Beloniformes,

Cyprinodontiformes, Perciformes y, con mayor distancia, Cichliformes. En este análisis la secuencia de glucagón humano fue utilizada como representante del grupo externo (*out group*).



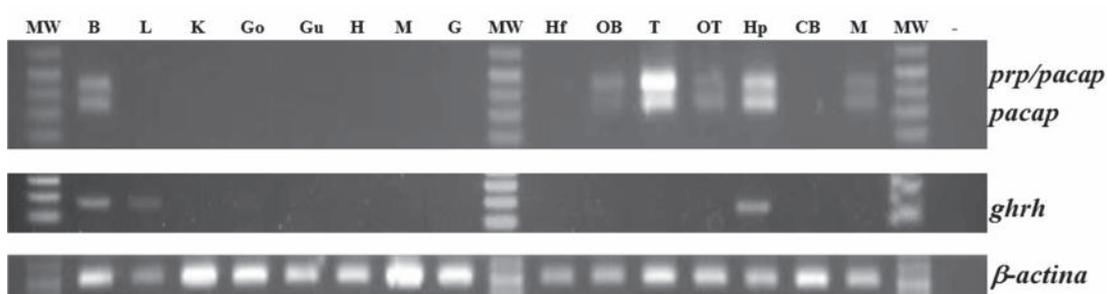
**Fig. 2.12:** Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud llevado a cabo con la secuencia completa de aminoácidos del marco abierto de lectura (ORF) de GHRH con el programa Mega5 (Tamura *et al.* 2011) considerando 500 iteraciones. El porcentaje de las réplicas (iteraciones) en las cuales los taxa relacionados se agrupan se muestra junto a las ramificaciones. Se utilizó el precursor de glucagón humano como representante de grupo externo (*out-group*). Los números de acceso de las secuencias de GHRH se encuentran en el Apéndice.

### 2.3.4 Expresión de *prp-pacap* y *ghrh* en distintos tejidos y áreas cerebrales

Los niveles de expresión de los precursores de *prp-pacap* y *ghrh* se determinaron en forma semicuantitativa utilizando la técnica de PCR a partir de ADNc de distintas áreas cerebrales y diferentes tejidos de pejerrey, utilizando oligonucleótidos específicos para las secuencias de *prp-pacap* y *ghrh* (ver Apéndice Tabla A.2). Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa y se midió la

intensidad de las diferentes bandas. Para estas determinaciones se utilizaron varios ejemplares de peces para tener tanto replicas biológicas como técnicas.

La expresión de las dos formas de transcritos de *pacap* (transcripto corto o *pacap* y transcripto largo o *prp-pacap*) solo se pudieron observar en el cerebro y no en otros tejidos. En una inspección más detallada de las áreas cerebrales se observó expresión de *prp-pacap* en la mayoría de ellas, comprendiendo bulbo olfatorio, telencéfalo, techo óptico, hipotálamo y medula, no así en hipófisis y cerebelo (Figura 2.13). Por otro lado, *ghrh* se expresó con mayor intensidad en el cerebro del pejerrey, pero también se observó, con menor intensidad, en tejidos como hígado y gónadas. En cuanto a la expresión de *ghrh* en el cerebro solo se pudo observar en una sola área, el hipotálamo (Figura 2.13).



**Fig. 2.13:** Expresión de los transcritos corto (*pacap* de 330 pb) y largo (*prp-pacap* de 435 pb), y de *ghrh* en diferentes tejidos y áreas cerebrales de pejerrey. Figura representativa de 5 réplicas. Se utilizó Actina como control positivo. **MW:** Marcador de peso molecular, **B:** Cerebro, **L:** Hígado, **K:** Riñón, **Go:** Gónada, **Gu:** Intestino, **H:** Corazón, **M:** Musculo, **G:** Branquias, **Hf:** Hipófisis, **OB:** Bulbo Olfatorio, **T:** Telencéfalo, **OT:** Techo Óptico, **Hp:** Hipotálamo, **CB:** Cerebelo, **M:** Médula.

## 2.4 Discusión

La secuencia de *prp-pacap* de pejerrey pertenece al clado 2 (Figura 2.8) o clado *catfish-like*. Si bien sería posible que una molécula *salmon-like* también estuviera presente en el pejerrey, como ocurre en el *zebrafish*, en el medaka, y en el pez globo que presentan los dos tipos de secuencias, hasta el momento no se pudo detectar. De este modo, es muy posible que el pejerrey sólo tenga un gen funcional del tipo *catfish-like* como es el caso de muchas especies de teleósteos incluyendo el bagre azul (*Ictalurus furcatus*) y el salmón (Tam *et al.* 2007).

En los precursores de *prp-pacap* de los vertebrados no mamíferos ocurre la formación de un transcripto corto por corte y empalme (*splicing*) alternativo generando la pérdida del exón 4, que codifica parte de PRP (1-32), y dejando la región codificante

de PACAP en el marco de lectura correcto (Parker *et al.* 1993, 1997; Small y Nonneman 2001). Como resultado de esto, la expresión de *pacap* puede ocurrir independientemente de *prp*. Esto proporciona un posible mecanismo de control en el aumento de expresión de *pacap* sin el aumento concomitante de *prp*, siendo una manera de regular la proporción de péptidos de genes que codifican multipéptidos (Adams *et al.* 2002; Tam *et al.* 2007). Este fenómeno se observa en varias especies de peces, incluyendo salmón del Atlántico, del Pacífico, del Ártico y real, bagre americano, mero, trucha arcoíris, esturión blanco, corégono, lenguado de cola amarilla, lenguado del Atlántico, y también en el pavo (*Meleagris gallopavo*). Sin embargo, las transcripciones alternativas no fueron detectados en *zebrafish* ni en *catfish* (Tam *et al.* 2007).

En cuanto a la expresión de *prp-pacap*, se vieron resultados similares a otros trabajos realizados en el salmón rojo (Parker *et al.* 1993), en la carpa herbívora (Sze *et al.* 2007), en el *goldfish* (Tam *et al.* 2011) y en la lamprea del Ártico (*Arctic lamprey*, *Lampetra japónica*, Ng *et al.* 2012). En el bagre tailandes, además del cerebro, también se observó expresión en tejidos como testículos, ovarios y estomago (McRory *et al.* 1995), en el *zebrafish*, en testículos, ovarios, ojos e intestino (Fradinger y Sherwood 2000), en el pez pulmonado, se observó la expresión de los dos transcritos de *pacap* separadamente y se pudo ver una expresión del transcrito largo (*prp-pacap*) en varios tejidos, incluyendo cerebro, intestino, hígado, riñón, testículos y ovarios, entre otros; y la expresión del transcrito corto (*pacap*) se observó solamente en cerebro, pero con mucha más intensidad que el transcrito largo (*prp-pacap*), indicando que PACAP es el producto mayoritario en dicha especie (Lee *et al.* 2009). Teniendo en cuenta los perfiles de expresión en órganos periféricos de varias especies de vertebrados no mamíferos, se sugiere que el gen *prp-pacap* se expresó tempranamente, en términos evolutivos, en el sistema nervioso central, y que las funciones de estos péptidos se fueron modificando y fueron expresados más tardíamente en otros tejidos (Lee *et al.* 2009). En la carpa herbívora (Sze *et al.* 2007) y el bacalao (Xu y Volkoff 2009) también se observó una amplia distribución de la expresión del transcrito largo (*prp-pacap*) en diferentes áreas del cerebro, con datos muy similares a los de pejerrey. La expresión de *ghrh* coincide con los del trabajo publicado por Qian y colaboradores (2012) realizado en mero, donde también vieron expresión en hígado y gónadas además de cerebro y con los datos del *goldfish* donde se observó expresión en cerebro e hígado (Lee *et al.* 2007). Pero si hubo diferencias en la expresión en las áreas cerebrales ya que en la especie de mero también

se vio expresión en telencéfalo, médula oblonga y médula espinal además del hipotálamo (Qian *et al.* 2012).

## **Capítulo 3**

### **Mapeo cerebral de la expresión de *prp-pacap* y *ghrh* por hibridación *in situ***

#### **3.1 Introducción**

#### **3.2 Materiales y métodos**

#### **3.3 Resultados**

#### **3.4 Discusión**

## 3.1 Introducción

### 3.1.1 PACAP

La localización de las neuronas que contienen PACAP en el SNC de los vertebrados no mamíferos, incluyendo aves (Peeters *et al.* 2000), anfibios (Yon *et al.* 1992, 1993; Alexandre *et al.* 2000), y peces (Vaudry *et al.* 2000) tiene un alto grado de similitud respecto a la distribución encontrada en los mamíferos (Arimura *et al.* 1991; Köves *et al.* 1991; Ghatei *et al.* 1993; Palkovits *et al.* 1995).

En ratas, se detectó inmunoreactividad para PACAP tanto en el hipotálamo como en regiones extra hipotalámicas (ver Vaudry *et al.* 2000 y 2009). En el hipotálamo de ratas PACAP se encontró en la región magnocelular del núcleo paraventricular y el núcleo supraóptico (Köves *et al.* 1991, 1994; Kivipelto *et al.* 1992; Kimura *et al.* 1994; Hannibal *et al.* 1995a, b; Piggins *et al.* 1996). Además, se encontró una densa acumulación de fibras inmunorreactivas a PACAP en la zona interna de la eminencia media y en la vecindad de los capilares del sistema portal hipotálamo hipofisario (Köves *et al.* 1990, 1991; Kivipelto *et al.* 1992; Tamada *et al.* 1994; Hannibal *et al.* 1995a, b; Mikkelsen *et al.* 1995). Por otro lado, se encontró inmunoreactividad para PACAP38 en regiones extra hipotalámicas, tales como, la sustancia nigra, el núcleo accumbens, el septum, el globo pálido, la corteza piriforme cerebral y la protuberancia (Ghatei *et al.* 1993; Masuo *et al.* 1993). También, en el sistema límbico, se detectaron fibras inmunorreactivas a PACAP en el complejo amigdalóide y en los núcleos medio dorsal y paraventricular del tálamo (Köves *et al.* 1991; Masuo *et al.* 1993; Takahashi *et al.* 1994; Palkovits *et al.* 1995). Por medio de hibridación *in situ* se reveló la presencia de cuerpos celulares dispersos que expresan ARNm de *pacap* en los núcleos paraventricular y arcuato del hipotálamo, en la corteza tanto cingulada como frontal y en las células de Purkinje del cerebelo (Murase *et al.* 1995; Ghatei *et al.* 1993; Mikkelsen *et al.* 1994; Takahashi *et al.* 1994; Hannibal *et al.* 1995a; Nielsen *et al.* 1998). En el bulbo raquídeo, la inmuno-reactividad a PACAP se encontró en el área comisural y medial del núcleo del tracto solitario, el núcleo dorsal motor del vago, el núcleo ambiguo, la médula ventrolateral, la superficie medular ventral y el núcleo rafe caudal (Legradi *et al.* 1994). En la médula espinal, el ARNm de *pacap* se expresó en una subpoblación de neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (Mulder *et al.* 1994), y se encontraron

numerosas fibras inmunorreactivas a PACAP en la capa superficial de los cuernos dorsales (Moller *et al.* 1993; Dun *et al.* 1996).

El único estudio mostrando la distribución cerebral de *pacap* en aves fue realizado por Peeters y colaboradores en 2000, aplicando hibridación *in situ* en cerebro de pollo. En este trabajo se detectó ARNm de *pacap* en varias áreas del telencéfalo incluyendo el hiperestriado accesorio, el hipocampo y el arquiestriado. En el diencefalo, observaron fuerte expresión en un grupo de neuronas desde el núcleo hipotalámico medial anterior hasta el núcleo hipotalámico inferior y con menor expresión en el núcleo paraventricular y la región preóptica. También se encontró un segundo grupo de neuronas que se extendió del núcleo dorsolateral anterior del tálamo hacia el núcleo ovoidal y el núcleo paramedial interior del tálamo. Además, se observó expresión dentro del núcleo del lecho de la comisura palial, el núcleo espiriforme medial, el techo óptico, la corteza cerebelosa, el bulbo olfatorio y varios núcleos dentro del tronco encefálico como, por ejemplo, en el complejo dorsal vagal y parabraquial y la formación reticular (Peeters *et al.* 2000).

En el cerebro de la *Rana ridibunda* se determinó por hibridación *in situ* que hay altos niveles de expresión en el bulbo olfatorio accesorio, el *pallium* distal, la parte ventral del núcleo preóptico magnocelular, el núcleo hipotalámico ventral, el tubérculo posterior y el núcleo habenular ventral, el techo óptico y varios núcleos mesencefálicos. Sin embargo, no se encontró marca en el cerebelo (Alexandre *et al.* 2000).

En los peces, PACAP tiene una amplia distribución en el cerebro, puntualmente el hipotálamo contiene tanto la población más abundante de neuronas que expresan PACAP como la mayor densidad de sitios de unión para PACAP. En la anguila europea, se encontraron neuronas PACAPérgicas ubicadas principalmente en subdivisiones parvo y magnocelular del núcleo preóptico (Matsuda *et al.* 1997a, b; Montero *et al.* 1998). Así mismo, en el cerebro de *japanese stargazer* (*Uranoscopus japonicus*) encontró PACAP principalmente en el área preóptica del diencefalo y en el hipotálamo ventral, cerebelo y la médula. También se observó un denso plexo de fibras nerviosas en el hipotálamo, en la neurohipófisis y en la región dorsal de la médula (Matsuda *et al.* 2005a). Además, en *zebrafish*, Mathieu y colaboradores, en el año 2004, encontraron PACAP en telencéfalo, diencefalo y cerebelo utilizando un anticuerpo anti PACAP humano. Más recientemente, en el año 2018, el grupo de Nakamachi y colaboradores diseñó un anticuerpo anti PACAP 2 de *zebrafish*, éste PACAP 2 difiere

en algunos aminoácidos en el extremo C-terminal respecto de PACAP 1. Además, PACAP 2 tiene una mayor similitud al PACAP que se encontró en pejerrey, esto se puede ver claramente en el alineamiento de secuencias y el árbol filogenético desarrollados anteriormente (ver Figura 2.6 y 2.7, Capítulo 2). Estos dos péptidos PACAP de *zebrafish* se originan de los genes *adcyap1a* (PACAP 1) y *adcyap1b* (PACAP 2), como resultado de una duplicación del genoma en los peces teleósteos. Tal duplicación se observó en otros peces teleósteos, pero hasta ahora no se informó una distribución diferencial en el cerebro de dos PACAP's. La distribución de PACAP 2 se pudo ver en una amplia zona del cerebro, así se observó inmunoreactividad principalmente en el telencéfalo, hipotálamo y cerebelo, además se observó fibras inmunoreactivas formando una línea hacia la habénula. En cerebros inyectados con colchicina, se observó células inmunoreactivas en las regiones ventral y dorsal del telencéfalo y dentro del diencefalo en el torus lateral, el núcleo difuso del lóbulo inferior, el hipotalámico paraventricular y el núcleo tuberal posterior. Esta distribución de PACAP sugiere su participación en funciones importantes del cerebro en teleósteos, como el aprendizaje y cognición, así como la adaptación instintiva como la alimentación y la regulación emocional (Nakamachi *et al.* 2018).

### 3.1.2 GHRH

En mamíferos, específicamente en ratas las células neurosecretoras que contienen GHRH se originan principalmente en el núcleo arcuato (ARC) y en los márgenes dorsal y ventral del núcleo ventromedial (VM) del hipotálamo (Lechan *et al.* 1984; Daikoku *et al.* 1986). Los axones de estas neuronas productoras de GHRH se proyectan a la eminencia media y terminan en los capilares del sistema porta hipofisario. También en primates, incluidos los humanos, GHRH se distribuye de manera similar al de ratas, con la excepción de que GHRH estaba presente en todo el VM, no solo en la porción dorsal y ventral (Bloch *et al.* 1983). Además de estos dos núcleos, en mamíferos también se encontró GHRH en otros núcleos o áreas hipotalámicas, como la parte dorsal del núcleo dorsomedial, las porciones medial y lateral del núcleo ventromedial, el núcleo paraventricular, el haz del prosencéfalo medial, la zona incerta y la región periférica medial del hipotálamo lateral (Merchenthaler *et al.* 1984; Jacobowitz *et al.* 1983; Fellmann *et al.* 1985; Lin-Su y Wajnrajch 2002). En *Rana temporaria*, se encontraron células positivas para GHRH en

la división magnocelular del núcleo preóptico (PO), con mayor concentración en la parte ventral del mismo, tanto utilizando un anticuerpo anti GHRH de humanos como un monoclonal contra el péptido de rata (Mariovet *et al.* 1988). Ninguna otra área del cerebro de rana mostro marcas positivas para GHRH (Mariovet *et al.* 1988).

En el cerebro del bacalao se encontró una intensa tinción de axones que surgió en la región preóptica del hipotálamo. Estas fibras se acercaron al receso infundibular para ingresar a la hipófisis y se ramificaron en la parte nerviosa. También se observaron algunas fibras en la parte distal proximal de la hipófisis (Pan *et al.* 1985). En la lubina (*Dicentrarchus labrax*) se encontró GHRH en el núcleo preóptico y en el núcleo lateral tuberal. En el núcleo preóptico particularmente en neuronas parvocelulares en la porción rostral y ventral, y en neuronas magnocelulares en las porciones más dorsal y caudal. En el núcleo lateral tuberal se encontró en la parte rostral. También se vio que las fibras nerviosas que expresan GHRH, originarias del hipotálamo, se proyectan a la parte distal rostral y la parte distal proximal de la adenohipófisis, a la neurohipófisis, y a la parte intermedia (Marivoet *et al.* 1988). Mientras que en el molly verde (*Poecilia latipinna*) se observó GHRH en cuerpos celulares de las divisiones parvocelular y magnocelular del núcleo preóptico, generalmente en el tracto preóptico-hipofisario y siempre estaban prominentes en la neurohipófisis, con la mayor concentración en la zona central. No se observó GHRH fuera del diencéfalo (Batten *et al.* 1990). Además, en la trucha arcoíris la mayor expresión de GHRH fue en las neuronas localizadas en el núcleo lateral tuberal y en la parte caudal del núcleo preóptico del hipotálamo. Las neuronas que expresan GHRH se proyectan a la parte distal a través de la parte nerviosa de la hipófisis. Esa distribución de GHRH indica que juega un papel fisiológico en la regulación de la liberación de la hormona de crecimiento en la hipófisis de la trucha arcoíris, como lo hace en los mamíferos (Luo y McKeown 1989).

A comienzos de la década de 1990 el grupo de Olivereau y colaboradores estudiaron la distribución de GHRH en otras 4 especies de peces teleosteos (anguilas, salmónidos, *goldfish* y carpa común) y encontraron que se expresaba en las porciones parvo y magnocelular del núcleo preóptico y en el núcleo lateral tuberal en *goldfish* y algunas especies de salmónidos del género *Oncorhynchus*. Las dos secciones del núcleo preóptico se proyectaron ventro-lateralmente hacia el quiasma óptico y luego en sentido caudal en el hipotálamo basal. No encontraron fibras en la zona de la parte distal rostral y pocas fibras pasaron cerca de los somatotropos. En el lóbulo neurointermedio

encontraron fibras exclusivamente en el tejido neural de todas las especies que analizaron en este trabajo (Olivereau *et al.* 1990).

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Animales**

Se seleccionaron ejemplares juveniles de pejerrey de un año por talla y pesos similares ( $19.7 \pm 0.6$  cm y  $59.2 \pm 4.8$  gr), a partir de un stock de animales criados en las instalaciones de acuicultura del INTECH ( $35^{\circ}34'13''$ S;  $58^{\circ}0'42''$ O), bajo condiciones de fotoperiodo y temperatura naturales que fueron aproximadamente de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad y  $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

Para anestesiarse los peces se usó benzocaína 1mg/L, como se describió anteriormente (capítulo 2, sección 2.2.1, página 47). Luego se pesaron, midieron y perfundieron con solución salina y solución fijadora (ver más abajo). La técnica de perfusión permitió limpiar de posibles fuentes de interferencia en las determinaciones histológicas posteriores y la formación de trombos durante la perfusión de fijador. Además, fijar el tejido del cerebro antes de disecarlo permite conservar mejor su estructura macroscópica. Para ello, se introdujo una cánula en el bulbo arterioso y se perfundió PBS (150 mL). Para evitar un aumento desmedido de presión se cortó el ventrículo permitiendo que el líquido perfundido salga fácilmente tras distribuirse por todo el cuerpo. Finalmente, se perfundió el fijador PAF al 4% en PBS (150 mL; ver Apéndice-Tabla A.3). Luego se extrajo cuidadosamente cada cerebro evitando dañar su estructura, conservándolos en fijador (PAF al 4% en PBS) por toda la noche (16-18 hs). Los cerebros disecados se lavaron 3 veces en PBS (ver Apéndice-Tabla A.3) y se procesaron para hacer cortes histológicos como se describe en la siguiente sección. Todo el manejo que involucró animales se realizó de acuerdo a las normas de manejo de animales de laboratorio (*UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, <http://www.ufaw.org.uk/pubs.htm#Lab>).

### **3.2.2-Hibridación *In Situ* (ISH)**

#### **3.2.2.1 Preparación del tejido y secciones histológicas**

Los cerebros ya fijados como se describió más arriba se deshidrataron en una serie de alcoholes de concentraciones crecientes, etanol 70% (2 pasajes de 30 minutos),

etanol 85% (30 minutos), etanol 95% (30 minutos) y etanol 100% (2 pasajes de 30 minutos) a 4°C. Luego se clarificaron con tolueno (2 pasajes de 30 minutos), se embebieron en parafina a 58-60°C (3 pasajes de 20 minutos) y finalmente se prepararon en un taco de parafina. Posteriormente se cortaron series de secciones transversales de 6 µm de espesor seleccionando cortes cada 60 µm. Dichas secciones se montaron en portaobjetos silanizados con TESPA (Apéndice-Tabla A.1) para lograr una mejor adhesión del tejido, evitando posibles pérdidas de cortes debido al riguroso tratamiento que reciben durante la técnica. Una vez montados en los portaobjetos, los cortes se guardaron a 4°C hasta su utilización en hibridación *in situ* (ISH).

### **3.2.2.2 Preparación de las sondas de ARN**

Para la preparación de las sondas de ARN se partió de un plásmido conteniendo la secuencia del fragmento del gen que fue previamente preparado en la etapa de clonado del mismo (capítulo 2, sección 2.2.8). Dada la orientación del inserto, se hizo una digestión con las enzimas de restricción NcoI para las sondas anti-sentido y Pst I para las sondas sentido, y así se linealizó el mismo. Luego de una extracción con el método de fenol-cloroformo y posterior cuantificación se procedió a crear las sondas sentido y anti-sentido para cada gen. Se utilizó la RNA polimerasa *T7* o *SP6* (*Promega*) para generar las sondas sentido y anti-sentido dependiendo de la orientación del inserto dentro del plásmido. Para la reacción se combinaron 3 µg del plásmido linealizado y 2 µl de rNTPs (10 mM sin UTP) más una mezcla de 1,1 µl UTP (10mM) y 0,9 µl UTP marcado con digoxigenina (UTP-DIG). Finalmente se precipitaron las sondas, para ello se incubaron con acetato de sodio 3 M y etanol 100% en frío durante 30 minutos a -80°C, posteriormente se centrifugaron y lavaron con etanol 70% y luego se resuspendieron con agua *DEPC*. Para determinar la concentración de las sondas producidas, se realizaron diluciones que fueron probadas con un ensayo de *Dot Blot* sobre membrana de Nylon (Hybond-N Amersham), el cual se reveló con un anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (*Roche*) y *NBT/BCIP* (*Roche*) como sustrato cromógeno.

### **3.2.2.3 Procedimiento de hibridación**

Las secciones transversales de cerebro ya montadas en los portaobjetos se desparafinaron con tolueno (2 pasajes de 10 minutos) y re-hidrataron en una serie

decreciente de alcoholes, etanol 100% (2 pasajes de 10 minutos), etanol 96% (2 pasajes de 5 minutos), etanol 70% (5 minutos), y etanol 50% (5 minutos). Se hicieron 2 lavados en *PBS* de 5 minutos, una fijación posterior con *PAF* al 4% en *PBS* durante 20 minutos y 2 lavados más en *PBS* por 5 minutos. Luego se trataron con proteinasa K (Apéndice-Tabla A.1) durante 7 a 10 minutos seguido de 2 lavados de 5 minutos en *PBS*. Después se volvieron a fijar durante 20 minutos con *PAF* al 4% en *PBS* y se lavaron nuevamente 2 veces durante 10 minutos con *PBS* para luego tratarlos con trietanolamina 0,1M pH 8 y 0,25% de anhídrido acético durante 10 minutos. A continuación se deshidrataron en serie creciente de alcoholes, etanol 50% (5 minutos), etanol 70% (5 minutos), etanol 96% (5 minutos), etanol 100% (2 pasajes de 10 minutos), y se dejaron hibridando a 55°C toda la noche con 200ng/mL de la correspondiente sonda marcada con DIG en solución de hibridación (Apéndice-Tabla A.1). Al día siguiente, las secciones se lavaron con 2X *SSC* (Apéndice-Tabla A.1)- 50% formamida a 60°C (2 pasajes de 20 minutos), y con 0,1X *SSC* pH 7 a 60°C (2 pasajes de 20 minutos), se lavaron con 1X *NTE* pH 7,5 (3 pasajes de 10 minutos), se incubaron con *RNAasa A* 10µg/mL en *buffer NTE* pH 7,5 (Apéndice-Tabla A.1) durante media hora y se volvieron a lavar con 1X *NTE* pH 7,5, 2X *SSC* pH 7 y 0,1X *SSC* pH 7 sucesivamente 15 minutos cada uno. Luego se sumergieron en *buffer TP* pH 7,5 (Apéndice-Tabla A.1) y se bloquearon con *buffer TP* pH 7,5 + *Tween 20* 0,1% + de *BSA* 3 % por una hora. Posterior al bloqueo se agregó a cada porta una solución de anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (dilución: 1/2.000) en la solución de bloqueo sin *Tween 20* y se incubó durante una noche a 4°C o 1 hora a T° ambiente. Luego, se realizaron tres lavados con *buffer TP* pH 7,5 (3 pasajes de 5 minutos), para eliminar el exceso de anticuerpo anti-DIG. Se sumergió en solución A (Apéndice-Tabla A.1) por 5 minutos y se reveló con *NBT/BCIP* (*Roche*) en solución A durante 30 minutos en oscuridad. Luego se realizaron tres lavados con *PBS* de 5 minutos cada uno, seguidos de una fijación con *PAF* 4% en *PBS* para bloquear la fosfatasa alcalina durante 20 minutos, seguido de un lavado con *PBS* de 5 minutos, un pasaje rápido por agua destilada, y por último una deshidratación rápida en serie creciente de alcoholes, clarificado con tolueno (2 pasajes de 10 minutos) y montado con bálsamo de Canadá.

Las fotografías de los cortes cerebrales se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse E7000 equipado con una cámara digital Nikon DS Fi1. Las imágenes digitales se ensamblaron con el programa Photoshop (Adobe System Inc., San José CA) donde

únicamente se ajustó brillo, contraste y balance de color. Dada la inexistencia de un atlas neuroanatómico específico para pejerrey, la localización anatómica de la tinción positiva se determinó por comparación con los atlas de medaka (Ishikawa *et al.* 1999), *zebrafish* (Wullimann *et al.* 1996) y de *goldfish* (Peter y Gill 1975; Braford y Northcutt 1983). La nomenclatura utilizada para los territorios cerebrales se adaptó de la nomenclatura utilizada para medaka (Ishikawa *et al.* 1999) o para *goldfish* (Peter y Gill 1975; Braford y Northcutt 1983) cuando se requirió una mayor descripción. Las diferencias y equivalencias entre las nomenclaturas de Peter y Gill 1975; Braford y Northcutt 1983 para el *goldfish* fueron revisadas por Cerdá-Reverter y Canosa (2009). Así, en este capítulo seguimos la nomenclatura que mejor describe los territorios cerebrales donde se expresan los péptidos en estudio y que según cada caso nos permite una descripción más detallada. La tabla 3.1 compila las abreviaturas con sus significados, utilizadas en la descripción de las distintas áreas, núcleos y estructuras cerebrales.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Distribución cerebral de *prp-pacap*

La expresión de *prp-pacap* se mapeó en el cerebro de pejerrey mediante hibridación *in situ* y la figura 3.1 resume los resultados obtenidos. La hibridación usando una sonda control (sonda sentido) no mostró una tinción específica (fig. 3.2 I, 3.4 H). Las células que expresan *prp-pacap* tienen una amplia distribución a lo largo del cerebro de pejerrey y se describirá desde la posición más rostral en el telencéfalo (Tel) hacia estructuras caudales.

