



TESIS DOCTORAL

Estudios de estructura-actividad de la interacción entre el receptor de melanocortinas tipo 4 (MC4R) y las proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAPs) e implicación de las melanocortinas en la regulación de los ritmos circadianos de actividad.

Lucía Soletto Esteban

Dirigida por Dr. José Miguel Cerdá Reverter

Valencia, Septiembre 2020



TESIS DOCTORAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Estudios de estructura-actividad de la interacción entre el receptor de melanocortinas tipo 4 (MC4R) y las proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAPs) e implicación de las melanocortinas en la regulación de los ritmos circadianos de actividad.

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València

Presentada por

Lucía Soletto Esteban

Director

José Miguel Cerdá Reverter



IATS
INSTITUTO DE ACUICULTURA TORRE DE LA SAL



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

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

El presente trabajo titulado “ Estudios de estructura-actividad de la interacción entre el receptor de melanocortinas tipo 4 (MC4R) y las proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAPs) e implicación de las melanocortinas en la regulación de los ritmos circadianos de actividad.” , presentado por Lucía Soletto Esteban, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia; ha sido realizado bajo su dirección y que, una vez revisado y comprobado el trabajo, considera que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Para que así conste

José Miguel Cerdá Reverter



La presente Tesis Doctoral llevada a cabo en el Departamento de Fisiología de peces y biotecnología del Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); se realizó con la ayuda del apoyo económico del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Lucía Soletto Esteban ha sido beneficiaria de un contrato de Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2014-070372) para la realización del proyecto “Estudios de estructura-actividad de la interacción entre el receptor de melanocortinas tipo 4 (MC4R) y las proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAPs) e implicación de las melanocortinas en la regulación de los ritmos circadianos de actividad” (AGL2013-46448-C3-3-R).

Parte de la financiación ha sido obtenida de proyectos de investigación entre los cuales destaca: “Implicación del sistema de melanocortinas en la regulación de los mecanismos temporales y conductuales de peces” (MELANOCONDUCT) (AGL2016-74857-C3-3-R) Proyectos I+D+I, RETOS.

Parte del trabajo experimental fue realizado en colaboración con el Prof. Nicholas S. Foulkes, del Instituto de Toxicología y Genética (ITG) del Instituto Tecnológico de Karlsruhe (KIT) de Alemania. Los fondos económicos para la realización de esta estancia breve de investigación fueron proporcionados por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (EEBB-I-16-11803).



Agradecimientos

Parece que fue ayer, y ya han pasado 15 años desde el día que había que elegir que ibas a estudiar durante los próximos 5 años. Mi primera opción, biología, y pese a los típicos comentarios de la falta de oportunidades laborales que suponía estudiar esa carrera, me aventuré en el conocimiento de la vida.

Desde entonces, muchas han sido las personas que han hecho posible este sueño. De esta etapa recuerdo con especial cariño a los profesores de la Universidad Autónoma de Madrid; gracias a todos ellos por transmitir su pasión por la biología y sus conocimientos.

Pero sobre todo gracias a los biologuitos por compartir esos inolvidables momentos como las partidas variadas, los paseos en silla por la cafetería o las caídas en la papelera. Gracias a Anita por su inestimable ayuda en la realización de la tesis, no se que habría hecho sin ti... Y gracias Martita por su preocupación e interés en la misma. Gracias a Ale, Gaby, Hector, Patri, Raquel y Vicky por todas las risas, las fiestas de pijama, las salidas al campito, y por compartir también aquellos momentos de pánico previos a los exámenes.

Avanzando un poco más, mi agradecimiento a Olivier Vincent por darme la oportunidad de adentrarme un poquito más en el mundo de la investigación, y gracias también a Antonio, quien me transmitió su pasión por descubrir por primera vez algo que nadie más había visto antes revelando una película de un western blot.

Moitas grazas a mis galleguiños. En primer lugar gracias a Nelson y Ana por darme la oportunidad de comenzar mi carrera profesional en investigación; gracias a Nelson por ser un gran investigador y profesor con quien era un placer asistir a sus clases de estadística. Graciñas a Ana, no solo por su gran capacidad como investigadora sino por su inmenso corazón haciendo que te sientas a gusto en todo momento. Gracias a Conchi por su profesionalidad y hospitalidad. Gracias a todos los del despacho en especial a Roberto por su ayuda con la biología molecular. Gracias Rubén y Ricardo por esos momentos en el café y su gran ayuda en las traducciones al gallego. Y mi más cariñoso gracias a mis niñas Eli y Ruti; gracias a Eli por su hospitalidad y su experiencia como chica todoterreno y gracias a Ruti no solo por estar ahí en los buenos momentos sino por estar en aquellos que no lo han sido tanto. Gracias a mi compi Laura por esos paseos y esas risas observando el temple de los gallegos en situaciones extraordinarias.

Muchas gracias a mi director de tesis. Sin el no hubiese sido posible doctorarme. Jose Miguel, gracias por darme la oportunidad de dar este gran paso en mi carrera en la investigación, gracias por esas reuniones en las que cada palabra era puro aprendizaje. Gracias a todo el grupo de control de ingesta en especial a Raul, Elisa, Ana, Rita y Sergio por esas ayudas sin las cuales hubiese sido

imposible sobrevivir. Gracias también toda la gente del IATS por su colaboración en las tareas de investigación, en especial moltes graciès a Ximet por su siempre dispuesta ayuda con los peces.

Pero sobre todo gracias a Paula, Vero, Cinta, Juan Antonio, Xavi y Aye no solo por las risas y barbacoas, sino, por haber estado ahí en todo momento. Muchas gracias a Miguel, Erick, Nando, Alejandra y Kike por la ayuda y por todos los buenos momentos.

I will be forever grateful to Nick and Daniela for welcoming me in your group and sharing your experience and knowledge. I also want to express my gratitude to all members of the group. 谢谢 Haiyu and Ly, and Danke Mareike for your dedication in teaching me.

Y por otro lado, unas breves líneas a todas esas personitas que han compartido esta aventura sin entender muy bien qué es lo que hago, pero sin quienes sé que hubiese sido imposible lograrlo.

Gracias a las hortalinas porque han sido de gran apoyo en los momentos difíciles, por todos estos años, y los que vendrán.

Gracias a Cris, Patri, Laura, Isa, David, Oscar por esas cenas, paseos y charlas pasadas, presentes y futuras.

Gracias a The rurals por todas esas escapadas, gymkanas varias y risas.

Gracias a mi tia Loli por ser un apoyo y por su disponibilidad para todo.

Gracias a mi familia por esos encuentros, celebraciones, fiestas de pueblo y bailes navideños pasados y futuros.

Gracias a mis abuelos, a mi abuela Rafaela por su preocupación por mi haya donde fuere, y a mis abuelos que aunque ya no están fueron siempre un ejemplo a seguir.

Gracias a Alfredo, por ser “magmánimo” y por acompañarme todos estos años, gracias por tus consejos y la mítica frase “Cuando lleguemos al río, vemos como lo cruzamos”; que me hace ver que todo es posible paso a paso.

Gracias a Álvaro, no solo por estos años, sino por todos. Gracias por esa red que hace saber que siempre tendrás a alguien ahí.

Gracias a quien les debo todo, a mis padres. Sin vosotros no hubiera conseguido llegar hasta aquí. Gracias por darme la oportunidad de dedicarme a lo que he querido y por apoyarme durante todo el camino, gracias por trasmitirme vuestros valores de pelear por lo que se quiere. Ellos son el mejor modelo a seguir, haciendo que me sienta orgullosa de ellos, gracias por hacerme la vida tan fácil y por todo vuestro cariño incondicional. A ellos les doy las gracias porque son los responsables de todo esto.

Índice

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

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

4.3.2. Análisis del efecto del sexo y las hormonas esteroideas sobre la actividad locomotora del pez cebra	126
4.3.3. Análisis del efecto del sexo y las hormonas esteroideas sobre los niveles de expresión génica en diferentes tejidos del pez cebra	129
4.4. Efecto de la sobreexpresión de antagonistas endógenos de melanocortinas sobre la actividad locomotora del pez cebra	135
5. Discusión	139
5.1. Conservación evolutiva de la respuesta de la sensibilidad del MC4R a la ACTH mediada por MRAP2	141
5.2. Identificación de dominios implicados en la sensibilización del MC4R a la ACTH mediada por la MRAP2.....	144
5.2.1. Importancia de los dominios extracelulares	153
5.2.2. Importancia de los dominios intracelulares	155
5.2.3. Importancia de los dominios transmembrana	158
5.2.4. Un modelo para la interacción con MRAP2a-ACTH-MC4R	165
5.3. Efecto del sexo y los esteroides sexuales sobre la actividad circadiana locomotora del pez cebra	168
5.4. Efecto de la sobreexpresión de antagonistas endógenos de melanocortinas sobre la actividad locomotora del pez cebra	173
6. Conclusiones.....	177
7. Bibliografía	181

The background of the slide is a teal-colored underwater scene. At the top, there is a turbulent surface of water with many bubbles and ripples. Below the surface, the water is clearer but still contains numerous small, rising bubbles, creating a sense of depth and movement. The overall color palette is various shades of teal and blue-green.

Abreviaturas

Abbreviations

11-CA	11-ceto-androstenediona/ 11-keto-androstenedione
11-CT	11-cetotestosterona /11- Ketotestosterone
8-Br- cAMP	8-bromo-adenosin-3',5'-monofosfato cíclico/ 8-bromo-adenosine 3',5'-c ycllic monophosphate
β-LPH	β-lipotrofina/ β-lipotrophin
β-EP	β-endorfina/ β-endorphin
AACE	Enzima convertidor de ACTH/ ACTH-converter enzyme
AAD	Aminoácido aromático descarboxilasa/ Aromatic amino acid decarboxylase
AANAT	Aril- alquilamina N-acetiltransferasa/ Aryl-alkylamine N-acetyl-transferasa
AC	Adenilato ciclasa/ Adenylate cyclase
ACTH	Hormona adrenocorticotropa / Adrenocorticotropic hormone
AGRP	Proteína relacionada con agutí / Agouti-related protein
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico/ Adenosine monophosphate
AMP_r	Gen de resistencia a ampicilina/ Ampicillin resistance gene
APB	Aminopeptidasa/ Aminopeptidase

ARH	Núcleo arqueado del hipotálamo / Arcuate nucleus of the hypothalamus
ASIP	Proteína de señalización agutí/ Agouti-signaling protein
ATP	Adenosín trifosfato/ Adenosine triphosphate
AVP	Arginina vasopresina/ Arginine vasopresine
bHLH	Dominios básicos hélice-lazo-hélice/ Basic domain helix-loop-helix
Bmal1	Proteína 1 del cerebro y músculo parecida a ARNT/ Brain and muscle ARNT-like protein 1
BMI	Índice de masa corporal/ Body mass index
BRET	Transferencia de energía de resonancia bioluminiscente/ Bioluminescence resonance energy transfer
BSA	Albúmina de suero bovino/ Bovine serum albumine
CART	Transcrito que regula cocaína y anfetamina/ Cocaine and amphetamine-regulated transcript
cADN	ADN complementario/ Complementary DNA
CKIϵ	Caseína quinasa épsilon / Casein kinase épsilon.
CKK	Colecistoquinina / Cholecystokinin

CLIP	Péptido intermediario parecido a corticotropina / Corticotropin-like intermediate peptide
CLK	Clock/ Clock
Clock	Ciclos de salida circadiana locomotora Kaput/ Circadian locomotor output cycles Kaput
CHO	Ovario de hámster chino/ Chinese hamste rovary
CLIP	Péptido intermediario parecido a la corticotropina/ Corticotropin-like intermediate peptide
CMV	Citomegalovirus/ Cytomegalovirus
COS-7	Fibroblastos de riñón de mono verde/ African green monkey fibroblast
CPE	Carboxipeptidasa/ Carboxypeptidase
CRE	Elementos de respuesta al AMPc / cAMP responsive elements
CREB	Elemento de unión en respuesta a AMPc/ cAMP response element-binding
CRF	Factor liberador de ACTH/ Corticotropin-releasing hormone
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas/ Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Abreviaturas/ Abbreviations

CRY	Criptocromo/ Cryptochrome
Ct	Ciclo umbral/ Threshold cycle
CYC	Cycle/ Cycle
DBT	Double time/Double time
DNA	Ácido desoxirribonucleico/ Desoxiribonucleic acid
DMEM	Medio eagle modificado por Dulbecco / Dulbecco's modified eagle's medium
DMH	Núcleo dorsomedial del hipotálamo / Dorsomedial nucleus of the hypothalamus
DMSO	Dimetilsulfóxido / Dimethyl sulfoxide
dNTP	Desoxinucleosido trifosfato/ Deoxynucleoside triphosphate
DPBS	Tampón fosfato salino de Dulbecco/ Dulbecco's phosphate buffered saline
DPE	Fosfodiesterasa/ Phosphodiesterase
ECL	Extracelular/ Extracellular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético/ Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas/ Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Retículo endoplasmático/ Endoplasmic reticulum
EST	Marcadores de secuencias expresadas/ Expressed sequence tags
FEO	Oscillator inducible por la alimentación/ Feeding-inducible oscillator
FAA	Actividad anticipatoria de alimentación/ Food anticipatory activity
FBS	Suero fetal bovino/ Fetal bovine serum
FDA	Asociación de Alimentación y Medicamentos/ US Food and Drug Association
FGD	Deficiencia de glucocorticoides familiar/ Familial glucocorticoid deficiency
GAL	Galactosidasa/ Galactosidase
GABA	Ácido γ -aminobutírico/ γ -aminobutyric acid
GDP	Guanosín difosfato/ Guanosine diphosphate
GLP1	Péptido similar al glucagón/ Glucagon-like peptide

Abreviaturas/ Abbreviations

GMPC	Guanosín monofosfato cíclico/ Cyclic guanosine monophosphate
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G / G protein-coupled receptors
GTP	Guanosín trifosfato/ Guanosine triphosphate
HEK	Embrionarias de riñón humano/ Human embryonic kidney
HIOMT	5-Hidroxi-indol-O-metiltransferasas / Hydroxy-indole-o-methyltransferase
HPA	Hipotalámico-pituitaria-adrenal/ Hypothalamic-pituitary-adrenal
HPLC	Cromatografía líquida/ High-performance liquid chromatography
IBMX	Inhibidor de fosfodiesterasa / Phosphodiesterase inhibitor
ICL	Intracelular/ Intracellular
IS	Espasmos infantiles/ Infantile spasms
JET	Jetlag/ Jetlag
JP	Péptido de unión/ Joint peptide
KO	Knockout/ Knockout
LA	Actividad locomotora/ Locomotor activity

