

<u>Abreviaturas/ Abbreviations</u>	1
<u>Resumen/ Resum/ Summary</u>	13
<u>1. Introducción</u>	21
<u>1.1. Sistema de melanocortinas</u>	23
<u>1.2. Antagonistas endógenos de los receptores de melanocortinas</u>	27
<u>1.3. Los receptores de melanocortinas</u>	29
<u>1.3.1. Receptor 1 de melanocortinas (MC1R)</u>	29
<u>1.3.2. Receptor 2 de melanocortinas (MC2R)</u>	31
<u>1.3.3. Receptor 3 de melanocortinas (MC3R)</u>	35
<u>1.3.4. Receptor 4 de melanocortinas (MC4R)</u>	37
<u>1.3.5. Receptor 5 de melanocortinas (MC5R)</u>	40
<u>1.4. Proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAP)</u>	41
<u>1.4.1. Estructura funcional de la MRAP1</u>	43
<u>1.4.2. Tras una función para la MRAP2</u>	47
<u>1.4.3 Las MRAPs en peces</u>	49
<u>1.5. Ritmos biológicos</u>	52
<u>1.5.1. Características de los ritmos biológicos</u>	54
<u>1.5.2. Bases moleculares de los relojes endógenos</u>	56
<u>1.5.3. Organización del sistema circadiano</u>	60
<u>1.5.4. Relojes endógenos y organización circadiana en peces</u>	61
<u>1.5.5. Alimentación y ritmos circadianos</u>	65
<u>1.5.6. Papel de las melanocortinas en los ritmos circadianos</u>	68
<u>2. Objetivos</u>	71
<u>3. Materiales y Métodos</u>	75
<u>3.1. Manejo de animales de experimentación</u>	77
<u>3.2. Reactivos</u>	78
<u>3.3. Conservación evolutiva de la respuesta de la sensibilidad del MC4R a la ACTH mediada por MRAP2</u>	79
<u>3.3.1. Construcciones plasmídicas</u>	79
<u>3.3.2. Cultivo celular</u>	79
<u>3.3.3. Diseño y dinámica experimental</u>	80
<u>3.3.4. Análisis “in silico” de la expresión tisular del hMC4R y hMRAP2</u>	81
<u>3.3.5. Alineamiento de secuencias de MRAP</u>	82
<u>3.3.6. Expresión de resultados y análisis estadísticos</u>	82
<u>3.4. Requerimientos estructurales de la interacción MRAP2-MC4R frente la respuesta a ACTH</u>	82

3.4.1. <u>Diseño de quimeras con pérdida de función</u>	82
3.4.2. <u>Diseño de quimeras con ganancia de función</u>	86
3.4.3. <u>Amplificación de las construcciones</u>	87
3.4.4. <u>Desarrollo de experimentos farmacológicos</u>	88
3.4.5. <u>Presencia de receptores quiméricos en la membrana plasmática</u>	89
3.5. <u>Efecto del sexo y los esteroides sexuales sobre la actividad circadiana locomotora del pez cebra</u>	90
3.5.1. <u>Diseño experimental</u>	90
3.5.2. <u>Preparación del alimento y alimentación</u>	91
3.5.3. <u>Registro de la actividad</u>	91
3.5.4. <u>Análisis de esteroides plasmáticos</u>	92
3.5.4.1. <u>Extracción de plasma sanguíneo en peces cebra</u>	92
3.5.4.2. <u>Determinación de los niveles de 17-β estradiol y 11-cetotestosterona (11-CT) mediante ELISA</u>	93
3.5.5. <u>Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión de los genes del reloj circadiano</u>	94
3.5.5.1. <u>Aislamiento de ARN total, síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (q)</u>	95
3.6. <u>Efecto de la sobreexpresión de ASIP sobre los ritmos de actividad locomotora del pez cebra</u>	98
4. Resultados	99
4.1. <u>Conservación evolutiva de la respuesta de la sensibilidad del MC4R a la ACTH mediada por MRAP2</u>	101
4.1.1. <u>Perfiles farmacológicos del MC4R inducidos por MRAP2a</u>	101
4.1.2. <u>Expresión tisular</u>	104
4.1.3. <u>La comparación de las secuencias de MRAP revela regiones conservadas y no conservadas potencialmente responsables de las propiedades funcionales específicas</u>	105
4.2. <u>Identificación de dominios implicados en la sensibilización del MC4R a la ACTH mediada por la MRAP2</u>	108
4.2.1. <u>Quimeras con pérdida de función</u>	108
4.2.2. <u>Quimeras con ganancia de función</u>	116
4.2.3. <u>Expresión en membrana de los receptores quiméricos</u>	119
4.3. <u>Efecto del sexo y los esteroides sexuales sobre la actividad circadiana locomotora del pez cebra</u>	126
4.3.1. <u>Niveles de esteroides sexuales en peces alimentados con piensos hormonados</u>	126
4.3.2. <u>Análisis del efecto del sexo y las hormonas esteroideas sobre la actividad locomotora del pez cebra</u>	126

<u>4.3.3. Análisis del efecto del sexo y las hormonas esteroideas sobre los niveles de expresión génica en diferentes tejidos del pez cebra</u>	129
<u>4.4. Efecto de la sobreexpresión de antagonistas endógenos de melanocortinas sobre la actividad locomotora del pez cebra</u>	135
<u>5. Discusión</u>	139
<u>5.1. Conservación evolutiva de la respuesta de la sensibilidad del MC4R a la ACTH mediada por MRAP2</u>	141
<u>5.2. Identificación de dominios implicados en la sensibilización del MC4R a la ACTH mediada por la MRAP2</u>	144
<u>5.2.1. Importancia de los dominios extracelulares</u>	153
<u>5.2.2. Importancia de los dominios intracelulares</u>	155
<u>5.2.3. Importancia de los dominios transmembrana</u>	158
<u>5.2.4. Un modelo para la interacción con MRAP2a-ACTH-MC4R</u>	165
<u>5.3. Efecto del sexo y los esteroides sexuales sobre la actividad circadiana locomotora del pez cebra</u>	168
<u>5.4. Efecto de la sobreexpresión de antagonistas endógenos de melanocortinas sobre la actividad locomotora del pez cebra</u>	173
<u>6. Conclusiones</u>	177
<u>7. Bibliografía</u>	181