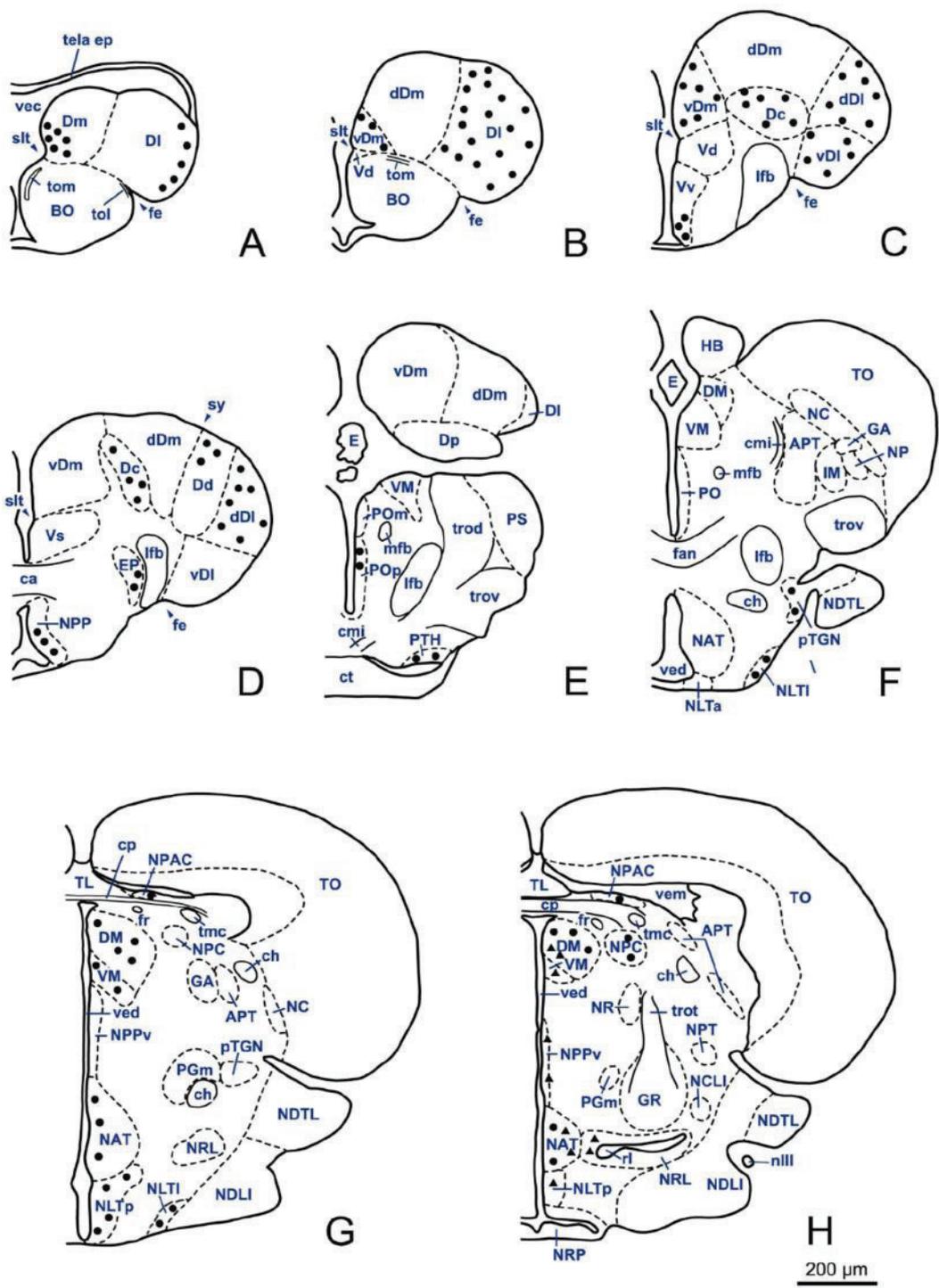
Así, en el Tel hay gran cantidad de células que expresan *prp-pacap* ubicadas en el núcleo lateral del Tel dorsal (Dl; Fig. 3.1, 3.2 A y B). Estas células son redondeadas, de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ , aparentemente unipolares y se distribuyen en toda la extensión del núcleo. Progresando caudalmente, se pueden observar en el núcleo medial del Tel dorsal (Dm) unas células redondeadas unipolares (7  $\mu\text{m}$  aprox.), positivas para *prp-pacap* formando una banda con orientación dorso-ventral cerca del borde del ventrículo telencefálico (vec, Fig. 3.1, 3.2 A y C) de unas 10-15 células de espesor. En posición aún más caudal dentro del Tel dorsal o *pallium*, aparecen células redondeadas, aparentemente unipolares, positivas para *prp-pacap* en el núcleo central del Tel dorsal

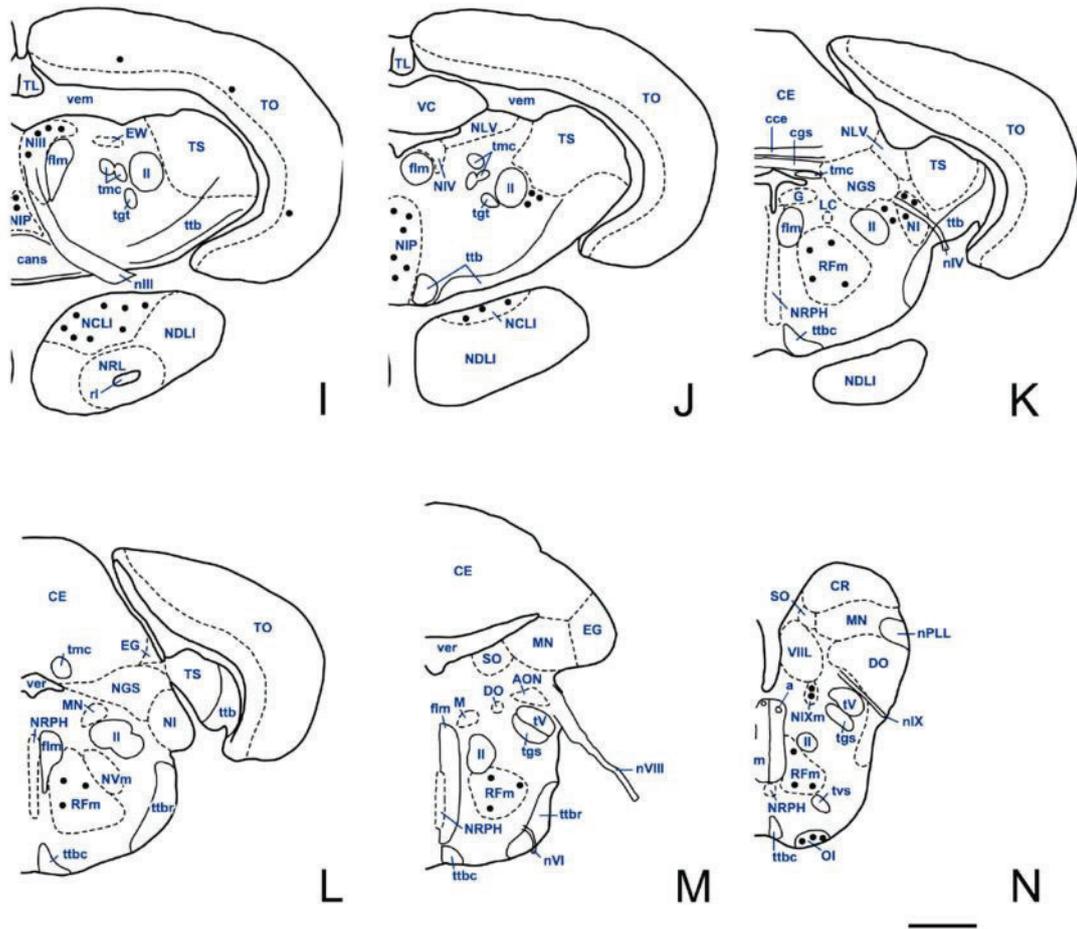
(Dc) de 12-13  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 3.1C y D, 3.2 C) y en el núcleo dorsal del Tel dorsal (Dd) de 4-5 $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 3.1D, 3.2 D), que se tiñen fuertemente. A esta altura del eje antero-posterior, todavía se puede ver marca positiva en los núcleos descritos previamente (Dl y Dm; Fig. 3.1C y D).

Por otro lado, también se observan células que expresan *prp-pacap* en el Tel ventral o *subpallium*. Estas células se encuentran en el núcleo ventral del Tel ventral (Vv; Fig. 3.1C y 3.2F), tienen diámetro aproximado de 11  $\mu\text{m}$  y son de forma más irregular, tal vez bipolares o multipolares. Estas células se pudieron mapear extendiéndose dorsalmente hasta la región de la comisura anterior (ca; Fig. 3.2 G).

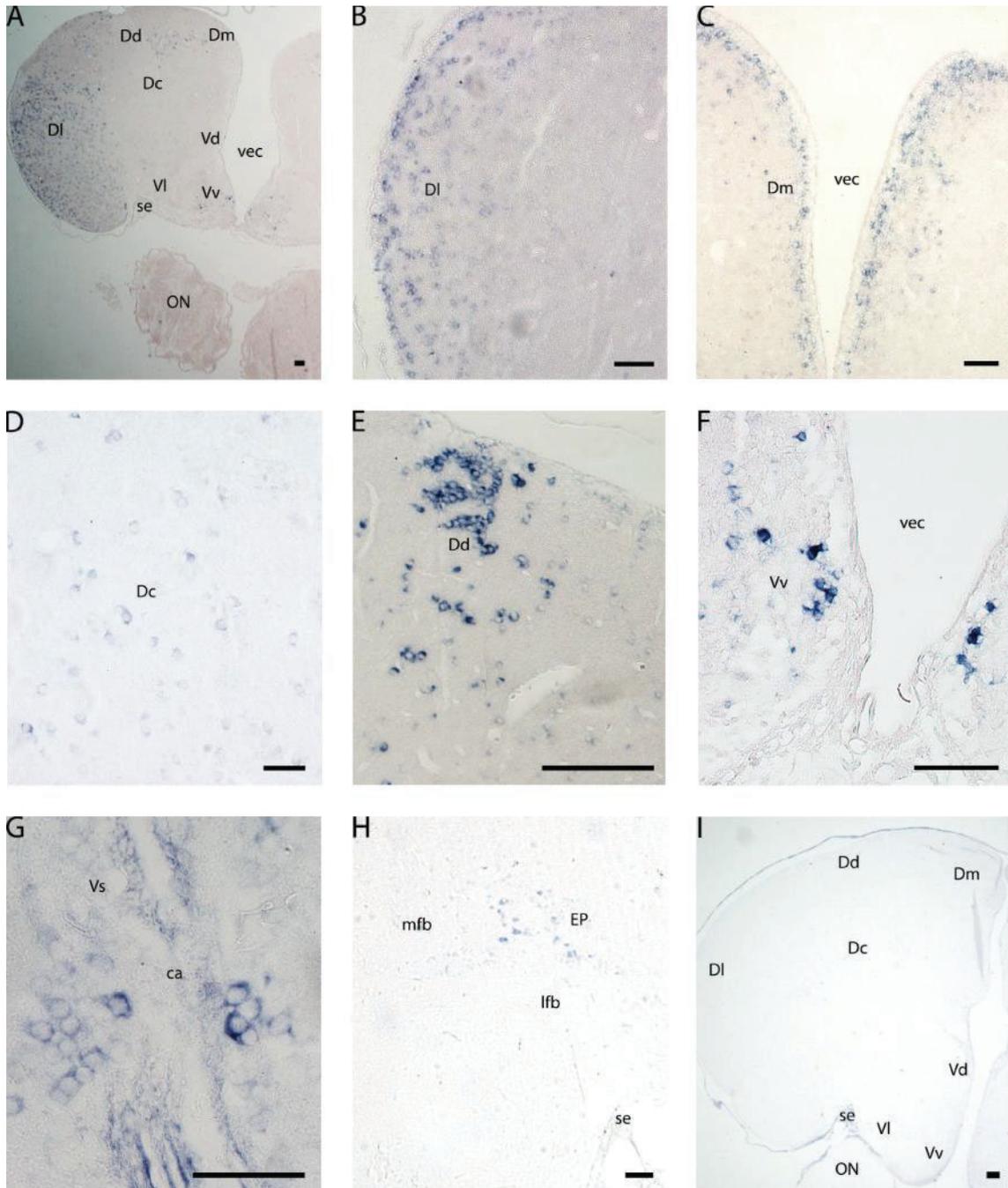
**Tabla 3.1:** Abreviatura de las figuras del capítulo 3.

	axón Mauthner	<b>NLTp</b>	parte posterior del núcleo lateral tuberal
<b>AON</b>	núcleo octavo anterior	<b>NLV</b>	núcleo lateral valvular
<b>APT</b>	área pretectal	<b>NP</b>	núcleo pretectal
<b>BO</b>	bulbo olfatorio	<b>NPAC</b>	núcleo paracomisural
<b>ca</b>	comisura anterior	<b>NPC</b>	núcleo de la comisura posterior
<b>cans</b>	comisura ansulata	<b>nPLL</b>	nervio lineal lateral posterior
<b>cce</b>	comisura cerebelar	<b>NPP</b>	núcleo preóptico periventricular
<b>CE</b>	cuerpo cerebelar	<b>NPPv</b>	núcleo posterior periventricular
<b>egs</b>	comisura del núcleo gustatorio secundario	<b>NPT</b>	núcleo posterior talámico
<b>ch</b>	comisura horizontal	<b>NR</b>	núcleo ruber
<b>CM</b>	cuerpos mamilares	<b>NRL</b>	núcleo del receso lateral
<b>cmi</b>	comisura menor	<b>NRP</b>	núcleo del receso posterior
<b>cp</b>	comisura posterior	<b>NRPH</b>	núcleo del rafe
<b>CR</b>	cresta cerebelar	<b>nVI</b>	nervio abducens
<b>ct</b>	comisura transversa	<b>nVIII</b>	nervio octavo
<b>Dc</b>	área central del telencéfalo dorsal	<b>NVm</b>	núcleo motor del nervio trigemino
<b>Dd</b>	área dorsal del telencéfalo dorsal	<b>OI</b>	oliva inferior
<b>dDI</b>	región dorsal del área lateral del telencéfalo dorsal	<b>ON</b>	nervio óptico
<b>dDm</b>	región dorsal del núcleo medial del telencéfalo dorsal	<b>PGm</b>	parte media del núcleo preglomeruloso
<b>DI</b>	área lateral del telencéfalo dorsal	<b>PGZ</b>	zona gris periventricular del techo óptico
<b>Dm</b>	área medial del telencéfalo dorsal	<b>PO</b>	núcleo preóptico
<b>DM</b>	núcleo dorsomedial del tálamo	<b>POm</b>	zona magnocelular del núcleo preóptico
<b>DO</b>	núcleo octavo descendente	<b>POp</b>	zona parvocelular del núcleo preóptico
<b>Dp</b>	área posterior del telencéfalo dorsal	<b>PS</b>	núcleo pretectal superficial
<b>E</b>	epíffisis	<b>pTGN</b>	núcleo preglomerular gustatorio terciario
<b>EG</b>	eminencia granular	<b>PTH</b>	núcleo pretalámico
<b>EP</b>	núcleo entopeduncular	<b>RFm</b>	formación reticular media
<b>EW</b>	núcleo Edinger-Westphal	<b>rl</b>	receso lateral
<b>fan</b>	fibra ansulata	<b>se</b>	surco exterior
<b>fe</b>	fisura endorhinal	<b>slt</b>	surco limitante del telencéfalo
<b>flm</b>	fascículo longitudinal medio	<b>SO</b>	población secundaria del octavo
<b>fr</b>	fascículo retroflexo	<b>sy</b>	surco ipsiloniforme
<b>G</b>	población granular	<b>tela ep</b>	tela endodimial
<b>GA</b>	parte anterior del cuerpo glomeruloso	<b>tgs</b>	tracto gustatorio secundario
<b>GR</b>	parte rotunda del cuerpo glomeruloso	<b>tgt</b>	tracto gustatorio terciario
<b>HB</b>	habénula	<b>TL</b>	torus longitudinal
<b>IM</b>	núcleo intermedio	<b>tmc</b>	tracto mesencefalocerebelar
<b>LC</b>	locus coeruleus	<b>TO</b>	techo óptico
<b>lfb</b>	fascículo lateral telencefálico	<b>tol</b>	tracto olfatorio lateral
<b>LL</b>	limnisco lateral	<b>tom</b>	tracto olfatorio medial
<b>M</b>	célula de Mauthner	<b>trod</b>	tracto óptico dorsomedial
<b>mfb</b>	fascículo medial telencefálico	<b>trot</b>	tracto rotundo
<b>MN</b>	núcleo medial	<b>trov</b>	tracto óptico ventrolateral
<b>NAT</b>	núcleo tuberal anterior	<b>TS</b>	torus semicircular
<b>NC</b>	núcleo cortical	<b>ttb</b>	tracto tectobulbar
<b>NCLI</b>	núcleo central del lóbulo inferior	<b>ttbc</b>	tracto tectobulbar cruzado
<b>NDLI</b>	núcleo difuso del lóbulo inferior	<b>ttbr</b>	tracto tectobulbar recto
<b>NDTL</b>	núcleo difuso tori lateral	<b>tV</b>	raíz descendente del nervio trigemino
<b>NGS</b>	núcleo gustatorio secundario	<b>tvs</b>	tracto vestibuloespinal
<b>NI</b>	núcleo del ítsmo	<b>VC</b>	válvula cerebelar
<b>nIII</b>	nervio oculomotor	<b>Vd</b>	parte dorsal del telencéfalo ventral
<b>NIII</b>	núcleo del nervio oculomotor	<b>vDI</b>	región ventral del DI
<b>NIP</b>	núcleo interpeducular	<b>vDm</b>	región ventral del Dm
<b>nIV</b>	nervio troclear	<b>vec</b>	ventrículo común telencefálico
<b>NIV</b>	núcleo del nervio troclear	<b>ved</b>	ventrículo diencefálico
<b>nIX</b>	nervio glossofaríngeo	<b>vem</b>	ventrículo mesencefálico
<b>NIXm</b>	zona motora del núcleo del nervio glossofaríngeo	<b>ver</b>	ventrículo rombencefálico
<b>NLTa</b>	parte anterior del núcleo lateral tuberal	<b>VIII</b>	lóbulo facial
<b>NLTI</b>	parte lateral del núcleo lateral tuberal	<b>VI</b>	núcleo lateral del telencéfalo ventral
<b>NLTp</b>	parte posterior del núcleo lateral tuberal	<b>VM</b>	núcleo ventromedial del tálamo
<b>NLV</b>	núcleo lateral valvular	<b>Vs</b>	núcleo supracomisural del Tel ventral
<b>NLTI</b>	parte lateral del núcleo lateral tuberal	<b>Vv</b>	núcleo ventral del Tel ventral





**Fig. 3.1:** Representación esquemática de las secciones transversales de cerebro de pejerrey, organizadas en el eje antero-posterior (A-N), donde se muestra la distribución de células marcadas por ISH positivas para *prp-pacap* (círculos negros) o *ghrh* (triángulos negros). El significado de las abreviaturas utilizadas se detalla en la tabla 3.1. Los gráficos se adaptaron del Atlas de medaka (Ishikawa *et al.* 1999). La barra representa 200  $\mu$ m.

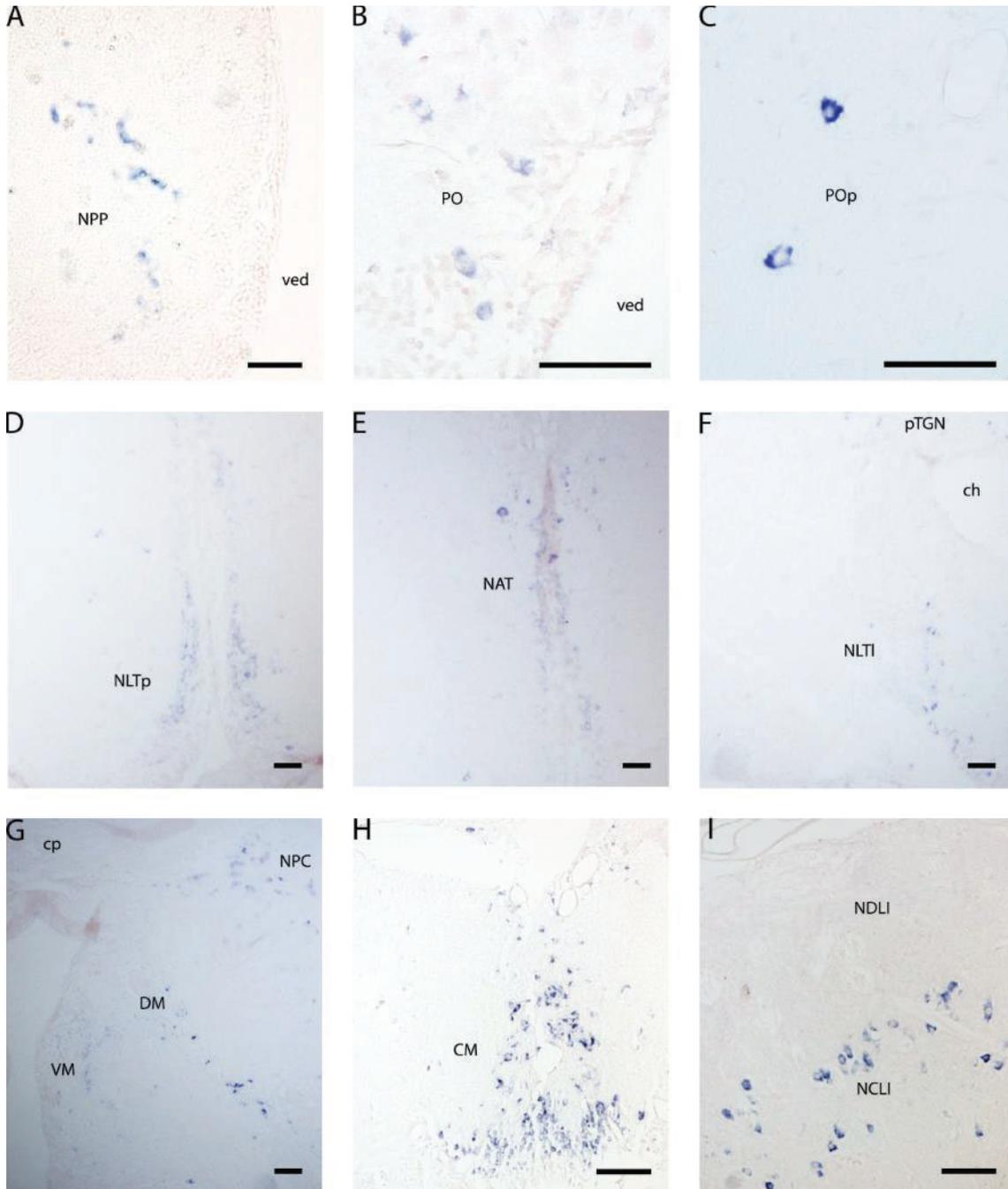


**Fig. 3.2:** ISH de cortes transversales de telencéfalo de pejerrey utilizando sonda anti-sentido para *prp-pacap* (A-H). Las secciones están orientadas en el eje antero-posterior siendo A la más rostral y H la más caudal. El panel I muestra un corte representativo marcado con sonda sentido de *prp-pacap* como control. La barra representa 50  $\mu$ m. **ca:** comisura anterior, **Dc:** núcleo central del telencéfalo dorsal, **Dd:** núcleo dorsal del telencéfalo dorsal, **Dl:** núcleo lateral del telencéfalo dorsal, **Dm:** núcleo medial del telencéfalo dorsal, **EP:** núcleo entopeduncular, **lfb:** haz lateral del cerebro anterior, **mfb:** haz medial del cerebro anterior, **ON:** nervio óptico, **se:** surco exterior, **VI:** núcleo lateral del telencéfalo ventral. **Vv:** núcleo ventral del telencéfalo ventral, **Vs:** núcleo supracomisural del telencéfalo ventral. **vec:** ventrículo telencefalico.

Si bien estas células presentan una morfología diferente a las encontradas en el Vv en posición más rostral (son un poco más grandes (11  $\mu\text{m}$ ) y de forma más redondeada) es dudoso asignarlas al núcleo supracomisural del Tel ventral (Vs), ya que no fue posible encontrar marca positiva para *prp-pacap* en cortes más caudales de este núcleo y por lo tanto consideramos que estas células representan el extremo más caudal del Vv y que no hay expresión de *prp-pacap* en el Vs (ver Fig. 3.1 panel C y D). También, en posición post-comisural (caudal a la ca) se encontraron células positivas para *prp-pacap* en el núcleo entopeduncular (EP; Fig. 3.1D, 3.2H). Estas células, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , parecen ser multipolares. En esta posición del eje antero-posterior, el núcleo Dm ya no presenta células marcadas para *prp-pacap*, pero si lo hacen el Dl, el Dd y el Dc (Fig. 3.1 D).

Dentro del área preóptica, se observaron escasas células de tamaño pequeño, de 4-5  $\mu\text{m}$ , que expresan *prp-pacap* dispersas en la parte rostral del núcleo preóptico periventricular (NPP) y también se vieron células multipolares de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro dispersas en el núcleo preóptico (PO; Fig. 3.1 D, 3.3 A y B). Más a caudal se encontraron células positivamente marcadas en la zona parvocelular del núcleo preóptico (POp; Fig. 3.1 E, 3.3 C). Estas últimas, aparentemente multipolares, se encontraron dispersas y en escasa cantidad, teniendo un tamaño de 10-11  $\mu\text{m}$ .

En el hipotálamo, se observó marca positiva de *prp-pacap* en la parte posterior del núcleo lateral tuberal (NLTp), el núcleo tuberal anterior (NAT), la parte lateral del núcleo lateral tuberal (NLTI; Fig. 3.1F-H, 3.2D-F) y el núcleo preglomerular gustatorio terciario (pTGN; Fig 3.1F, 3.3F). En el NLTp las células marcadas positivamente que expresan *prp-pacap* se distribuyen a lo largo de la superficie del tercer ventrículo o ventrículo diencefálico (ved) formando una zona de 4-5 células de espesor de un diámetro de 9-10  $\mu\text{m}$  que se prolonga dorsalmente en un continuo con el NAT (Fig. 3.1G y H, 3.3D y E). En este núcleo, las células son en su mayoría de menos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque también se observan algunas de mayor tamaño, que van de 12 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro.

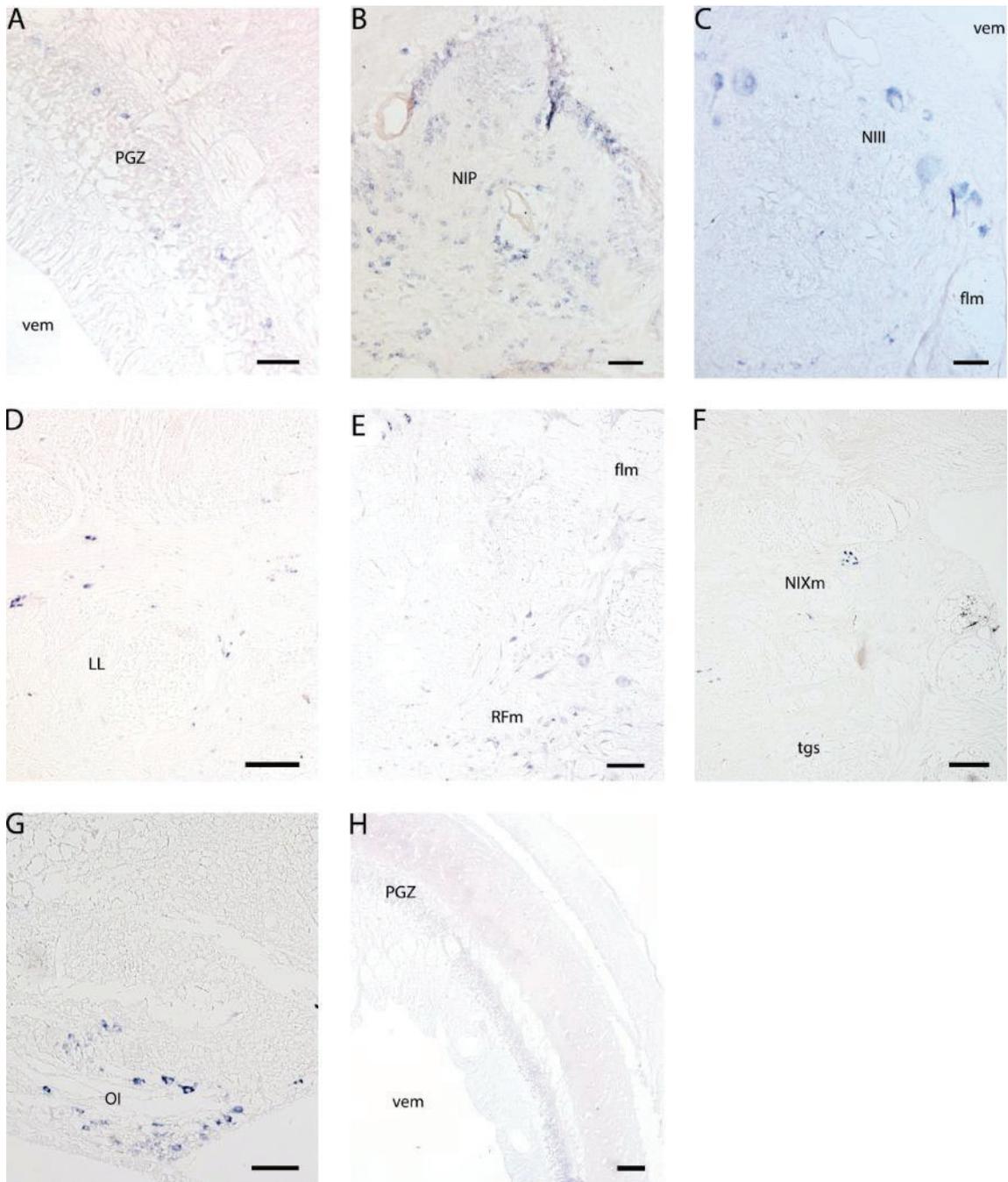


**Fig. 3.3:** ISH de cortes transversales del área preóptica (A-C), del hipotálamo y tálamo (D-I) de pejerrey utilizando sonda anti-sentido para *prp-pacap*. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . CM: cuerpos mamilares, cp: comisura posterior, DM: núcleo dorsomedial del tálamo, NAT: núcleo anterior tuberal, NCLI: núcleo central del lóbulo inferior, NDLI: núcleo difuso del lóbulo inferior, NLTI: parte lateral del núcleo lateral tubera, NLTp: parte posterior del núcleo lateral tuberal, NPC: núcleo de la comisura posterior, NPP: núcleo preóptico periventricular, PO: núcleo preóptico, POp: núcleo preóptico parvocelular VM: núcleo ventromedial del tálamo. ved: ventrículo diencefálico. La hibridación con la sonda sentido no generó marca específica (dato no mostrado).

Las células marcadas positivamente en el NLTI son fusiformes, aparentemente bipolares, de un diámetro de aproximadamente 9  $\mu\text{m}$ , mientras que en el pGTN se ven

células también fusiformes de tamaño un poco menor (8  $\mu\text{m}$ ; Fig. 3.1F, 3.3F). A esta misma altura del eje anteroposterior, se encontraron marcas positivas para *prp-pacap* en células de 9 o 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, de forma redondeada u ovoide en los núcleos dorsomedial (DM) y ventromedial (VM) del tálamo, y en el núcleo de la comisura posterior (NPC; Fig. 3.1G y H, 3.3G). Progresando más caudalmente, se observó marca positiva para *prp-pacap* en la zona del hipotálamo caudal, en células pequeñas, de 4-5  $\mu\text{m}$  de forma redondeada, ovoide o estrellada probablemente multipolares de los cuerpos mamilares (CM; Fig. 3.3I). Además, se observó marca en células de 7-8  $\mu\text{m}$  con forma redondeada, ovoide o triangular en el núcleo central del lóbulo inferior (NCLI; Fig. 3.1I y J, Fig. 3.3I). También a esta altura del eje anteroposterior, dentro del mesencéfalo se observaron escasas células positivas para *prp-pacap* dispersas en el techo óptico (TO). Estas células de 7 -8  $\mu\text{m}$  fueron en general redondas u ovoides y se encontraron dispersas específicamente en la zona gris periventricular (PGZ) del TO (Fig. 3.1 I, 3.4A).

En el tectum y la médula oblonga se encontró marca positiva en el núcleo interpeduncular (NIP; Fig. 3.1I y J, Fig. 3.4B) y en el núcleo del tercer nervio craneal, el nervio oculomotor (NIII; Fig. 3.1I, Fig. 3.4C). También, se observó un grupo de células ubicadas lateralmente al limniscus lateral (LL) y en posición ventromedial respecto del torus semicircular (TS; Fig. 3.1J y K, Fig. 3.4D). Estas células probablemente corresponden al núcleo del itsmo (NI) descrito en medaka (Ishikawa *et al.* 1999) y en trucha arcoíris (Nieuwenhuys y Pouwels 1983) o el núcleo perilimniscal (perilimniscal nucleus, PL) que se describe en *zebrafish* (Wullimann *et al.* 1996). Progresando caudalmente se encontraron células pequeñas dispersa en la formación reticular media (RFm; Fig. 3.1K-N, Fig. 3.4E) y en lo que podría ser la zona motora del núcleo del noveno nervio craneal, el nervio glosofaríngeo (NIXm; Fig. 3.1N, Fig. 3.4F).