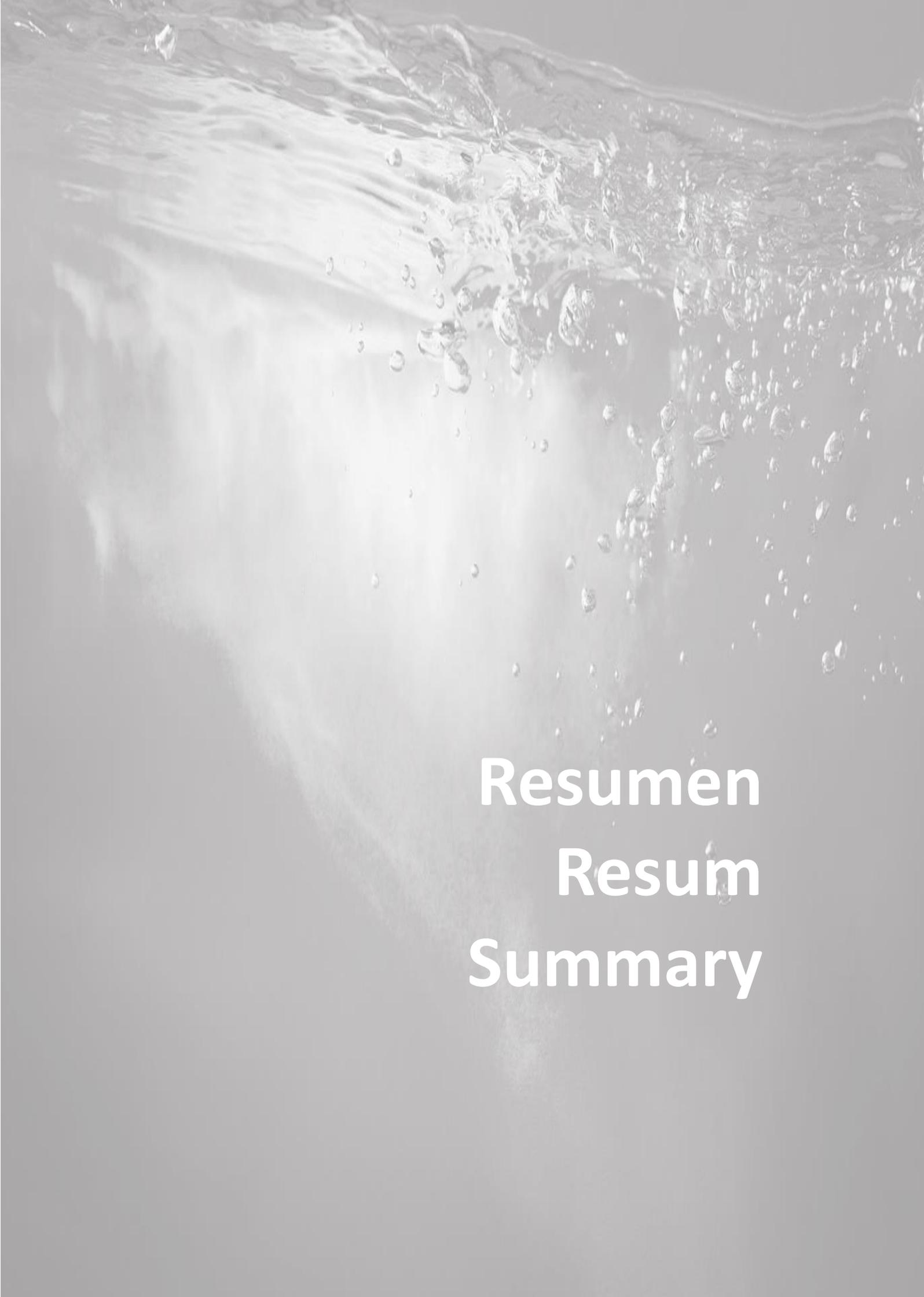
LACRs	Actividad locomotora de los ritmos circadianos/ Locomotor activity circadian rhythms
LEO	Oscilador inducible por luz / Light-inducible oscillator
Mbp	Mega pares de bases/ Mega base pairs
MCH	Hormona concentradora de los melanocitos/ Melanin-concentrating hormone
MCRs	Receptores de melanocortinas / Melanocortin receptors
MRAP	Proteína accesoria de los receptores de melanocortinas/ Melanocortin receptor accessory protein
MSHs	Hormonas estimulantes de los melanocitos / Melanocyte-stimulating hormones
MT II	Melanotan II / Melanotan II
NAS	Ajuste no significativo/ Non adjustment significative
NAT	N-acetiltransferasa/ N-acetyltransferase
NPY	Neuropéptido Y / Neuropeptide Y
OD	Densidad óptica/ Optical density
ONPG	Orto-nitrofenil-galactopiranosido/Ortho-Nitrophenyl- β -galactoside

PAF	Paraformaldehido/ Paraformaldehyde
PAM	Peptidilglicina monooxigenasa α -amidación / Peptidyl α -monooxygenase
PBS	Tampón fosfato salino / Phosphate buffered saline
pBSSK	Plásmido pBlue-Script SK/ pBlue-Script SK plasmide
PC	Prohormona convertasas / Prohormone convertases
PDP1ϵ	Proteína de dominio PAR1 epsilon/ PAR1 domain protein epsilon
PER	Periodo/ Period
PAK	Proteína quinasa A/ Protein kinase A
PKR	Receptor de prokineticina / Prokineticin receptor
POMC	Proopiomelanocortina / Proopiomelanocortin
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisómicos/ Peroxisome proliferator-activated receptors
PRCP	Proilcarboxipeptidasa/ Prolylcarboxypeptidase
PVN	Núcleo paraventricular/ Paraventricular nucleus
RLU	Unidades relativas de luz/ Relative light units
RNA	Ácido ribonucleico/ Ribonucleic Acid

RNAseq	Secuenciación masiva de RNA/ RNA sequencing
RPM	Revoluciones por minuto/ Revolutions per minute
RT	Transcripción inversa/ Reverse transcription
RT-PCR	PCR en tiempo real/Real time PCR
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa/ Quantitative polymerase chain reaction
S1PR	Receptor de esfingosina 1-fosfato/ Sphingosine-1-phosphate receptor
SCN	Núcleo supraquiasmático/ Suprachiasmatic nucleus
SEM	Error estándar de la media/ Standard error of the mean
SNC	Sistema nervioso central/ Central nervous system
SNP	Mutaciones de único nucleótido/ Single Nucleotide Polymorphism
spPVNz	Zona subparaventricular del núcleo paraventricular / Subparaventricular zone of the paraventricular nucleus
SPZ	Zona subparaventricular/ Subparaventricular zone
TAE	Tris-acetato-EDTA/ Tris-acetate-EDTA
TIM	Timeless/ Timeless

Abreviaturas/ Abbreviations

TM	Transmembrana/ Transmembrane
TPH	Triptofano hidroxilasa/ Tryptophan hydroxylase
TPM	Transcritos por millón/ Transcrip per million
TTLF	Loop de retroalimentación transcripcional-translacional/ Transcription-translation feedback loop
UV	Ultravioleta/ Ultraviolete
VIP	Péptido intestinal vasoactivo/ Vasoactive intestinal peptide
VRI	Factores de transcripción Vrille/ Vrille transcription factors
VTA	Área tegmental ventral/ Ventral tegmental area
Zf	Pez cebra/ Zefrafish
ZT	Zeitgeber/ Zeitgeber

A grayscale, high-speed photograph of water splashing and bubbling, creating a dynamic and textured background. The water is captured in mid-air, with numerous small bubbles and larger droplets visible, giving it a sense of movement and depth. The lighting is soft, highlighting the intricate patterns of the water's surface.

Resumen Resum Summary

El sistema de melanocortinas es un sistema hormonal crítico en la respuesta al estrés y el control del balance energético. Sus péptidos agonistas, las hormonas estimuladoras de los melanocitos (MSHs) y la hormona adrenocorticotropa (ACTH) están codificados en un precursor común denominado proopiomelanocortina (POMC). Sus efectos se medían a través de 5 receptores (MCRs) que exhiben farmacologías y dominios de expresión particulares. Los efectos de los agonistas son contrarrestados por la acción de dos antagonistas endógenos, la proteína de señalización agutí (ASIP) y la proteína relacionada con agutí (AGRP), que pueden actuar como agonistas inversos de los receptores activados constitutivamente. Para aumentar la complejidad del sistema hormonal existen dos proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAPs) que interactúan físicamente con los receptores para permitir (MC2R) o modular (MC1R, MC3R, MC4R, MC5R) la expresión funcional de los mismos. La MRAP1 es imprescindible para la migración a la membrana plasmática del MC2R mientras que la MRAP2 interactúa con el resto de receptores para modular su actividad.

Experimentos anteriores demostraron que, en el pez cebra, uno de los dos parálogos de MRAP2 (MRAP2a) es capaz de interactuar con el MC4R, un receptor canónico de la MSH, transformándolo en un receptor de ACTH. Los experimentos recogidos en esta tesis doctoral demuestran que esta función se ha conservado evolutivamente y esta conservación evolutiva sugiere la existencia de un rol fisiológico para la interacción MRAP2-MC4R. Este rol puede estar relacionado con la transmisión de información desde el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, que regula la respuesta al estrés hacia los sistemas centrales que controlan el balance energético. Además, proponemos que dicha interacción oferta un mecanismo molecular potencial para la explicación de los beneficios de la terapia con ACTH en el síndrome de espasmos infantiles.

Nuestro segundo objetivo fue caracterizar molecularmente la interacción entre ambas proteínas (MRAP2 y MC4R) utilizando una estrategia de receptores quiméricos. Experimentos previos en nuestro laboratorio habían demostrado que la interacción MRAP2a-MC1R no provocaban una alteración farmacológica del receptor. Por tanto, nuestra estrategia fue sustituir diferentes dominios del MC4R

por aquellos homólogos del MC1R esperando una pérdida de función, es decir una pérdida de la sensibilidad a ACTH inducida por la MRPA2a en el receptor quimérico. Una vez detectados estos dominios fundamentales optamos por la estrategia contraria, es decir, la sustitución de dominios del MC1R por aquellos homólogos del MC4R esperando una ganancia de función. Los resultados demuestran que la sustitución conjunta de los dominios transmembranales (TM) 3, 5 y 7 conjuntamente con el segundo y tercer giros extracelulares (ECL) del MC4R sobre el MC1R confiere sensibilidad a ACTH al receptor quimérico. Basándonos en los modelos estructurales de la interacción de diversos agonistas con el MC4R, nuestros resultados otorgan luz sobre la relación funcional entre la MRPA2a y el MC4R y permiten inferir modelos de interacción especulativos.

Resultados transcriptómicos previos del grupo de investigación habían sugerido la participación del sistema de melanocortinas en la regulación del reloj circadiano, por tanto, nuestro siguiente objetivo fue demostrar esta interrelación. Para ello utilizamos el paradigma de la actividad locomotora circadiana habitualmente utilizada para el estudio de los ritmos circadianos. En primer lugar, y para poner a punto el sistema de registro de la actividad, estudiamos las diferencias de actividad locomotora entre grupos aislados de machos y hembras mostrando que bajo estas condiciones de aislamiento los ritmos de actividad locomotora son dependientes del sexo, además también demostramos que la administración oral de esteroides opuestos al sexo fenotípico, es decir estradiol en machos y 11-ceto-androstenediona (como precursor de la 11-cetotestosterona) en hembras, revertía parcialmente los efectos del sexo sobre el perfil locomotor. Finalmente quisimos estudiar la posible interacción del sistema de melanocortinas y la regulación del reloj circadiano demostrando que la sobreexpresión de antagonistas endógenos en modelos de transgénesis en el pez cebra modifica el patrón de actividad de los animales. Los animales transgénicos exhiben una mayor actividad significativa especialmente durante el periodo nocturno. Estos datos concuerdan con datos ya publicados por nuestro grupo de investigación donde se demuestra la ausencia de diferencias significativas en los niveles de melatonina entre el día y la noche en animales transgénicos.

El sistema de melanocortines és un sistema hormonal crític en la resposta a l'estrès i el control del balanç energètic. Els seus pèptids agonistes, les hormones estimuladores dels melanòcits (MSHs) i l'hormona adrenocorticotropa (ACTH) estan codificats en un precursor comú denominat proopiomelanocortina (POMC). Els seus efectes es mesuraven a través de 5 receptors (MCRs) que exhibeixen farmacologies i dominis d'expressió particulars. Els efectes dels agonistes són contrarestats per lacció de dos antagonistes endògens, la proteïna de senyalització agutí (ASIP) i la proteïna relacionada amb agutí (AGRP), que poden actuar com agonistes inversos dels receptors activats constitutivament. Per a augmentar la complexitat del sistema hormonal existeixen dos proteïnes accessòries dels receptors de melanocortines (MRAPs) que interaccionen físicament amb els receptors per a permetre (MC2R) o modular (MC1R, MC3R, MC4R, MC5R) l'expressió funcional dels receptors. La MRAP1 és imprescindible per la migració a la membrana plasmàtica del MC2R mentre que la MRAP2 interactua amb la resta de receptors per a modular la seua activitat.

Experiments anteriors van demostrar que, en el peix zebra, un dels dos paràlegs de MRAP2 (MRAP2a) és capaç d'interactuar amb el MC4R, un receptor canònic de la MSH, transformant-lo en un receptor d'ACTH. Els experiments recollits en aquesta tesis doctoral demostren que aquesta funció s'ha conservat evolutivament i aquesta conservació evolutiva suggereix l'existència d'un rol fisiològic per a la interacció MRAP2-MC4R. Aquest rol pot estar relacionat amb la transmissió d'informació des de l'eix hipotàlam-hipòfisis-interrenal que regula la resposta a l'estrès cap als sistemes centrals que control·len el balanç energètic. A més a més, proposem que l'esmentada interacció oferta un mecanisme molecular potencial per l'explicació dels beneficis de la teràpia amb ACTH en síndrome d'espasmes infantils.

El nostre segon objectiu fou caracteritzar molecularment la interacció entre ambdues proteïnes (MRPA2 y MC4R) utilitzant una estratègia de receptors quimèrics. Experiments previs al nostre laboratori havien demostrat que la interacció MRAP2a-MC1R no provocaven una alteració farmacològica del receptor.