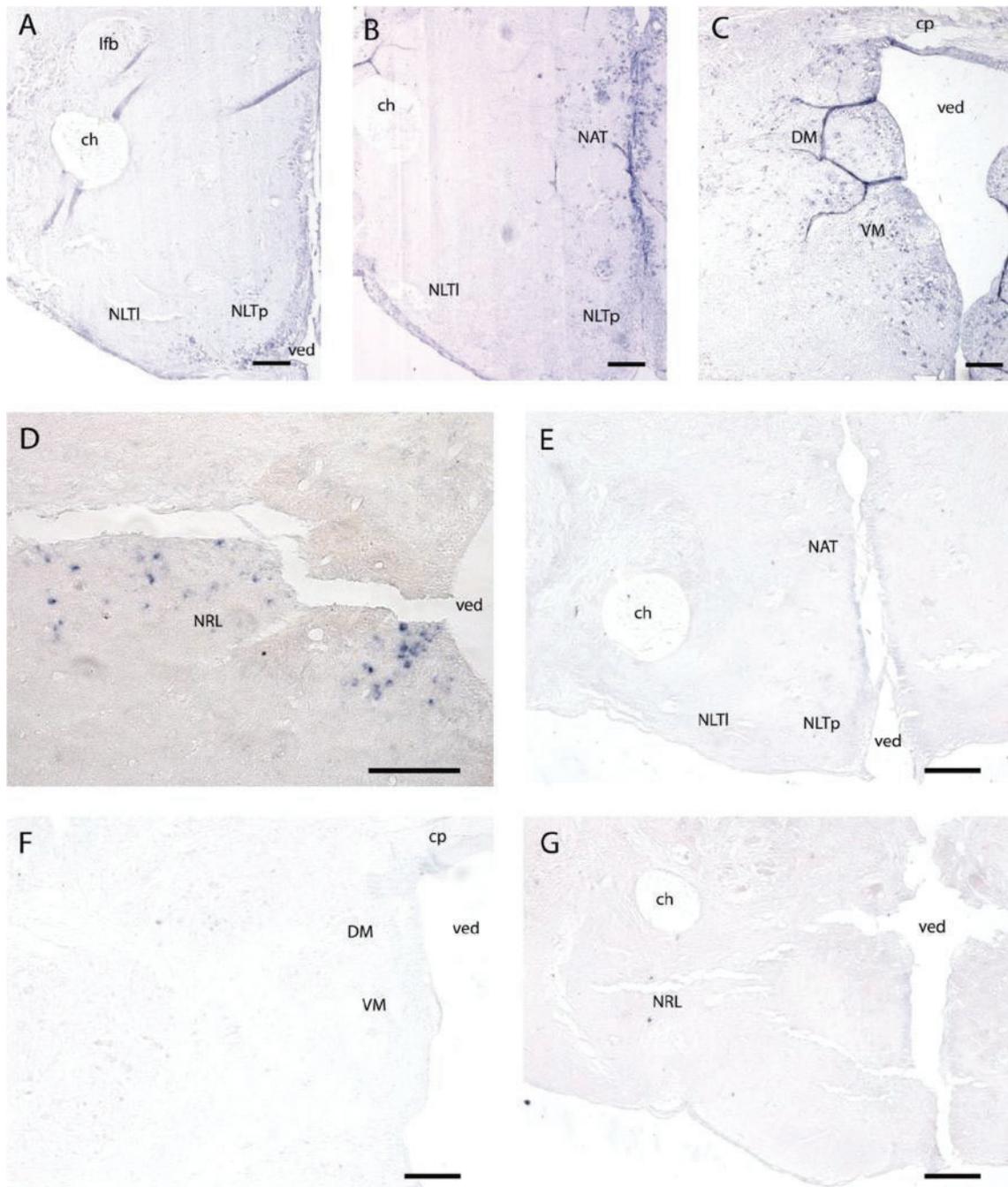
**Fig. 3.4:** ISH de cortes transversales del cerebro medio (**A, B**) y cerebro posterior (**C-G**) de pejerrey utilizando sonda anti-sentido para *prp-pacap*. El panel **H** muestra un corte representativo marcado con sonda sentido de *prp-pacap* como control. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . **flm**: fascículo longitudinal medial, **NIP**: núcleo interpeduncular, **LL**: limniscus lateral, **NIII**: núcleo de tercer par craneal, nervio oculomotor. **NIXm**: núcleo del noveno par craneal, nervio glossofaríngeo, **OI**: oliva inferior, **PGZ**: zona gris periventricular, **tgs**: tracto gustatorio secundario, **vem**: ventrículo mesencefálico.

Además, se encontraron células positivas para *prp-pacap* en una posición bien ventral del rombencéfalo en la oliva inferior (OI; Fig. 3.1N, Fig.3.4G). Estas células de

8  $\mu\text{m}$ , tienen forma ovoide con el eje mayor, y plausiblemente sus prolongaciones axonales, orientado más o menos paralelo a la superficie ventral del cerebro.

### 3.3.2 Distribución cerebral de *ghrh*

Se analizó la distribución de las células que expresan *ghrh* en el cerebro mediante hibridación *in situ* y la figura 3.1 resume los resultados obtenidos. La hibridación usando una sonda control (sonda sentido) no dio tinción específica (Fig. 3.5 E-G). Los resultados mostraron que la expresión del ARNm de *ghrh* fue mucho más restringida comparada con la expresión de *prp-pacap*, detectándose solo en estructuras diencefálicas. Las células que expresan *ghrh* se observaron únicamente en la región ventral del hipotálamo y en algunos núcleos talámicos (Fig. 3.1H). En el hipotálamo, se encontraron células marcadas positivamente para *ghrh* en el NLTP (Fig. 3.1H, 3.5A). Estas células se ubican bordeando el ventrículo (ved) en una banda de 4-5 células de espesor. El tamaño de las mismas fue de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . Progresando caudalmente se encontraron células GHRHérgicas en el núcleo anterior tuberal (NAT, Fig. 3.1H, 3.5B) de 6  $\mu\text{m}$  de diámetro. A esa misma altura del eje antero-posterior también se observó marca en los núcleos talámicos DM y VM (Fig. 3.1H, 3.5C). Por otro lado, se encontraron células que expresan *ghrh*, de 4-5  $\mu\text{m}$  de diámetro y forma redondeada en el núcleo del receso lateral (NRL; Fig.3.1H, 3.5D).



**Fig. 3.5:** ISH de cortes transversales del cerebro de pejerrey a la altura del hipotálamo (diencefalo) utilizando sonda anti-sentido para *ghrh* (A-D) y sonda sentido para *ghrh* como control negativo (E-G). La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . **ch:** comisura horizontal, **cp:** comisura posterior, **DM:** núcleo dorsomedial del tálamo, **lfb:** haz lateral del cerebro anterior, **NAT:** núcleo anterior tuberal, **NLTI:** parte lateral del núcleo lateral tuberal, **NLTp:** parte posterior del núcleo lateral tuberal, **VM:** núcleo ventromedial del tálamo. **ved:** ventrículo diencefálico.

### 3.4 Discusión

La distribución de PACAP en peces muestra un alto grado de similitud con la de mamíferos, es decir que, aunque las cantidades más altas de PACAP se producen en el hipotálamo (Arimura *et al.* 1991), también se encuentra en muchas otras regiones del cerebro, incluyendo la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, el cuerpo estriado, el núcleo accumbens, la sustancia nigra, el locus coeruleus, y la glándula pineal (Köves *et al.* 1991; Ghatei *et al.* 1993; Palkovits *et al.* 1995). Así, PACAP se encontró distribuido ampliamente en el cerebro y médula del pejerrey y otras especies de peces como *zebrafish* (Nakamachi *et al.* 2018), *japanese stargazer* (Matsuda *et al.* 2005a) y anguila europea (Montero *et al.* 1998). La abundancia y amplia distribución de PACAP sugiere que puede actuar como un factor hipofisiotrópico liberando hormonas adenohipofisarias y como un neuromodulador y neurotransmisor en el sistema nervioso central (Matsuda *et al.* 2005a), además actúa como un neuroprotector (Shioda y Nakamachi 2015; Reglodi *et al.* 2011), como un factor neurotrófico (Matsumoto *et al.* 2016), como un regulador de astrocitos (Nakamachi *et al.* 2011; Masmoudi-Kouki *et al.* 2007) y como mediador del estrés (Hashimoto *et al.* 2011; Smith y Eiden 2012). PACAP también regula una amplia gama de funciones cerebrales relacionadas con la alimentación, la ansiedad y la memoria (Vaudry *et al.* 2009).

La región *pallium* del telencéfalo, el hipocampo y la amígdala participan en el sistema de memoria en los mamíferos (Pennartz *et al.* 2011). PACAP se observó con intensidad en el telencéfalo de pejerrey como así también en *zebrafish* (Nakamachi *et al.* 2018) y en el hipocampo y la amígdala de ratas (Vaudry *et al.* 2009). En un estudio comparativo de las regiones cerebrales del ratón y *zebrafish* se encontró que el hipocampo y la amígdala del ratón corresponden a la parte lateral y media, respectivamente, del área dorsal telencefálica en *zebrafish* (Mueller y Wullimann 2009), también coincidente con los núcleos lateral y medial del Tel dorsal (DI y Dm) en el pejerrey. En *goldfish*, en un estudio donde se extirpó el telencéfalo revelaron que la parte lateral del área dorsal, equivalente al núcleo lateral del Tel dorsal (DI) descrito en pejerrey, es esencial para la formación de asociaciones temporales en la memoria (Rodríguez-Expósito *et al.* 2017). En otros estudios *in vivo* en *zebrafish* revelaron que el telencéfalo se activa durante la recuperación de un programa de comportamiento almacenado en la memoria a largo plazo (Aoki *et al.* 2013). Todo esto sugiere que el telencéfalo es un importante centro neural del sistema de memoria, con funciones

conservadas a lo largo de la evolución desde los teleósteos a los mamíferos. Contribuyendo a esta idea, cuando se inyectó PACAP 38 intracerebroventricularmente a bajas dosis en ratas se incrementaron los procesos mnemónicos (Sacchetti *et al.* 2001) lo que sugiere que PACAP podría estar involucrado en el sistema de memoria en *zebrafish* y de la misma manera podría estar actuando en el pejerrey y otros teleósteos debido a las similitudes en su distribución.

Se observó una alta densidad de PACAP en fibras y cuerpo celulares del núcleo hipotalámico de cerebros de roedores, anfibios y peces (Yon *et al.* 1992; Köves *et al.* 1990). En *zebrafish* se ven células y fibras inmunoreactivas de PACAP en el hipotálamo, similares a estudios previos (Nakamachi *et al.* 2018). En el pejerrey hay una distribución importante en el hipotálamo, coincidente con lo encontrado en otras especies de peces. En la anguila europea la presencia de un plexo denso de fibras inmunoreactivas de PACAP en la parte distal rostral y proximal de la hipófisis, sugiere que estas fibras, se originan en el PO del hipotálamo. Por cierto, las neuronas que expresan PACAP se localizaron principalmente en las subdivisiones parvo y magno celular del PO (Montero *et al.* 1998; Vaudry *et al.* 2009), similar a lo que ocurre con el pejerrey, aunque solo lo encontramos en la subdivisión parvo celular del mismo. Apoyando esta hipótesis, se desarrollaron experimentos que demostraron que los cuerpos celulares en el área preóptica se proyectan directamente a la parte distal de la hipófisis (Montero *et al.* 1998). Además, las fibras inmunoreactivas de PACAP se distribuyeron ampliamente fuera del territorio neuroendocrino, sugiriendo que, en anguila europea, como en otras especies de vertebrados, PACAP podría estar involucrado en varias funciones como neuromodulador y/o neurotransmisor (Montero *et al.* 1998). Otro grupo (Matsuda *et al.* 2005a) también concluyó que PACAP podría funcionar como un factor hipotalámico estimulador de la liberación hormonal hipofisaria al analizar otra especie de teleósteo, el *japanese stargazer*.

El hipotálamo está estrechamente asociado con los comportamientos instintivos. La ablación de ambos lados de la región lateral del hipotálamo induce anorexia, y la extirpación del núcleo ventromedial induce bulimia en ratas y gatos (Anand y Brobeck 1951). En *goldfish* la electroestimulación del hipotálamo induce el comportamiento de alimentación (Savage y Roberts 1975). Por lo tanto, el hipotálamo se considera como el centro de control de la alimentación de los vertebrados. Además, apoyando esta idea, numerosos neuropéptidos hipotalámicos están implicados en la regulación de la

alimentación y la homeostasis de energía en roedores y teleósteos (Matsuda *et al.* 2011; Shioda *et al.* 2008). PACAP se considera un neuropéptido con efecto anoréxico en los vertebrados (Matsuda *et al.* 2013). Además, juega un rol importante en la regulación del comportamiento alimenticio en vertebrados incluyendo roedores (Morley *et al.* 2018), pollos (Tachibana *et al.* 2004) y *goldfish* (Matsuda y Maruyama 2007). Todo esto sugiere que la acción anorexigénica de PACAP está evolutivamente conservada en los vertebrados. Así, PACAP puede contribuir a la regulación de la alimentación en *zebrafish* (Nakamachi *et al.* 2018) y en el pejerrey, como en otros teleósteos.

La amplia distribución de *prp-pacap* en el cerebro de pejerrey nos permitió encontrarlo en varias áreas del cerebro relacionadas con el procesamiento de señales sensoriales. Así, se detectó presencia de células marcadas para *prp-pacap* en la zona gris periventricular del techo óptico (PGZ). Esta estructura cerebral se encarga del procesamiento de señales visuales (Northcutt 1983; Vanegas 1983). El núcleo entopeduncular (EP) también está involucrado en la modulación de señales sensoriales (Jadhao y Malz 2004, 2007). Por otro lado, hemos encontrado la expresión de *prp-pacap* en los núcleos ventromedial y dorsomedial del tálamo (VM y DM), en los cuerpos mamilares (CM), en el núcleo preglomerular gustatorio terciario (pTGN) y en el núcleo central del lóbulo inferior (NCLI) que funcionan como relevo de señales sensoriales conectando en algunos casos con áreas del Tel o con áreas de la formación reticular (Ito *et al.* 1986; Wullimann y Meyer 1993; Yamamoto e Ito 2005) modulando la respuesta a estas señales. La expresión de *prp-pacap* se encontró en zonas del rombencéfalo también relacionadas con el procesamiento de señales sensoriales como son el núcleo del tercer y del noveno par craneal, el núcleo del itmo (NI) y la formación reticular media (RFm) dando una respuesta motora de orientación (Luque *et al.* 2008). Similarmente, *prp-pacap* fue detectado en la oliva inferior (OI), este núcleo funciona como relevo de señales sensoriales y proyecta aferencias ascendentes a la *válvula cerebelis* tomando contacto con las células cerebelares de Purkinje (Finger 1978). La OI ejerce el filtrado de información predecible transmitiendo solo aquellos eventos sensoriales no predecibles (Devor, 2000). Esta estructura da información al cerebelo para generar respuestas motoras coordinadas ante estímulos no previstos tanto en el contexto de navegación por el entorno, como de captura de presas. Así, en base a estos resultados podemos inferir que además del control de la secreción de hormonas

hipofisarias PACAP podría estar involucrada en el procesamiento de estímulos sensoriales relacionados con la ingesta.

En 2002 el grupo de Miranda y colaboradores determinaron en cerebro de pejerrey la presencia de inmunoreactividad GHRH, utilizando un anticuerpo desarrollado contra GHRH de carpa común, este anticuerpo fue diseñado en base a la secuencia peptídica (Figura 3.6A) que por entonces se consideraba como GHRH de carpa común (Vaughan *et al.* 1992), y que luego se nombró como GHRH-like peptide (GHRH-LP) para disminuir la confusión en la nomenclatura y distinguirlo del verdadero GHRH de carpa común (Castro *et al.* 2009). Esta secuencia peptídica resulta ser de PRP, un péptido de 28 o 45 aminoácidos que, como se describió en el Capítulo 2 de esta Tesis, es generado por procesamiento del mismo precursor de PACAP. Esto ocurre también en pejerrey y otras especies (ver Capítulo 2). De este modo, este péptido (GHRH-LP o PRP) estaría expresándose en los mismos sitios que PACAP, salvo que se exprese el transcripto corto que se genera por *splicing* alternativo (ver Capítulo 2 para mayores detalles). Así, sería de esperar que la marca inmunológica usando anticuerpo anti-GHRH-LP coincidiera con la expresión de PACAP.

### A

PRP	salmon	HADGMFNKAY	RKALGQLSAR	KYLHSLMA	KR	VGGGSTMEDDSEPLS	KR
PRP	carpa	HADGMFNKAY	RKALGQLSAR	KYLHTLMA	KR	VGGGSMIEDDNEPLS	KR
PRP1	zebrafish	HADGMFNKAY	RKALGQLSAR	KYLHTLMA	KR	VGGGSTTEDDNEPLS	KR
PRP2	zebrafish	HADGLLDRAL	RDILVQLSAR	KYLHSLMAV	R	VGGGSSEEDSEPLS	KR
PRP	pejerrey	HAEELDRAL	REILGQLTAR	HYLHSLMTI	R	ASDDNSMEESEPLS	KR

### B

GHRH humano	YADAIFTNSY	RKVLGQLSAR	KLLQDIMS	R	QQGESNQERGARARL	GR
GHRH zebrafish	HADAIFTNSY	RKVLGQISAR	KFLQTVM	GKR	LGPETE-----SNV	KR
GHRH Pejerrey	HADAIFTNSY	RKVLGQISAR	KFLQTIM	GKR	LGDESE-----SYM	KR

**Fig. 3.6:** (A) Alineamiento de PRP de pejerrey con otros teleósteos. Los PRP de carpa común y salmón rojo *full length* fueron utilizados para generar los anticuerpos empleados por Miranda *et al.* 2002 y Castro *et al.* 2009. En rojo se ven las zonas idénticas de PRP de pejerrey con las de carpa común y otras especies indicando zonas potenciales de reconocimiento o reacción cruzada con el anticuerpo utilizado por Miranda *et al.* 2002 y Castro *et al.* 2009. (B) Alineamiento de GHRH de pejerrey con GHRH humano y de *zebrafish*. En rojo se ven las zonas idénticas de GHRH de pejerrey con las de humano indicando zonas potenciales de reconocimiento o reacción cruzada con anticuerpo anti-GHRH de humanos utilizados en la bibliografía. Los potenciales sitios de clivaje R y KR, además del sitio de amidación G se muestran en negrita.

En pejerrey, Miranda y colaboradores (2002) observaron una marca positiva bien temprano en el desarrollo larval en el BO al momento de la eclosión, que luego desaparece. La marca positiva fue apareciendo en distintos puntos a medida que se avanzaba en el desarrollo hasta llegar al patrón final (11 semanas post-eclosión) donde se observó marcas positivas en el NPP del área preóptica, en el NLT del hipotálamo, en el LL del mesencéfalo, en la médula oblonga y algunas células en el cerebelo. Este patrón de expresión es coincidente con lo descrito en el presente capítulo en relación a la distribución de *prp-pacap*. Las diferencias que se encuentran como, por ejemplo, la ausencia de marca inmunoreactiva en varias áreas donde se detectó el mensajero (varias áreas del telencéfalo, del tálamo, del LL, la PGZ y varias áreas del rombencéfalo incluyendo la OI), se podrían atribuir a una menor sensibilidad del anticuerpo heterólogo o al *splicing* alternativo del gen donde podría expresarse la versión corta del mensajero en esas áreas. Por otro lado, la presencia de inmunoreactividad en cerebelo, donde no fue detectada expresión del mensajero con nuestra sonda, es más difícil de explicar. Estudios previos con anticuerpos anti-PRP (GHRH-LP) de carpa común o salmón rojo o anti-GHRH de humano, tampoco detectaron marca en el cerebelo de varias especies de peces (Rao *et al.* 1996; Pan *et al.* 1985; Marivoet *et al.* 1988; Olivereau *et al.* 1990; Batten *et al.* 1990; Luo y McKeown, 1989; Castro *et al.* 2009). Por otro lado, la presencia de PACAP (sintetizado en el mismo precursor de PRP) en el cerebelo se demostró en mamíferos (Vaudry *et al.* 2009), en *japanese stargazer* (Matsuda *et al.* 2005a), pero no en anguila europea (Montero *et al.* 1998). Es interesante notar que en el cerebelo de *zebrafish* se observó inmunoreactividad a PACAP en estadios juveniles, pero no en adultos (Mathieu *et al.* 2004). Así, es posible inferir que la discrepancia entre los datos de Miranda y colaboradores (2002) y la presente Tesis, en lo que concierne la presencia de PRP o GHRH-LP en el cerebelo de pejerrey pueda deberse a diferencias en el desarrollo de los ejemplares estudiados.

En el trabajo de Castro y colaboradores (2009) se caracterizó la reacción cruzada de los péptidos de *zebrafish* tanto con el anticuerpo anti-GHRH-LP de carpa común (el mismo utilizado por Miranda y colaboradores 2002), como con el anticuerpo anti GHRH-LP de salmón rojo. El *zebrafish* presenta dos variantes de GHRH-LP o PRP (Fradinger y Sherwood, 2000; Wang *et al.* 2003). Así, mediante un ensayo de ELISA los autores demostraron que el anticuerpo anti-GHRH-LP de salmón rojo detecta los péptidos de 28 o 29 aa del extremo n-terminal de las dos variantes (zfGHRH-LP1 y

zfGHRH-LP2; Figura 3.6A), mientras que el anticuerpo anti GHRH-LP de carpa común reaccionó solo con zfGHRH-LP1. También en este estudio se demostró que el anticuerpo anti GHRH-LP de carpa común fue más sensible en detectar la presencia de inmunoreactividad. Sin embargo, existe la posibilidad que los anticuerpos pudieran reconocer una parte conservada del extremo c-terminal (Castro *et al.* 2009), también presente en pejerrey (Figura 3.6A), ya que esta parte no fue incluida en el ensayo de ELISA. Por otro lado, ninguno de estos anticuerpos detectó GHRH de *zebrafish* (Castro *et al.* 2009) y sería lógico suponer, dada la similitud de secuencias, que tampoco reaccionaría con GHRH de pejerrey (ver Figura 3.6B y Capítulo 2). En este trabajo Castro y colaboradores analizaron la expresión cerebral de PRP de *zebrafish* por inmunohistoquímica, encontrando una muy amplia distribución similar a la encontrada por HIS para *prp-pacap* en pejerrey, apoyando la interpretación que estos anticuerpos detectan PRP y no GHRH.

En cuanto a la distribución de *ghrh*, se encontró expresión en algunos núcleos del hipotálamo tales como el NLTp bordeando el ved, el NAT, los núcleos talámicos DM y VM, y el NRL, algo bastante parecido a lo que ocurrió en otras especies de peces (Pan *et al.* 1985; Marivoet *et al.* 1988; Batten *et al.* 1990; Luo y McKeown 1989; Olivereau *et al.* 1990). La mayor discrepancia entre los resultados presentados en esta Tesis y la bibliografía preexistente fue la ausencia de marca positiva de *ghrh* en el área preóptica. Sin embargo, hubo coincidencia en la marcación positiva en el NLT, tal como se viera en otras especies de peces.

Estudios inmunohistológicos en teleósteos, usando anticuerpos anti GHRH de mamíferos, mostraron marca positiva en el núcleo PO de especies tales como la anguila europea, el bacalao, la carpa común, el *goldfish*, la lisa gris (*Chelon ramada*, previamente *Mugli ramada*), la lubina, el molly verde, el pez escorpión de cuernos largos (*Myoxocephalus octodecemspinosus*), la trucha arcoíris, la trucha marrón (*Salmo trutta*), y otros salmonidos (Batten *et al.* 1990; Mariovet *et al.* 1988; Olivereau *et al.* 1990; Pan *et al.* 1985). También, se encontró marca positiva en distintas partes del NLT según las especies estudiadas, con excepción de la anguila europea, el molly verde y la trucha arcoíris (Batten *et al.* 1990; Olivereau *et al.* 1990). El NLTv sería equivalente al núcleo ARC de mamíferos (Cerdá-Reverter *et al.* 2000a; Cerdá-Reverter *et al.* 2000b; Cerdá-Reverter *et al.* 2003; Cerdá-Reverter y Canosa 2009; Soengas *et al.* 2018, Canosa y Bertucci 2020). Es importante destacar que, en los estudios donde se

utilizaron anticuerpos contra GHRH de mamíferos es probable que se haya marcado al verdadero GHRH de peces debido a que está bastante conservado y tiene gran similitud de secuencia respecto del GHRH de mamíferos (ver Figura 3.6B y Capítulo 2).

Las fibras marcadas positivamente para GHRH parten del PO y se proyectan principalmente hacia la neurohipófisis (NH) y en algunas especies también se vieron innervando la adenohipófisis (AH), pero no en todas. En salmónidos, el bacalao, la lisa gris, el molly verde y el pez escorpión de cuernos largos, las fibras GHRH se extienden a la parte intermedia (PI) y pocas en la parte distal proximal (PPD) de la hipófisis, pero no parecen estar en contacto con células productoras de GH (Batten *et al.* 1990; Pan *et al.* 1985; Olivereau *et al.* 1990), a excepción de unas pocas fibras en el pez escorpión y el bacalao. En el caso de ciprínidos y las anguilas, las fibras GHRH positivas innervan la PI y la PPD evidenciándose contacto con los somatotrófos en esta última (Olivereau *et al.* 1990). Por otro lado, en la lubina, las fibras innervan todas las partes de la hipófisis, estando en contacto estrecho con células productoras de ACTH en la parte rostral proximal (RPD) de la hipófisis, de GH en la PPD y de SL y  $\alpha$ MSH en la PI (Mariovet *et al.* 1988). La producción de GHRH en células del PO y su presencia en la NH sugieren una función sistémica no descrita aún. Tanto en las anguilas como en el molly verde GHRH se co-expresa con AVT en el PO (Batten *et al.* 1990; Olivereau *et al.* 1990), pudiendo estar relacionada con la función de AVT y el balance hidro-mineral (Cerdá-Reverter y Canosa 2009).

Aunque no hubo trabajos más recientes sobre la distribución cerebral de células y fibras GHRHérgicas en otras especies, sería interesante estudiar si realmente el contacto entre fibras GHRHérgicas y los somatotrófos es más evidente en las especies marinas que en las de agua dulce como sugiere Olivereau *et al.* (1990) y respecto a qué función endocrina se correlacionaría dicha variable neuroanatómica.

Esta información implica la existencia de una relación compleja entre los núcleos hipotalámicos productores de GHRH en la regulación de la liberación de GH (Luo y McKeown 1989). Así, se observó que las inyecciones intraperitoneales de GHRH aumentan el nivel de GH en plasma en *goldfish* (Peter *et al.* 1984). Sin embargo, *in vitro*, no se pudo estimular la liberación de GH en fragmentos de hipófisis (Marchant y Peter 1989). Algo parecido se vio en trucha arcoíris, debido a que GHRH aumentó la liberación de GH *in vivo* (Luo y McKeown 1989).

Con la información que tenemos hasta el momento podemos decir que, en pejerrey, GHRH estaría trabajando en la regulación de la función hipofisaria ya que su distribución es más acotada en comparación con la de PACAP, encontrándose restringida al hipotálamo medio-basal.

## **Capítulo 4**

### **Análisis de la regulación de la expresión génica de *prp-pacap* y *ghrh* en contexto de distintas situaciones fisiológicas**

#### **4.1 Introducción**

#### **4.2 Materiales y métodos**

#### **4.3 Resultados**

#### **4.4 Discusión**

## 4.1 Introducción

En mamíferos, se sabe que la regulación de la secreción de GH en la hipófisis anterior está bajo el control recíproco de dos hormonas hipotalámicas: una hormona estimulante de liberación de la hormona del crecimiento (GHRH) encontrada en el núcleo arcuato y una inhibidora, la SS14, sintetizada en el núcleo periventricular. Las evidencias sugieren que, además de los patrones intrincados de GHRH y la liberación de SS14 que regulan la liberación de GH directamente en el nivel hipofisario, SS14 modula la secreción de GH indirectamente a través de la regulación central de las neuronas que contienen GHRH (Tannenbaum y Epelbaum 1999). En los últimos años, se incluyó en el modelo regulador de la secreción de GH, la grelina, un péptido de 28 aminoácidos que fue reconocido como el ligando endógeno del receptor secretagogo de GH (Tannenbaum *et al.* 2003a; Veldhuis 2003). La grelina estimula el flujo de salida de GHRH en el nivel del núcleo arcuato y, a través de las acciones hipofisarias directas, sirve como un antagonista funcional de SS14 a nivel de la hipófisis (Tannenbaum *et al.* 2003b). La grelina se sintetiza principalmente en el estómago y actúa como orexígeno, vinculando así el crecimiento y el equilibrio energético (Kojima *et al.* 1999; Dickson *et al.* 2003).

El crecimiento en los peces está regulado por el eje neuroendocrino-GH-IGF-1 (Peter y Marchant 1995). El control de la secreción hipofisaria de GH en peces es multifactorial, con un balance de neurohormonas estimulantes e inhibitorias que actúan directamente sobre los somatotropos hipofisarios en base estacional (Peng y Peter 1997). SS14 es el principal inhibidor de GH en los peces (Canosa *et al.* 2005). Tanto PACAP como GHRH inducen la estimulación de la liberación de GH ejerciendo acciones equipotentes en *goldfish* (Wong *et al.* 2000), células hipofisarias de anguila europea (Montero *et al.* 2000), rodaballo (Rousseau *et al.* 2001), y salmón rojo (Parker *et al.* 1997). En humanos, PACAP es menos potente que GHRH en estimular la liberación de GH en cultivos primarios de células somatotróficas derivadas de adenomas (Desai *et al.* 1994) y la administración intravenosa de PACAP no modifica los niveles plasmáticos de GH (Chiodera *et al.* 1996). Como se dijo anteriormente (capítulo 2, sección 2.2.1), PACAP ejerce efectos pleiotrópicos incluyendo la modulación de la liberación de neurotransmisores, vasodilatación, broncodilatación, activación de la motilidad intestinal, aumento de la insulina y la secreción de histamina,

así como la estimulación de la multiplicación y/o diferenciación celular (Vaudry *et al.* 2000).

La determinación de los cambios en los niveles de ARNm puede proporcionar un buen indicio sobre la actividad de las células o la liberación hormonal, ya que los cambios en la secreción requieren que en algún momento influyan en los niveles estacionarios de ARNm (Canosa *et al.* 2008). Del mismo modo, en los mamíferos, los cambios en los niveles de ARNm de LH $\beta$  y FSH $\beta$  en la hipófisis están estrechamente relacionados a los cambios en los niveles plasmáticos de LH y de FSH respectivamente (Tam *et al.* 2011).