Per tant, la nostra estratègia fou substituir diferents dominis del MC4R per aquells homòlegs del MC1R esperant una pèrdua de funció, és a dir una pèrdua de la sensibilitat a ACTH induïda per la MRPA2a en el receptor quimèric. Una vegada detectats aquests dominis fonamentals optem per l'estratègia contrària, és a dir, la substitució de dominis del MC1R per aquells homòlegs del MC4R esperant una ganància de funció. Els resultats demostren que la substitució conjunta dels dominis transmembranals (TM) 3, 5 i 7 conjuntament amb el segon i tercer girs extracelulars (ECL) del MC4R sobre el MC1R confereix sensibilitat a ACTH al receptor quimèric. Basant-nos en els models estructurals de la interacció de diversos agonistes amb el MC4R els nostres resultats atorguen llum sobre la relació funcional entre la MRPA2a i el MC4R i permeteixen inferir models d'interacció especulatiu.

Resultats transcriptòmics previs del grup d'investigació havien suggerit la participació del sistema de melanocortines en la regulació del rellotge circadià, per tant, el nostre següent objectiu fou demostrar aquesta interrelació. Per a això utilitzem el paradigma de l'activitat locomotora circadiana habitualment utilitzada per l'estudi dels ritmes circadians. En primer lloc, i per posar a punt el sistema de registre de l'activitat, estudiem les diferències d'activitat locomotora entre grups aïllats de mascles i femelles mostrant que baix aquestes condicions d'aïllament els ritmes d'activitat locomotora són dependents del sexe, a més a més també demostrem que l'administració oral de esteroïdes oposats al sexe fenotípic, és a dir estradiol en mascles i 11-ceto-androstenediona (com a precursor de la 11-cetotestosterona) en femelles, revertia parcialment els efectes del sexe sobre el perfil locomotor. Finalment vam voler estudiar la possible interacció del sistema de melanocortines i la regulació del rellotge circadià demostrant que la sobreexpressió d'antagonistes endògens en models de transgènesis en el peix zebra modifica el patró d'activitat dels animals. Els animals transgènics exhibeixen una major activitat significativa especialment durant el període nocturn. Aquestes dades concorden amb dades publicades anteriorment pel nostre grup d'investigació on es demostra l'absència de diferències significatives en els nivells de melatonina entre el dia i la nit en animals transgènics.

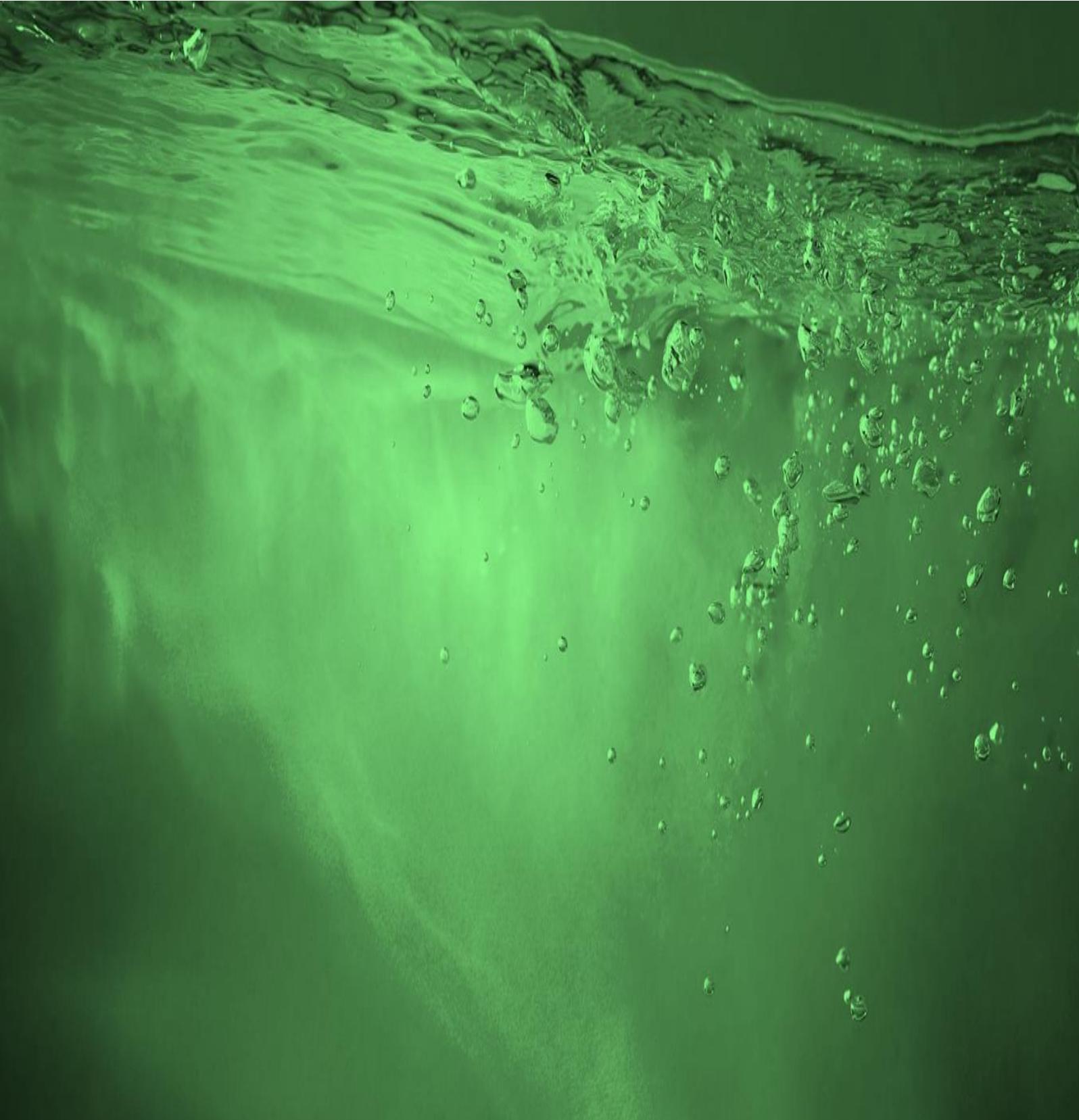
Melanocortin system is a key hormonal system in the regulation of stress response and the control of energy balance. Peptide agonist, the melanin-stimulating hormones (MSHs) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) are encoded in a common precursor named proopiomelanocortin (POMC). Their effects are mediated through five receptors that exhibit different expression domains and pharmacological properties. Agonist effects are counterbalanced by the action of endogenous competitive antagonist, agouti-signalling protein (ASIP) and agouti-related protein (AGRP) that can also work as inverse agonist at constitutive activated receptors. To increase the complexity of the hormonal system, two melanocortin receptor accessory proteins (MRAPs) physically interplay with the melanocortin receptors to allow (MC2R) or modulate (MC1R, MC3R, MC4R, and MC5R) the functional expression of the receptors. MRAP1 is critical for the MC2R traffic to the plasma membrane whereas MRAP2 interacts with the remaining receptors to modulate their activity.

Our previous experiments demonstrated that, in the zebrafish, one of the two MRAP2 paralogues (MRAP2a) is able to physically interact with the MC4R, a canonical MSH receptor, to become an ACTH receptor. Experiments in the doctoral thesis demonstrate that this function is conserved and this evolutionary conservation suggests a physiological role for the MC4R-MRAP2 interaction. This role can be related to the information relay from the hypothalamic-pituitary-interrenal axis, that regulates the stress response, to the central systems that controls energy balance. In addition, we propose that this interaction can be the molecular substrate explaining the ACTH therapy of the infantile spasm syndrome in humans.

One second objective was to molecularly characterize the interaction between both proteins (MC4R and MRAP2a) using a receptor quimeras strategy. Previous experiments in our lab demonstrated that the interaction of MRAP2a with MC1R cannot modify the pharmacological profile of the receptor. Therefore, our strategy was to exchange different receptor domains of the MC4R with those homologues in the MC1R looking for a loss of function, i.e. a loss of the MRAP2a-induced ACTH sensitivity. Once characterized the main domains responsible for a

loss of function in the MC4R quimeras, we follow the opposite strategy, i.e. exchange the critical domains of MC4R into MC1R waiting for a gain of function in the new MC1R quimeras. Our results demonstrate that integrated substitution of the transmembrane domains (TM) 3, 5, and 7 together with the external loops (ECL) 2 and 3 provides ACTH sensitivity to the new MC1R quimeras. Following several structural models of the interaction between different agonists with the melanocortin receptors, our results provides some light on the functional relationship between MRAP2a and MC4R and allow to infer some interactive and speculative models.

Previous transcriptomic results in the research group suggested the involvement of the melanocortin system in the regulation of circadian clock, therefore, our following objective was to demonstrate this interaction. To that, we use the circadian locomotor activity paradigm usually utilized for the study of circadian rhythms. First and with the aim to set up the recording systems we studied the potential differences between the locomotor activity patterns between isolated groups of males and females showing that under these conditions of grouped-sex isolation the locomotor activity is sex-dependent, moreover we also demonstrate that the oral administration of opposed sex steroids to the phenotypic sex, i.e. 17β -estradiol to males and 11-keto-androstenedione (as 11-keto-testosterone precursor) to females was able to revert the sex effects on locomotor pattern. Finally, we wanted to study the potential interaction of the melanocortin system and the regulation of circadian clock using the previous setup thus demonstrating that the overexpression of ASIP in transgenic models modifies the locomotor activity. The transgenic animals exhibit higher global activity specially during the nocturnal period. These data are in well-agreement with those previously reported by our research group showing the absence of significant differences between brain melatonin levels during the light and dark period of the photoperiod in transgenic animals.



1. Introducción

1.1. Sistema de melanocortinas

Las melanocortinas se producen mediante procesamiento postraducional del precursor proopiomelanocortina (POMC), el cual se produce en la pituitaria anterior predominantemente (Padilla et al., 2010), y se procesa de forma diferencial dependiendo del tipo celular hipofisiario (Castro y Morrison, 1997). En tetrápodos este precursor integra tres dominios principales: el amino terminal pro- γ -hormona estimulante de los melanocitos (pro- γ -MSH); el central, la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y el dominio carboxilo terminal, la β -lipotrofina (β -LPH). Cada dominio exhibe un péptido MSH que se caracterizan por la presencia de un tetrapéptido con la siguiente secuencia HFRW (histidina-fenilalanina-arginina-triptófano). En el fragmento N-terminal encontramos la γ -MSH, en el fragmento central se localiza la α -MSH, que en realidad constituye los 13 primeros aminoácidos de la ACTH y en el fragmento C-Terminal encontramos la β -MSH (revisado por Navarro et al., 2016).

El POMC se expresa fundamentalmente en dos tipos celulares de la hipófisis de vertebrados, los corticotropos de la *pars* distalis y los melanotropos de la *pars* intermedia y en cada tipo celular se procesa una batería diferente de péptidos desde el POMC. En las células corticotropas la acción de la prohormona convertasa de tipo 1 (PC1) provoca la liberación de ACTH y β -lipotrofina mientras que la acción combinada de PC1 y PC2 en los melanotropos de la *pars* intermedia provoca la liberación de α -MSH y el opioide endógeno β -endorfina (Figura 1) (Benjannet et al., 1991; Castro y Morrison, 1997). En mamíferos, el POMC se expresa también en dos núcleos neuronales del cerebro, concretamente en el núcleo arqueado (NAq) del hipotálamo y en el núcleo del tracto solitario (NTS) del cerebro posterior, donde se procesa hacia la producción de α -MSH y β -endorfina por acción combinada de las convertasas (Bangol et al., 1999). Algunos estudios, no exentos de ambigüedad, también han sugerido la presencia de ACTH central lo que implicaría la acción única de la PC1 sobre el precursor de melanocortinas (Smith y Funder, 1988).

Tras su escisión desde el POMC, las MSHs se procesan postranscripcionalmente, generando diversas isoformas. En primer lugar, las

MSHs sufren un proceso de amidación C-terminal gracias a la acción de la monooxigenasa amidante de peptidil-glicina (PAM) (Kumar et al., 2016). Tras este proceso, las hormonas se acetilan en su extremo N-terminal pudiendo encontrar tres variantes: sin acetilación, monoacetiladas o diacetiladas. La acetilación provoca una variación de la actividad farmacológica del péptido y también protege a este de la degradación por aminopeptidasas, lo que incrementa la vida media del péptido (Arends et al., 2000).

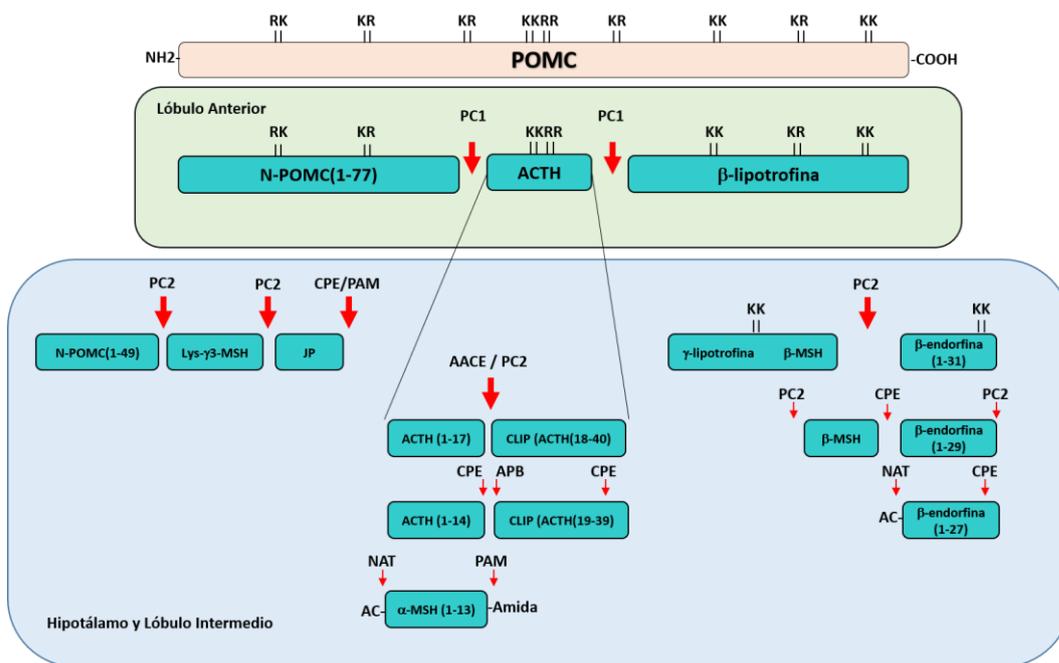


Figura 1. Esquema general que representa el procesado del POMC bovino. En el lóbulo anterior hipofisario PC1/3 es la primera convertasa en generar un fragmento del POMC de 16 kb (N-POMC), la ACTH y la β-lipotrofina (β-LPH). En el hipotálamo y el lóbulo intermedio el procesado prosigue produciendo α-MSH y β-endorfina. APB aminopeptidasa, AACH enzima convertidor de ACTH, CPE carboxipeptidasa, NAT N-acetiltransferasa, PAM peptidilglicina monooxigenasa α-amidación, JP péptido de unión, PC prohormona convertasa, Ac grupo acetil, K lisina, R arginina. Modificado de Cawley et al., (2016).