De este modo, el objetivo central de este capítulo fue analizar los cambios en la expresión de *prp-pacap*, *ghrh* y *gh* en situaciones fisiológicas que pudieran alterar la secreción endógena de GH. Este tipo de estudio buscó encontrar situaciones fisiológicas que desencadenen una regulación diferencial de péptidos estructuralmente similares y con funciones o efectos superpuestos. De esta manera se podría discriminar la participación de cada uno en diferentes contextos fisiológicos. Cabe destacar que esta aproximación experimental ya fue utilizada para mostrar aspectos funcionales en péptidos de la familia de la somatostatina donde se encontró que todos estos péptidos fueron capaces de inhibir la secreción *in vitro* de GH de células hipofisarias de *goldfish* (Yunker *et al.* 2003). En estos trabajos se estudió en el *goldfish* la expresión de 3 genes que codifican para péptidos de la familia de la somatostatina, PSS-I, PSS-II y PSS-III (Canosa *et al.* 2007). Se pudo ver que PSS-I, que codifica para SS14 y PSS-III, que codifica para [Pro<sup>2</sup>]-SS14, ortólogo a cortistatina (CST), se regularon diferencialmente con el tratamiento de esteroides sexuales y durante la ovulación (Canosa *et al.* 2002; 2008); mientras que, PSS-II, una variante exclusiva de teleósteos, reguló su expresión en el contexto de control de la ingesta (Canosa y Peter 2004; Canosa *et al.* 2005). Similarmente los experimentos realizados en la presente tesis buscaron también aportar datos para entender mejor el rol de péptidos relacionados y pertenecientes a una misma familia, en el crecimiento somático y su interacción con la ingesta y la reproducción.

Los datos sobre el efecto de dietas compuestas usadas como alimento de pejerrey desde el día 27 dpe (días post eclosión) son, a nuestro entender, inexistentes porque en esa etapa del desarrollo, los peces generalmente se alimentan de presas vivas, rotíferos y nauplios de artemia. Sin embargo, en pejerrey, Toledo-Cuevas *et al.* (2011) mostraron un rápido desarrollo del tracto digestivo y la capacidad de producir enzimas

digestivas desde la primera semana después de la eclosión. Por lo tanto, parece plausible que pejerreyes alimentados con dietas experimentales con niveles crecientes de lípidos, a partir de 27 dpe, puedan digerir correctamente los pellets o granos de alimento balanceado y así poder estudiar el efecto de la composición de nutrientes sobre el eje de crecimiento.

Las pruebas para los niveles de GH según el sexo y los cambios de GH durante el desarrollo gonadal indican que las hormonas esteroideas sexuales influyen en la secreción de GH (Stacey *et al.* 1984; Sumpter *et al.* 1991; Riley *et al.* 2002). Los tratamientos con estradiol (E2) aumentan los niveles séricos de GH en *goldfish* (Trudeau *et al.* 1992; Canosa *et al.* 2002), trucha arcoíris (Holloway y Leatherland 1997) y un híbrido de tilapia (*Rocky mountain, Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, Melamed *et al.* 1995). Los implantes de E2 durante 2-5 días en *goldfish* inducen aumentos en GH independientemente del estadio gonadal (Trudeau *et al.* 1992; Canosa *et al.* 2002).

En base a estos antecedentes, nos propusimos analizar los cambios en la expresión de *prp-pacap*, *ghrh* y *gh* en relación a cambios en la composición lipídica de la dieta y el aumento de estradiol circulante para evidenciar la relevancia de estos neuropéptidos en el control de la expresión de *gh* en relación con la nutrición y la reproducción.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Animales, implantes y disección de tejidos**

Los ejemplares de pejerrey utilizados en estos estudios se criaron en las mismas condiciones que se describieron anteriormente (sección 2.2.1), en la unidad de acuicultura del INTECH. Todos los procedimientos experimentales con peces siguieron las normas internacionales de manejo de animales de laboratorio (*UFAW Handbook on the Care and Managment of Laboratory Animals*, <http://www.ufaw.org.uk/pubs.htm#Lab>).

La obtención de larvas de pejerrey se realizó siguiendo los procedimientos de rutina de la unidad de acuicultura del INTECH. Brevemente, los huevos de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) se obtuvieron por desove natural y se transfirieron a frascos de eclosión con circulación continua de agua de manera de mantener a los huevos en

suspensión. Las larvas eclosionadas se colocaron en 6 tanques experimentales de 140 litros con un flujo continuo de agua. Se transfirieron 400 larvas por tanque. El flujo de agua fue de 10 L/min, el contenido de oxígeno del agua fue mayor que el 85% de saturación durante todo el período experimental, y la salinidad y el pH del agua permaneció constante en 15 g/L y 8,1, respectivamente. El fotoperíodo se mantuvo artificialmente en 12L: 12O (luz: oscuridad) y la temperatura osciló entre  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ . Estas larvas se alimentaron continuamente con nauplios de *Artemia sp.* (*Super Red, Aquatic Enterprise Co. Sarawak, Malaysia*) desde el día 1 al 27 dpe, cuando se inicia el ensayo de alimentación (ver sección 2.2.4). A partir de los 20 dpe, las larvas se co-alimentaron con un alimento iniciador comercial (proteína cruda 43%; grasa cruda 3%; fibra cruda 3%; *Ayu\_Nihon Haigo Jiryo Corp.*) además de nauplios de *Artemia sp.* Estos animales se utilizaron para analizar los niveles de expresión de *prp-pacap* y *ghrh* por la técnica de qPCR (Canosa *et al.* 2008) como se describe más abajo (sección 4.2.4).

#### **4.2.2 Ensayo con dietas experimentales**

Las dietas experimentales (Apéndice-Tabla A.4) se diseñaron y formularon en el Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN, Junín de los Andes, Argentina) y se basaron en harina de sangre y caseína de pescado como fuentes de proteínas (proteína bruta: 52,3-55,9% de materia seca, MS). Se utilizaron aceite de pescado y aceite de girasol (1:1) como fuentes de lípidos y harina de trigo como carbohidratos, con un contenido lipídico de 20,8% MS (L21), 13% MS (L13) y 9,7% MS (L10), ver Tabla A.4 para más detalles. Cada dieta experimental se asignó al azar para grupos de peces por duplicado durante 56 días. En el comienzo del experimento (día 0 = día 27 post eclosión), se obtuvo una muestra de unos 30-40 peces por tratamiento (15-20 peces de cada tanque) para calcular el peso medio y la longitud del cuerpo iniciales del pez. El alimento se administró manualmente hasta la saciedad aparente visual en 3 comidas al día (10, 13, 16 h). Cada 14 días, aproximadamente, 30 peces por tratamiento (15 peces de cada tanque) se anestesiaron en agua enfriada con hielo y se sacrificaron para medir el peso y longitud corporal. Al final del periodo experimental, y siguiendo ayuno durante la noche, 12 peces por tratamiento (6 peces de cada tanque) se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta hacer el análisis de expresión génica por qPCR de *ghr-I*, *ghr-II*, *igf-I* e *igf-II* (datos publicados en Gómez-Requeni *et al.* 2012). Adicionalmente, se extirpó rápidamente la cabeza de 12 peces por tratamiento (6

peces de cada tanque), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta hacer el análisis de expresión génica por qPCR de *gh*, *prp-pacap* y *ghrh* (sección 4.2.4).

### **4.2.3 Implantes intraperitoneales (ip) con estradiol**

Se capturaron, por medio de redes, juveniles de aproximadamente 1 año y se anestesiaron con benzocaína (50-100 mg/L). Luego se les implantaron, intraperitonealmente, *pellets* de silastic vacíos (control) o conteniendo estradiol en diferentes concentraciones (25, 50 y 100  $\mu\text{g/g}$ ), se los recupero de la anestesia y se los devolvió a sus estanques por 5 días. El experimento se realizó con 10 individuos por grupo y se hizo por duplicado. Al cabo de ese lapso, se los anestesió profundamente con benzocaína. Los ejemplares se pesaron y midieron, se les extrajo sangre por medio de una punción de la vena caudal utilizando jeringas de entre 3 y 5 mL, dependiendo esto del tamaño del ejemplar. La sangre extraída se colocó en tubos heparinizados para evitar la coagulación y luego los peces se sacrificaron mediante un rápido corte de la columna vertebral a nivel cervical. Finalmente se diseccionaron las áreas cerebrales para la obtención de ARN utilizando Trizol (Invitrogen) como se describe en la siguiente sección. A partir de éste se obtuvo ADNc y se utilizó para comparar la expresión de *prp-pacap* y *ghrh* por la técnica de qPCR. Con la sangre se obtuvo el plasma y en él se midieron los niveles de GH mediante la técnica de ELISA como se describe más abajo (sección 4.2.5).

### **4.2.4 Determinación de los niveles de expresión de *prp-pacap*, *ghrh* y *gh***

Se retrotranscribió 1  $\mu\text{g}$  del ARN total de hipotálamo a ADNc utilizando la enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Life Technologies) y un oligo(dT)12-18 según las instrucciones de uso.

Las amplificaciones se realizaron por qPCR (*Mx3000P™ Real-Time PCR System - Stratagene*) en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  conteniendo: 5  $\mu\text{l}$  de *FastStar Universal SYBR Green Master (ROX)* (Roche) 2X, 2.5  $\mu\text{l}$  de una *mix* de oligonucleótido específico 1.5  $\mu\text{M}$  (Tabla 3) y 2.5  $\mu\text{l}$  de ADNc en una dilución 1:100. Después de desnaturalizar al ADNc durante 10 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , se realizaron 40 ciclos de amplificación que incluían las siguientes condiciones:  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 segundos y  $60^{\circ}\text{C}$  por

30 segundos. Luego se hizo el correspondiente análisis con el *software MxPro QPCR* (Agilent Technologies).

#### 4.2.5 Determinación de GH de pejerrey por ELISA

Los ensayos de ELISA se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. Silvia Arranz en el IBR (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario).

Inicialmente, se inoculó una colonia de las transformantes BL21 *Codon Plus* (DE3) *Escherichia coli cells* (Novagen) en medio LB conteniendo los antibióticos cloranfenicol (20 µg/mL) y kanamicina (30 µg/mL) a una A600 de 0,5 y se agregó lactosa a una concentración de 20 g/L. Las células se crecieron toda la noche, luego se centrifugaron por 15 minutos a 5.000 xg y se resuspendieron en *buffer TE* (1/20 del volumen del cultivo). Las bacterias transformadas se incubaron por 1 hora a 37°C con 1 mg/mL de lisozima (*Roux-Ocefa*) y 2 µg/mL de *DNAsa I type 4* (*Sigma*), se lisaron células con prensa francesa y el lisado obtenido se diluyó 1/4 con agua destilada y se centrifugó por 15 minutos a 10.000 xg. El precipitado se resuspendió en una solución de Triton X-100 0,5% y EDTA 20 mM, se incubó 10 minutos y se lavó 3 veces con agua destilada. Los cuerpos de inclusión obtenidos se guardaron a -20°C hasta su posterior uso (Sciara *et al.* 2006).

A partir de los cuerpos de inclusión se generó una solución madre de hormona recombinante pjGH en *buffer TEA* (Apéndice-Tabla A.1), con una concentración de 16 mg/mL. A partir de la solución madre se hicieron diluciones seriadas desde 1250 ng/mL hasta 4,9 ng/mL en *PBS-T* 0,05% pH 7,6 (Apéndice-Tabla A.1) para realizar una curva de competencia. A 500 µl de solución de GH a las diferentes concentraciones se los incubó con 500 µl de anticuerpo anti-pjGH en una dilución 1/30.000 en *PBS-T* 0,05% pH 7,6 teniendo así un volumen final de competencia de 1 mL. En el tubo control (sin hormona) solo se incubaron 500 µl de la dilución de anti-pjGH 1/30.000 con 500 µl del *buffer* de dilución. Los sueros y medios de cultivo se incubaron de la misma manera. Se realizó la dilución correspondiente en *PBS-T* 0,05% pH 7,6. Los volúmenes de competencia de los sueros y medios de cultivo dependieron de los volúmenes disponibles de estos. Finalmente se agregó el mismo volumen que se agregó de suero o medio de cultivo de la solución de anti-pjGH. La incubación de la competencia se llevó a cabo a una temperatura de 25°C en rotación constante de los tubos durante 3 horas y 45 minutos.

En paralelo al inicio de la reacción de competencia se comenzó con el *coating* de la placa (ver a continuación), para luego sembrar 200 µl de las reacciones de competencias por duplicado o triplicado (según el volumen preparado debido al escaso material con que trabajamos) e incubar durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se hicieron 3 lavados de 2 minutos cada uno con *PBS-T* 0,1%, y se incubó con 100 µl de anticuerpo secundario anti-rabbit IgG HRP en un título de 1/2.500 en *PBS-T* 0,05% leche 4% pH 7,6 en estufa a 37°C durante una hora. Después se realizaron 3 lavados como se explicó anteriormente y finalmente se reveló incubando con 100 µl del reactivo único *TMB* (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) de *Wiener Lab.* por 30 minutos a 25°C y en oscuridad. Esta reacción se cortó con el agregado de 50 µl de solución de HCl 2 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

#### **4.2.6 Activación o *Coating* de la placa**

La hormona recombinante se diluyó en Tris 20 mM pH 9 hasta una concentración de 3.500 ng/mL. Luego se sembró 100 µl de esta dilución en los pocillos a ensayar y se incubó en estufa a 37°C por 2 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar 3 lavados de 2 minutos cada uno con *PBS-T* 0,1% pH 7,6 para eliminar el exceso de hormona no adherida a la placa. Luego posibles sitios de unión no específica se bloquearon incubando con 200 µl de *PBS-T* 0,05% leche 4% pH 7,6 a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se procedió a hacer los lavados como se explicó anteriormente.

#### **4.2.7 Análisis estadístico**

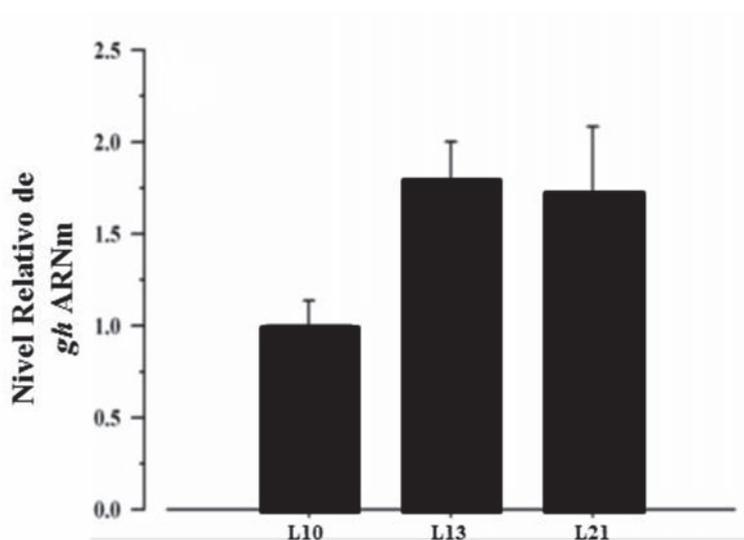
Las comparaciones estadísticas de los resultados se realizaron utilizando la prueba t de Student, o el análisis de varianza (ANOVA), según hubiera 2 o más grupos de datos para analizar. Cuando se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales utilizando ANOVA, se empleó el test de comparación múltiple de Dunnett. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas con valores de  $p < 0.05$ . Estos análisis se realizaron en el programa comercial *GraphPad Prism 5.0*.

## 4.3 Resultados

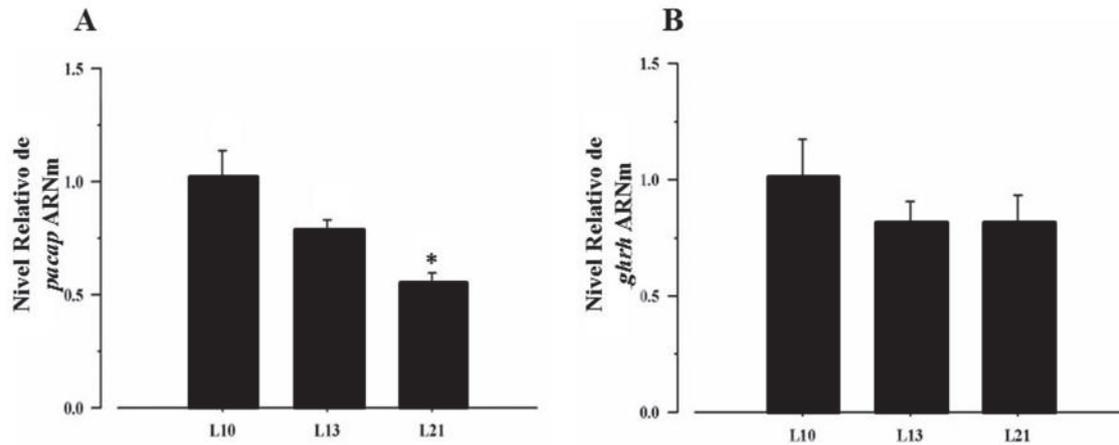
### 4.3.1 Efectos del contenido lipídico de la dieta

Se estudiaron los niveles de expresión de *prp-pacap* y *ghrh* en peces alimentados con dietas conteniendo cantidades crecientes de lípidos en el alimento.

Los datos sobre la expresión en la cabeza de alevines de pejerrey de 83 dpe se resumen en la figura 4.1 para *gh* y 4.2 para *prp-pacap* y *ghrh*. La expresión de *gh* no cambió significativamente entre los peces alimentados con diferentes dietas, aunque se observó un ligero aumento en los peces alimentados con las dietas L13 y L21 en comparación con los peces alimentados con dieta L10 (Figura 4.1). Por el contrario, la expresión de *prp-pacap* disminuyó progresiva y significativamente con el aumento del contenido de lípidos en la dieta, y fue significativamente menor en los peces alimentados con la dieta L21 en comparación con los peces alimentados con la dieta L10 (Figura 4.2.A). Finalmente, que *ghrh* no mostró diferencias significativas en los niveles de expresión comparando las diferentes dietas (Figura 4.2.B).



**Fig. 4.1:** Nivel relativo de expresión de ARNm de *gh* en cabezas de larvas de pejerrey alimentados con una dieta de diferentes porcentajes de lípidos, **L10:** 10%, **L13:** 13% y **L21:** 21%.  $\beta$ -Actina se utilizó como gen de referencia.

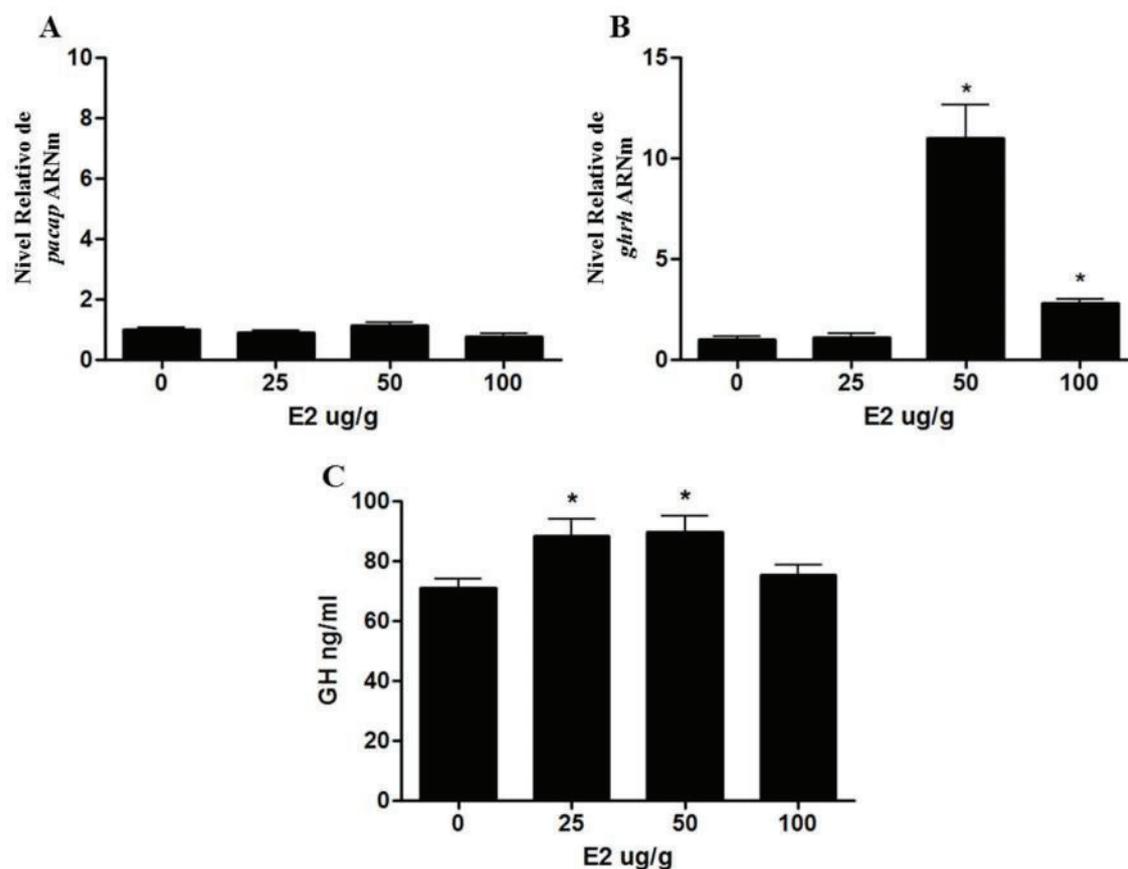


**Fig. 4.2:** Nivel relativo de expresión de ARNm de *prp-pacap* (A) y *ghrh* (B) en cabezas de larvas de pejerrey alimentados con una dieta de diferentes porcentajes de lipidos, **L10:** 10%, **L13:** 13% y **L21:** 21%.  $\beta$ -Actina se utilizo como gen de referencia. \*:  $p < 0,05$  vs. L10.

#### 4.3.2 Efectos de implantes de estradiol sobre la expresión de *prp-pacap* y *ghrh*

Este experimento se diseñó para ver cómo varían los niveles de expresión de *prp-pacap* y *ghrh* en el contexto de un aumento de la liberación de GH provocado por el aumento de los niveles de estradiol.

En nuestro experimento se observó que la administración de estradiol en concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g/g}$  (peso corporal) aumenta los niveles de GH en plasma (figura 4.3C). Paralelamente, estradiol estimuló significativamente la expresión de *ghrh* solo a una concentración mayor a 50  $\mu\text{g/g}$  (peso corporal) (Figura 4.3B), pero no modificó la expresión de *prp-pacap* a ninguna de las dosis utilizadas (Figura 4.3A). A la dosis más alta de estradiol (100  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal), no hubo efecto significativo en la liberación de GH, mientras que el aumento de la expresión de *ghrh*, aunque significativo, fue marcadamente menor (Figura 4.3B). Así mismo, utilizando una dosis de 25  $\mu\text{g/g}$  (peso corporal) de estradiol la expresión de *ghrh* no cambia respecto del control, aunque fue suficiente para estimular la liberación de GH (Figura 4.3A y C).



**Fig. 4.3:** Nivel relativo de expresión de ARNm de *prp-pacap* (A) y *ghrh* (B) en hipotálamo de pejerrey, y de GH (C) en plasma de pejerrey, tratados con diferentes concentraciones de estradiol (E2).  $\beta$ -Actina se utilizó como gen de referencia.  
\*:  $p < 0,05$  vs. 0.

## 4.4 Discusión

### 4.4.1 Efectos del contenido lipídico de la dieta

En nuestro experimento no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los peces al final del ensayo de alimentación de 56 días, aunque se observó un ligero aumento en el peso corporal final en los peces alimentados con el mayor contenido de lípidos en la dieta (dieta L21). Siendo este aumento significativo a los 35 días del experimento ( $53.4 \pm 3.3^a$  en L10,  $56.5 \pm 3.3^a$  en L13 y  $69.9 \pm 3.5^b$  en L21; Gómez-Requeni *et al.* 2012). Aunque los requerimientos nutricionales son específicos para cada especie de peces, en la lubina el aumento del contenido de lípidos en la dieta del 10 al 30% condujo a un aumento significativo del peso corporal final de las larvas, lo que sugiere que las rápidas tasas de crecimiento inicial en larvas de peces y alevines requieren dietas de alta energía (Zambonino-Infante y Cahu 1999).

En los peces, PACAP se considera como un potente estimulador de la liberación de GH, así como lo demuestran en el trabajo de Sze *et al.* (2007), donde PACAP-27 y PACAP-38 elevan GH en una manera dependiente de la dosis y el tiempo en la carpa herbívora.

En estudios anteriores llevados a cabo en varias especies de peces, como trucha arcoíris (Krueckl y Sherwood 2001), el *zebrafish* (Krueckl *et al.* 2003), y el bacalao (Xu y Volkoff 2009) se vio que PACAP se expresa en las primeras etapas de desarrollo, dentro del rango de pocas horas/días después de la fertilización en coincidencia con el último estadio de blástula. Esta expresión temprana en embriones de peces y larvas y la casi exclusivamente detección de PACAP en el cerebro de peces (Sze *et al.* 2007, Ji *et al.* 2011) corroboran el papel crucial de PACAP durante el desarrollo temprano de los peces.

Además de su papel como secretagogo de GH, las inyecciones intraperitoneales (IP) e intracerebroventriculares (ICV) de PACAP suprimen la ingesta de alimentos (efecto anorexigénico) en el *goldfish* (Matsuda *et al.* 2006, 2007), corroborando que PACAP está implicado en la regulación de la ingesta de alimentos. Sin embargo, en esta última especie no se observaron cambios en el ARNm de *pacap* ni en el del receptor PAC1 entre los peces alimentados y en ayunas, mientras que una alimentación excesiva durante 7 días indujo un aumento significativo en la expresión de ambos genes (Matsuda *et al.* 2005b). Estos resultados sugieren que la síntesis de PACAP y del receptor PAC1 podría ser inducida por la alimentación excesiva con el fin de suprimir la ingesta de alimentos y, por lo tanto, PACAP actuaría como una señal de saciedad en el *goldfish*. En el bacalao, la expresión génica de *pacap* no se vio afectada por un período de ayuno de 30 días, pero aumentó significativamente durante los 10 días de re-alimentación en comparación con un grupo control alimentado permanentemente (Xu y Volkoff 2009).

El aumento en los niveles del ARNm de *pacap* durante el período de re-alimentación fue consistente con la hipótesis de la acción de PACAP como una señal de saciedad en un estado hiperfágico tras un largo periodo de ayuno. Xu y Volkoff (2009) no muestran los datos sobre el consumo de alimento ya que el grano fino de la comida ofrecida a los peces hizo inviable su cuantificación. Sin embargo, nosotros observamos una mayor voracidad y actividad en la alimentación por un período más largo de tiempo en los peces alimentados con la dieta L21 (Gómez-Requeni *et al.* 2012), que estaría de

acuerdo con los niveles más bajos de ARNm de *prp-pacap* encontrados en pejerreyes alimentados con esta dieta, en el final del período experimental. Respecto a esto, es interesante observar que en un experimento similar que se desarrolló con juveniles de pejerrey se registró un mayor consumo de comida en los peces alimentados con 25% de lípidos en la dieta, en comparación con los peces alimentados con una dieta baja en lípidos (Gómez-Requeni *et al.* 2019). Alternativamente, Nakata y Yada (2007) mostraron que, en los mamíferos, PACAP potencia el almacenamiento de lípidos en los adipocitos estimulado por la insulina. En este contexto, la disminución de la expresión de transcritos de ARNm de *prp-pacap* en los peces alimentados con 21% de lípidos en la dieta también serviría para disminuir el almacenamiento de lípidos mediado por la insulina, favoreciendo la capacidad de los peces para liberar rápidamente sustratos energéticos disponibles y sostener altas tasas de crecimiento.

#### **4.4.2 Efectos de implantes de estradiol sobre la expresión de *prp-pacap* y *ghrh***

Estudios previos mostraron que los tratamientos con estradiol aumentaron los niveles de GH en suero en diferentes especies de peces, tales como el *goldfish* (Trudeau *et al.* 1992, Canosa *et al.* 2002), la trucha arcoíris (Holloway y Leatherland 1997), y el híbrido de tilapia *Rocky mountain* (Melamed *et al.* 1995). Como se esperaba en el pejerrey se pudo observar un aumento significativo en los niveles de GH plasmático utilizando dosis de estradiol de 25 y 50  $\mu\text{g/g}$  (peso corporal), similar a lo observado en *goldfish* a partir de los 50  $\mu\text{g/g}$  (peso corporal) de estradiol (Canosa *et al.* 2002). Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de ARNm de *prp-pacap*, pero sí hubo un aumento significativo en los niveles de ARNm de *ghrh* utilizando concentraciones de 50-100  $\mu\text{g/g}$  (peso corporal) de estradiol. En trabajos anteriores en *goldfish* se observó un aumento en la expresión de ARNm de *prp-pacap* luego de la administración de 100  $\mu\text{g/g}$  (peso corporal) de estradiol (Canosa *et al.* 2007). Sin embargo, este efecto no fue observado en el pejerrey a ninguna de las dosis ensayadas.

Cuando se expusieron a E2 cultivos celulares de hipófisis de *goldfish* no hubo cambios en el contenido celular de GH, pero se estimuló la respuesta de los somatotrofos a GnRH (Canosa *et al.* 2007). Tampoco se pudo observar cambios en la expresión de ARNm de *gh* en cultivos primarios de células de hipófisis de *zebrafish* cuando se utilizó concentraciones de 0, 1, 10 y 100  $\text{ng/g}$  (peso corporal) de estradiol (Lin y Ge 2009).

Estos trabajos nos ayudan a comprender que la regulación de la expresión y liberación de GH no ocurre de la misma manera en las diferentes especies de peces. Así, en el caso de nuestro modelo se podría decir que el estradiol estimula un aumento en la expresión de *ghrh* en una concentración mayor a 50 µg/g (peso corporal), pero no de *prp-pacap*, además, aumenta los niveles de GH en plasma en concentraciones de 25 y 50 µg/g (peso corporal).

En estudios previos en *goldfish* se vio que los estímulos que aumentan los niveles circulantes de GH paradójicamente aumentan también la expresión de la SS14 (Canosa *et al.* 2002). Estos resultados se interpretaron como una evidencia más que SS14 ejerce una inhibición tónica sobre GH y que aumenta concomitantemente al aumento de GH, manteniendo su secreción bajo un estricto control. Se demostró además que es la misma GH la que estimula la expresión hipotalámica de SS14, ya que al inmunoneutralizar GH a nivel cerebral, administrando un anticuerpo anti-GH en forma ICV, la expresión hipotalámica de SS14 disminuyó (Canosa *et al.* 2007). De esta forma se podría hipotetizar que a 50 µg/g (peso corporal) de estradiol estimularía la expresión de *ghrh* generando un aumento significativo de GH y que a valores mayores la estimulación de SS14 llegaría a revertir el efecto sobre GHRH. De todas formas, esta hipótesis debe ser probada experimentalmente. Otra conclusión que se puede sacar de estos resultados es que *prp-pacap* no estaría involucrado en la regulación de GH en el contexto de la reproducción en pejerrey.