Dada la duplicación extra del genoma en los peces teleósteos (Amores et al., 1998), muchos presentan una segunda copia o parálogo del POMC que ha sufrido un proceso de subfuncionalización, es decir, la función original del POMC se ha repartido entre los dos parálogos del gen (de Souza et al., 2005). Además, existe una pérdida gradual del dominio γ-MSH con la desaparición del péptido en los

peces más modernos, los teleósteos (revisado por Cortés et al., 2014; Navarro et al., 2016).

La señalización de las melanocortinas en vertebrados está mediada por la unión de estas a una familia de cinco receptores (MC1R- MC5R) que pertenecen a la familia de la rodopsina, o tipo A (Schiöt et al., 2005). Cuando se une el ligando al receptor, este se activa y se produce un cambio conformacional en el mismo y en la proteína G acoplada; la subunidad α de dicha proteína se escinde y se produce la fosforilación de la adenilatociclasa (AC) y el consecuente incremento de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) intracelular. Dicho compuesto activa la proteína quinasa A (PKA); que es una holoenzima formada por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. A bajas concentraciones de AMPC, la holoenzima permanece en estado inactivo y las subunidades catalíticas permanecen unidas a las subunidades reguladoras; pero a altas concentraciones de AMPC, este compuesto se une a las subunidades reguladoras provocando un cambio conformacional en las subunidades reguladoras que dejan libres las subunidades catalíticas exponiendo así el sitio activo. Esto provoca la escisión de la subunidad catalítica que activa el factor de transcripción CREB (proteína de unión a los elementos de respuesta al AMPC) que a su vez activan/reprimen la transcripción de genes que presentan elementos de respuesta al AMPC (CRE) en sus promotores (Lopes et al., 2018). La PKA se encarga de la fosforilación del receptor de nuevo para que esta adquiera la conformación inicial (Figura 2).

El ciclo de los receptores de melanocortinas se inicia en el retículo endoplasmático (ER) y tras las modificaciones postraduccionales pertinentes alcanzan la superficie celular, donde interaccionarán con los ligandos. Las chaperonas, proteínas de choque térmico y proteínas accesorias son las encargadas de su correcta conformación y ensamblaje, y el sistema de ubiquitina-proteosoma es el encargado de degradar los polipéptidos con conformaciones incorrectas (Cooray et al., 2009; Cooray et al., 2011; Meimaridou et al., 2011).

El clonaje en 1992 de los receptores de melanocortinas produjo un avance en el entendimiento de las funciones fisiológicas de este sistema hormonal (Mountjoy et al., 1992). La expresión de los receptores de melanocortinas exhibe

una amplia distribución corporal y están involucrados en diversas funciones fisiológicas (Mountjoy et al., 1992). La generación de ratones “knockout” para los receptores de melanocortinas ha proporcionado una importante herramienta para la investigación de sus funciones. Los receptores MC1R, MC3R, MC4R y MC5R se activan gracias a la unión de cualquier melanocortina, aunque con diferentes afinidades dependiendo del tipo de receptor, pero responden de manera ineficiente a la ACTH. Por el contrario, el MC2R es únicamente activado por la ACTH pero no puede unir las diferentes MSHs (Cone y Mountjoy, 1993).

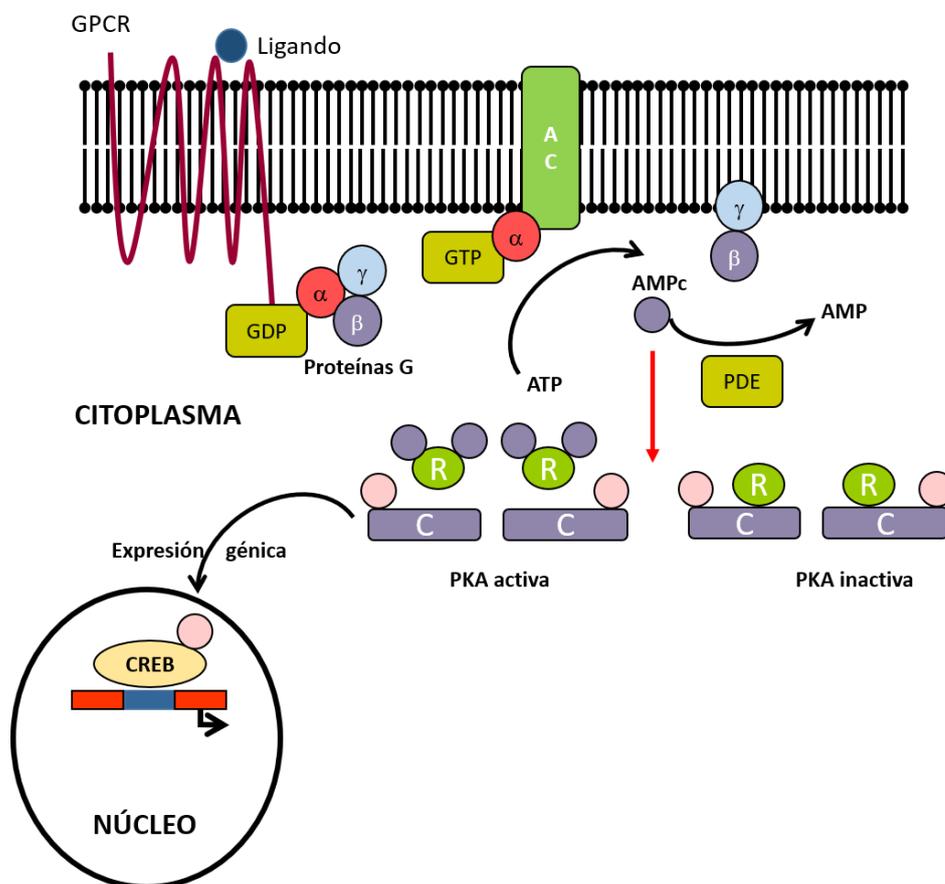


Figura 2. Ruta de señalización del AMPc. Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) sufren un cambio conformacional tras la unión del ligando o en respuesta a un estímulo extracelular. La subunidad G α intercambia guanósín difosfato (GDP) por la forma trifosfatada (GTP) que activa a su vez la adenilato ciclasa (AC) encargada de transformar ATP en AMPc. Al elevarse los niveles de AMPc, regulados por la fosfodiesterasa (DPE) que también degrada cGMP a GTP se activa la proteína quinasa A (PKA) que consiste de un tetrámero de dos subunidades reguladoras homo- o heterodímeras (R) y dos catalíticas (C) responsables de la fosforilación de factores de transcripción, como CREB (proteína de unión a los elementos de respuesta a AMPc), que entrarán en el núcleo celular para unirse a los promotores génicos y activar su transcripción. Modificado de Hannah-Shmouni et al., (2016).

Los dos primeros receptores en ser caracterizados fueron el receptor de α -MSH (MC1R) y el receptor de ACTH (MC2R) (Mountjoy et al., 1992). El MC1R regula la pigmentación de la piel (Robbins et al., 1993), el MC2R, receptor de ACTH es un componente importante en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (Mountjoy et al., 1992) que regula la síntesis de glucocorticoides adrenales en respuesta al estrés. El MC3R y el MC4R se expresan fundamentalmente en el cerebro y son importantes reguladores de la homeostasis energética (Ollmann et al., 1997). El MC5R, último receptor en ser caracterizado, ha sido el más esquivo en cuanto a la caracterización de su función fisiológica. Los experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Roger Cone finalmente concretaron su participación en la regulación de las secreciones exocrinas de diferentes glándulas tanto sebáceas como preuciales (Chen et al., 1997); aunque también está implicado en la regulación de otros procesos fisiológicos (Rodrigues et al., 2013).

1.2. Antagonistas endógenos de los receptores de melanocortinas

La señalización de las melanocortinas no está exclusivamente regulada por la unión de agonistas, sino también por antagonistas como la proteína de señalización agutí (ASIP), denominada exclusivamente agutí en el caso del ratón, y la proteína relacionada con agutí (AGRP) que compiten con los agonistas por la unión a los receptores. Ambas proteínas se caracterizan estructuralmente por la presencia de un patrón característico de cisteínas y puentes disulfuro en la región C-terminal que confiere un patrón estructural característico denominado “Knot structure”. A diferencia de AGRP, ASIP presenta una región rica en prolinas previa a la región de cisteínas C-terminal y una región N-terminal básica, rica en residuos de arginina y lisina. Por el contrario, AGRP presenta un par dibásicos inminentemente anterior a la región activa de C-terminal donde el precursor se procesa (Guillot et al., 2012).

ASIP se expresa fundamentalmente en las células epiteliales del folículo piloso donde antagoniza los efectos de α -MSH sobre el MC1R, su receptor más específico. Su expresión pulsátil durante una fase del ciclo de crecimiento piloso provoca un cambio en la síntesis de eumelanina, un pigmento de color

marrón/negro, en favor de la síntesis de feomelanina, un pigmento de color amarillo/naranja. Dicho pulso conlleva la formación de una banda subapical amarilla que genera el aspecto pardo en el pelaje de muchos mamíferos (Bultman et al., 1992; Michaud et al., 1993; Miller et al., 1993). El control espacial de la expresión de ASIP conlleva la aparición de un patrón de pigmentación dorsoventral característico con regiones dorsales de color oscuro y vientres de color claro ampliamente extendido en el reino animal (Vrieling et al., 1994).

Paradójicamente, ASIP también es capaz de activar el MC4R, aunque esta interacción no tiene significado fisiológico ya que ASIP se expresa en la piel mientras que el MC4R es de expresión central y por tanto ambas proteínas nunca están en contacto. Sin embargo, una mutación letal en homocigosis denominada “lethal yellow mice” (*Ay/Ay*) sitúa a ASIP bajo el control del promotor del gen *Raly*, una proteína de unión al RNA de expresión ubicua (Michaud et al., 1993; Miller et al., 1993). Esto provoca que ASIP también se exprese de forma ubicua incluyendo el cerebro donde interacciona con el MC4R. La cepa de ratones heterocigotos “viable yellow” (*Ay/+*) son de color amarillo por desplazamiento de la melanogénesis hacia la síntesis de feomelanina y obesos por antagonización del MC4R central (Lu et al., 1994).

La existencia de un antagonista endógeno del MC1R en la piel y el efecto de ASIP sobre MC4R central produciendo obesidad llevó al Dr. Greg Barsh de la Universidad de Standford a hipotetizar la existencia de un sistema paralelo en el cerebro de mamíferos. Tras el escrutinio de librerías de ESTs (“expressed sequence tags”) del cerebro de ratón encontraron una proteína similar a ASIP que exhibía el mismo patrón de cisteínas C-terminal, que denominaron AGRP. Comprobaron que efectivamente AGRP era un antagonista del MC4R que se expresaba en el núcleo arqueado del hipotálamo y finalmente demostraron que la sobreexpresión en transgénesis recuperaba el fenotipo energético del ratón (*Ay/+*), es decir la obesidad. Por el contrario, la sobreexpresión de AGRP no tenía efectos sobre el pelaje, ya que AGRP no puede antagonizar los efectos de MSH sobre el MC1R (Ollman et al., 1997). Investigaciones posteriores han demostrado que en realidad ASIP y AGRP son agonistas inversos del MC1R y MC4R, respectivamente.

Es decir, ambos receptores se activan de forma constitutiva sin necesidad de ligando y los agonistas inversos reducen esta actividad constitutiva (García-Borrón et al., 2005; Nijenhuis et al., 2001; Sánchez et al., 2009). Por tanto, la acción de ASIP y AGRP no depende de la mera competencia con el agonista por los sitios de unión al receptor, sino que por sí solos son capaces de unirse al receptor y disminuir su actividad constitutiva. Además, se ha demostrado la relevancia fisiológica de este agonismo in vivo (Tolle y Low, 2008).

1.3. Los receptores de melanocortinas

Como he expuesto anteriormente, las melanocortinas señalizan a través de 5 receptores positivamente acoplados a la proteína G, sus dominios de expresión son muy variados y las funciones que cubren muy diversas, desde el control de la melanogénesis hasta la regulación de la ingesta y el gasto energético.

1.3.1. Receptor 1 de melanocortinas (MC1R)

El MC1R se expresa en diferentes tipos celulares de la piel, incluyendo melanocitos, queratinocitos y células epiteliales y está implicado en la regulación de la síntesis de melanina, o melanogénesis, que determinará en última instancia la coloración del pelaje en los mamíferos (García-Borrón et al., 2005). Como hemos esbozado anteriormente la pigmentación en mamíferos está determinada por la cantidad de dos pigmentos, eumelanina y la feomelanina. La tirosinasa participa en la síntesis de ambos siendo el enzima limitante del proceso. Cuando los niveles de tirosinasa son escasos el proceso sintético deriva hacia la producción de feomelanina mientras que ante elevados niveles de tirosinasa el exceso de L-DOPA y dopaquinona deriva hacia la síntesis de eumelanina (Figura 3).

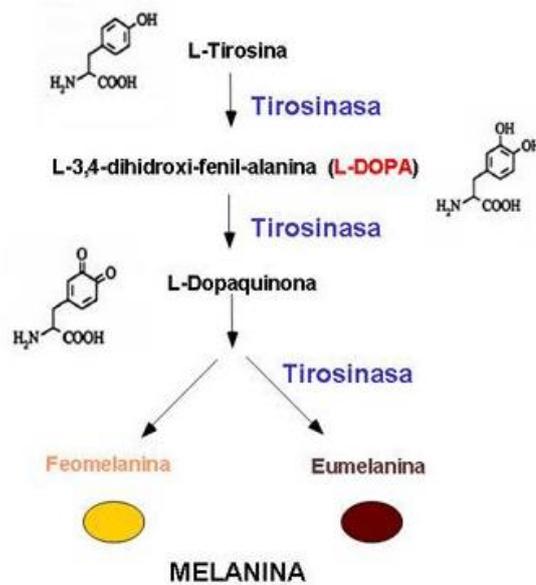


Figura 3. Esquema de la síntesis de diferentes formas químicas de la melanina en mamíferos.

Las cantidades relativas de estos dos pigmentos dependen de los *loci*: *agouti* y *extension* (ver sección 2). La clonación de los receptores de melanocortinas y el conocido efecto de la MSH sobre la expresión y actividad de la tirosinasa rápidamente condujo a la identificación del MC1R como el gen que ocupa el *locus extension* (Robbins et al., 1993). De hecho, las mutaciones que confieren una actividad constitutiva al receptor son responsables de hipermelanosis y del conocido fenotipo de la “oveja o el lobo negro”. El gen MC1R es altamente polimórfico y determinante principal de las variaciones de la pigmentación humana (Valverde et al., 1995; revisado por Herraiz et al., 2017), las diversas variantes de pérdida de función están asociadas con un fenotipo de color del pelo pelirrojo y tez blanca (Box et al., 1997). La melanina sintetizada en los melanocitos se distribuye a los queratinocitos dotándolos de un escudo de protección solar contra el daño del ADN inducido por la radiación ultravioleta (Herraiz et al., 2018). Por tanto, las mutaciones hipomórficas del MC1R conllevan mayor susceptibilidad hacia el desarrollo de melanoma (Herraiz et al., 2018).

El MC1R se conoce también como el receptor de α -MSH debido a la alta afinidad que presenta por esta melanocortina, de hecho, es el receptor con mayor afinidad por la α -MSH en humanos (García Borrón et al., 2005) aunque en

vertebrados no tetrápodos la afinidad por α -MSH no es tan elevada (Schiöth et al., 2005). Sin embargo, en humanos MC1R también presenta mucha afinidad por la ACTH (Schiöth et al., 2005) casi tanta como por la α -MSH. Por este motivo los pacientes con adenomas hipofisarios que secretan un exceso de ACTH exhiben una pigmentación/tez oscura, además de hipercortisolismo, provocada por la estimulación de la melanogénesis vía MC1R. Esta enfermedad se le conoce como “síndrome de Cushing” (Chan et al., 2011).

En peces, el MC1R tiene un perfil de expresión más amplio, pero también aparece en la piel dorsal y ventral sugiriendo su implicación en el control del patrón de pigmentación en peces. Se ha demostrado que mutaciones en el MC1R son las responsables del fenotipo asociado a la mutación “*brown*” en los tetras de cueva (*Astyanax mexicanus*), que se caracteriza por una reducción en el contenido de melanina, del número de melanóforos y la presencia de ojos marrones (Gross et al., 2009). Los experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el bloqueo de la expresión del receptor mediante técnicas de CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) conlleva una fuerte reducción en el número de melanóforos (denominación común de los melanocitos en peces) y xantóforos (cromatóforos que acumulan pigmentos de tipo carotenoide y pterinas con aspecto amarillo/rojo/anaranjado dorsales. Por el contrario, el número ventral de ambos cromatóforos aumenta junto con la severa disminución de iridóforos (cromatóforos formados por placas de guanina de aspecto irisado/plateado) (Cal et al., 2019).

1.3.2. Receptor 2 de melanocortinas (MC2R)

El MC2R es el receptor acoplado a proteína G de menor tamaño y quizás el más característico de los receptores de melanocortinas debido a su perfil farmacológico. Es el único receptor que responde exclusivamente a la ACTH y nunca a las diferentes MSHs (Schiöth et al., 2005). En humanos, se expresa casi exclusivamente en el córtex adrenal donde estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides tras activación por ACTH. Es, por tanto, un punto crucial del conocido eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) que regula junto con el eje

hipotálamo-simpático-cromafín la respuesta al estrés en vertebrados (Wenderlar-Bonga et al., 1997). Ante un estímulo considerado estresante, las neuronas hipotalámicas del núcleo paraventricular (PVN), o de su equivalente en peces el núcleo preóptico, liberan factor liberador de ACTH (CRF) hacia el sistema portal hipofisiario. El CRF estimula la liberación de ACTH desde los corticotropos de la *pars distalis* que pasa al torrente sanguíneo para estimular la síntesis y secreción de glucocorticoides adrenales (Gallagher et al., 2008).

Las mutaciones del MC2R son causantes de la deficiencia familiar de glucocorticoides (FGD) de tipo I, una enfermedad autosómica caracterizada por la resistencia a la ACTH, es decir, altos niveles de ACTH, ausencia de glucocorticoides, niveles normales de mineralocorticoides y melanogénesis aumentada (Tsigos et al., 1993; Chan et al. 2011).

En peces los glucocorticoides y el MC2R también están implicados en la regulación de la respuesta al estrés (Aluru y Vijayan, 2009). El MC2R se expresa principalmente en el tejido interrenal, el equivalente del córtex adrenal en peces, aunque sorprendentemente existe un elevado nivel de expresión en el telencéfalo e hipotálamo de trucha (Aluru y Vijayan, 2008) o en el tejido hepático de la lubina (Agulleiro et al., 2013). Su expresión en el tejido interrenal aumenta rápidamente tras el estrés, en consonancia temporal con el aumento de la expresión de enzimas esteroideogénicas y la presencia de glucocorticoides plasmáticos en trucha (Aluru y Vijayan, 2008). En la lubina, la expresión interrenal del MC2R está regulada por los propios glucocorticoides estableciéndose un sistema de retroalimentación corto que podría tener implicaciones en la adaptación al estrés. Es decir, la propia elevación de glucocorticoides inducida por la secreción de ACTH haría remitir la expresión interrenal del MC2R reduciendo la respuesta del tejido interrenal a la ACTH en un proceso de adaptación que llevaría a una reducción de la síntesis de glucocorticoides en presencia de elevados niveles de ACTH (Agulleiro et al., 2013). La expresión hepática podría estar relacionada con la movilización de reservas energéticas durante la respuesta al estrés, ya que los datos procedentes de nuestro laboratorio han demostrado que la ACTH es capaz de inducir la lipólisis hepática en la lubina (Agulleiro et al., 2013).

La paradoja del MC2R refiere i) su expresión funcional y ii) su particular farmacología. Los intentos de caracterización del perfil farmacológico de este receptor *in vitro* nunca llegaban a término, debido a que el receptor no es capaz de alcanzar la membrana plasmática cuando se expresa en líneas celulares convencionales (HEK-293, Cos-7) (Noon et al., 2002), con las que se han caracterizado los perfiles farmacológicos del resto de receptores de melanocortinas (Cerdá-Reverter et al., 2011). Sin embargo, la expresión funcional sí se obtenía en células de origen adrenal, donde se expresa el MC2R, lo que hacía suponer la existencia de un factor de origen adrenal necesario para la expresión funcional del MC2R (Schimmer et al., 1995). Finalmente, mediante el estudio de la FGD, el laboratorio del Dr. Clark (Queen Mary University of London) consiguió identificar un factor celular que interactuaba físicamente con el receptor y permitía su tráfico a membrana y, por tanto, su expresión funcional (Metherell et al., 2005). Este tema será tratado posteriormente en la sección referente a las proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas.

El segundo punto paradójico refiere a la respuesta del MC2R a la ACTH. La cuestión es, cómo puede el receptor discriminar entre ambas hormonas si la α -MSH está integrada dentro de la ACTH y por tanto muestran secuencias coincidentes. Mediante ensayos de bioactividad encaminados a la producción de glucocorticoides, Schwyzer (1977) comprobó la actividad biológica de diversos fragmentos de ACTH acortados (Figura 4) viendo que los primeros 24 aa de la secuencia de ACTH confieren una actividad plena al péptido. Por el contrario, la reducción a los 16 primeros aminoácidos minimiza la actividad del receptor y, como hemos expuesto anteriormente, la α -MSH no tiene actividad. Sorprendentemente el fragmento 11-24 no induce la actividad *per se*, pero bloqueaba la activación inducida por la ACTH (1-39).

Introducción

ACTH (1-39)	SYSME HFRW GKPVGKKRRPVKVYPNVAENESAEAFPLEF	Actividad completa
ACTH (1-24)	SYSME HFRW GKPVGKKRRPVKVYP	Actividad completa
ACTH (1-16)	SYSME HFRW GKPVGKK	Actividad mínima
α -MSH	SYSME HFRW GKPV-NH ₂	Sin actividad
ACTH (11-24)	KPVGKKRROVKVYP	Bloquea la unión de ACTH(1-39)

Figura 4. Péptidos utilizados para estudiar la activación del MC2R y efecto desarrollado. Ver texto para más información.

Además, comprobó que el tetrapéptido HFRW es esencial, en cualquier caso, para la activación del receptor. Estos resultados hicieron suponer la presencia de dos sitios de unión para la ACTH en el receptor. El primer sitio de unión formado por el motivo KKRRP de la ACTH es el sitio director o permisivo y cuya unión al receptor induce un cambio conformacional que expone el segundo sitio de unión, hasta el momento no accesible a otros péptidos particularmente al motivo HFRW. Una vez abierto este segundo sitio, la unión del motivo HFRW induce un segundo cambio conformacional que activa la proteína G dirigiendo el sistema de transducción celular (revisado por Dores et al., 2014) (Figura 5). Los experimentos de mutagénesis dirigida han revelado la importancia del segmento transmembrana 3 (TM3), concretamente la leucina 112 (L112). Así, la substitución de L112 por isoleucina confiere al MC2R sensibilidad a la α -MSH (Yang et al., 2019).

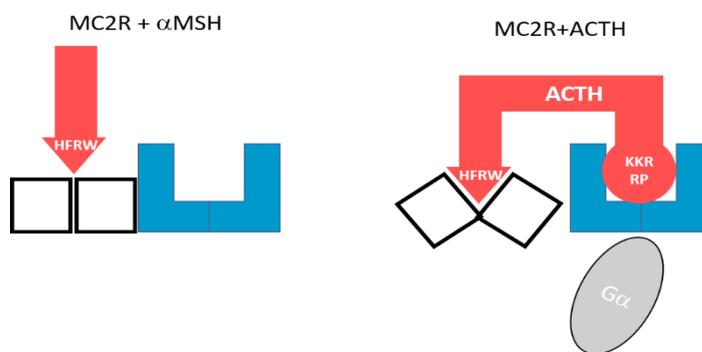


Figura 5. Modelo de activación del MC2R por la ACTH. El receptor presenta 2 sitios de unión. El primer lugar de unión, donde actúa el motivo "KKRRP", provoca un cambio conformacional que expone el sitio de unión para el motivo "HFRW", presente también en α -MSH. La unión del último motivo permite un segundo cambio conformacional que activa la vía intracelular de segundo mensajero. α -MSH no puede activar el receptor porque en ausencia del motivo KKRRP el lugar de unión para HFRW permanece cerrado.

1.3.3. Receptor 3 de melanocortinas (MC3R)

El MC3R presenta gran afinidad por el péptido γ -MSH, y por esta razón se le conoce cotidianamente como el receptor de γ -MSH, aunque también se activa por unión de otras MSHs (Roselli-Reh fuss et al., 1993; Schiöth et al., 2005). A su vez, AGRP actúa como un antagonista competitivo sobre el MC3R (Yang et al., 1999).

Dentro del sistema nervioso central (SNC), el MC3R presenta elevados niveles de expresión hipotalámica incluyendo el núcleo arqueado, el área hipotalámica lateral, el hipotálamo dorso y ventromedial y la región preóptica. Sin embargo, este receptor también se expresa en diversas estructuras límbicas mesencefálicas, como el área tegmental ventral (VTA), y paliales como la amígdala anterior (Roselli-Reh fuss et al., 1993; Bagnol et al., 1999). Esta distribución sugiere su implicación en sistemas de control homeostático y particularmente del balance energético (Chen et al., 2000), así como en sistemas de regulación comportamentales (Mavrikaki et al., 2016). De hecho, se ha descrito la expresión de MC3R (ver después) en las neuronas AGRP/NPY y POMC del núcleo arqueado en rata pero no del MC4R (Bagnol et al., 1999). Estudios recientes han demostrado que la activación del MC3R en las neuronas AGRP/NPY/GABA hipotalámicas ejerce una fuerte señal inhibitoria de la ingesta durante el periodo de oscuridad, cuando los ratones muestran su mayor tasa de ingesta (Girardet et al., 2018). De hecho, el bloqueo genético de la expresión en ratón del receptor [MC3R (-/-)] produce hipofagia pero, a la vez, incrementa la masa de tejido adiposo y reduce la de tejido muscular, sin llegar a variaciones en el peso corporal. Los ratones MC3R (-/-) muestran una tasa metabólica normal, pero presentan una mejor eficiencia alimenticia, es decir son capaces de aumentar más de peso con igual cantidad de comida que su contrapartida salvaje (Chen et al., 2000).

El MC3R también está implicado en la ritmicidad de la ingesta. Paradójicamente, el bloqueo genético de la expresión del MC3R en la cepa de ratones B6, produce una ligera hiperfagia durante la fase luminosa del fotoperiodo, fase de mínima ingesta, sugiriendo su implicación en la regulación circadiana del comportamiento alimenticio (Shutton et al., 2008). Estos resultados son contrarios a los publicados por Chen et al., (2000), utilizando ratones de la

cepa C57BL/6J, quien publicó la condición hipofágica de los ratones MC3R (-/-), lo que demuestra un probable efecto del acervo genético sobre los efectos provocados por la inactivación de la expresión del MC3R. La distribución neuroanatómica del MC3R apoya su implicación en la regulación circadiana ya que existe una densa expresión en el hipotálamo dorso y ventromedial, dos áreas hipotalámicas íntimamente ligadas con la regulación circadiana del comportamiento alimenticio (revisado por Begriche et al., 2009). Los experimentos realizados por Shutton et al., (2008) demostraron que los ratones MC3R (-/-) con privación calórica carecen de actividad locomotora anticipatoria a los eventos de alimentación así como severas anormalidades en la expresión de genes de la maquinaria circadiana. Finalmente, el MC3R también parece estar implicado en las respuestas motivacionales de ratones con privación calórica. Así, la adquisición de alimento por el mismo animal (auto-alimentación) y la expresión de c-fos en el núcleo accumbens de ratones privados calóricamente esta atenuada en la cepa MC3R(-/-). Esta motivación por la alimentación se recupera mediante rescate de la expresión del MC3R en el área ventral tegmental donde proyectan las neuronas AGRP hipotalámicas (Mavrikaki et al., 2016).