## **Capítulo 5**

### **Efecto *in vitro* de los péptidos PACAP, PRP y GHRH sobre la expresión y liberación de GH en cultivos primarios de células hipofisarias**

#### **5.1 Introducción**

#### **5.2 Materiales y métodos**

#### **5.3 Resultados**

#### **5.4 Discusión**

## 5.1 Introducción

Como ya se mencionó anteriormente en el capítulo 1.2, el eje somatotrófico formado por el hipotálamo, la hipófisis y el hígado es el que regula el crecimiento somático de diversas maneras. Los factores hipotalámicos estimuladores más importantes son GHRH y PACAP y el inhibidor más importante es SS14, entre otros. Previamente, se había comentado que GHRH es más potente que PACAP para estimular la liberación de GH en cultivos primarios de células somatotróficas de adenomas humanos (Desai *et al.* 1994) y también que la administración intravenosa de PACAP no modifica los niveles plasmáticos de GH (Chiodera *et al.* 1996). Se sabe que PACAP ejerce efectos pleiotrópicos incluyendo la modulación de la liberación de neurotransmisores, vasodilatación, broncodilatación, activación de la motilidad intestinal, aumento de la insulina y la secreción de histamina, así como la estimulación de la multiplicación y/o diferenciación celular (Vaudry *et al.* 2000). En peces, PACAP de mamíferos induce la estimulación de la liberación de GH en *goldfish* (Wong *et al.* 2000), células hipofisarias de anguila europea (Montero *et al.* 1998) y rodaballo (Rousseau *et al.* 2001), y en salmón rojo se vio el mismo efecto usando PACAP homólogo (Parker *et al.* 1997).

La administración de PACAP de mamífero a cultivos celulares de hipófisis de ratas (Velkeniers *et al.* 1994) y de anguila europea (Rousseau *et al.* 1999) provoca un aumento significativo en la expresión de ARNm de *gh* y en la liberación de GH. Además, la actividad estimuladora de PACAP sobre la liberación de GH en cultivos celulares de hipófisis bovinas se inhibió en presencia de SS14 (Hashizume *et al.* 1994; Vaudry *et al.* 2000).

GHRH, en su mayor parte, actúa mediante la estimulación de la producción y liberación de GH en la hipófisis. Así, se vio que en cultivos de células de *goldfish* aumenta la liberación de GH de manera dosis dependiente con la concentración de GHRH (Lee *et al.* 2007). También se vio cambios de manera dosis dependiente de GHRH en la expresión y liberación de GH en cultivos celulares de mero (Qian *et al.* 2012). Sin embargo, hay fuentes extra-hipofisarias de GHRH, tanto en peces como en mamíferos. Se detectó producción de GHRH en varios tejidos como riñón, hígado, intestino, branquias, ovario, páncreas y miocardio (Miranda *et al.* 2002; Lee *et al.* 2007; Qian *et al.* 2012; Barabutis y Schally 2010; Kiaris *et al.* 2011).

En cuanto a PRP, lo que se conoce es mucho menos comparado con PACAP o GHRH. En el *goldfish* se mostró que PRP, en lugar de actuar como una hormona liberadora de GH, funciona como una hormona reproductiva (Tam *et al.* 2011). Debido a que PRP en vertebrados no mamíferos anteriormente era conocido como péptido GHRH o GHRH-like, la mayoría de los estudios realizados en el pasado se centraron en buscar su capacidad en la liberación de GH como en mamíferos. Los datos así obtenidos, no coincidían con los de GHRH. En ellos se observó una débil actividad de PRP en la liberación de GH, ya sea utilizando PRPs purificados o sintéticos.

Cuando se estudió la distribución de PRP y el receptor PRP midiendo sus transcritos de ARNm en diferentes tejidos del *goldfish* se encontró que los principales sitios de expresión son el cerebro, la hipófisis y las gónadas, que corresponden al eje cerebro-hipófisis-gonadal que regula la reproducción en los peces teleósteos (Sohn *et al.* 2001). También se comprobó que la variante gfPRP *salmon-like* es un péptido biológicamente activo y que utiliza la vía del AMPc tras activar su receptor específico. Además, se demostró que gfPRP *salmon-like* tiene acción estimulante de la transcripción de las subunidades LH $\beta$  y FSH $\beta$  en la hipófisis (Tam *et al.* 2011).

Aunque se caracterizó un receptor altamente específico para PRP en especies de vertebrados no mamíferos, no se pudo aislar un receptor equivalente en mamíferos. Esta ausencia de un receptor específico para PRP, sugiere que las funciones de PRP podrían haberse perdido en los mamíferos debido a la ausencia de su receptor (Lee *et al.* 2007).

## **5.2 Materiales y métodos**

### **5.2.1 Animales y disección de la hipófisis**

Los ejemplares de pejerrey utilizados en estos estudios se criaron en las mismas condiciones que se describieron anteriormente (sección 2.2.1) en la unidad de acuicultura del INTECH. Para estos ensayos se utilizaron ejemplares juveniles de aproximadamente 1 año sin distinguir entre machos o hembras. El manejo, captura, procedimiento de anestesia y sacrificio siguió los lineamientos descriptos anteriormente (sección 2.2.1), en acuerdo con las normas de manejo de animales de laboratorio (*UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, <http://www.ufaw.org.uk/pubs.htm#Lab>). De estos peces se disecaron las glándulas

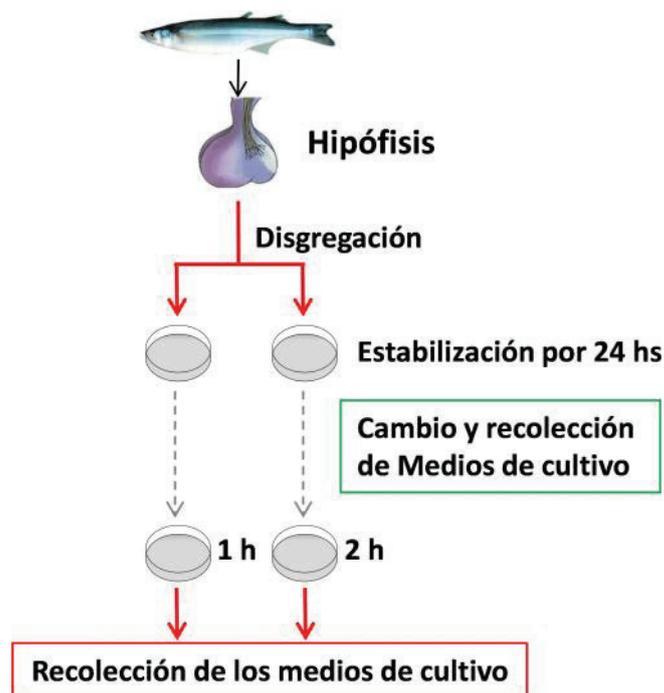
hipófisis, las cuales se colectaron en un tubo Falcon de 15 mL conteniendo *PBS*, pH 7,4 frío y se transportaron en hielo al laboratorio.

### 5.2.2 Cultivos celulares

Las hipófisis obtenidas se incubaron en *PBS* conteniendo 0,5% (p/v) de tripsina (*Sigma*) durante 15 minutos a 37°C. Luego las células se disgregaron mecánicamente por medio de varios pasajes (10 veces) a través de una aguja 21G. A la suspensión de células así obtenida se le agregó 1 mL de inhibidor de tripsina (*Sigma*) en una concentración 1 mg/mL en *PBS* y se incubó a 37°C, por 5 minutos. Después las células se lavaron tres veces con 1 mL de medio de cultivo M199, centrifugando a 500xg por 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron en 1 mL de medio M199. El número de células viables se determinó por exclusión de azul de tripano, en cámara de Neubauer y con la ayuda de un microscopio invertido.

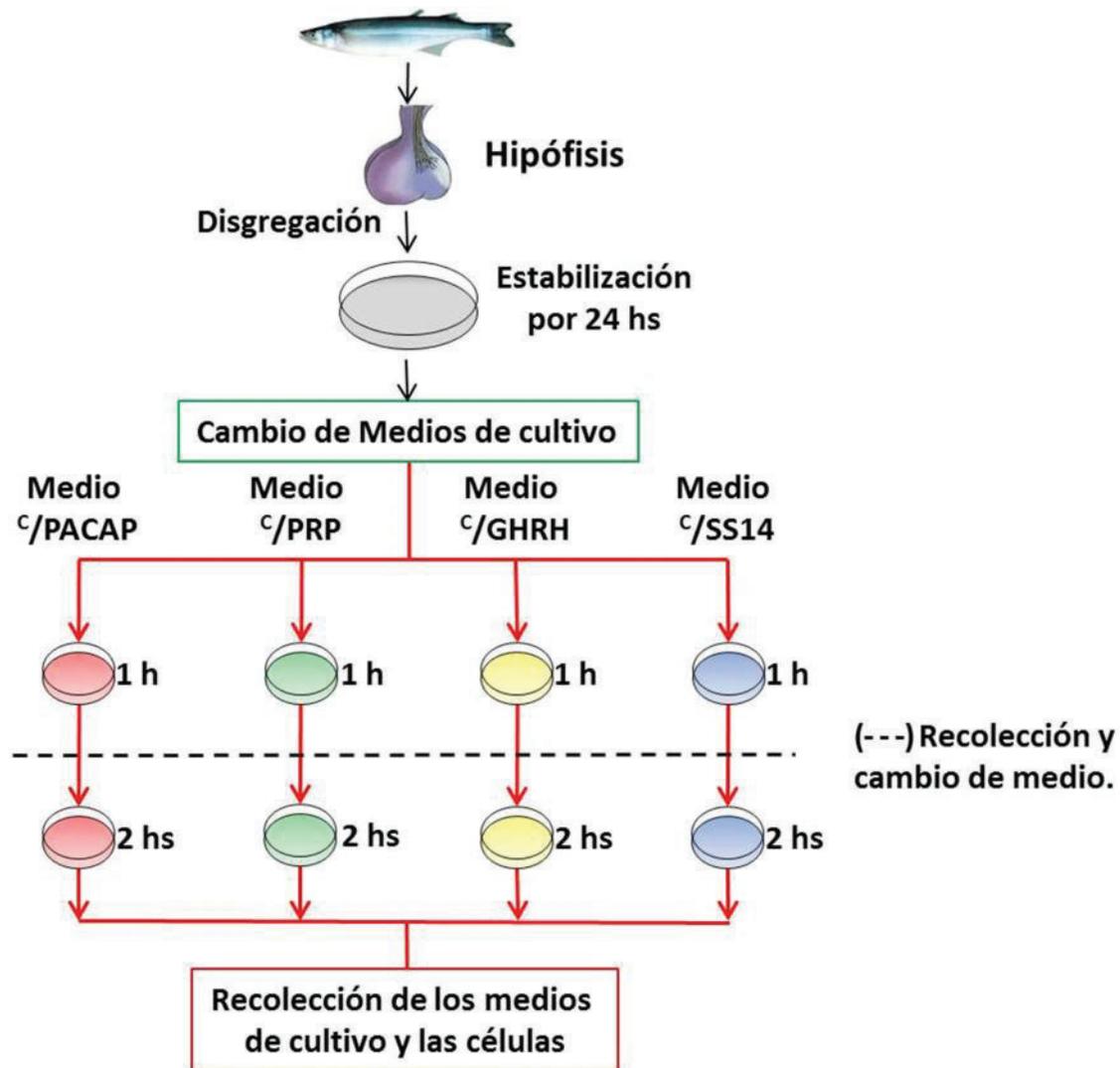
Inicialmente se realizó un ensayo para determinar los tiempos de cultivo y la capacidad de las células de secretar GH (Figura 5.1). De este modo, se sembraron las células en placa de 24 pocillos, en una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo con un volumen final de 1 mL. Las células se incubaron por 24 horas para permitir que las mismas se adhieran a la placa y se estabilicen. Al cabo de ese tiempo se retiró el medio y se reemplazó por 1 mL de medio fresco, el cual se retiró al pasar una o dos horas. Los medios de cultivo colectados de esta manera se guardaron a -20°C hasta la determinación de la concentración de GH por ELISA.

Los experimentos diseñados para determinar el efecto de los neuropeptidos sobre la expresión y secreción de GH *in vitro* se realizaron en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Los tratamientos con péptidos se realizaron por duplicado por 1 hora inicial seguido de un segundo período de tratamiento de 2 horas (Figura 5.2). Como control una hora y dos horas en el posterior experimento, se utilizaron las mismas muestras del experimento de estabilización (Figura 5.1). Los péptidos se agregaron al cultivo de células disueltos en medio M199 en una concentración final de 10 nM. Las células se cultivaron en estufa (Thermo Fisher Scientific, Forma Serie II Wáter Jacket model 3111) a 23°C con 5% de CO<sub>2</sub>, provista de una serpentina rerefrigerante, conectada a un baño termostático con circulación Haake A10 (Thermo Fisher Scientific). De esta manera la estufa puede mantener 23°C independientemente de la temperatura ambiente y la época del año.



**Fig. 5.1:** Esquema del experimento de estabilización del cultivo celular. Se extrajo hipófisis de pejerrey y se disgregó para hacer los cultivos celulares. Los mismos se estabilizaron durante 24 horas y luego una hora y dos horas más con medio de cultivo fresco. Finalmente, los medios de cultivo se recolectaron para posterior estudio.

Al final del experimento, las células adheridas a la placa se levantaron con 1 mL de Trizol (Invitrogen) y se procedió a la extracción de ARN y síntesis de los respectivos cDNAs como se describió en el capítulo 2, secciones 2.2.2 página 48 y 2.2.3, página 49 respectivamente. Los niveles de expresión de *gh* se determinaron por medio de la técnica de qPCR como se describe a continuación.



**Fig. 5.2:** Esquema del experimento de cultivo celular. Se extrajo hipófisis de pejerrey y se disgregó para hacer los cultivos celulares. Los mismos se estabilizaron durante 24 horas y luego fueron tratados con los diferentes péptidos (PACAP, PRP, GHRH y SS14) por 1 hora inicial seguida de otro periodo de 2 horas. Finalmente, los medios de cultivo y las células se recolectaron para posteriores estudios.

### 5.2.3 Determinación de los niveles de expresión de *gh*

La determinación de los niveles de ARNm de *gh* se realizó por qPCR como se describió en el capítulo 2, sección 2.2.12, página 54 utilizando los *primers* GH-f1 y GH-r1 (Apéndice-Tabla A.2) en una concentración final de 1,5  $\mu$ M. La amplificación por qPCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 4, sección 4.2.4

### 5.2.4 Determinación de GH de pejerrey por ELISA

La determinación de las concentraciones de GH en el medio de cultivo se realizó de la manera descrita en el capítulo 4, secciones 4.2.5 y 4.2.6.

Brevemente, 500 µl de la curva y los medios de cultivo diluidos ( $\frac{1}{2}$  y  $\frac{1}{4}$ ) con *PBS-T* 0.05% pH 7,6 se incubaron con 500 µl de una dilución 1/30.000 del anticuerpo anti-GH en *PBS-T* 0.05% pH 7,6. La incubación se llevó a cabo a una temperatura de 25°C en rotación constante de los tubos durante 3 horas y 45 minutos. Al cabo de ese tiempo, 200 µl de la incubación de la curva y los medios con anticuerpo se sembraron en placa de 96 pocillos activada con GH recombinante como se describiera en el capítulo 4, sección 4.2.5, por duplicado para las muestras y triplicado para la curva de calibración. Las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego de incubar por una hora con 100 µl de anticuerpo secundario anti-rabbit IgG HPR diluido 1/2.500 en solución de bloqueo (*PBS-T* 0.05% leche 4% pH 7,6) y revelar con 100 µl del reactivo único *TMB* (*Wiener Lab*) por 30 minutos a 25°C, en oscuridad, se midió la absorbancia a 450 nm.

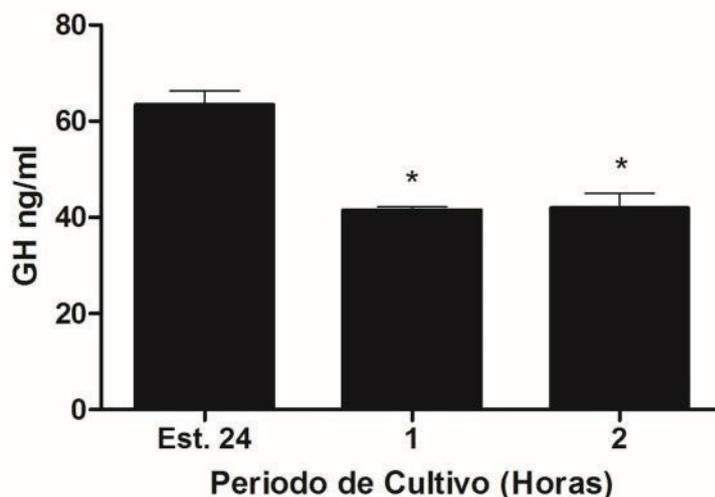
### **5.2.5 Análisis estadístico**

Las comparaciones estadísticas de los resultados se realizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA), seguido por un test de comparación de Dunnett. Se consideraron diferencias significativas con valores de  $p < 0,05$ . Estos análisis se realizaron en el *software* comercial GraphPad Prism 5.0.

## **5.3 Resultados**

### **5.3.1 Puesta a punto de los cultivos primarios de células hipofisarias**

En primer lugar, se observó la liberación de GH cada una hora, comparando con la liberación a las 24 horas de estabilización de las células con medio de cultivo sin tratamiento. Luego de 24 horas de incubación en medio de cultivo se vio que las células eran viables y seguían adheridas a la placa de cultivo. Además, las células fueron capaces de liberar GH al medio en estas condiciones tanto luego de 24 horas de incubación como de 1 o 2 horas adicionales, incubadas en las mismas condiciones (Figura 5.3).



**Fig. 5.3:** Cantidad de GH liberado al medio en cultivos primarios hipofisarios sin estímulos durante 1 o 2 horas, comparado con los valores de estabilización del cultivo por 24 horas iniciales (Est. 24). \*:  $p < 0,05$  vs. Est. 24.

Lo que se puede apreciar es que la concentración de GH liberada al medio de cultivo durante 1 o 2 horas permanece estable. Además, los niveles de GH secretada al medio de cultivo luego de las 24 horas de estabilización iniciales fue levemente superior (20%) a lo liberado en las sub-siguientes horas (1-2 horas). Esto podría interpretarse como que la tasa de secreción de GH por hora en el periodo de incubación fue mayor que la tasa de secreción por hora en el periodo de estabilización de 24 horas (Figura 5.3). En cultivo de células de hipófisis de rodaballo (citado: *Psetta máxima*, nombre actual: *Scophthalmus maximus*) se observó liberación de 50 ng de GH en 62.500 células cultivadas por día (Rousseau *et al.* 2001). En pejerrey fue de 63 ng de GH en 250.000 células cultivadas en 24 horas, teniendo en cuenta la cantidad de células cultivadas podríamos decir que en pejerrey hay una menor liberación de GH *in vitro* en comparación con rodaballo, esto se puede deber a la presencia de factores inhibitorios presentes en la preparación inicial de las células y/o a un efecto inhibitorio de la misma GH u otros factores secretados durante el periodo de estabilización de 24. De todos modos, lo que se muestra aquí es que las células están viables y son capaces de secretar GH.

De esta manera se decidió que, en los experimentos sucesivos, luego de dispersar las células, estas se incubarían 24 horas o por toda la noche, y se reemplazaría el medio por medio fresco en presencia de 10 nM de los péptidos hipotalámicos a

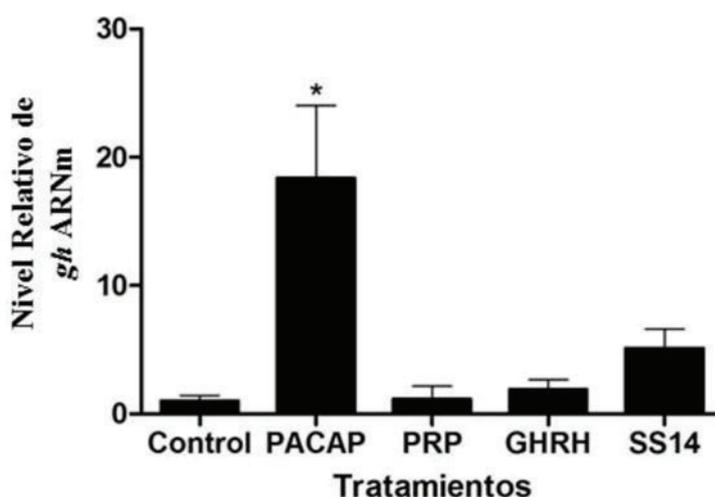
estudiar. El valor de 10 nM utilizado surgió de la revisión bibliográfica (Sze *et al.* 2007; Levy *et al.* 2010; Levy y Degani 2011; Qian *et al.* 2012).

### 5.3.2 Determinación de los efectos de PACAP, PRP y GHRH sobre los niveles de expresión de *gh* en cultivos primarios de células hipofisarias

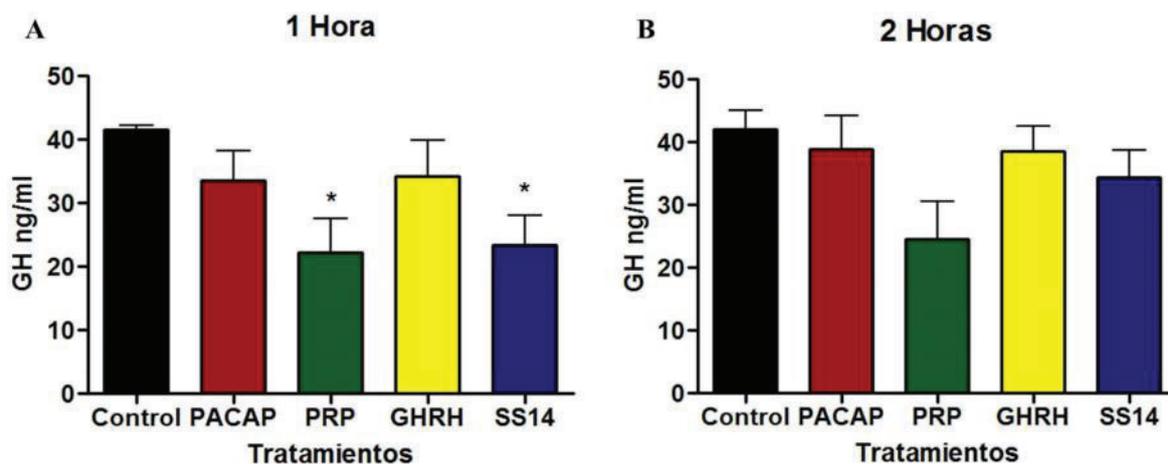
Luego del tratamiento con PACAP a una concentración de 10 nM por tres horas (una hora inicial más dos horas finales) de células de hipófisis de pejerrey en cultivos primarios, se vio un aumento de la expresión de *gh* respecto al control (medio de cultivo solo). Ninguno de los otros péptidos testeados (PRP, GHRH o SS14) tuvieron efecto sobre la expresión de *gh* en estas condiciones (Figura 5.4).

### 5.3.3 Liberación de GH

Los tratamientos de los cultivos primarios de células hipofisarias durante 1 o 2 horas con 10 nM tanto de PACAP como de GHRH no tuvieron efectos significativos. Sin embargo, hubo una disminución significativa cuando los cultivos se trataron tanto con PRP como con SS14 luego de una hora de incubación (Figura 5.5 A). El efecto dejó de ser significativo luego de 2 horas adicionales de incubación (Figura 5.5 B).



**Fig. 5.4:** Nivel relativo de expresión de ARNm de *gh* de cultivos primarios hipofisarios utilizando como estímulo 10nM de PACAP, PRP, GHRH y SS14, o medio solo (CTRL) durante 3 horas. C: Control; PC: PACAP; P: PRP; G: GHRH; S: SS14.  $\beta$ -Actina se utilizó como gen de referencia.  $p < 0,05$  vs. Control.



**Fig. 5.5:** Porcentaje de liberación de GH utilizando el método de ELISA en cultivos primarios hipofisarios estimulados con 10nM de PACAP, PRP, GHRH, SS14, o medio solo (Control) durante **A:** 1 hora y **B:** 2 horas. \*:  $p < 0,05$  vs. Control.

## 5.4 Discusión

### 5.4.1 PACAP

Como se comentó anteriormente en cultivos primarios de hipófisis de salmón rojo se ve diferencias significativas en la liberación de GH utilizando PACAP sintético como estímulo en concentraciones de 1 nM en adelante, con un tiempo de incubación de 4 horas (Parker *et al.* 1997). En anguila europea ocurrió lo mismo, utilizando una concentración de 1.000 nM de PACAP heterólogo con 24 horas de incubación (Montero *et al.* 1998).

En otro trabajo demostraron que PACAP heterólogo estimula directamente la transcripción de ARNm y liberación de GH en la carpa herbívora utilizando concentraciones de 10 nM del péptido, obteniendo picos de liberación de GH a los 10-20 minutos (Sze *et al.* 2007).

En este sentido, en cultivos primarios de células hipofisarias de *zebrafish* se mostró algo similar: PACAP (200 nM) generó un aumento significativo en la expresión de ARNm de *gh* a las 72 horas (Lin y Ge 2009).

Más allá de que los tiempos y concentración en algunos casos son algo diferentes a los nuestros, el resultado es coincidente con lo encontrado a nivel expresión de ARNm de *gh* en cultivos primarios de hipófisis de pejerrey incubados con PACAP. Sin embargo, más allá que se sugirió que en teleósteos PACAP actúa como un potente secretagogo de GH, en nuestro modelo y condiciones experimentales no observamos cambios en la liberación de GH respecto a los controles.

En un estudio realizado con cultivos primarios de células hipofisarias de *gourami* azul, utilizando la misma concentración de PACAP (10 nM) que la utilizada en el presente trabajo en pejerrey, se observó que en células provenientes de hembras vitelogénicas no hubo efecto significativo en la expresión de *gh* luego de 24 o 48 horas de cultivo (Levy *et al.* 2010). Sin embargo, cuando se utilizaron células provenientes de machos con testículos maduros que no mostraban comportamiento reproductivo, vieron que 10 nM de PACAP indujo una disminución en la expresión de *gh* tanto a 24 como 48 horas de cultivo (Levy *et al.* 2010). Estos autores sugieren que PACAP estaría relacionado con la reproducción en esta especie y podría regular negativamente la transcripción de ARNm de *gh* sólo en los machos de *gourami* azul no reproductivos maduros, posiblemente en forma indirecta por medio de la acción paracrina de otros factores presentes en el cultivo de células dispersas (Levy *et al.* 2010). En el rodaballo, el tratamiento de células hipofisarias con PACAP heterólogo, por 24 horas, no generó diferencias significativas en la liberación de GH a ninguna de las concentraciones testeadas (0,01 a 1.000 nM). Por otro lado, la incubación con SS14 desde 1 nM en adelante produjo una inhibición de la liberación de GH en 24 horas de cultivo (Rousseau *et al.* 2001). En este trabajo, la co-incubación de 1 nM de SS14 y concentraciones crecientes de PACAP (1 a 1.000 nM) permitió evidenciar el efecto estimulador de PACAP cuando se lo compara con la incubación de SS14 sola. En estas condiciones el máximo de liberación de GH se obtuvo con 10 nM de PACAP, aunque los valores de GH liberada al medio fueron iguales o menores al control sin estimular (Rousseau *et al.* 2001).

Como se dijo anteriormente, no se observó liberación de GH con PACAP en pejerrey, lo cual puede deberse a tiempos cortos de cultivo, aunque como también se mencionó anteriormente, hay trabajos en los que se usaron tiempos muy similares a los nuestros (Parker *et al.* 1997; Sze *et al.* 2007) y otros en los que los tiempos fueron mayores (Montero *et al.* 1998; Lin y Ge 2009; Levy *et al.* 2010), sugiriendo que el tiempo de cultivo más adecuado dependerá de la especie que se estudie. Así mismo, la concentración utilizada (10 nM) es la misma a la utilizada en la mayoría de los trabajos previamente citados, incluso en algunos casos se vio diferencias utilizando una concentración menor a 10 nM (Parker *et al.* 1997). Otra posible interpretación es que al estabilizarse el cultivo por 24 horas los somatotrofos pudieran estar liberando GH a su máxima capacidad, haciendo imposible evidenciar una estimulación ulterior, como se

vio en el rodaballo (Rousseau *et al.* 2001). Se necesitan realizar más estudios para descartar que la falta de respuesta de las células hipofisarias ante un desafío con PACAP liberando más GH sea consecuencia del protocolo utilizado en este ensayo o de factores propios de la regulación de GH en el pejerrey.

#### 5.4.2 GHRH

En cultivos celulares hipofisarios de una especie de mero se vieron resultados diferentes que en pejerrey respecto a la expresión de *gh*, utilizando como estímulo GHRH. Se observó un aumento significativo en la expresión de *gh* con concentraciones de 10 a 1.000 nM de GHRH sintético luego de 4 horas de estímulo. Además, también se observó liberación de GH, pero a partir de los 100 nM de GHRH (Qian *et al.* 2012).

Similarmente, Levy y Degani (2011) muestran un aumento en la expresión de *gh* con 10 nM de GHRH heterólogo en cultivo a partir de las 24 horas en el *gourami* azul. En cultivos de hipófisis del lenguado verde oliva también se vio un aumento de la expresión de *gh* a las 24 y 48 horas de incubación con 1.000 nM de GHRH homólogo (Nam *et al.* 2011).

En cultivos primarios de hipófisis de anguila europea con 1.000 nM de GHRH heterólogo durante 24 horas no se pudo detectar un aumento en la liberación de GH (Montero *et al.* 1998). Incluso cuando se duplico el tiempo de incubación (48 horas) tampoco se pudo observar liberación de GH, tanto en anguila europea como en rodaballo (Rousseau *et al.* 2001). Sin embargo, en cultivos de hipófisis de *goldfish* se probaron concentraciones crecientes de GHRH homólogo que estimularon la liberación de GH a partir de 10 nM y 4 horas de cultivo (Lee *et al.* 2007). El grupo de Grey y Chang (2013) tuvieron resultados similares utilizando los mismos cultivos, pero concentración de 100 nM de GHRH y en un tiempo muy inferior (a partir de los 5-10 minutos). Wang y colaboradores (2014) encontraron un aumento en la liberación de GH a partir de hipófisis de mero en cultivos con concentraciones desde 10 nM de GHRH homólogo y 3 horas de incubación.

Tomando en consideración los resultados de los trabajos que hicieron otros grupos podríamos decir que generalmente cuando se estimularon los cultivos celulares con GHRH se determinó un aumento tanto de la expresión de ARNm de *gh*, como de la liberación de GH al medio en los cultivos. Para determinar si los resultados obtenidos en pejerrey en este trabajo son específicos de esta especie o dependen de las condiciones

experimentales elegidas se necesita realizar más ensayos. En el futuro habrá que probar si aumentando el tiempo de incubación podría evidenciar un aumento de expresión y liberación de GH con la incubación de GHRH. Alternativamente, se debiera probar incubaciones en combinación con otros neuropéptidos como por ejemplo SS14 para evidenciar efectos de interacción entre ellos y dar más información sobre la regulación de la GH en esta especie.