La presencia de MC3R en peces ha generado diversa controversia. Se ha descrito la presencia de MC3R en el genoma de peces basales, desde el punto de vista evolutivo, como peces cartilaginosos, el catán pinto (*Lepisosteus oculatus*), perteneciente al linaje previo a la divergencia de peces teleósteos y el celacanto (*Latimeria chalumnae*), especie perteneciente al linaje previo a la divergencia de los tetrápodos. Sin embargo, el receptor está ausente en la mayoría de los genomas de peces teleósteos, aunque se han publicado secuencias de MC3R en el pez cebra (*Danio rerio*) y en el carpín dorado (*Carassius auratus*) (Cortés et al., 2014). Los estudios de sintenia y de filogenia bayesiana no apoyan la ortología del MC3R de pez cebra con el MC3R de vertebrados sugiriendo un origen diferente (Kumar et al., 2011). Debe destacarse que los peces teleósteos también carecen de γ -MSH, el principal agonista del MC3R, en lo que podría ser un proceso de co-evolución (Navarro et al., 2016).

1.3.4. Receptor 4 de melanocortinas (MC4R)

El MC4R es probablemente el receptor mejor estudiado de la familia desde el punto de vista estructural y funcional. La intensidad en su estudio se debe fundamentalmente a su íntima relación con el desarrollo de la obesidad en mamíferos y particularmente en humanos, de hecho, las mutaciones en el MC4R son la principal causa de obesidad monogénica (van der Klaauw y Farooqi, 2015).

Su perfil farmacológico revela una relativa afinidad por las MSHs endógenas, mostrando afinidad máxima por la β -MSH y nula afinidad por γ -MSH y ACTH (Schiöth et al., 2005). Su activación deriva en un acoplamiento a la proteína Gs, como activador de la vía del AMPc, aunque también puede acoplarse a otras proteínas G, como Gq y Gi. Su activación también impacta sobre la actividad de canales de calcio disparados por voltaje de tipo N y la tasa de disparo neuronal en el núcleo paraventricular puede ser regulada por AGRP y α -MSH por medio del canal de potasio Kir1.7 rectificadores (Ghamari-Langroudi et al., 2015; revisado por Heyder et al., 2019). Una de las características funcionales del receptor es su actividad constitutiva, es decir la señalización basal con independencia de la unión de agonistas (Nijenhuis et al., 2001). Esta actividad parece ser mantenida por la propia unión de regiones presentes en el dominio N-terminal del receptor que actuaría como agonista. De las 8 mutaciones en el MC4R humano conocidas a causar un descenso de la actividad constitutiva, sin perjuicio de la activación por α -MSH, cinco están en el dominio N-terminal y tres residen en los dominios transmembranales (Ersoy et al., 2012). Un receptor que carece de los 24 primeros aminoácidos es capaz de responder a los diferentes agonistas y al antagonismo competitivo de AGRP, sin embargo, presenta una actividad constitutiva reducida (Srinivasan et al., 2004). El hexapéptido HLWNRS del dominio N-terminal parece ser crítico en la inducción de la actividad constitutiva del receptor, sin embargo, la modelización estructural del receptor sugiere que su lugar de unión es diferente del lugar donde α -MSH ejerce su activación (Ersoy et al., 2012). La actividad constitutiva es contrarrestada por la unión de AGRP que actúa como un agonista inverso, además, de como un antagonista competitivo (Nijenhuis et al., 2001). AGRP si parece utilizar, o cubrir, los sitios de unión del hexapéptido N-terminal

explicando, así, la reducción de la actividad constitutiva del receptor (Ersoy et al., 2012).

En mamíferos, el MC4R se expresa principalmente a nivel del sistema nervioso central, aunque, existen diferencias interespecíficas a nivel de su distribución tisular (Bagnol et al., 1999). Por tanto, no es un receptor exclusivamente central. A nivel central, se expresa en sitios clave para la regulación hipotalámica de la homeostasis energética, como el núcleo paraventricular, el hipotálamo dorso y ventromedial, el hipotálamo lateral, y diversas regiones de la región preóptica incluyendo en núcleo supraóptico. En el cerebro posterior, los niveles más elevados de expresión se encuentran en el núcleo dorsal motor del nervio vago, la sustancia nigra, el raphe y la formación reticular. Tras el hipotálamo y el cerebro posterior, el mayor lugar de expresión se encuentra en la amígdala incluyendo varios núcleos como el núcleo medial (parte antero-dorsal) y central (parte capsular) (revisado por Mountjoy, 2010). De especial importancia en la regulación de la ingesta son las proyecciones AGRP y POMC del núcleo arqueado hacia las neuronas MC4R. Ambas terminaciones coinciden sobre las neuronas MC4R del hipotálamo dorsomedial y paraventricular, del núcleo preóptico mediano, área preóptica medial y el núcleo lecho de la estría terminal subpalial (Lima et al., 2019). También existen zonas de expresión del MC4R que no son inervadas por terminales AGRP y/o POMC, así como, zonas de inervación AGRP/POMC que no expresan MC4R (Lima et al., 2019). La expresión del MC4R sin inervación melanocortinérgica sugiere la presencia de agonistas adicionales. De hecho, recientemente se ha caracterizado otro agonista del MC4R denominado lipocalina-2, un péptido óseo que inhibe la ingesta en mamíferos (Cowley et al., 1999; Mosialou et al., 2017). El MC4R también muestra expresión presináptica de forma que AGRP o MSH pueden regular la liberación de neurotransmisores (Cowley et al., 1999).

La expresión en la región dorsomedial y paraventricular sugieren su relación con la regulación de la ingesta (Cowley et al., 1999; 2001). De hecho, el bloqueo genético de la expresión del receptor en ratones resulta en una severa obesidad e incrementado crecimiento lineal, recapitulando el síndrome de obesidad agutí

(Huszar et al., 1997) o la sobreexpresión de AGRP en modelos de transgénesis (Ollmann et al., 1997). Sin embargo, la restauración de la expresión del receptor en el hipotálamo paraventricular y la amígdala medial mediante un sistema de Cre/Lox revierte la obesidad hasta en un 60% y el 100% de la hiperfagia (Balthasar et al., 2005). Además, la inyección de melanotan (MTII), un agonista promiscuo de los receptores de melanocortinas que inhibe severamente la ingesta en ratones salvajes (Fan et al., 1997), no tiene ningún efecto sobre ratones deficientes en MC4R (Marsh et al., 1999), lo que demuestra que este receptor es crucial en la inhibición melanocortinérgica de la ingesta. Su actividad constitutiva (ver antes) ha llevado a generar un modelo en el cual el hambre estaría constitutivamente inhibida por la actividad del receptor y es necesario reducir la señalización de este para permitir la ingesta (Cone, 2006). El efecto del agonismo inverso sobre el balance energético juega un papel fisiológico *in vivo* ya que se ha evidenciado que la AGRP puede ejercer un efecto sobre el metabolismo energético independiente de MSH y del antagonismo competitivo sobre MC3R y MC4R (Tolle y Low, 2008). Además, se sabe que la inyección intracerebroventricular del fragmento C-terminal de AGRP en rata produce un aumento de la ingesta sostenido y prolongado (Rossi et al., 1998; Hagan et al., 2000).

Los estudios desarrollados en peces también han demostrado la implicación del MC4R en el control de la ingesta y el crecimiento de peces. Al igual que en mamíferos, el MC4R presenta una extensa expresión diencefálica, destacando su presencia en el núcleo lateral tuberal, el equivalente del núcleo arqueado en peces, así como en la región magnocelular del área preóptica, equivalente del hipotálamo paraventricular de mamíferos (Cerdá-Reverter et al., 2003; Sánchez et al., 2009; Agulleiro et al., 2013). La inyección intracerebroventricular de agonistas de melanocortinas, como MTII o NDP-MSH, inhiben la ingesta en carpines rojos ayunados durante 24 horas, pero, por el contrario, la inyección de antagonistas del MC4R estimulan la ingesta en animales alimentados cuatro horas antes (Cerdá-Reverter et al., 2003). Su actividad también parece independiente de ligando mostrando una actividad constitutiva regulada por la unión de AGRP, que actúa como agonista inverso (ver antes, Sánchez et al., 2009). La sobreexpresión de ASIP,

que actúa como antagonista competitivo del MC1R y MC4R (Cerdá-Reverter et al., 2003; Guillot et al., 2016), en modelos de transgénesis en el pez cebra resulta en una estimulación de la ingesta y potenciación del crecimiento longitudinal sin afectar al porcentaje de grasa corporal (Guillot et al., 2016), un efecto que parece mediado por su acción sobre el MC4R.

1.3.5. Receptor 5 de melanocortinas (MC5R)

El MC5R fue el último receptor en caracterizarse molecularmente (Chhajlani et al., 1993; Gantz et al., 1994). Presenta una amplia distribución expresándose en muchos tejidos a bajos niveles (Schiöth et al., 2005; Cone, 2006). Su función, o mejor dicho una de ellas, no fue caracterizada hasta el desarrollo de la cepa mutante para el MC5R (Chen et al., 1997). Chen y colaboradores observaron que las ratas carentes en MC5R, una vez sumergidas en agua, tardaban más en secarse, sobre 20 minutos, cuando se les ponía sobre una base caliente, demostrando que estos ratones tienen defectos en la repulsión del agua y termogénesis. De hecho, los ratones carentes de MC5R absorben hasta dos veces más agua en su pelaje tras un baño de 3' a 32 °C. Comprobaron que el MC5R presentaba niveles de expresión relativamente elevados en las glándulas exocrinas incluyendo las glándulas prepuciales, las sebáceas, las lacrimales y las "Haderian" y, de hecho, corroboraron que la mayor absorción de agua está asociada a una reducción en la secreción lipídica que recubre el pelaje del animal. La ausencia de secreción lipídica conlleva también una reducción de la temperatura corporal de 2 °C tras el baño en agua a 32 °C (Chen et al., 1997).

El estudio evolutivo realizado entre 114 secuencias de MC5R en mamíferos placentarios ha demostrado que este receptor se ha perdido o está mutacionalmente inactivado en los linajes que carecen de glándulas sebáceas, o están en degeneración, incluyendo Cetacea (ballenas y delfines), Hippopotamidae (hipopotámicos), Sirenia (manatíes y dugongos), Proboscidea (elefantes) y Rhinocerotidae (rinocerontes) (Springer y Gatesy, 2018). Esto sugiere que evidentemente su función principal es la regulación de la secreción exocrina (Chen et al., 1997).

También se han descrito funciones metabólicas, incrementando la captura de glucosa en el músculo esquelético tras secreción hipofisiaria de α -MSH (Enriori et al., 2016), funciones relacionadas con el sistema inmune (Millington, 2006) y el comportamiento agresivo y la secreción de feromonas prepuciales (Morgan y Cone, 2006).

En peces hay pocos artículos referentes a la caracterización funcional del MC5R. Los estudios realizados en el carpín dorado muestran un perfil farmacológico con poca afinidad por las melanocortinas endógenas, mucho menor que la del MC4R (Cerdá-Reverter et al., 2003) y una expresión central y periférica. En la periferia se encuentra expresión fundamentalmente en la piel, riñón, bazo y retina. Además, hay una fuerte expresión en el SNC superando en extensión rostro caudal al MC4R. Su profusa expresión se puede detectar en áreas subpiales del telencéfalo, el área preóptica e hipotálamo tuberal donde coincide con la expresión de MC4R, hipotálamo caudal, el complejo pregglomerular y el lóbulo vagal, equivalente del núcleo del tracto solitario (Cerdá-Reverter et al., 2003). En la lubina también se expresa en el tejido adiposo y hepático y parece mediar los efectos de las melanocortinas sobre la lipólisis hepática (Sánchez et al., 2009).

1.4. Proteínas accesorias de los receptores de melanocortinas (MRAP)

Las proteínas accesorias se descubrieron gracias al estudio de una enfermedad relativamente rara denominada deficiencia familiar de glucocorticoides (FGD) que conjuga bajos niveles de glucocorticoides con altos niveles de ACTH plasmática. Las mutaciones en el MC2R que imposibilitan la respuesta a ACTH explican la FGD de tipo I (FGD-I) pero, sin embargo, un cierto porcentaje de pacientes sigue presentando los síntomas de la FGD, aun cuando el MCR2 es totalmente funcional. A esta segunda versión de FGD se le denominó tipo II o FGD-II. Como hemos descrito anteriormente, los estudios farmacológicos habían intuido la existencia de un factor característico y determinante en células del córtex adrenal, ya que el receptor solamente alcanzaba su expresión funcional y la migración a la membrana plasmática en células de origen adrenal, pero nunca en líneas celulares convencionales (Noon et al., 2002). Con estas premisas, el

laboratorio del Dr. Clark realizó un estudio del genoma completo de una familia de individuos que presentaba la enfermedad mediante un microarray de mutaciones de único nucleótido (SNP). Sus estudios revelaron una región candidata en la región cromosómica 21q22.1 que fue acotada secuencialmente a 2.4 mega pares de bases (Mbp). Dentro de esta región se encontraron 30 genes, ninguno de ellos aparentemente asociados con la FGII. Asumiendo la presencia del gen responsable en el córtex adrenal estudiaron los perfiles de expresión de los 30 genes candidatos mediante PCR y solamente uno de ellos mostró expresión específica en el córtex adrenal. Este se nombró como C21orf61 y encontrado a codificar un gen ya descrito en la bibliografía llamado proteína de bajo peso molecular del tejido adiposo y renombrado, a partir de ese momento, como proteína accesoria del MC2R (Metherell et al., 2005). Ya en ese mismo artículo se citaba la existencia de un fragmento abierto de lectura denominado C6orf117 que codificaba otra proteína de 205 aminoácidos con cierta identidad en la región N-terminal pero divergente en la zona C-terminal y como la MRAP original, presenta un dominio transmembranal (ver después). Estudios posteriores concluyeron en la denominación de esta proteína como MRAP2 (Chan et al., 2009; Sebag y Hinkle, 2009b) lo que introduce una ambigüedad en la nomenclatura. Los estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio propusieron denominar como MRAP1 a la proteína original caracterizada inicialmente y MRAP2 al parálogo caracterizado subsecuentemente (Agulleiro et al., 2010). A partir de este punto se utilizará la nomenclatura numérica.

El gen MRAP1 se procesa de forma alternativa para generar dos isoformas proteicas denominadas MRAP1 α y MRAP1 β . Ambas isoformas son idénticas en la región N-terminal, donde se presume la existencia de un único dominio transmembrana, y difieren extensamente en la región C-terminal (Figura 6). El análisis de expresión revela que, además, las isoformas de MRAP1s se expresan en el testículo, ovario, glándula tiroides, nódulos linfáticos, pecho y grasa, además de en las líneas celulares Y1 e Y6 derivadas del córtex adrenal y utilizadas para la caracterización farmacológica del MC2R.

hMRAP- α	MANGTNASAP	YYSYEYYLDY	LDLIPVDEKK	LKAHKHSIVI	AFWVSLAAAFV
hMRAP- β	MANGTNASAP	YYSYEYYLDY	LDLIPVDEKK	LKAHKHSIVI	AFWVSLAAAFV
Consenso	*****	*****	*****	*****	*****
hMRAP- α	VLLFLILLYM	SWSASPQMRN	SPKHHQTCPW	SHGLNLHLICI	QKCLPCHREP
hMRAP- β	VLLFLILLYM	SWSASPQMSF	NTDESLHSE	VLPQTRAI SC	DELQAPREEG
Consenso	*****	*****--	-----	-----	-----*
hMRAP- α	LATSQAQASS	VEPGSRTGPD	QPLRQESSST	LPLGGFQTHP	TLLWELTLNG
hMRAP- β	AA				
Consenso	-*-----	-----	-----	-----	-----
hMRAP- α	GPLVRSKPSE	PPPGDRTSQL	QS		
	-----	-----	--		

Figura 6. Comparación de las isoformas de MRAP humana. Asterisco y guiones marcan coincidencia o desigualdad de residuos entre ambas secuencias, respectivamente.

Como se ha esbozado anteriormente la expresión funcional del receptor solamente ocurre en células derivadas del córtex adrenal (Y6) pero nunca en líneas celulares convencionales sugiriendo la existencia de un factor capaz de permitir la migración del receptor hasta la membrana plasmática, algo que si ocurre en la línea celular Y6 (ver antes). Como se demostró también en el artículo de su caracterización la co-expresión de MRAP1 y MC2R en la línea celular CHO permitía, por primera vez, la expresión funcional del receptor en una línea celular no adrenal demostrando la interdependencia de ambas proteínas. Los experimentos de Metherrell y colaboradores demostraron mediante métodos inmunocitoquímicos que ambas proteínas colocalizan en el retículo endoplasmático y la membrana plasmática demostrando que la interacción física de ambas proteínas permite el tráfico del receptor a la membrana. Bajo estas condiciones el MC2R es capaz de responder a la activación con ACTH activando la síntesis de AMPc (Metherrell et al., 2005).

1.4.1. Estructura funcional de la MRAP1

La MRAP1 se caracteriza por presentar un único dominio transmembranal. Ambas isoformas, MRAP1 α y β , son idénticas en los 69 primeros aminoácidos donde se encuentra la región N-terminal que se extiende entre los 37 primeros aminoácidos. Subsecuentemente, encontramos los 25 aminoácidos que

caracterizan el dominio transmembranal y el resto de la proteína integra la región más divergente del dominio C-terminal que parece estar implicada en la localización intracelular y la producción de AMPc inducida por la ACTH (Roy et al., 2007, 2012). Según estudios adicionales, esta región C-terminal también podría estar implicada en la cantidad de receptor que alcanza la membrana plasmática ya que su delección aumenta la cantidad de receptor que llega a la superficie celular (Webb et al., 2009).

La MRAP1 no tiene péptido señal que permita su secreción y en su versión humana presenta dos sitios potenciales de glicosilación (Asn-Ser/Thr) en las posiciones 3 y 6, además de una región rica en residuos de tirosina (Y) (Figura 8). La topología de la molécula sugiere que es una proteína integral de membrana de tipo II con un C-terminal exoplasmático, lo que significa que la región C-terminal enfoca hacia la región interna del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, pero gira hacia el exterior de la célula cuando alcanza la membrana plasmática. Metherell y colaboradores (2005) corroboraron esta orientación marcando el dominio C-terminal de la MRAP1 en células CHO. Estudios posteriores demostraron que la MRAP1 exhibe una topología dual, lo que significa que ambos extremos, C-terminal y N-terminal, pueden encontrarse en el exterior celular de las células CHO (Sebag and Hinkle, 2007) o HEK293 (Roy et al., 2007). Las dos orientaciones, es decir N-exo-plasmático/C-endo-plasmático y N-endo-plasmático/C-exo-plasmático están presentes en un ratio 1/1 (Sebag and Hinkle, 2007). La migración más lenta de lo esperado por su peso molecular en geles SDS-PAGE de la MRAP1 junto con estudios de co-immunoprecipitación y espectrofotometría de masas sugieren que realmente la MRAP1 forma, en realidad, un homodímero (Cooray et al., 2008; Metherell et al., 2005). Sebag y Hinkle, 2007 demostraron elegantemente que la MRAP1 forma homodímeros antiparalelos y que ambos tipos de homodímeros N-exo-plasmático/C-endo-plasmático: N-endo-plasmático/C-exo-plasmático y N-endo-plasmático/C-exo-plasmático: N-exo-plasmático/C-endo-plasmático son capaces de interactuar de forma similar con el MC2R (Figura 7).

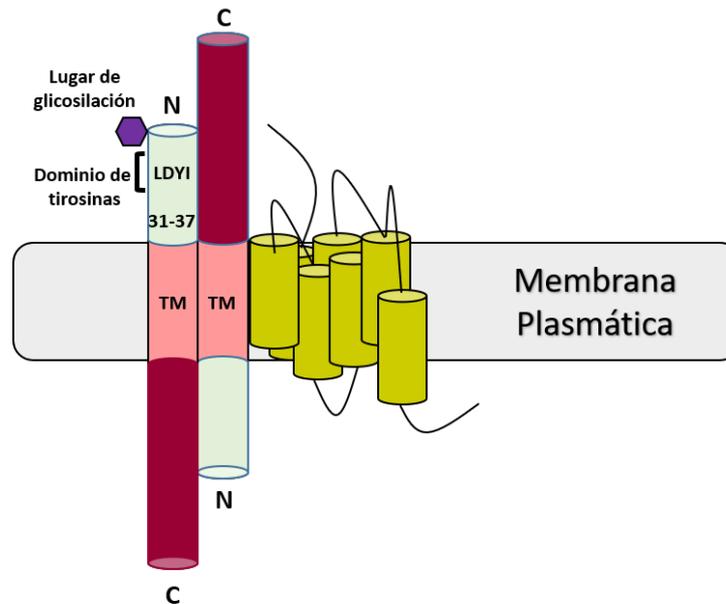


Figura 7. Representación gráfica de la topología antiparalela de la MRAP1 con un extremo N-terminal y C-terminal a cada lado de la membrana plasmática. En verde claro y granate se representan las regiones amino- y carboxi-terminal y en rosa el dominio transmembranal. Los residuos 31-37 resaltados en la región N-terminal son críticos para la adopción de la morfología dual. La tétrada LDYI inmersa en el dominio de tirosinas (ver texto) es crítica para la unión de ACTH y el tráfico a la membrana plasmática. En amarillo verdoso aparece representado el MC2R con sus diferentes dominios transmembrana. Modificado de Rouault et al., (2017).

Estudios posteriores llevados a cabo por Cooray y colaboradores (2011) corroboraron la formación de homodímeros antiparalelos mediante BRET (transferencia de energía de resonancia bioluminiscente) pero también demostraron que el MC2R forma homodímeros en el retículo endoplasmático. Sus estudios concluyeron que estos homodímeros de MC2R forman un complejo con al menos dos homodímeros de MRAP1 para formar un complejo hexamérico que probablemente deba ser estimulado por dos moléculas de ACTH (Cooray et al., 2011). Sebag y Hinkle (2009) estudiaron los requisitos estructurales necesarios para adoptar la topología dual y permitir al receptor el tráfico a membrana. La delección de los primeros 30 aminoácidos, así como de los 64 de los 67 aminoácidos de la región C-terminal no afectan al establecimiento de la topología dual de la molécula, sin embargo, los residuos situados justo antes del dominio transmembranal (31-37 LKAHKHS) son críticos para la adopción de la estructura dual. La delección de estos residuos fuerza la topología N-exo-plasmático/C-endo-

plasmático, pero además previene la formación del dímero, lo que sugiere que la topología dual es un requisito para la dimerización de la MRPA1. Estos residuos junto con el dominio transmembrana también están implicados en la expresión funcional del receptor ya que cuando se expresa el MC2R con una MRAP1 carente del dominio transmembrana el receptor queda atrapado en el retículo endoplasmático. Así pues, el dominio es suficiente para la interacción con el receptor, pero insuficiente para promover la migración a membrana (Webb et al., 2009). Lo mismo ocurre cuando el receptor se co-expresa con una MRAP1 monomérica carente de los residuos 31-37. Es interesante notar que cuando el receptor interactúa con una molécula de MPRA1 carente de los 30 primeros aminoácidos migra perfectamente a la membrana, pero no puede disparar la producción de AMPc inducida por ACTH (Sebag and Hinkle, 2009). Deleciones más dirigidas demostraron que los residuos 18-21 son críticos en la activación de la ruta de segundo mensajero debido a una carencia de unión de la ACTH al receptor. Cuando estos aminoácidos se mutan a residuos de alanina (18-21A), la unión de ACTH es inexistente y consecuentemente la producción de AMPc. Estos resultados contrastan con los de Webb et al., (2009) quienes demostraron que la deleción del fragmento 9-24, que incluye la región rica en residuos de tirosina, impide la migración del receptor a membrana. Realmente esta región no es necesaria para el tráfico de la MRAP1 a la membrana, pero podría jugar un papel crítico en la estabilización de la interacción MRAP1/MC2R o alternativamente podría interactuar con otras proteínas para promover el tráfico a la membrana (Webb et al., 2009). Dentro de este dominio, el motivo EYY está completamente conservado en todas las secuencias de MRAP1 y podría jugar un papel importante en el tráfico del receptor (Agulleiro et al., 2010). Utilizando construcciones quiméricas secuenciales entre el MC2R y el MC4R Fridmanis y colaboradores (Fridmanis et al., 2010) hipotetizaron un modelo de interacción MRAP1/MC2R sugiriendo que la MRAP1 interactúa con los dominios TM4 y TM5 del MC2R, los cuales son importantes para la unión de los cuatro aminoácidos básicos de la ACTH. Sin embargo, los datos aportados por Hinkle y colaboradores (2011) no apoyan el modelo desde que la substitución de ambos dominios en el receptor MC2R con los homólogos del MC4R no altera la dependencia de la MRAP1.

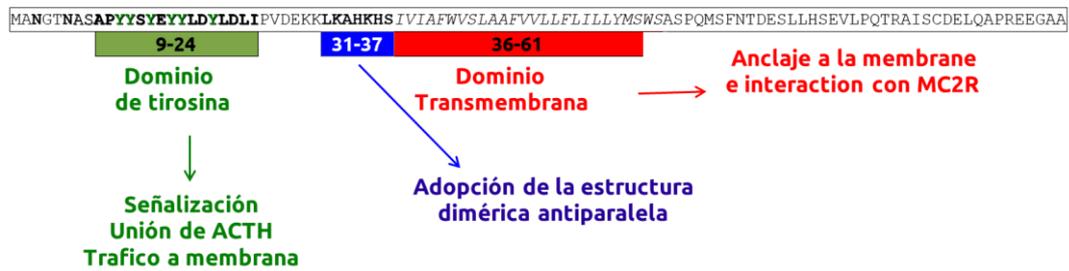


Figura 8. Estructura funcional de la MRAP1 humana. Los residuos 36-61 constituyen el dominio transmembrana, crítico para el anclaje de la proteína a la membrana y la interacción con el MC2R. El motivo 31-37 es importante para la adopción de la estructura dual antiparalela de la molécula. El dominio rico en tirosinas (9-24) es crítico para la producción de AMPc inducida por ACTH, la unión de la propia hormona y el tráfico a la membrana. Ver texto para más detalles.

1.4.2. Tras una función para la MRAP2

Una vez caracterizada la función de la MRAP1, diferentes grupos de investigación tornaron su interés hacia la búsqueda de una función para la MRAP2. De hecho, esta proteína parece ser evolutivamente más antigua que la MRAP1, puesto que, a diferencia de esta última, se ha encontrado en lampreas (Valsalan et al., 2013). La MRAP2 presenta cierto grado de identidad con la MRAP1 y una estructura similar, en virtud de la presencia de un dominio transmembranal y cierto grado de conservación en el dominio de tirosinas y en la región crítica para la formación de la estructura dimérica (Figura 9). A semejanza de la MRAP1, MRAP2 también forma homodímeros antiparalelos, pero también heterodímeros con MRAP1 (Chan et al., 2009; Chaly et al., 2016; Asai et al., 2013); y se glicosila en la posición 9-12, donde se encuentra la secuencia consenso de glicosilación NRTS (Chan et al., 2009).

La interacción de hMRAP2 con hMC2R en células CHO permite el tráfico del receptor a la membrana plasmática, gracias a una interacción física demostrada mediante experimentos de inmunoprecipitación. Sin embargo, los experimentos farmacológicos desarrollados en células HEK293T demuestran que tal interacción es incapaz de permitir la expresión funcional del receptor ya que solamente responde a la estimulación con ACTH en el rango micromolar.

Introducción

hMRAP1- α	MANGTNASAP-----YYSYEYYLDYLDLIPVDEKKLKAHKHSIVIAFWVSLA
hMRAP2	MSAQRLLISNRTSQSASNSDYTWEEYEEIG----PVSFEGLKAHKYSIVIGFWVGLA
Consenso	*-----*-----*****-----*****-----*-----*
hMRAP1- α	AFVVLFLTLIYMSWSASPQMRNSPKHHQTCPWSHGLNLHLICIQKCLPCHREPLATSQAQ
hMRAP2	VFVIFMFFVLTLLTKTGAPHQDNAESSEKRFMRNSFVSDFGRPLEPKVFSRQGNESRS
Consenso	-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*
hMRAP1- α	AQASSVEPGSRTGPDQPLRQESSSTLPLGGFQTHPTLLWELTLNGGPLVRSKPSEPPPG
hMRAP2	RSLFHCYINEVERLDRAKACHQTALDSDVQLQEAIRSSGQPEEELNRLMKFDIPNFVN
	-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*
hMRAP1- α	DRTSQLQS-----
hMRAP2	TDQNYFGEDDLLISEPPIVLETKPLSQTSHKDLD
Consenso	-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----*

Figura 9. Alineamiento de MRPA1- α y MRAP2 humanas. En verde se destaca la coincidencia de residuos de tirosina en la región N-terminal, en amarillo la región anterior al dominio transmembranal, marcado en rojo, importante para la dimerización dual antiparalela. Los asteriscos en la secuencia consenso marcan coincidencia en los residuos de ambas secuencias mientras que los guiones marcan discrepancia.