### 5.4.3 PRP y SS14

Teniendo en cuenta que previo al 2007 (Lee *et al.* 2007) se consideró erróneamente que en peces PRP, que se codifica en el mismo gen que PACAP, era GHRH (nombrado también como GHRH-like; ver Capítulo 1, paginas 34-35, para más detalle), en los trabajos de ese periodo (los anteriores a 2007) se buscó su función como secretagogo de GH y se lo comparó con la actividad que PACAP presentaba en ese mismo sentido (ver Sherwood *et al.* 2000 y la literatura citada allí). En estos trabajos la capacidad de los péptidos en evocar la liberación de GH dependía del origen del péptido y de la especie en estudio, viéndose mayor consistencia y potencia con PACAP que con GHRH-like. La efectividad de este último era baja o nula en algunos casos como en anguila europea y rodaballo (Rousseau *et al.* 2001). La conclusión a la que se arribó a partir de estos trabajos fue que PACAP, y no GHRH, era el principal regulador positivo de GH en especies no mamíferas (Sherwood *et al.* 2000; Rousseau y Dufour 2004). Sin embargo, esta conclusión debe ahora hacerse extensiva a PRP y no asignársele al verdadero GHRH de peces (Lee *et al.* 2007). En este trabajo, Lee y colaboradores (2007) pudieron mostrar que PRP homólogo, en concentraciones de 0,1 a 1.000 nM, no estimuló la liberación de GH en cultivos de hipófisis de *goldfish* luego de 4 horas. Similarmente, en cultivos primarios de células de hipófisis de carpa herbívora no se vieron cambios en la liberación de GH utilizando como estímulo PRP homólogo en concentraciones desde 1 a 1.000 nM (Sze *et al.* 2007),

Más recientemente el grupo de Nam y colaboradores (2013) identificaron PRP (además de PACAP y su receptor PAC1) en el lenguado verde oliva y pudieron ver que se estimulaba la expresión de ARNm de *gh* utilizando PRP a una concentración de 100 nM a las 24 y 48 horas de cultivo y se perdía el efecto a las 72 horas en cultivos de células HINAE (línea celular embrionaria de peces) transfectadas con un vector de expresión para el receptor de PACAP tipo 1 (PAC1R). Sin embargo, el efecto de PRP

debió de ocurrir por la activación de un receptor aun no descrito, ya que PRP no afectó la producción de cAMP, la expresión de PAC1R y TNF $\alpha$ , como sí lo hizo PACAP (Nam *et al.* 2013). Estos resultados confirmaron la especificidad de PAC1R por PACAP y mostraron que PRP no interactúa con este receptor. Llamativamente, en estas células, PACAP no indujo cambios en la producción de mensajero de GH (Nam *et al.* 2013). Lamentablemente, el efecto de PRP de lenguado verde oliva no se testeó en cultivo primario de hipófisis, y queda así la duda si no será una respuesta particular de este tipo celular embrionario.

En cultivos de hipófisis de *gourami* azul vieron que 10 nM de PRP homólogo aumentó la expresión de ARNm de *gh* solo en machos, a las 48 horas de incubación (Levy y Degani 2011). Sin embargo, en cultivos primarios de hipófisis de *goldfish* donde se utilizaron concentraciones de 1 a 10.000 nM de PRP homólogo durante 18 horas no se vieron cambios en los niveles de ARNm de *gh* (Tam *et al.* 2011).

En los trabajos descritos anteriormente no se encontraron variación respecto a los controles en la expresión de ARNm de *gh* o liberación de GH, aunque hubo casos excepcionales donde se detectaron aumentos de dichos parámetros. De este modo, que PRP no haya estimulado la expresión y liberación de GH en el pejerrey podría ser esperable. Sin embargo y llamativamente, en pejerrey si se pudo ver una disminución en la liberación de GH luego de una hora de tratamiento. Este efecto dejó de ser significativo en incubaciones más largas. Estos resultados son muy interesantes ya que podrían representar un mecanismo contra regulatorio entre la función primaria de PRP (reproducción o alguna otra aun no descrita) con el crecimiento somático y la liberación de GH. De todos modos, es necesario hacer más estudios para poder confirmar un efecto inhibitorio de PRP sobre la liberación de GH.

En cuanto a SS14, la misma se utilizó como control, para asegurarnos que las células responden a los estímulos. Es sabido que SS14 aplicada a los cultivos de hipófisis produce un efecto inhibitorio en la liberación de GH al medio. Por ejemplo, en cultivos de hipófisis de *goldfish* pudieron observar que administrando SS14 sintética en concentraciones de 0,01 a 100 nM en pulsos de 2 minutos cada 30 minutos, se inhibía la liberación de GH (Lin *et al.* 1999). En rodaballo, se observó que utilizando SS14 a una concentración de 10 nM se inhibió la liberación de GH, en cultivos que duraron 24 horas (Rousseau *et al.* 2001). En cultivos de hipófisis de mero se observó una disminución de la liberación de GH a partir de las 3 horas de cultivo y utilizando

concentraciones desde los 10 nM de SS14 sintética (Wang *et al.* 2014). Luego, Wang y colaboradores (2016) utilizaron el mismo modelo de cultivo para ver el efecto de SS14 sobre la expresión de ARNm de *gh*. Utilizando concentraciones desde 10 nM de SS14 sintética por 24 horas, notaron que a pesar que la liberación de GH disminuía, la expresión a nivel de mensajero no resultó afectada. En pejerrey se pudo observar algo similar, una disminución significativa en la primera hora de cultivo mientras que no hubo cambios en la expresión de ARNm de *gh*. En apoyo de este resultado, estudios previos en mamíferos demostraron que SS14 no afecta la transcripción ni la traducción del gen de *gh* (Stachura 1977; Barinaga *et al.* 1985; Fukata *et al.* 1985; Gick y Bancroft 1987). Similarmente, tanto en trucha arcoíris como en la tilapia de Mozambique se vio que SS14 no altera los niveles de ARNm de *gh* (Melamed *et al.* 1996; Yada y Hirano 1992).

### 5.4.3 Resumen conjunto

Tal como se comentó anteriormente existe la posibilidad que al estabilizarse el cultivo por 24 horas los somatotrofos pudieran estar liberando GH a su máxima capacidad, haciendo imposible evidenciar una estimulación ulterior. En peces se considera que la liberación de GH esta fisiológicamente controlada por una acción tónica inhibitoria ejercida principalmente por SS14. Cuando la hipófisis es autotransplantada fuera del control hipotalámico, o se incuba *in vitro*, la liberación de GH aumenta (Ball *et al.* 1972; Peter 1973; Ingleton *et al.* 1973; Baker e Ingleton 1975). Esto podría explicar la razón por la cual no se ha detectado aumentos de GH producidos tanto por PACAP como por GHRH. Si esta hipótesis es correcta, también es esperable que se detecte muy claramente la acción de péptidos inhibitorios. De este modo, se pudo evidenciar, como era de esperarse, que 10 nM de SS14 inhibiera la liberación de GH. Interesantemente, este ensayo también permitió detectar, por primera vez, un efecto inhibitorio de PRP sobre la liberación de GH. De todos modos, este resultado requiere confirmación con más ensayos, en diferentes condiciones tanto de tiempo como concentración.

## **Capítulo 6**

### **Resumen Final y perspectivas futuras**

**6.1 *prp-pacap***

**6.2 *ghrh***

**6.3 Perspectivas a futuro en pejerrey**

## 6.1 *prp-pacap*

En este trabajo se describió la secuencia de *prp-pacap* de pejerrey como perteneciente al clado *catfish-like*. Aunque sería posible que también existiera una molécula *salmon-like* en el pejerrey, como ocurre en otros peces (Tam *et al.* 2007), hasta el momento no se pudo detectar. Nuestros resultados muestran que durante la transcripción del gen *prp-pacap* ocurre un *splicing* alternativo generando dos mensajeros de diferente tamaño. Este fenómeno también se observa en otras especies de peces (Tam *et al.* 2007), lo que sugiere que representa un mecanismo regulatorio importante. Como resultado de este mecanismo, se disocia la síntesis de ambos péptidos. Así, este *splicing* proporciona un mecanismo de control diferencial de la expresión de *pacap* respecto de *prp* (Adams *et al.* 2002, Tam *et al.* 2007), sugiriendo que en algunos contextos fisiológicos y/o tejidos la función de ambos péptidos puede ser diferente, incluso antagónica. Esto hace interesante estudiar la regulación de dicho *splicing* alternativo en función de los requerimientos fisiológicos de los distintos tejidos en cuanto a los efectos de PACAP y PRP en los mismos.

En cuanto a la expresión de *prp-pacap*, se vio una amplia distribución en el cerebro, encontrándose el transcrito largo y corto en la mayoría de los tejidos que lo comprenden.

Los estudios de mapeo cerebral por ISH de la distribución de células que expresan *prp-pacap* mostraron una gran prevalencia en áreas del telencéfalo y en varios núcleos del área preóptica y del hipotálamo. Además, se encontraron células que expresan *prp-pacap* en el hipotálamo caudal, el tálamo, el cerebro medio y posterior. Estas diferentes áreas y núcleos podrían estar relacionadas con la función de memoria, comportamientos motivados, control de la hipófisis, de la ingesta, el procesamiento de señales sensoriales y la respuesta motora coordinada.

Interesantemente la expresión en cerebro anterior de *prp-pacap* no correlacionó con las variaciones de la liberación de GH inducida por la administración de estradiol. Esto sugiere que el control de GH en un contexto hormonal relacionado con la reproducción no estaría mediado por PRP o PACAP. Tampoco se observó una correlación positiva de *prp-pacap* con la expresión de *gh* en peces alimentados con dietas ricas en lípidos. En este caso, el mayor contenido de lípidos en la dieta indujo a un aumento de los niveles de expresión de *gh* pero una concomitante reducción de la

expresión de *prp-pacap* sugiriendo que *pacap* pudiera estar relacionado con el comportamiento alimenticio y el balance energético.

Los estudios *in vitro* que realizamos, no pudieron mostrar un efecto de PACAP en la estimulación de la secreción de GH, pero sí de la expresión a nivel de mensajero de *gh*. Es posible que el tiempo de incubación no fuera suficientemente largo para evidenciar un aumento de la liberación de GH con el agregado de PACAP. Sin embargo, la incubación en presencia de SS14 por una hora inhibió la liberación de GH. Este efecto dejó de ser significativo con incubaciones más prolongadas. Estos resultados nos llevan a pensar que es posible que luego de estabilizarse por 24 horas en cultivo, los somatotrófos podrían estar liberando GH a su máxima capacidad, haciendo imposible evidenciar una mayor estimulación. Esto podría explicar por qué no se ha detectado aumentos de GH producidos tanto por PACAP como por GHRH (ver más abajo). Esta situación fue informada en el rodaballo (Rousseau *et al.* 2001) en el cual el efecto estimulador de PACAP solo se pudo comprobar co-incubando con SS14.

Un resultado que llamó la atención, fue observar un efecto inhibitorio de la liberación de GH al incubar las células de la hipófisis con PRP. La función de PRP no está del todo esclarecida, pero se sugiere que está involucrado en reproducción, al menos en el *gourami* azul, donde la estimulación de las células hipofisarias con PRP provocó un aumento en los niveles de transcripción en la subunidad  $\beta$ LH solo en hembras, mientras que, en machos, solo provocó un aumento en los niveles de ARNm de *gh* (Levy y Degani 2011). Estos datos fueron respaldados además por la expresión del receptor de PRP en células hipofisarias (Levy y Degani 2011). Por lo tanto, PRP puede actuar de manera diferente en los ejes gonadotróficos de machos y hembras, estimulando la expresión de gonadotropina en hembras y de *gh* en machos. Es posible que, como se señaló anteriormente las células en cultivo estén liberando GH al máximo y esto le da al sistema una gran sensibilidad para detectar inhibiciones. Hasta el momento solo se vio que PRP estimuló la expresión de *gh* en cultivo de células de la hipófisis de *gourami* azul (Levy y Degani 2011). Así, si la inhibición de GH encontrada en pejerrey es fisiológica y propia de la especie o un artefacto del sistema de cultivo, es algo que requiere más investigación.

## 6.2 *ghrh*

La secuencia del ORF de *ghrh* está altamente conservada entre las diferentes especies de peces, entre ellos *Oryzias latipes*. La expresión coincide con la de *goldfish* (Lee *et al.* 2007) y con mero (Qian *et al.* 2012) pero respecto a esta última fue más acotada porque en pejerrey solo se vio en hipotálamo. Además, comparada con la distribución de *prp-pacap*, la distribución cerebral del ARNm de *ghrh*, también fue mucho más restringida encontrándose solo en estructuras diencefálicas. Las células que expresan *ghrh* se observaron únicamente en la región ventral del hipotálamo y en algunos núcleos talámicos. En el hipotálamo, se encontraron células marcadas positivamente en el NLTP bordeando el ventrículo, en el NAT, en el NRL y en los núcleos talámicos DM y VM.

La expresión cerebral de *ghrh* no se modificó por la ingesta de dietas con contenido lipídico creciente, pero la administración de implantes de estradiol estimuló la expresión de *ghrh* en una concentración mayor a 50 µg/g (peso corporal), sugiriendo que GHRH podría estar involucrada en la regulación de la expresión y liberación de GH desencadenada por hormonas sexuales.

Cuando medimos el efecto de GHRH sobre la liberación de GH en cultivos primario de hipófisis, no pudimos observar un efecto estimulador como era esperable según los datos de la bibliografía (Montero *et al.* 1998; Levy y Degani 2011; Qian *et al.* 2012). Si bien no se puede descartar que tal vez fuera necesario una mayor concentración de GHRH y/o un mayor tiempo de incubación, para evidenciar un efecto estimulador de GHRH sobre los niveles de ARNm de *gh* y la liberación de GH en los cultivos celulares del pejerrey, otra alternativa también es posible. Como se mencionó anteriormente, es posible que los somatotrofos en cultivo, al perder el tono inhibitorio, estén produciendo y liberando GH a su máxima capacidad. De este modo, el efecto estimulador de GHRH no se pudo poner en evidencia. Si este fuera el caso, la co-incubación de GHRH y SS14 podría mostrar el efecto estimulador de GHRH en el pejerrey de manera similar a lo encontrado en el rodaballo (Rousseau *et al.* 2001).

## 6.3 Perspectivas futuras

El rol de PRP y su actividad biológica es un interrogante que nos hacemos como muchos otros colegas y sería de mucho aporte conocer en un futuro su implicancia en el

control de la hipófisis tanto en la liberación de GH como de otras hormonas hipofisarias. Además, en este trabajo se obtuvieron resultados interesantes sobre la expresión y liberación de GH, por lo tanto, sería esencial poder ver el efecto de GHRH y PACAP en combinación con SS14 y así determinar si realmente tienen efecto estimulador de GH en el pejerrey. Finalmente, y como se mencionó anteriormente, sería interesante analizar la regulación del *splicing* alternativo del transcripto de *prp-pacap* en distintos tejidos y contextos fisiológicos, lo cual podría ayudar a entender la actividad biológica de PRP ya que este *splicing* permite la síntesis de PACAP sin generar concomitantemente PRP, alterando la proporción de ambos péptidos.

## Apéndice

**Tabla A.1:** Lista de soluciones utilizadas para el clonado y caracterización de *prp-pacap* y *ghrh*.

<b>Buffer TE</b>	10mM Tricina-KOH (pH 8,5) + 1mM EDTA
<b>Buffer TAE</b>	40 mM Tris-HCl (pH 8,5) + 1 mM EDTA + 20 mM ácido acético
<b>Medio LB</b>	10 g triptona, 5 g extracto de levaduras, 5 g NaCl, 100µl NaOH10 N por litro preparado
<b>Medio LB-Agar</b>	Medio LB + 15 g/L de agar
<b>Solución FSB</b>	10 mM KAc + 45 mM MnCl <sub>2</sub> + 10 mM KCl + 10 mM CaCl <sub>2</sub> + 10% glicerol, (pH 6,4)
<b>Buffer R</b>	50 mM Tris-HCl (pH 8) + 1 mM EDTA + 100 mg/mL <i>RNsa A</i>
<b>Buffer L</b>	200 mM NaOH + SDS 1%
<b>Buffer N</b>	3M KAcO (pH 5,5)

### Sitios web utilizados:

<http://www.predisi.de/>: Utilizado para predecir posiciones dentro de cada gen, entre ellos, péptido señal, UTR 3' y 5', ORF, sitios de clivaje, longitud y composición de los mismos.

<http://align.genome.jp/>: Utilizado para realizar los árboles filogenéticos.

### Números de acceso de las bases de datos GenBank o Ensembl para PACAP:

Glucagón humano (BT006813), *Astatotilapia burtoni* (EU523856), *Carassius auratus* (de A.O.L. Wong, comunicación personal), *Clarias gariepinus* (EF524513), *Coregonus clupeaformis* (de Adams *et al.* 2002), *Ctenopharyngodon idella* (EF592488.1), *Danio rerio 1* (NM152885.1), *Danio rerio 2* (NM214715.1), *Gadus morhua* (DQ109988), *Gallus gallus 1* (U67275), *Gallus gallus 2* (U71185), *Hippoglossus hippoglossus* (de Adams *et al.* 2002), *Homo sapiens* (S83513), *Ictalurus punctatus* (AF321243), *Oryzias latipes 1* (ENSORLT00000014055), *Oryzias latipes 2*, (ENSORLT00000022363), *Mus musculus* (AB010149), *Oncorhynchus mykiss* (AF343977), *Odontesthes bonariensis* (JN228384), *Pleuronectes ferrugineus* (de Adams *et al.* 2002), *Protopterus dolloi* (EU935602), *Sparus aurata* (DQ659328.1), *Takifugu rubripes 1* (DQ659331), *Takifugu rubripes 2* (DQ659332), *Tetraodon nigroviridis 1* (ENSTNIT00000020483), *Tetraodon nigroviridis 2* (ENSTNIT00000022060), *Xenopus laevis* (NM001088478.1).

## Números de acceso de las bases de datos GenBank o Ensembl para GHRH:

Glucagón humano (BT006813), *Nothobranchius furzeri* (HADY01004946), *Nothobranchius kuhntae* (HAED01018498), *Lates calcarifer* (XM\_018681526), *Stegastes partitus* (XM\_008293503), *Haplochromis burtoni* (XM\_005933452), *Maylandia zebra* (XM\_004559935), *Pundamilia nyererei* (XM\_013909202), *Oreochromis niloticus* (XM\_013269954), *Danio rerio* (NM\_001080092.1), *Carassius auratus* (DQ991243.1), *Paralichthys olivaceus* (HQ402560), *Odontesthes bonariensis* (JN228385), *Epinephelus coioides* (GU966634), *Oryzias latipes* (DK092558), *Rattus norvegicus* (NM\_031577), *Mus musculus* (ENSMUST00000029172), *Homo sapiens* (ENST00000373614), *Bos Taurus* (NP\_847895), *Canis lupus familiaris* (CS804552).

**Tabla A.2:** Oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones para la obtención de las secuencias de *prp-pacap* y *ghrh*, y los análisis de expresión de las mismas y *gh*.

Nombre	Longitud	Secuencia
<b>SMART II™ A Oligonucleotide</b>	30pb	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
<b>3'-RACE CDS Primer A</b>	57pb	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) <sub>30</sub> V N-3' (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)
<b>5'-RACE CDS Primer A</b>	27 pb	5'-(T) <sub>25</sub> V N-3' (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)
<b>Universal Primer A Mix (UPM)</b>	45pb 22pb	<i>Long</i> (0.4μM): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAT CAACGCAGAGT-3' <i>Short</i> (2μM): 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
<b>Nested Universal Primer A (NUP)</b>	23pb	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
<b>olGHRH-f1</b>	18pb	5'-TCCAGTAAAGCGACTCTA-3'
<b>olGHRH-r1</b>	19pb	5'-CCTAACTCTCTGTCTGTAC-3'
<b>PjGHRH-f2</b>	18pb	5'-CCCATCACTGAACGACGA-3'
<b>PjGHRH-r1</b>	18pb	5'-CTTCTCCATGCTGTTGT-3'
<b>olGHRH f4</b>	17pb	5'-CCCCGCTCTACCCATCC-3'
<b>olGHRH r4</b>	18pb	5'-CAGCCGTTTGCCATAAT-3'
<b>PjGHRH f4</b>	17pb	5'-CTCAGAACGCCACGCTG-3'
<b>PjGHRH r4</b>	17pb	5'-CAGCGTGGCGTTCTGAG-3'
<b>GH-f1</b>	19pb	5'-AGAAGTAGCATTAGCGTAG-3'
<b>GH-r1</b>	20pb	5'-AACACTTTATTTTACACACG-3'
<b>FAP</b>	19pb	5'-ACATTCAAGTACTGGACTC-3'

**Tabla A.3:** Lista de soluciones utilizadas para el mapeo cerebral por ISH.

<b>PBS</b>	137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)
<b>PAF 4%</b>	Paraformaldehido al 4% en PBS
<b>TESPA</b>	<i>aminopropiltriehoxlano A 3648 Sigma</i>
<b>Proteinasa K</b>	4 µg/mL en 50 mM Tris-HCl (pH 8) + 5mM EDTA
<b>Solución de Hibridación</b>	50 % formamida + 300 mM NaCl + 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 5 mM EDTA + solución de Denhart 1X + 0,05 % tRNA + 10 % dextran sulfato
<b>Solución de Denhart 100X</b>	BSA 2 % + Ficoll 400.000 2 % + PVP 40.000 2 % + SSPE 20X 15 %
<b>Solución SSPE 20X</b>	3 M NaCl + 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (pH 7,4)
<b>Solución Citrato (SSC)</b>	3 M NaCl + 300 mM Citrato de sodio (pH 7)
<b>Buffer TP</b>	100 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl (pH 7,5)
<b>Buffer NTE</b>	500 mM NaCl + 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 5 mM EDTA
<b>Solución A</b>	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) + 100 mM NaCl + 50 mM MgCl <sub>2</sub> + Tween 20 0,1% + 1 mM Levamisole
<b>Buffer TEA</b>	20 mM Tris-HCl + 0,5 mM EDTA (pH 9) + azida 0,05 %

**Tabla A.4:** Formulación y composición de las 3 dietas experimentales.

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>L10</b>	<b>L13</b>	<b>L21</b>
<b>Harina de pescado (62% CP) <sup>a</sup></b>	45.00	45.00	45.00
<b>Harina de sangre</b>	15.00	15.00	15.00
<b>Caseína</b>	15.00	15.00	15.00
<b>Almidón de trigo</b>	11.00	6.00	1.00
<b>Aceite de pescado <sup>a</sup></b>	3.50	6.00	8.50
<b>Aceite de girasol</b>	3.50	6.00	8.50
<b>Mix de vitaminas y minerales <sup>b</sup></b>	1.00	1.00	1.00
<b>Rovimix Stay C-35</b>	0.10	0.10	0.10
<b>Cloruro de sodio</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Fosfato monobásico de calcio</b>	2.00	2.00	2.00
<b>Cloruro de colina</b>	0.50	0.50	0.50
<b>Na-CMC <sup>c</sup></b>	2.00	2.00	2.00
<b>Hidroxitolueno butilado (BHT)</b>	0.01	0.01	0.01
<b><math>\alpha</math>-tocoferol</b>	0.01	0.01	0.01
<b>Lisina</b>	0.20	0.20	0.20
<b>Metionina</b>	0.20	0.20	0.20
<b>Composición aproximada</b>			
<b>Materia seca (MS, %)</b>	91.10	91.20	92.30
<b>Proteína cruda (% MS)</b>	55.90	54.50	52.30
<b>Grasa cruda (% MS)</b>	9.70	13.00	20.80
<b>Carbohidratos (% MS)</b>	20.20	18.40	13.00
<b>Ceniza (% MS)</b>	14.20	14.10	13.80
<b>Energía bruta (kJ/gMS)</b>	20.41	21.07	22.69

**a** Moliendas del Sur S.A., Mar del Plata, Argentina

**b** “Vitafac Super Acqua”. Previsto por kilogramo de alimento: retinol, 24.000 UI; vitamina D3, 4.800 UI; tocoferol, 500 UI; vitamina K3, 16 mg; tiamina, 20 mg; riboflavina, 40 mg; pyrodoxina-HCl, 30 mg; vitamina B12, 0,06 mg; ácido ascórbico, 300 mg; niacina, 300 mg; ácido pantoténico, 80 mg; ácido fólico, 12 mg; biotina 2 mg; zinc, 140 mg; hierro, 200 mg; manganeso, 100 mg; cobre, 10 mg; cobalto, 4 mg; iodina, 3,4mg; selenio, 6 mg.

**c** Sodio carboximetil celulosa.

## Bibliografia:

- Adams BA, Lescheid DW, Vickers ED, Crim LW, Sherwood NM (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in sturgeon, whitefish, grayling, flounder and halibut: cDNA sequence, exon skipping and evolution. *Regul. Pept.* 109 (1-3): 27-37.
- Alexandre D, Vaudry H, Jégou S, Anouar Y (2000). Structure and Distribution of the mRNAs Encoding Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Growth Hormone-Releasing Hormone-Like Peptide in the Frog, *Rana ridibunda*. *J. Comp. Neurol.* 421: 234-246.
- Anand BK, Brobeck JR (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J. Biol. Med.* 24: 123-140.
- Aoki T, Kinoshita M, Aoki R, Agetsuma M, Aizawa H, Yamazaki M, Takahoko M, Amo R, Arata A, Higashijima S, Tsuboi T, Okamoto H (2013). Imaging of neural ensemble for the retrieval of a learned behavioral program. *Neuron.* 78: 881-894.
- Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991). Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129 (5): 2787-9.
- Asnicar MA, Köster A, Heiman ML, Tinsley F, Smith DP, Galbreath E, Fox N, Ma YL, Blum WF, Hsiung HM (2002). Vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 2 deficiency in mice results in growth retardation and increased basal metabolic rate. *Endocrinology* 143: 3994-4006.
- Baker BI, Ingleton PM (1975). Secretion of Prolactin and Growth-Hormone by Teleost Pituitaries In vitro. 2. Effect of Salt Concentration during Long-Term Organ-Culture. *Journal of Comparative Physiology.* 100: 269-282.
- Ball JN, Baker M, Olivereau M y Peter RE (1972). Investigation on hypothalamic control of adenohipophysial functions in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* 3: 11-21.
- Barabutis N, Schally AV (2010). Growth hormone-releasing hormone: extrapituitary effects in physiology and pathology. *Cell Cycle.* 9 (20): 4110-6.
- Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale WW, Rosenfeld MG, Evans RM (1985). Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281.
- Batten TF, Cambre ML, Moons L, Vandesande F (1990). Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J. Comp. Neurol.* 302 (4): 893-919.
- Beauloye V, Willems B, de Coninck V, Franck SJ, Edery M, Thissen AP (2002). Impairment of Liver GH Receptor Signaling by Fasting. *Endocrinology* 143 (3): 792- 800.
- Beckman BR (2011). Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170(2): 233-52.
- Beckman BR, Shimizu M, Gadberry BA, Cooper KA (2004). Response of the somatotrophic axis of juvenile coho salmon to alterations in plane of nutrition

- with an analysis of the relationships among growth rate and circulating IGF-I and 41 kDa IGFBP. *General and Comparative Endocrinology* 135: 334-344.
- Berasain G, Colautti D, Velasco CAM (2000). Experiencias de cría de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, durante su primer año de vida. *Rev. Ictiol.* 8: 1-7.
- Bertucci JI, Tovar MO, Blanco AM, Gómez-Requeni P, Unniappan S, Canosa LF (2017). Influence of water salinity on genes implicated in somatic growth, lipid metabolism and food intake in Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 210: 29-38.
- Bertucci JI, Tovar MO, Unniappan S, Navarro JC, Canosa LF (2018). Effects of dietary sunflower oil on growth parameters, fatty acid profiles and expression of genes regulating growth and metabolism in the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) fry. *Aquaculture Nutrition.* 24: 748-757.
- Betancur-R R, Wiley EO, Arratia G, Acero A, Bailly N, Miya M, Lecointre G, Ortí G (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evol. Biol.* 17 (1):162.
- Biga PR, Schelling GT, Hardy RW, Cain KD, Overturf K, Ott TL (2004). The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 135: 324-333.
- Björnsson BT, Johansson V, Benedet S, Einarsdottir IE, Hildahl J, Agustsson T, Jönsson E (2002). Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 227-242.
- Bloch B, Brazeau P, Ling N, Bohlen P, Esch F, Wehrenberg WB, Benoit R, Bloom F, Guillemin R (1983). Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. *Nature* 301 (5901): 607-8.
- Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55: 505-518.
- Bonetto A, Castello H (1985). Pesca y piscicultura en aguas continentales de América Latina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Washington D.C.
- Braford MR, Northcutt RG (1983). Organization of the diencephalons and pretectum of ray-finned fishes. In: Davis RE, Northcutt RG, editors. *Fish neurobiology*, vol. 2. Higher brain areas and functions. Ann Arbor: The University of Michigan Press. pp. 117-140.
- Calduch-Giner JA, Duval H, Chesnel F, Boeuf G, Pérez-Sánchez J, Boujard D (2001). Fish growth hormone receptor: Molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* Vol. 142, No. 7: 3269-3273.
- Campard PK, Crochemore C, Rene F, Monnier D, Koch B, Loeffler JP (1997). PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol.* 16: 323-333.
- Canny BJ, Rawlings SR, Leong D (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide specifically increases cytosolic calcium ion concentration in rat gonadotropes and somatotropes. *Endocrinology* 130: 211-215.

- Canosa LF, Bertucci JI (2020). Nutrient regulation of somatic growth in teleost fish. The interaction between somatic growth, feeding and metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 518: 111029.
- Canosa LF, Chang JP, Peter RE (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology* 151: 1-26.
- Canosa LF, Lin X, Peter RE (2002). Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. *Neuroendocrinology.* 76 (1): 8-17.
- Canosa LF, Peter RE (2004). Effects of cholecystokinin and bombesin on the expression of preprosomatostatin-encoding genes in goldfish forebrain. *Regul Pept* 121(1-3): 99-105.
- Canosa LF, Stacey N, Peter RE (2008). Changes in brain mRNA levels of gonadotropin-releasing hormone, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and somatostatin during ovulatory luteinizing hormone and growth hormone surges in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295 (6): R1815-21.
- Canosa LF, Unniappan S, Peter RE (2005). Periprandial changes in growth hormone release in goldfish: role of somatostatin, ghrelin, and gastrin-releasing peptide. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (1): R125-33.
- Cardoso JC, Power DM, Elgar G, Clark MS (2003). Genomic characterisation of putative growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor genes in the teleost fish *Fugu rubripes*. *DNA Seq.* 14 (2): 129-33.
- Castrillo JL, Theill LE, Karin M (1991). Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science (Wash. DC)* 253: 197-199.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Tello J, Sherwood NM, Anadón, R (2009). Distribution of Growth Hormone-Releasing Hormone-Like Peptide: Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology* 513: 685-701.
- Cavallaro S, Copani A, D'Agata V, Musco S, Petralia S, Ventra C, Stivala F, Travali S, Canonico PL (1996). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide prevents apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Mol. Pharmacol.* 50 (1): 60-6.
- Cerdá-Reverter JM, Anglade I, Martínez-Rodríguez G, Mazurais D, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M, Kah O, Zanuy S (2000a). 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 JM, 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. *Journal of Comparative Neurology.* 426: 197.
- Cerdá-Reverter JM, Ringholm A, Schiöth HB, Peter RE (2003). Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: Involvement in the control of food intake. *Endocrinology.* 144: 2336-2349.
- Cerdá-Reverter JM, Canosa LF (2009). Neuroendocrine systems of the fish brain. In: Farrell AP, Brauner CG, Van Der Kraak G, Bernier N, editors. *Fish Neuroendocrinology, Fish Physiology Series*, vol. 28. San Diego: Academic Press. pp. 3-74.

- Chalde T, Fernández DA, Cussac VE, Somoza GM (2011). The effect of rearing temperature in larval development of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* - Morphological indicators of development, *Neotropical Ichthyology*, 9 (4): 747-756.
- Chalde T, Miranda LA (2017). Pituitary-thyroid axis development during the larval-juvenile transition in the pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *J Fish Biol.* 91 (3): 818-834.
- Chan KW, Yu KL, Rivier J, Chow BK (1998). Identification and characterization of a receptor from goldfish specific for a teleost growth hormone-releasing hormone-like peptide. *Neuroendocrinology* 68 (1): 44-56.
- Chang JY, Korolev VV, Wang JZ (1996). Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 206 (2-3): 181-4.
- Chen TT, Marsh A, Shamblott M, Chan KM, Tang YL, Cheng CM, Yang BY (1994). Structure and evolution of fish growth hormone and insulin like growth factors genes. *Fish physiology*. New York: Academic Press. pp 179-209.
- Chêne N, Martal J, de la Llosa P, Charrier J (1989). Growth hormones. II. Structure-function relationships. *Reprod Nutr Dev.* 29 (1): 1-25.
- Chiodera P, Volpi R, Capretti L, Caffarri G, Magotti MG, Coiro V (1996). Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide on adenohipophyseal hormone secretion in normal men. *Neuroendocrinology* 64: 242-246.
- Chi-Wei L, Chang SL, Weng CF (2007). Pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (PACAP) regulates the expression of PACAP in cultured tilapia astrocytes. *Exp. Biol. Med.* 232: 262-276.
- Clay LA, Wang SY, Wolters WR, Peterson BC, Waldbieser GC (2005). Molecular characterization of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim Biophys Acta* 1731: 139-148.
- Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR (1997). The mitogenic and the myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272: 6653-6662.
- Daikoku S, Kawano H, Noguchi M, Nakanishi J, Tokuzen M, Chihara K, Nagatsu I (1986). GRF neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 399 (2): 250-61.
- Dastot F, Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Goossens M, Amselem S (1996). Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, pp. 10723-10728.
- Daughaday WH (2000). Growth hormone axis overview-somatomedin hypothesis. *Pediatr. Nephrol.* 14: 537-540.
- Davey HW, Xie T, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Waxman DJ, Grattan DR (2001). STAT5b Is Required for GH-Induced Liver IGF-I Gene Expression. *Endocrinology* 142 (9): 3836-3841.
- De-Almeida VI, Mayo KE (2001). The growth hormone-releasing hormone receptor. *Vitam Horm.* 63: 233-76.

- Delgado M (2013). Chapter 208 - PACAP, in: Kastin AJ (Ed.), Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition). Academic Press, Boston, pp. 1527-1534.
- Degger BG, Richardson N, Collet C, Ballard FJ, Upton Z (1999). In vitro characterization and in vivo clearance of recombinant barramundi (*Lates calcarifer*) IGF-I. *Aquaculture* 177: 153-160.
- Degger B, Upton Z, Soole K, Collet C, Richardson N (2000). Comparison of Recombinant Barramundi and Human Insulin-like Growth Factor (IGF)-I in Juvenile Barramundi (*Lates calcarifer*): In Vivo Metabolic Effects, Association with Circulating IGF-Binding Proteins, and Tissue Localisation. *General and Comparative Endocrinology* 117: 395-403.
- Degger B, Richardson N, Collet C, Upton Z (2001). Production, in Vitro Characterisation, in Vivo Clearance, and Tissue Localisation of Recombinant Barramundi (*Lates calcarifer*) Insulin-like Growth Factor II. *General and Comparative Endocrinology* 123: 38-50.
- Desai BJ, Monson JP, Holdstock JG, Aylwin SJ, Geddes JF, Wood DF, Burrin JM (1994). Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on hormone secretion by human pituitary adenomas *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab.* 79 (6): 1771-7.
- Devor A (2000). Is the cerebellum like cerebellar-like structures? *Brain Research Reviews.* 34: 149-156.
- Dickson SL, Tung LYC, Lall S, Jansson JO, Hewson AK (2003). Interaction of growth hormone secretagogues with leptin-sensitive brain networks. In: *Brain Somatic Cross-Talk and the Central Control of Metabolism*, Springer, p. 1-14.
- Doerr-Schott J (1980). Immunohistochemistry of the adenohypophysis of non-mammalian vertebrates. *Acta Histochem. Suppl.* 22: 185-223.
- Dolle P, Castrillo JL, Theill LE, Deerinick T, Ellisman M, Karin M (1990). Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* 60: 809-820.
- Duan C (1997). The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *Am. Zool.* 37: 491-530.
- Duan C (1998). Nutritional and Developmental Regulation of Insulin-like Growth Factors in Fish. *J. Nutr.* 128 (2 Suppl): 306S-314S.
- Dun EC, Huang RL, Dun SL, Dun NJ (1996). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res.* 721: 233-237.
- Duval H, Rousseau K, Eliès G, Le Bail PY, Dufour S, Boeuf G, Boujard D (2002). Cloning, characterization, and comparative activity of turbot IGF-I and IGF-II. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126: 269-278.
- Dyer AR, Barlow CG, Bransden MP, Carter CG, Glencross BD, Richardson N, Thomas PM, Williams KC, Carragher JF (2004). Correlation of plasma IGF-I concentrations and growth rate in aquacultured finfish: a tool for assessing the potential of new diets. *Aquaculture* 236: 583-592.
- Edens A, Talamantes F (1998). Alternative Processing of Growth Hormone Receptor Transcripts. *Endocrine Reviews* 19 (5): 559-582.

- Eipper BA, Stoffers DA, Mains RE (1992). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 57-85.
- Elisio M, Chalde T, Miranda LA. (2011). Effects of short periods of warm water fluctuations on reproductive endocrine axis of the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) spawning. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 163 (1): 47-55.
- Elisio M, Chalde T, Miranda LA. (2014). Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) oogenesis in the wild. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 175: 102-9.
- Elisio M, Chalde T, Miranda LA. (2015). Seasonal changes and endocrine regulation of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) spermatogenesis in the wild. *Gen. Comp. Endocrinol.* 221: 236-43.
- Feany MB, Quinn WG (1995). A neuropeptide gene defined by the drosophila memory mutant amnesiac. *Science (Wash. DC)* 268: 869-873.
- Fellmann D, Bugnon C, Lavry GN (1985). Immunohistochemical demonstration of a new neurone system in rat brain using antibodies against human growth hormone-releasing factor (1-37). *Neurosci Lett.* 58 (1): 91-6.
- Fernández-Pérez L, Guerra B, Díaz-Chico JC, Flores-Morales A (2013). Estrogens regulate the hepatic effects of growth hormone, a hormonal interplay with multiple fates. *Front Endocrinol* 4: 66.
- Finger TE (1978). Cerebellar afferents in teleost catfish (Ictaluridae), *Journal of Comparative Neurology.* 181: 173-181.
- Frohman LA, Szabo M (1981). Ectopic production of growth hormone-releasing factor by carcinoid and pancreatic islet tumors associated with acromegaly. *Prog. Clin. Biol. Res.* 74: 259-71.
- Fruchtman S, McVey DC, Borski RJ (2002). Characterization of pituitary IGF-I receptors: modulation of prolactin and growth hormone. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R468-R476.
- Fox BK, Breves JP, Davis LK, Pierce AL, Hirano T, Grau EG (2010). Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. *General and Comparative Endocrinology* 166: 573-580.
- Fradinger EA, Sherwood NM (2000). Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the zebrafish. *Mol. Cell Endocrinol.* 165 (1-2): 211-9.
- Fuentes EN, Björnsson BT, Valdés JA, Einarsdóttir IE, Lorca B, Alvarez M, Molina A (2011). The IGF-I/PI3K/Akt and the IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300: R1532-R1542.
- Fuentes EN, Einarsdóttir IE, Valdés JA, Alvarez M, Molina A, Björnsson BT (2012). Inherent Growth Hormone Resistance in the Skeletal Muscle of the Fine Flounder Is Modulated by Nutritional Status and Is Characterized by High Contents of Truncated GHR, Impairment in the JAK2/STAT5 Signaling Pathway, and Low IGF-I Expression. *Endocrinology* 153 (1): 283-294.

- Fuentes EN, Einarsdottir IE, Paredes R, Hidalgo C, Valdes JA, Björnsson BT, Molina A (2015). The TORC1/P70S6K and TORC1/4EBP1 signaling pathways have a stronger contribution on skeletal muscle growth than MAPK/ERK in an early vertebrate: Differential involvement of the IGF system and atrogenes. *Gen Comp. Endocrinol.* 210: 96-106.
- Fukata J, Diamond DJ, Martin JB (1985). Effects of rat growth hormone (rGH)-releasing factor and somatostatin on the release and synthesis of rGH in dispersed pituitary cells. *Endocrinology* 117: 457-467.
- Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Martínez-Fuentes AJ, Quintero A, Gutiérrez-Pascual E, Córdoba-Chacón J, Malagón MM, Gracia-Navarro F, Castaño JP (2009). Understanding the Multifactorial Control of Growth Hormone Release by Somatotropes. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1163: 137-153.
- Gárriz Á, Del Fresno PS, Miranda LA (2017). Exposure to E<sub>2</sub> and EE<sub>2</sub> environmental concentrations affect different components of the Brain-Pituitary-Gonadal axis in pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 144: 45-53.
- Gárriz Á, Del Fresno PS, Carriquiriborde P, Miranda LA (2019). Effects of heavy metals identified in Chascomus shallow lake on the endocrine-reproductive axis of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *Gen Comp Endocrinol.* 273: 152-162.
- Gárriz Á, Miranda LA (2020). Effects of metals on sperm quality, fertilization and hatching rates, and embryo and larval survival of pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicology.* 29 (7): 1072-1082.
- Gaylinn BD (1999). Molecular and cell biology of the growth hormone-releasing hormone receptor. *Growth Horm. IGF Res.* 9 Suppl A: 37-44.
- Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR (1993). Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J. Endocrinol.* 136 (1): 159-66.
- Gick GG, Bancroft C (1987). Glucocorticoid stimulation of growth hormone messenger ribonucleic acid levels in GH3 cells is inhibited by calcium but not by somatostatin. *Endocrinology*; 120 (5): 1986-90.
- Giustina A, Mazziotti G, Canalis E (2008). Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocr. Rev.* 29 (5): 535-59.
- Golden JA (1998). Holoprosencephaly: a defect in brain patterning. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57: 991-999.
- Gómez-Requeni P, Bedolla-Cázares F, Montecchia C, Zorrilla J, Villian M, Toledo-Cuevas EM, Canosa LF (2013). Effects of increasing the dietary lipid levels on the growth performance, body composition and digestive enzyme activities of the teleost pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Aquaculture* 416-417: 15-22.
- Gómez-Requeni P, Kraemer MN, Canosa LF (2012). Regulation of somatic growth and gene expression of the GH-IGF system and PRP-PACAP by dietary lipid level in early juveniles of a teleost fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *J. Comp. Physiol. B* 182: 517-530.

- Gómez-Requeni P, Kraemer MN, Canosa LF (2019). The Dietary Lipid Content Affects the Tissue Gene Expression of Muscle Growth Biomarkers and the GH/IGF System of Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) Juveniles. *Fishes* 4: 37.
- González A, Fernandino JI, Somoza GM (2015). Effects of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone on expression of genes related to steroidogenesis and spermatogenesis during the sex determination and differentiation periods of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 182: 1-7.
- González A, Fernandino JI, Hammond GL, Somoza GM (2017). Sex hormone binding globulin: Expression throughout early development and adult pejerrey fish, *Odontesthes bonariensis*. *Gen Comp Endocrinol*. 247: 205-214.
- González A, Fernandino JI, Elisio M, Chalde T, Miranda LA, Hammond GL, Somoza GM (2019). Sex hormone binding globulin during an annual reproductive cycle in the hepatopancreas and ovary of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Gen Comp Endocrinol* 272: 52-56.
- González BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience*. 78 (2): 419-30.
- Gorbman A (1995). Olfactory origins and evolution of the brain-pituitary endocrine system: facts and speculation. *Gen. Comp. Endocrinol*. 97: 171-178.
- Goth MI, Lyons CE, Canny BJ, Thorner MO (1992). Pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide, growth hormone (GH)-releasing peptide and GH-releasing hormone stimulate GH release through distinct pituitary receptors. *Endocrinology* 130: 939-944.
- Gracia-Navarro F, Lamacz M, Tonon MC, Vaudry H (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates calcium mobilization in amphibian pituitary cells. *Endocrinology* 131: 1069-1074.
- Gray ES, Kelley KM, Law S, Tsai R, Young G, Bern HA (1992). Regulation of Hepatic Growth Hormone Receptors in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp. Endocrinol*. 88 (2): 243-52.
- Grey CL, Chang JP (2013). Growth hormone-releasing hormone stimulates GH release while inhibiting ghrelin- and sGnRH-induced LH release from goldfish pituitary cells. *General and Comparative Endocrinology* 186: 150-156.
- Grosman F (1995). El pejerrey. *Ecología, cultivo, pesca y explotación*. Editorial Astyanax. Buenos Aires. pp 132.
- Guilgur LG, Ortí G, Strobl-Mazzulla PH, Fernandino JI, Miranda LA, Somoza GM (2007). Characterization of the cDNAs encoding three GnRH forms in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes) and the evolution of GnRH precursors. *J. Mol. Evol*. 64 (6): 614-27.
- Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB (1982). Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218: 585-7.
- Hannibal J, Mikkelsen JD, Clausen H, Holst JJ, Wulff BS, Fahrenkrug J (1995a). Gene expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regul. Pept*. 55: 133-148.
- Hannibal J, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J, Larsen PJ (1995b). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing

- factor-containing parvicellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology* 136: 4116-4124.
- Harmar AJ (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* 2 (12): REVIEWS3013.
- Harvey S, Baudet ML, Murphy A, Luna M, Hull KL, Aramburo C (2004). Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *General and Comparative Endocrinology* 139: 158-167.
- Hashimoto H, Hagihara N, Koga K, Yamamoto K, Shintani N, Tomimoto S, Mori W, Koyama Y, Matsuda T, Baba A (2000). Synergistic induction of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene expression by nerve growth factor and PACAP in PC12 cells. *J. Neurochem.* 74 (2): 501-7.
- Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A (2011). PACAP is implicated in the stress axes. *Curr. Pharm. Des.* 17: 985-989.
- Hashizume T, Soliman EB, Kanematsu S (1994). Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), prostaglandin E2 (PGE2) and growth hormone releasing factor (GRF) on the release of growth hormone from cultured bovine anterior pituitary cells in vitro. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11: 331-337.
- Hattori RS, Somoza GM, Fernandino JI, Colautti DC, Miyoshi K, Gong Z, Yamamoto Y, Strüssmann CA (2019). The Duplicated Y-specific amhy Gene Is Conserved and Linked to Maleness in Silversides of the Genus *Odontesthes*. *Genes (Basel)*. 10 (9): 679.
- Herrington J, Carter-Su C (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Endocrinology & Metabolism Vol.12 No. 6.*
- Hildahl J, Sweeney G, Galay-Burgos M, Einarsdóttir IE, Björnsson BT (2007). Cloning of Atlantic halibut growth hormone receptor genes and quantitative gene expression during metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology* 151: 143-152.
- Holloway AC, Leatherland JF (1997). Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105 (2): 246-54.
- Hoyle CH (1998). Neuropeptide families: Evolutionary perspectives. *Regul. Pept.* 73: 1-33.
- Hurley JD, Gardiner JV, Jones PM, Bloom SR (1995). Cloning and molecular characterization of complementary deoxyribonucleic acid corresponding to a novel form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide messenger ribonucleic acid in the rat testis. *Endocrinology* 136: 550-7.
- Ingleton PM, Baker BI, Ball JN (1973). Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries *in vitro*. *J. Comp. Physiol.* 87: 317-328.
- Inooka H, Endo S, Kitada C, Mizuta E, Fujino M (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by 1:1H NMR and CD spectroscopies and distance geometry in 25% methanol solution. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40: 456-464.
- Ishikawa Y, Yoshimoto M, Ito H (1999). A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Biol. J. Medaka.* 10: 1-26.

- Ito H, Murakami T, Fukuoka T, Kishida R (1986). Thalamic fiber connections in a teleost (*Sebastiscus marmoratus*): visual, somatosensory, octavolateral, and cerebellar relay region to the telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 250: 2159-227.
- Jacobowitz DM, Schulte H, Chrousos GP, Loriaux DL (1983). Localization of GRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Peptides* 4(4): 521-4.
- Jadhao AG, Malz CR (2004). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase activity in the brain of a cichlid fish, with remarkable findings in the entopeduncular nucleus: a histochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* 27: 75-86.
- Jadhao AG, Malz CR (2007). Localization of calcium-binding protein (calretinin, 29 kD) in the brain and pituitary gland of teleost fish: An immunohistochemical study, *Neuroscience Research.* 59: 265-276.
- Jansson JO, Edén S, Isaksson O (1985). Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Spring;* 6 (2): 128-50.
- Jankowski JM, Dixon GH (1987). The GC box as a silencer. *Biosci. Rep.* 7: 955-963.
- Jenkins RC, Ross RJM (1996). Acquired growth hormone resistance in catabolic states. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism.* Vol. 10. N°3. 411-419.
- Jentoft S, Aastveit AH, Anderson O (2004). Molecular cloning and expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): lack of responsiveness to growth hormone treatment. *Fish Physiol Biochem* 30: 67-76.
- Ji XS, Chen SL, Jiang YL, Xu TJ, Yang JF, Tian YS (2011). Growth differences and differential expression analysis of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH) between the sexes in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170 (1): 99-109.
- Jiang Y, Li WS, Xie J, Lin HR (2003). Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone in grouper (*Epinephelus coioides*). *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai).* 35: 864-72.
- Jiao B, Huang X, Chan CB, Zhang L, Wang D, Cheng CHK (2006). The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology.* 36; 23-40.
- Kajimura S, Uchida K, Yada T, Riley LG, Byatt JC, Collier RJ, Aida K, Hirano T, Grau EG (2001). Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 25: 221-230.
- Kee F, Ng SS, Vaudry H, Pang RT, Lau EH, Chan SM, Chow BK (2005). Aspartic acid scanning mutation analysis of a goldfish growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor specific to the GHRH salmon-like peptide. *Gen Comp. Endocrinol.* 140 (1): 41-51.
- Kelley KM, Schmidt KE, Berg L, Sak K, Galima MM, Gillespie C, Balogh L, Hawayek A, Reyes JA, Jamison M (2002). Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *Journal of Endocrinology* 175: 3-18.
- Kermouni A, Mahmoud SS, Wang S, Moloney M, Habibi HR (1998). Cloning of a full-length insulin-like growth factor-I complementary DNA in the goldfish liver and

- ovary and development of a quantitative PCR method for its measurement. *Gen Comp Endocrinol* 111: 51-60.
- Kiaris H, Chatzistamou I, Papavassiliou AG, Schally AV (2011). Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. *Endocrinol. Metab.* 22 (8): 311-7.
- Kimura C, Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Itoh Y, Onda H, Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Stibbs HH, Arimura A, Fujino M (1990). A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166 (1): 81-9.
- Kimura S, Ohshige Y, Lin L, Okumura T, Yanaihara C, Yanaihara N, Shiotani Y (1994). Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: Light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Neuroendocrinol.* 6: 503-507.
- Kivipelto L, Absood A, Arimura A, Sundler F, Håkanson R, Panula P (1992). The distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity is distinct from helodermin- and helospectin-like immunoreactivities in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 5: 85-94.
- Klover P, Hennighausen L (2007). Postnatal Body Growth Is Dependent on the Transcription Factors Signal Transducers and Activators of Transcription 5a/b in Muscle: A Role for Autocrine/Paracrine Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinology* 148 (4): 1489-1497.
- Klover P, Chen W, Zhu BM, Hennighausen L (2009). Skeletal muscle growth and fiber composition in mice are regulated through the transcription factors STAT5a/b: linking growth hormone to the androgen receptor. *The FASEB Journal.* Vol. 23: 3140-3148.
- Kocho-Schellenberg M, Lezak KR, Harris OM, Roelke E, Gick N, Choi I, Edwards S, Wasserman E, Toufexis DJ, Braas KM, May V, Hammack SE (2014). PACAP in the BNST produces anorexia and weight loss in male and female rats. *Neuropsychopharmacology* 39 (7): 1614-1623.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kanagawa K (1999). Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
- Kopchick JJ, Andry JM (2000). Growth Hormone (GH), GH Receptor, and Signal Transduction. *Molecular Genetics and Metabolism* 71: 293-314.
- Kossiakoff A (1995). Structure of growth-hormone-receptor complex and mechanism of receptor signaling. *J. Nucl. Med.* 45: 178-181.
- Köves K, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, Miller J (1990). Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 127: 264-271.
- Köves K, Arimura A, Görös TG, Somogyvári-Vigh A (1991). Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology.* 54 (2): 159-69.
- Köves K, Görös TG, Arimura A (1994-). Colocalization of PACAP, but not VIP, with oxytocin in the hypothalamic magnocellular neurons of colchicine treated and pituitary stalk sectioned rats. *Endocrine* 2: 1169-1175.

- Krueckl SL, Fradinger EA, Sherwood NM (2003). Developmental changes in the expression of growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 455 (3): 396-405.
- Krueckl SL, Sherwood NM (2001). Developmental expression, alternative splicing and gene copy number for the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GRF) gene in rainbow trout. *Mol. Cell Endocrinol.* 182 (1): 99-108.
- Kuradomi RY, Figueiredo MA, Lanes CFC, da Rosa CE, Almeida DV, Maggioni R, Silva MDP, Marins LF (2011). GH overexpression causes muscle hypertrophy independent from local IGF-I in a zebrafish transgenic model. *Transgenic Res.* 20: 513-521.
- Lamine-Ajili A, Fahmy AM, Létourneau M, Chatenet D, Labonté P, Vaudry D, Fournier A (2016). Effect of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on the autophagic activation observed in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1862 (4): 688-695.
- Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, Glass DJ (2005). Insulin-like growth factor-1 (IGF-I) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 2737-2744.
- Lechan RM, Lin HD, Ling N, Jackson IM, Jacobson S, Reichlin S (1984). Distribution of immunoreactive growth hormone releasing factor(1-44)NH<sub>2</sub> in the tuberoinfundibular system of the rhesus monkey. *Brain Res.* 309 (1): 55-61.
- Lee LT, Siu FK, Tam JK, Lau IT, Wong AO, Lin MC, Vaudry H, Chow BK (2007). Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104 (7): 2133-8.
- Lee LT, Tam JK, Chan DW, Chow BK (2009). Molecular cloning and mRNA distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PACAP-related peptide in the lungfish. *Ann. NY Acad. Sci.* 1163: 209-14.
- Legradi G, Shioda S, Arimura A (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in autonomic regulatory areas of the rat medulla oblongata. *Neurosci Lett* 176: 193-196.
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001a). The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews* 22 (1): 53-74.
- Le Roith D, Scavo L, Butler A (2001b). What is the role of circulating IGF-I? *Endocrinol. Metab.* 12 (2): 48-52.
- Levy G, Jackson K, Degani G (2010). Association between pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and reproduction in the blue gourami. *Gen Comp Endocrinol.* 166 (1): 83-93.
- Levy G, Degani G (2011). Evidence of a reproduction-related function for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-related peptide in an Anabantidae fish. *J. Mol. Endocrinol.* 46 (2): 101-10.
- Li M, Mbikay M, Arimura A (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor is processed solely by prohormone convertase 4 in the gonads. *Endocrinology* 141: 3723-3730.

- Li WS, Chen D, Wong AOL, Lin HR (2005). Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology* 144: 78-89.
- Liang YH, Cheng CH, Chan KM (1996). Insulin-like growth factor IEa2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol Mar Biol Biotechnol* 5: 145-152.
- Liao ZY, Chen XL, MingJiang WU (2009). Molecular cloning and functional analysis of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) growth hormone receptor. *Sci China Ser C-Life Sci* 52 (10): 911-921.
- Lin SW, 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. *Gen Comp. Endocrinol.* 160 (2): 183-93.
- Lin-Su K, Wajnrajch MP (2002). Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) and the GHRH Receptor. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 3 (4): 313-23.
- Lin XW, Otto CJ, Peter RE (1999). Expression of three distinct somatostatin messenger ribonucleic acids (mRNAs) in goldfish brain: Characterization of the complementary deoxyribonucleic acids, distribution and seasonal variation of the mRNAs, and action of a somatostatin-14 variant. *Endocrinology* 140: 2089-2099.
- Lindström E, Eliasson L, Björkqvist M, Håkanson R (2001). Gastrin and the neuropeptide PACAP evoke secretion from rat stomach histamine-containing (ECL) cells by stimulating influx of Ca<sup>2+</sup> through different Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Physiol.* 535: 663-677.
- Luna M, Huerta L, Berumen L, Martinez-Coria H, Harvey S, Arámburo C (2004). Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *General and Comparative Endocrinology* 137: 37-49.
- Luo D, McKeown BA (1989). Immunohistochemical detection of a substance resembling growth hormone-releasing factor in the brain of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Experientia.* 45 (6): 577-80.
- Luque MA, Pérez-Pérez MP, Herrero L, Torres B (2008). Afferent and efferent connections of the mesencephalic reticular formation in goldfish, *Brain Research Bulletin.* 75: 480-484.
- Macoretta CL, Miranda LA (2020). Cooling of pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinidae) embryos at sub-zero temperatures. *Theriogenology.* 149: 123-130.
- Marchant TA, Peter RE (1989). Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 133-139.
- Marivoet S, Moons L, Vandesande F (1988). Localization of growth hormone releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophyseal system of the frog (*Rana temporaria*) and the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp. Endocrinol.* 72 (1): 72-9.
- Martínez-Fuentes AJ, Castano JP, Gracia-Navarro F, Malagon MM (1998a). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP27 activate common and distinct intracellular signaling pathways to stimulate growth hormone secretion from porcine somatotropes. *Endocrinology* 139: 5116-5124.

- Martínez-Fuentes AJ, Castano JP, Malagon MM, Vazquez-Martinez R, Gracia-Navarro F (1998b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides 38 and 27 increase cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in porcine somatotropes through common and distinct mechanisms. *Cell Calcium* 23: 369-378.
- Martínez-Fuentes AJ, Malagon MM, Castano JP, Garrido-Gracia JC, Gracia-Navarro F (1998c). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP27 differentially stimulate growth hormone release and mRNA accumulation in porcine somatotropes. *Life Sci* 62: 2379-2390.
- Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Castel H, Leprince J, Fournier A, Dejda A, Vaudry H, Tonon MC (2007). Role of PACAP and VIP in astroglial functions. *Peptides* 28: 1753-1760.
- Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M, Fujino M (1993). Regional distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res.* 602: 57-63.
- Mathieu M, Ciarlo M, Trucco N, Griffero F, Damonte G, Salis A, Vallarino M (2004). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the brain, spinal cord and sensory organs of the zebrafish, *Danio rerio*, during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 151 (1-2): 169-85.
- Matsuda K, Maruyama K (2007). Regulation of feeding behavior by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vertebrates. *Peptides.* 28 (9): 1761-6.
- Matsuda K, Maruyama K, Nakamachi T, Miura T, Shioda S (2006). Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on food intake and locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1070: 417-21.
- Matsuda K, Maruyama K, Miura T, Uchiyama M, Shioda S (2005b). Anorexigenic action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the goldfish: feeding-induced changes in the expression of mRNAs for PACAP and its receptors in the brain, and locomotor response to central injection. *Neurosci. Lett.* 386 (1): 9-13.
- Matsuda K, Nagano Y, Uchiyama M, Onoue S, Takahashi A, Kawauchi H, Shioda S (2005a). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in the brain of a teleost, *Uranoscopus japonicus*: immunohistochemical relationship between PACAP and adenohipophysial hormones. *Regul. Pept.* 126 (1-2): 129-36.
- Matsuda K, Shioda S, Arimura A, Uchiyama M (1997a). The study of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Zoological science.* 14: 645-650.
- Matsuda K, Takei Y, Katoh J, Shioda S, Arimura A, Uchiyama M (1997b). Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides.* 18 (5): 723-7.
- Matsuda K, Kang KS, Sakashita A, Yahashi S, Vaudry H (2011). Behavioral effect of neuropeptides related to feeding regulation in fish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1220: 117-126.

- Matsuda K, Azuma M, Maruyama K, Shioda S (2013). Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in vertebrates, *Obes. Res. Clin. Pract.* 7: e1–e7.
- Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki A, Shioda S (2016). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke. *Journal of Molecular Neuroscience*: 1-10. *J. Mol. Neurosci.* 59 (2): 270-9.
- McRory JE, Parker DB, Ngamvongchon S, Sherwood NM (1995). Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Mol. Cell Endocrinol.* 108: 169-77.
- McRory JE, Parker RL, Sherwood NM (1997). Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA and Cell Biol.* 16: 95-102.
- Mechaly AS, Tovar Bohórquez MO, Mechaly AE, Suku E, Pérez MR, Giorgetti A, Ortí G, Viñas J, Somoza GM (2018). Evidence of Alternative Splicing as a Regulatory Mechanism for Kissr2 in Pejerrey Fish. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9: 604.
- Melamed P, Eliahu N, Levavi-Sivan B, Ofir M, Farchi-Pisanty O, Rentier-Delrue F, Smal J, Yaron Z, Naor Z (1995). Hypothalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *Gen Comp. Endocrinol.* 97 (1): 13-30.
- Melamed P, Gur G, Elizur A, Rosenfeld H, Sivan B, Rentier-Delrue F, Yaron Z (1996). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin II beta subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 64 (4): 320-8.
- Merchenthaler I, Vigh S, Schally AV, Petrusz P (1984). Immunocytochemical localization of growth hormone-releasing factor in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 114 (4): 1082-5.
- Mikkelsen JD, Hannibal J, Larsen PJ, Fahrenkrug J (1994). Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) mRNA in the rat neocortex. *Neurosci Lett.* 171 (1-2): 121-4.
- Mikkelsen JD, Hannibal J, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Olcese J, McArdle C (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP-38), PACAP-27, and PACAP related peptide (PRP) in the rat median eminence and pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 7: 47-55.
- Miranda LA, Strobl-Mazzulla PH, Somoza GM (2002). Ontogenetic development and neuroanatomical localization of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in the brain and pituitary gland of pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20 (6): 503-10.
- Miranda LA, Berasain GE, Velasco CAM, Shirojo Y, Somoza GM (2006). Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. *BIOCELL*, 30 (1): 157-162.
- Miranda LA, Somoza GM (2001). Biología reproductiva del pejerrey *Odontesthes bonariensis*: Diferenciación sexual y endocrinología de la reproducción. Aspectos básicos y su potencial aplicación en acuicultura. En: *Fundamentos*

- biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. F Grosman Ed. Editorial Astyanax, Buenos Aires, pp 41-45.
- Miranda LA, Strobl-Mazzulla PH, Strüssmann CA, Parhar I, Somoza GM (2003). Gonadotropin-releasing hormone neuronal development during the sensitive period of temperature sex determination in the pejerrey fish, *Odontesthes bonariensis*. Gen Comp. Endocrinol. 132 (3): 444-53.
- Miranda LA, Strüssmann CA, Guilgur LG, Strobl-Mazzulla PH, Somoza GM (2007). Cloning of FSH- $\beta$ , LH- $\beta$  and glycoprotein hormone- $\alpha$  subunits in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes): expression profile and relationship with GnRHs expression and plasma sex steroid levels in male fish. J. Fish Biol. 71 pp. 1-19.
- Mituta T (2001). Historia del pejerrey en Japón. En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. F Grosman Ed. Editorial Astyanax, Buenos Aires, pp 21-24.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164 (1): 567-74.
- Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). Biochem. Biophys. Res. Commun. 170 (2): 643-8.
- Miyata A, Sano H, Li M, Matsuda Y, Kaiya H, Sato K, Matsuo H, Kangawa K, Arimura A (2000). Genomic organization and chromosomal localization of the mouse pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. Ann. NY Acad. Sci. 921: 344-8.
- Moller K, Zhang Y-Z, Håkanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a sensory neuropeptide: Immunocytochemical and immunochemical evidence. Neuroscience 57: 725-732.
- Montaner AD, Park M, Fischer WH, Craig AG, Chang JP, Somoza GM, Rivier JE, Sherwood NM (2001). Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone (GnRH) variant in the brain of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Endocrinology 142: 1453-1460.
- Montero M, Yon L, Kikuyama S, Dufour S, Vaudry H (2000). Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. J. Mol. Endocrinol. 25(2): 157-68.
- Montero M, Yon L, Rousseau K, Arimura A, Fournier A, Dufour S, Vaudry H (1998). Distribution, characterization, and growth hormone-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the European eel, *Anguilla anguilla*. Endocrinology. 139 (10): 4300-10.
- Moody TW, Nuche-Berenguer B, Jensen RT (2016). Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity 23 (1): 38-47.

- Morley JE, Horowitz M, Morley PM, Flood JF (2018). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces food intake in mice. *Peptides* 13: 1133-1135.
- Mueller T, Wullimann MF (2009). An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy, *Brain. Behav. Evol.* 74: 30-42.
- Mulder H, Uddman R, Moller K, Zhang Y-Z, Ekblad E, Alumets J, Sundler F (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide expression in sensory neurons. *Neuroscience* 63: 307-312.
- Muller EE, Locatelli V, Cocchi D (1999). Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* 79: 511-607.
- Murase T, Kondo K, Arima H, Iwasaki Y, Ito M, Miura Y, Oiso Y (1995). The expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mRNA in rat brain: Possible role of endogenous PACAP in vasopressin release. *Neurosci Lett* 185: 103-106.
- Mustafa A, Nyberg F, Mustafa M, Bakhiet M, Mustafa E, Winblad B, Adem A (1997). Growth hormone stimulates production of interferon-gamma by human peripheral mononuclear cells. *Horm. Res.* 48: 11-15.
- Nakamachi T, Nakamura K, Oshida K, Kagami N, Mori H, Watanabe J, Arata S, Yofu S, Endo K, Wada Y, Hori M, Tsuchikawa D, Kato M, Shioda S (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates proliferation of reactive astrocytes in vitro. *J. Mol. Neurosci.* 43 (1): 16-21.
- Nakamachi T, Kamata E, Tanigawa A, Konno N, Shioda S, Matsuda K (2018). Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 2 in zebrafish brain. *Peptides* 103: 40-7.
- Nakao N, Higashimoto Y, Ohkubo T, Yoshizato H, Nakai N, Nakashima K, Tanaka M (2004). Characterization of structure and expression of the growth hormone receptor gene of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Endocrinology* 182: 157–164.
- Nakata M, Yada T (2007). PACAP in the glucose and energy homeostasis: physiological role and therapeutic potential. *Curr. Pharm. Des.* 13 (11): 1105-12.
- Nam BH, Moon JY, Kim YO, Kong HJ, Kim WJ, Kim DG, Lee SJ (2011). Molecular and functional analyses of growth hormone-releasing hormone (GHRH) from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 159 (2):84-91.
- Nam BH, Moon JY, Kim YO, Kong HJ, Kim WJ, Kim DG, Jee YJ, Lee SJ (2013). Structural and functional characterization of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP)/PACAP-related peptide (PRP) and its receptor in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 164 (1): 18-28.
- Ng SY, Chow BK, Kasamatsu J, Kasahara M, Lee LT (2012). Agnathan VIP, PACAP and their receptors: ancestral origins of today's highly diversified forms. *PLoS One.* 7 (9): e44691.
- Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J (1998). Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *Neuro Report* 9: 2639-2642.

- Nieuwenhuys R, Pouwels E (1983). The brain stem of actinopterygian fishes. In: Davis RE, Northcutt RG, editors. Fish neurobiology, vol. 1. Brain Stem and sense organs. Ann Arbor: The University of Michigan Press. pp. 25-87.
- Nordgarden U, Fjellidal PG, Hansen T, Björnsson BT, Wargelius A (2006). Growth hormone and insulin-like growth factor-I act together and independently when regulating growth in vertebral and muscle tissue of atlantic salmon postsmolts. *Gen Comp. Endocrinol.* 149 (3): 253-60.
- Northcutt RG (1983). Evolution of the optic tectum in ray-finned fishes. In: Davis RE, Northcutt RG, editors. Fish neurobiology, vol. 2. Higher brain areas and functions. Ann Arbor: The University of Michigan Press. pp. 1-42.
- Nyberg F (2000). Growth Hormone in the Brain: Characteristics of Specific Brain Targets for the Hormone and Their Functional Significance. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21: 330-348.
- Ogi K, Kimura C, Onda H, Arimura A, Fujino M (1990). Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (3): 1271-9.
- Ohlsson C, Mohan S, Sjögren K, Tivesten Å, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO, Svensson J (2009). The Role of Liver-Derived Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocrine Reviews*, 30 (5): 494-535.
- Ohkubo S, Kimura C, Ogi K, Okazaki K, Hosoya M, Onda H, Miyata A, Arimura A, Fujino M (1992). Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA Cell Biol.* 11 (1): 21-30.
- Ohkubo S, Ogi K, Kimura C, Okazaki K, Onda H, Fujino M (1994). Expression of the PACAP gene in a human neuroblastoma cell line: cDNA cloning and analyses of the upstream regulatory region. *Endocr. J.* 2: 135-145.
- Okazaki K, Itoh Y, Ogi K, Ohkubo S, Onda H (1995). Characterization of murine PACAP mRNA. *Peptides.* 16 (7): 1295-9.
- Okazaki K, Kimura C, Kosaka T, Watanabe T, Ohkubo S, Ogi K, Kitada C, Onda H, Fujino M (1992). Expression of human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. *FEBS Lett.* 298 (1): 49-56.
- Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M (2004). Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27 (3): 219-40.
- Olivereau M, Olivereau J, Vandesande F (1990). Localization of growth hormone-releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophysial system of some teleost species. *Cell Tissue Res.* 259 (1): 73-80.
- Olsson C, Holmgren S (2000). PACAP and nitric oxide inhibit contractions in the proximal intestine of the atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* 203: 575-583.
- Olsson C, Holmgren S (2001). The control of gut motility. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 128: 481-503.

- Palkovits M, Somogyvári-Vigh A, Arimura A (1995). Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res.* 699 (1): 116-20.
- Pan JX, Lechan RM, Lin HD, Jackson IM (1985). Immunoreactive neuronal pathways of growth hormone-releasing hormone (GRH) in the brain and pituitary of the teleost *Gadus morhua*. *Cell Tissue Res.* 241 (3): 487-93.
- Parker DB, Coe IR, Dixon GH, Sherwood NM (1993). Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *Eur. J. Biochem.* 215 (2): 439-48.
- Parker DB, Power ME, Swanson P, Rivier J, Sherwood NM (1997). Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology.* 138 (1): 414-23.
- Peeters K, Gerets HH, Arckens L, Vandesande F (2000). Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor mRNA in the chicken brain. *J. Comp. Neurol.* 423 (1): 66-82.
- Peng C, Peter RE (1997). Neuroendocrine regulation of growth hormone and growth in fish. *Zool. Stud.* 36: 79-98.
- Pennartz CMA, Ito R, Verschure PFMJ, Battaglia FP, Robbins TW (2011). The hippocampal-striatal axis in learning, prediction and goal-directed behavior. *Trends Neurosci.* 34: 548-559.
- Pérez-Sánchez J, Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P, Saera-Vila A, Astola A, Valdivia MM (2002). Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiology and Biochemistry.* 27: 243-258.
- Pérez-Sánchez J, Le Bail PY (1999). Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177: 117-128.
- Pérez-Sánchez J, Marti-Palanca H, Le Bail PY (1994). Seasonal changes in circulating growth hormone (GH), hepatic GH binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine fish, gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.* 13 (3): 199-208.
- Persson K, Åhrén B (2002). The neuropeptide PACAP contributes to the glucagon response to insulin-induced hypoglycaemia in mice. *Acta Physiol. Scand.* 175: 25-28.
- Persson-Sjögren S, Forsgren S, Lindström P (2006). Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: effects on insulin release in isolated mouse islets in relation to metabolic status and age. *Neuropeptides* 40: 283-290.
- Peter RE (1973). Neuroendocrinology of teleost. *Am. Zool.* 13: 743-755.
- Peter RE, Gill VE (1975). A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei for the *goldfish*, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 159: 69-102.
- Peter RE, Nahorniak CS, Vale WW, Rivier JE (1984). Human pancreatic growth hormone-releasing factor (hpGRF) stimulates growth hormone release in goldfish. *J. Exp. Zool.* 231: 161-163.

- Peter RE, Marchant TA (1995). The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture* 129: 299-321.
- Picha ME, Turano MJ, Tipsmark CK, Borski RJ (2008a). Regulation of endocrine and paracrine sources of Igfs and Gh receptor during compensatory growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *J Endocrinol.* 199 (1): 81-94.
- Picha ME, Turano MJ, Beckman BR, Borski RJ (2008b). Endocrine Biomarkers of Growth and Applications to Aquaculture: A Mini review of Growth Hormone, Insulin Like Growth Factor (IGF)-I, and IGF Binding Proteins as Potential Growth Indicators in Fish. *North American Journal of Aquaculture* 70: 196-211.
- Piggins HD, Stamp JA, Burns J, Rusak B, Semba K (1996). Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *J. Comp. Neurol.* 376: 278-294.
- Postel-Vinay MC, Finidori J (1995). Growth hormone receptor: Structure and signal transduction. *Eur. J. Endocrinol.* 133: 654-659.
- Postel-Vinay MC (1996). Growth hormone- and prolactin- binding proteins: soluble forms of receptors. *Horm. Res.* 45: 178-181.
- Qian Y, Yan A, Lin H, Li W (2012). Molecular characterization of the GHRH/GHRH-R and its effect on GH synthesis and release in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 163 (2): 229-37.
- Rao SD, Prasada Rao PD, Peter RE (1996). Growth hormone-releasing hormone immunoreactivity in the brain, pituitary, and pineal of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp. Endocrinol.* 102: 210-220.
- Rawlings SR, Canny BJ, Leong DA (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat gonadotropes and somatotropes through different intracellular mechanisms. *Endocrinology* 132: 1447-1452.
- Rawlings SR, Piuz I, Schlegel W, Bockaert J, Journot L (1995). Differential expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptor subtypes in clonal pituitary somatotrophs and gonadotrophs. *Endocrinology* 136: 2088-2098.
- Reglodi D, Kiss P, Lubics A, Tamas A (2011). Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* 17: 962-972.
- Reichlin S (1961). Growth hormone content of pituitaries from rats with hypothalamic lesions. *Endocrinology.* 69: 225-30.
- Resch JM, Maunze B, Phillips KA, Choi S (2014). "Inhibition of food intake by PACAP in the hypothalamic ventromedial nuclei is mediated by NMDA receptors. *Physiology and Behavior* 133: 230-235.
- Riley LG, Richman NH III, Hirano T, Gordon Grau E (2002). Activation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17 alpha-methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol.* 127 (3): 285-92.
- Ringuelet RA (1942a). Ecología alimenticia del Pejerrey, *Odonthestes bonariensis*, con notas limnológicas sobre la laguna Chascomús. *Rev. Mus. La Plata, Zool.* 17: 427-461.

- Ringuelet RA (1942b). Ecología alimenticia del Pejerrey, *Odonthestes bonariensis*, del embalse Anzulón, La Rioja. Rev. Mus. La Plata, Zool. 58: 177-200.
- Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W (1982). Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. Nature 300: 276-8.
- Rodríguez-Expósito B, Gómez A, Martín-Monzón I, Reiriz M, Rodríguez F, Salas C (2017). Goldfish hippocampal pallium is essential to associate temporally discontinuous events. Neurobiol. Learn. Mem. 139: 128-134.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001). Mediation of IGF-I-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat. Cell Biol. 3: 1009-1013.
- Rosati L, Prisco M, Di Fiore MM, Santillo A, Valiante S, Andreuccetti P, Agnese M (2016). Role of PACAP on testosterone and 17 $\beta$ -estradiol production in the testis of wall lizard *Podarcis sicula*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology 191: 180-186.
- Rosenfeld RG, Hwa V (2004). New molecular mechanisms of GH resistance. European Journal of Endocrinology 151: S11-S15.
- Rousseau K, Dufour S (2004). Phylogenetic evolution of the neuroendocrine control of growth hormone: Contribution from teleosts. Cybium. 28: 181-198.
- Rousseau K, Huang YS, Le Belle N, Vidal B, Marchelidon J, Epelbaum J, Dufour S (1998). Long-Term Inhibitory Effects of Somatostatin and Insulin-Like Growth Factor 1 on Growth Hormone Release by Serum-Free Primary Culture of Pituitary Cells from European Eel (*Anguilla anguilla*). Neuroendocrinology 67: 301-309.
- Rousseau K, Le Belle N, Marchelidon J, Dufour S (1999). Evidence that corticotropin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the european eel (*Anguilla anguilla*). J. Neuroendocrinol. 11: 385-392.
- Rousseau K, Le Belle N, Pichavant K, Marchelidon J, Chow BK, Boeuf G, Dufour S (2001). Pituitary growth hormone secretion in the turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern of neuropeptides. Neuroendocrinology. 74 (6): 375-85.
- Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Roberto M, Tassoni G, Brunelli M (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat. Neurobiol. Learn. Mem. 76: 1-6.
- Savage GE, Roberts MG (1975). Behavioural effects of electrical stimulation of the hypothalamus of the goldfish (*Carassius auratus*). Brain. Behav. Evol. 12: 42-56.
- Savage MO, Cohen L, Cohen AJ, Cohen P, Saenger PH (2010). Pathophysiology, assessment and management of the child with growth hormone resistance. Pediatr. Endocrinol. Rev. 4: 347-56.
- Schally AV, Varga JL, Engel JB (2008). Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 4 (1): 33-43.
- Sciara AA, Rubiolo JA, Somoza GM, Arranz SE (2006). Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odonthestes bonariensis*) growth hormone. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 142: 284-292.

- Sciara AA, Somoza GM, Arranz SE (2008). Insulin-Like Growth Factor-I of Pejerrey, *Odontesthes bonariensis*: cDNA Characterization, Tissue Distribution and Expression Profiles After Growth Hormone Administration. *J. Exp Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 309 (7): 407-18.
- Seidah NG, Chrétien M (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain. Res.* 848: 45-62.
- Seidah NG, Chrétien M, Day R (1994). The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie.* 76: 197-209.
- Seidah NG, Day R, Marcinkiewicz M, Chrétien M (1998). Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* 839: 9-24.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.* 21 (6): 619-70.
- Shinoda T, Miranda LA, Okuma K, Hattori RS, Fernandino JI, Yoshizaki G, Somoza GM, Strüssmann CA, (2010). Molecular cloning and expression analysis of Fshr and Lhr in relation to Fsh $\beta$  and Lh $\beta$  subunits during the period of temperaturedependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 521-532.
- Shioda S, Takenoya F, Yagi M, Wang L, Hori Y, Kageyama H (2008). Neural networks of several novel neuropeptides involved in feeding regulation. *Nutrition* 24: 848-853.
- Shioda S, Nakamachi T (2015). PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides* 72: 202-207.
- Si Y, He F, Wen H, Li J, Zhao J, Ren Y, Zhao M, Ji L, Huang Z, Zhang M, Chen S (2016). Genetic polymorphisms and DNA methylation in exon 1 CpG-rich regions of PACAP gene and its effect on mRNA expression and growth traits in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology Biochemistry* 42 (2): 407-21.
- Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Törnell J, Isaksson OP, Jansson JO, Ohlsson C (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96: 7088-7092.
- Small BC, Nonneman D (2001). Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen Comp. Endocrinol.* 122 (3): 354-63.
- Smith CB, Eiden LE (2012). Is PACAP the major neurotransmitter for stress transduction at the adrenomedullary synapse? *J. Mol. Neurosci.* 48: 403-412.
- Soengas JL, Cerdá-Reverter JM, Delgado MJ (2018). Central regulation of food intake in fish: An evolutionary perspective. *Journal of Molecular Endocrinology.* 60: R171-R199.
- Sohn YC, Kobayashi M, Aida K (2001). Regulation of gonadotropin beta subunit gene expression by testosterone and gonadotropin-releasing hormones in the goldfish,

- Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129: 419-426.
- Stacey NE, MacKenzie DS, Marchant TA, Kyle AL, Peter RE (1984). Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*: I. Gonadotropin, growth hormone, and thyroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56: 333-348.
- Stachura ME (1977). Interaction of somatostatin inhibition and dibutyryl cyclic AMP or potassium stimulation of growth hormone release from perfused rat pituitaries. *Endocrinology* 101: 1044-1053.
- Stahlbom AK, Sara VR, Hoeben P (1999). Insulin-like growth factor mRNA in Barramundi (*Lates calcarifer*): alternative splicing and nonresponsiveness to growth hormone. *Biochem Genet* 37: 69-93.
- Stéfano AV, Aldana-Marcos HJ, Affanni JM, Somoza GM (2000). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiol. Biochem.* 23: 215-223.
- Strüssmann CA (1989). Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Doctoral Thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, 351pp. (Tesis).
- Strüssmann CA, Ng BC, Takashima F, Oshiro T (1993). Triploidy induction in an atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *The Progressive Fish-Culturist* 55: 83-89.
- Sumpter JP, Lincoln RF, Bye VJ, Carragher JF, LeBail PY (1991). Plasma growth hormone levels during sexual maturation in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 83 (1): 103-110.
- Suzuki N, Harada M, Hosoya M, Fujino M (1994). Enhanced production of pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide by 1, N<sup>6</sup>-dibutyryladenosine 3', 5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells, IMR-32. *Eur. J. Biochem.* 223 (1): 147-53.
- Sze KH, Zhou H, Yang Y, He M, Jiang Y, Wong AO (2007). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology.* 148 (10): 5042-59.
- Tachibana T, Saito ES, Takahashi H, Saito S, Tomonaga S, Boswell T, Furuse M (2004). Anorexigenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in the chick brain are mediated by corticotrophin-releasing factor. *Regul. Pept.* 120: 99-105.
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Ohneda M, Sasano H, Mouri T (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in human hypothalamus: Co-localization with arginine vasopressin. *Regul. Pept.* 50: 267-275.
- Tam JK, Lee LT, Cheng CH, Chow BK (2011). Discovery of a new reproductive hormone in teleosts: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-related peptide (PRP). *Gen Comp. Endocrinol.* 173 (3): 405-10.
- Tam JK, Lee LT, Chow BK (2007). PACAP-related peptide (PRP)--molecular evolution and potential functions. *Peptides.* 28 (9): 1920-9.

- Tamada T, Tanaka M, Ichitani Y, Okamura H, Yanaihara N, Iyata Y (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactive neuronal elements in rat hypothalamus and median eminence with special reference to morphological background of its effect on anterior pituitary-light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neurosci Lett.* 180: 105-108.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 (10): 2731-9.
- Tanaka M, Taniguchi T, Yamamoto I, Sakaguchi K, Yoshizato H, Ohkubo T, Nakashima K (1998). Gene and cDNA structures of flounder insulin-like growth factor-I (IGF-I): multiple mRNA species encode a single short mature IGF-I. *DNA Cell Biol* 17: 859-868.
- Tannenbaum GS, Epelbaum J (1999). Somatostatin. In: *Handbook of Physiology. The Endocrine System. Hormonal Control of Growth.* Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc. sect. 7, vol. V, chapt. 9, p. 221-265.
- Tannenbaum GS, Epelbaum E, Bowers CY (2003a). Ghrelin and the growth hormone neuroendocrine axis. In: *Brain Somatic Cross-Talk and the Central Control of Metabolism.* Berlin: Springer, p. 65-80.
- Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY (2003b). Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144: 967-974.
- Tejedor D (2001). El pejerrey como recurso genético. En: *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey.* F Grosman Ed. Editorial Astyanax, Buenos Aires, pp 27-31.
- Toledo-Cuevas EM, Moyano López FJ, Ramírez DT, Strüssmann CA, Álvarez-González CA, Martínez-Chávez CC, Martínez-Palacios CA (2011). Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquacult. Res.* 42: 776-786.
- Tovar Bohórquez MO, Mechaly AS, Hughes LC, Campanella D, Ortí G, Canosa LF, Somoza GM (2017a). Kisspeptin system in pejerrey fish (*Odonthestes bonariensis*). Characterization and gene expression pattern during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 204: 146-156.
- Tovar Bohórquez MO, Mechaly AS, Elisio M, Chalde T, Canosa LF, Miranda LA, Somoza GM (2017b). Kisspeptins and their receptors in the brain-pituitary-gonadal axis of *Odonthestes bonariensis*: Their relationship with gametogenesis along the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 252: 209-218.
- Trudeau VL, Somoza GM, Nahorniak CS, Peter RE (1992). Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology.* 56 (4): 483-90.
- Untergasser G, Kranewitter W, Walser F, Madersbacher S, Dirnhofer S, Berger P (1996). The testis as eutopic production site of human growth hormone, placental lactogen and prolactin: possible autocrine/ paracrine effects on testicular function. *Wien. Klin. Wochenschr.* 108: 541-546.

- Untergasser G, Kranewitter W, Schwärzler P, Madersbacher S, Dirnhofer S, Berger P (1997). Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 130: 53-60.
- Vanegas H (1983). Organization and physiology of the teleostean optic tectum. In: Davis RE, Northcutt RG, editors. *Fish neurobiology*, vol. 2. Higher brain areas and functions. Ann Arbor: The University of Michigan Press. pp. 43-90.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.* 61 (3): 283-357.
- Vaudry D, González BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52 (2): 269-324.
- Vaughan JM, Rivier J, Spiess J, Peng C, Chang JP, Peter RE, Vale W (1992). Isolation and characterization of hypothalamic growth-hormone releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology* 56: 539-49.
- Veldhuis JD (2003). A tripeptidyl ensemble perspective of interactive control of growth hormone secretion. *Horm. Res.* 60: 86-101.
- Velkeniers B, Zheng L, Kazemzadeh M, Robberecht P, Vanhaelst J, Hooghe-Peters E (1994). Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 on growth hormone and prolactin expression. *J. Endocrinol* 143: 1-11.
- Velloso CP (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British Journal of Pharmacology* 154: 557-568.
- Vera Cruz EM, Brown CL (2009). Influence of the photoperiod on growth rate and insulin-like growth factor-I gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *J. Fish. Biol.* 75 (1): 130-41.
- Vera Cruz EM, Brown CL, Luckenbach JA, Picha ME, Bolivar RB, Borski RJ (2007). Insulin-like growth factor-I cDNA cloning, gene expression and potential use as a growth rate indicator in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 251: 585-595.
- Villalba M, Bockaert J, Journot L (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J. Neurosci.* 17 (1): 83-90.
- Vu JP, Goyal D, Luong L, Oh S, Sandhu R, Norris J, Parsons W, Pisegna JR, Germano PM (2015). Pacap intraperitoneal treatment suppresses appetite and food intake via PAC1 receptor in mice by inhibiting ghrelin and increasing GLP-1 and leptin. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309 (10): 816-825.
- Wallis AE, Devlin RH (1993). Duplicate insulin-like growth factor-I genes in salmon display alternative splicing pathways. *Mol Endocrinol* 7: 409-422.
- Wang B, Jia J, Yang G, Qin J, Zhang C, Zhang Q, Sun C, Li W (2016). In vitro effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology* 237: 1-9.

- Wang B, Qin C, Zhang C, Jia J, Sun C, Li W (2014). Differential involvement of signaling pathways in the regulation of growth hormone release by somatostatin and growth hormone-releasing hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Molecular and Cellular Endocrinology* 382: 851-859.
- Wang X, Wei H, Zhao T, Zhu X, Yang X, Chen D, Zhou H (2013). Evidence for pituitary adenylate cyclase-activating peptide as a direct immunoregulator in teleost head kidney. *Fish and Shellfish Immunology* 34 (1): 265-272.
- Wang Y, Wong AO, Ge W (2003). Cloning, regulation of messenger ribonucleic acid expression, and function of a new isoform of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the zebrafish ovary. *Endocrinology* 144: 4799-4810.
- Wargelius A, Fjellidal PG, Benedet S, Hansen T, Björnsson BT, Nordgarden U (2005). A peak in *gh-receptor* expression is associated with growth activation in Atlantic salmon vertebrae, while upregulation of *igf-I receptor* expression is related to increased bone density. *Gen Comp. Endocrinol.* 142 (1-2): 163-8.
- Wei L, Chan WWS, Butler B, Cheng K (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced desensitization on growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 1396-1401.
- White SL, May V, Braas KM (2000). Organization of the rat PACAP gene. *Ann. NY Acad. Sci.* 921: 370-2.
- Williams NG, Interlichia JP, Jackson MF, Hwang D, Cohen P, Rodgers BD (2011). Endocrine Actions of Myostatin: Systemic Regulation of the IGF and IGF Binding Protein Axis. *Endocrinology*, 152 (1): 172-180.
- Wong AO, Li WS, Lee EK, Leung MY, Tse LY, Chow BK, Lin HR, Chang JP (2000). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell Biol.* 78: 329-343.
- Wood AW, Duan C, Bern HA (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* 243: 215-285.
- Wray V, Kokoschke C, Nokihara K, Naruse S (1993). Solution structure of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32: 5832-5841.
- Wu S, Roch GJ, Cervini LA, Rivier JE, Sherwood NM (2008). Newly-identified receptors for peptide histidine-isoleucine and GHRH-like peptide in zebrafish help to elucidate the mammalian secretin superfamily. *J Mol Endocrinol.* 41 (5): 343-66.
- Wullimann MF, Meyer DL (1993). Possible multiple evolution of indirect telencephalo-cerebellar pathways in teleosts: studies in *Carassius auratus* and *Pantodon buchholzi*. *Cell Tissue Res.* 274: 447-455.
- Wullimann MF, Rupp B, Reichert H (1996). Neuroanatomy of the Zebrafish Brain. A Topological Atlas. Birkhauser Verlag, Basell, Suiza, 144 pp.
- Xu M, Volkoff H (2009). Cloning, tissue distribution and effects of food deprivation on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)/PACAP-related peptide (PRP) and preprosomatostatin 1 (PPSS 1) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Peptides.* 30 (4): 766-76.
- Xu M, Long L, Chen L, Qin J, Zhang L, Yu N, Li E (2012). Cloning and differential expression pattern of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and the PACAP-specific receptor in darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*.

- Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 161 (1): 41-53.
- Xu Z, Ohtaki H, Watanabe J, Miyamoto K, Murai N, Sasaki S, Matsumoto M, Hashimoto H, Hiraizumi Y, Numazawa S, Shioda S (2016). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. *Scientific Reports* 6.
- Yada T, Hirano T (1992). Inhibition of growth hormone synthesis by somatostatin in cultured pituitary of rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 162B: 575-580.
- Yada T, Vigh S, Arimura A (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) increases cytosolic-free calcium concentration in folliculostellate cells and somatotropes of rat pituitary. *Peptides* 14: 235-239.
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96: 7324-7329.
- Yamamoto K, Hashimoto H, Hagihara N, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Baba A (1998). Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (PACAP) gene. *Gene*. 211 (1): 63-9.
- Yamamoto M, Iguchi G, Takeno R, Okimura Y, Sano T, Takahashi M, Nishizawa H, Handayaningshi AE, Fukuoka H, Tobita M, Saitoh T, Tojo K, Mokubo A, Morinobu A, Iida K, Kaji H, Seino S, Chihara K, Takahashi Y (2011). Adult combined GH, prolactin, and TSH deficiency associated with circulating PIT-1 antibody in humans. *J. Clin. Invest.* 121 (1): 113-119.
- Yamamoto N, Ito H (2005). Fiber connections of the anterior preglomerular nucleus in cyprinids with notes on telencephalic connections of the preglomerular complex, *Journal of Comparative Neurology*. 491: 212-233.
- Yang R, Jiang X, Ji R, Meng L, Liu F, Chen X, Xin Y (2015). Therapeutic potential of PACAP for neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Biology Letters* 20 (2): 265-278.
- Yon L, Feuilloley M, Chartrel N, Arimura A, Conlon JM, Fournier A, Vaudry H (1992). Immunohistochemical distribution and biological activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. *J. Comp. Neurol.* 324 (4): 485-9.
- Yon L, Jeandel L, Chartrel N, Feuilloley M, Conlon JM, Arimura A, Fournier A, Vaudry H (1993). Neuroanatomical and physiological evidence for the involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the regulation of the distal lobe of the frog pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 5 (3): 289-96.
- Yunker WK, Smith S, Graves C, Davis PJ, Unniappan S, Peter RE, Chang JP (2003). Endogenous hypothalamic somatostatins differentially regulate growth hormone secretion from goldfish pituitary somatotropes in vitro. *Endocrinology* 144: 4031-4041.
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL (1999). High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 129: 1195-1200.

- Zhang DC, Huang YQ, Shao YQ, Jiang SG (2006). Molecular cloning, recombinant expression, and growth-promoting effect of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) insulin-like growth factor-I. *Gen Comp Endocrinol* 148: 203-212.
- Zhang Y, Marchant TA (1999). Identification of serum GH-binding proteins in the goldfish (*Carassius auratus*) and comparison with mammalian GH-binding proteins. *Journal of Endocrinology* 161: 255-262.
- Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okoda S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94: 13215-13220.
- Zhu T, Goh ELK, Graichen R, Ling L, Lobie PE (2001). Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cellular Signalling* 13: 599-616.

**La presente tesis corresponde a la última versión de la misma e incluye las correcciones propuestas por los jurados.**

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and strokes, appearing to be a stylized name.

**Firma del autor**

A handwritten signature in black ink, featuring a large, sweeping initial 'C' followed by several smaller, connected letters, possibly 'Cun...'. The signature is written in a cursive style.

**Firma del director**