El rango de glicosilación parece afectar a la interacción hMC2R/hMRAP2 ya que formas desglicosiladas de MRAP2 no permiten la señalización del receptor incluso en el rango micromolar (Chan et al., 2009). La hMRAP2 no solamente interactúa con el hMC2R, sino que también es capaz de inmunoprecipitar con los restantes receptores de melanocortinas e interferir con su función. La interacción de hMRAP2 con hM4CR y hMC5R produce una disminución de la presencia en membrana de ambos receptores, algo que no ocurre tras la interacción con MC1R y MC3R. Sin embargo, en todos los casos la anterior interacción disminuye la respuesta del receptor a la estimulación con NDP-MSH ([Nle4, DPhe7]- α -MSH) (Chan et al., 2009). Paradójicamente, Assai y colaboradores (2013) obtuvieron respuestas opuestas trabajando con el MC4R de ratón y estimulando con α -MSH vs NDP-MSH. Es decir, en el caso del MC4R de ratón, la interacción con MRAP2 produce una sensibilización del receptor a la α -MSH, algo que también ha sido demostrado en estudios posteriores (Liang et al., 2018).

El patrón de expresión de la MRAP2 difiere sustancialmente del de la MRAP1. En humanos, se expresa fundamentalmente en el sistema arterial, con niveles también significativos en el SNC, las glándulas salivares y el bazo y niveles más modestos en la glándula adrenal (Soletto et al., 2019). Experimentos *in silico*

sobre los “data-set” de expresión hipotalámica con resolución de célula única han demostrado que la expresión MRAP2 co-localiza con las de MC3R y MC4R a nivel celular, aunque su expresión hipotalámica no se restringe exclusivamente a las células MC3R/MC4R (Liang et al., 2018). Estudios inmunocitoquímicos han acotado la coexpresión del MC4R y MRAP2 al núcleo paraventricular hipotalámico, una región crítica en la integración de información energética y la regulación del balance energético (Asai et al., 2013; Bruschetta et al., 2018). De hecho, la disrupción genética de la expresión de MRAP2 en ratones, específicamente en el cerebro, o más específicamente en el PVN genera obesidad a edades tempranas, probablemente debido a la insensibilidad a la MSH, pero también a una reducción de la actividad constitutiva del MC4R tras interacción con la proteína accesoria (Asai et al., 2013; Bruschetta et al., 2018). Un estudio muy reciente ha demostrado que las mutaciones que inducen pérdida de función de MRAP2 inducen obesidad hiperfágica, hipertensión e hiperglicemia en humanos (Baron et al., 2019). MRAP2 no solamente interactúa con los receptores de melanocortinas, sino que además puede interactuar y potenciar la respuesta del receptor de grelina a su agonista, una hormona orexigénica estomacal (Srisai et al., 2017) y puede promover la ingesta a través de la inhibición del receptor de prokineticina 1 (Chaly et al., 2016).

1.4.3 Las MRAPs en peces

Los experimentos farmacológicos realizados con el MC2R de peces llegaron a la misma conclusión inicial que la alcanzada en mamíferos. El MC2R de peces solamente podía responder a la ACTH cuando se expresaba en líneas adrenales de mamíferos (Klovins et al., 2004). Esto llevo a sospechar de la conservación de la expresión funcional del MC2R en peces, así como de la existencia de proteínas accesorias en taxones diferentes de mamíferos. La exploración *in silico* de diferentes genomas de peces incluyendo el del pez cebra llevó a la caracterización de las secuencias de MRAP1 y MRAP2 (Agulleiro et al., 2010) (Figura 10).

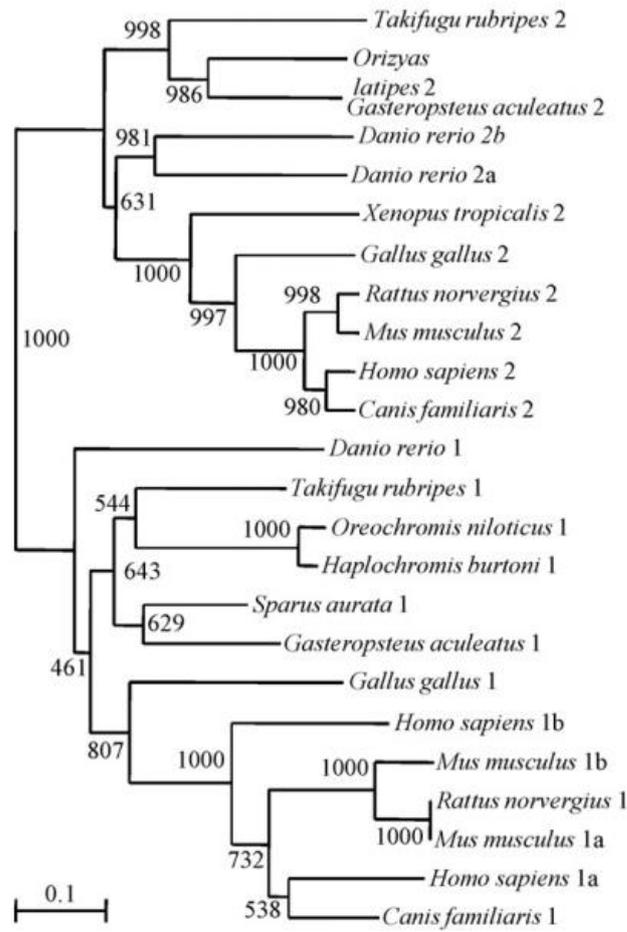


Figura 10. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de MRAP1 y MRAP2. Los números representados en los nodos de las ramas indican el nivel de confianza del agrupamiento tras 1000 “boopstraps” (Agulleiro et al., 2010).

En el pez cebrá, concretamente, la zfMRAP2 se encuentra duplicada (zfMRAP2a y zfMRAP2b). La expresión de MRAP1 aparece en el riñón anterior, donde se encuentran las células interrenales productoras de glucocorticoides que expresan zfMC2R, pero también en bazo, testículo y músculo (Agulleiro et al., 2013). La coexpresión de zfMC2R y zfMRAP1 permite la migración a membrana plasmática del receptor y su expresión funcional, siendo activado por concentraciones nanomolares de ACTH (Agulleiro et al., 2010). MRAP2a y MRAP2b expresadas en HEK-293 colocalizan con el MC2R también expresado *in vitro* pero no permiten su expresión funcional dado que el complejo MC2R/MRAP2a, b no es capaz de posicionarse en la membrana plasmática. Sin embargo, la coexpresión de MRAP2a o MRAP2b junto con MRAP1 potencia la respuesta del MC2R a la ACTH

(Agulleiro et al., 2010). La expresión de MRAP1 se modula de forma hormonal siendo inhibida por la administración oral de cortisol y bezafibrato, un agonista del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR) de tipo alpha (Agulleiro et al., 2013).

MRAP2a y MRAP2b también son capaces de interactuar con otros receptores de melanocortinas en peces, concretamente con el MC1R (Cortés et al., 2014; Ji et al., 2019), con el MC4R (Agulleiro et al., 2013; Sebjaj et al., 2013; Rao et al., 2019; Wang et al., 2019) y el MC5R (Agulleiro et al., 2013; Zhu et al., 2018) aunque la interacción con el MC4R también se ha registrado en aves (Zhang et al., 2017). Sin embargo, aunque hay una interacción entre la MRPA2 y diversos receptores, demostrada por inmunoprecipitación, la interacción solamente tiene implicaciones farmacológicas cuando se produce con el MC4R. Se ha demostrado que la interacción entre MRAP2a y MC4R produce una sensibilización del receptor del pez cebra por la ACTH. Debe recordarse que MC4R presenta baja afinidad por esta hormona, pero tras interacción con MRAP2a es capaz de responder de una manera tan sensible como lo hace MC2R. Es decir, la interacción MC4R/MRAP2a transforma a un receptor canónico de MSH en un receptor de ACTH y abre una nueva vía de señalización de los efectos del estrés hacia aquellos tejidos que expresen MC4R y MRPA2a (Agulleiro et al., 2013). Dicho efecto ha sido también corroborado en aves (Zhang et al., 2017). En relación al efecto de la interacción entre zfMRAP2a/MC4R sobre la sensibilidad a la α -MSH; los trabajos de Agulleiro y colaboradores (2013) mostraron que la interacción no tenía efectos sobre la actividad inducida por α -MSH, manteniéndose los niveles de AMPc intracelulares similares a los de las células transfectadas únicamente con el receptor, ni sobre la actividad constitutiva. Sin embargo, Sebjaj y colaboradores (2013) demostraron que la interacción con MRAP2a reduce la capacidad de MC4R para unir α -MSH, sin modificar la expresión del receptor en la superficie celular, algo que también había demostrado Agulleiro et al (2013) en su trabajo paralelo, y sin modificar la afinidad de la hormona por el receptor. Los autores defienden que la interacción MRAP2a/MC4R reduce los lugares de interacción de la α -MSH con el receptor, descendiendo así la capacidad de unión. Además, la interacción MRAP2a/MC4R

provoca un descenso de la actividad constitutiva del receptor y de la actividad inducida por α -MSH estabilizando una forma inactiva del receptor (Sebaj et al., 2013), resultados contrarios a los reportados por Agulleiro et al., (2013). La inactivación de la expresión de MRAP2a mediante métodos de morfolino produce una fuerte reducción del crecimiento larvario, probablemente debida a una mayor activación del MC4R que conlleva reducciones en el crecimiento (ver antes) (Sebaj et al., 2013).

Según los estudios de Agulleiro et al (2013), MRAP2b interactúa físicamente con el receptor 4 y 5 pero no produce ningún cambio en la activación de los receptores por ACTH o α -MSH. Sin embargo, sí se observa una reducción de la actividad constitutiva del MC4R. Esta reducción fue observada también en los estudios de Sebaj et al., (2013) y se enmarcaría perfectamente en el aumento de la expresión de MRAP2b inducido por el ayuno en el pez cebra (Agulleiro et al., 2013). Es decir, durante el ayuno el aumento de la expresión de MRAP2b permitiría un descenso de la actividad constitutiva del receptor dirigiendo al animal hacia la búsqueda de alimento e ingesta. Los estudios de Sebaj et al., (2013) encontraron que MRAP2b aumentaba sensiblemente la presencia del receptor en la membrana plasmática sin afectar, otra vez, su afinidad por α -MSH, pero si aumentando 17 veces la actividad del receptor en respuesta a la α -MSH. La inactivación de la MRAP2b mediante técnicas de morfolino no tuvo efecto sobre el crecimiento larvario del pez cebra (Sebaj et al., 2013). La ausencia de expresión de MRAP2b durante la fase larvaria en contraposición a la fuerte expresión de MRAP2a hicieron concluir a los autores que la MRAP2a induce una conformación estable inactiva del receptor durante la fase larvaria que permite los elevados ritmos de crecimiento. Durante el desarrollo la expresión central de MRPA2a se reduce incrementando la de MRAP2b que retiene el crecimiento durante la fase adulta (Sebaj et al., 2013).

1.5. Ritmos biológicos

La sucesión del día y la noche, el ciclo lunar, así como de las estaciones del año debidas a los movimientos de rotación y traslación de la tierra han supuesto

una presión evolutiva para todos los organismos, que han adaptado consecuentemente sus procesos vitales. La anticipación a los cambios ha permitido a los seres vivos sincronizarse mejor a las condiciones ambientales y ha provisto ventajas selectivas importantes para la supervivencia de la especie (Hurd et al., 1998). La capacidad de los organismos para adaptarse a los cambios cíclicos genera una serie de respuestas repetitivas, cíclicas o rítmicas que afectan a diferentes niveles tanto comportamentales (sueño/ vigilia, actividad/reposo, alimentación / excreción) como fisiológicos (temperatura corporal, secreción hormonal, reproducción). Así, podemos definir un ritmo biológico como la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo (Madrid y Rol, 2015).

Los periodos de los ritmos son muy diferentes oscilando desde fracciones de segundo hasta años. Si bien, la mayoría de los seres vivos han sincronizado sus funciones vitales a los ciclos fotoperiódicos o ciclos día-noche, que integran las horas de luz y oscuridad durante el periodo de 24 horas (Zulley et al., 1981). Las horas diarias de luz/oscuridad, a su vez, varían a lo largo del año, gracias al proceso de traslación de la tierra que genera la sucesión de estaciones. Muchos organismos también sincronizan eventos fisiológicos, como la reproducción, a las estaciones del año de forma que la progenie emerja en la estación más adecuada desde el punto de vista de disponibilidad de recursos y ausencia de predadores, para así tener las mejores expectativas de supervivencia (Nakane y Yoshimura, 2019). Aunque existen otras variables, como la temperatura y las precipitaciones, que muestran variaciones estacionales, la pista principal que utilizan los seres vivos es el fotoperiodo, ya que es la más predecible de todas ellas. Su variación interanual es ínfima mientras que otras pistas como la temperatura o las precipitaciones son más volubles. La aparición de un invierno cálido podría confundir a los sistemas/sensores de detección y romper el acoplamiento entre la función fisiológica y el ciclo estacional.

1.5.1. Características de los ritmos biológicos

La cronobiología o ciencia que estudia los ritmos biológicos ha definido unos parámetros, expresables en unidades numéricas, para poder cuantificar los ritmos. Estos parámetros son: el periodo (τ) que representa el tiempo necesario para completar un ciclo del ritmo y por tanto se expresa en unidades de tiempo. La frecuencia representa la inversa del periodo ($1/\tau$) y corresponde, por tanto, al número de ciclos por unidad de tiempo, el mesor (M) o valor medio del ritmo tras ajuste a una curva sinusoidal, la amplitud (A), que corresponde a la distancia entre el mesor (M) y el máximo del parámetro siempre que el ritmo se ajuste a una curva sinusoidal (en caso contrario corresponde a la distancia entre el valor máximo y mínimo del ritmo), la fase que define un punto de referencia temporal en un ritmo, siendo los más característicos los picos y los valles. Cuando el ritmo se ajusta a un perfil sinusoidal el pico se conoce con el nombre de acrofase (ϕ) mientras que el valle corresponde a la batifase (Figura 11).

En función de su frecuencia, los ritmos se pueden clasificar como circadianos, con una frecuencia cercana al día (entre >20 y <28 h), ultradianos, con una frecuencia superior a un ciclo por día (<20 h) e infradianos, que son aquellos con una frecuencia menor de un ciclo por día (>28 h). Entre estos últimos se encuentran los ritmos circalunares (≈ 28 días), circanuales (365 días) y los circaseptanos (7 años).

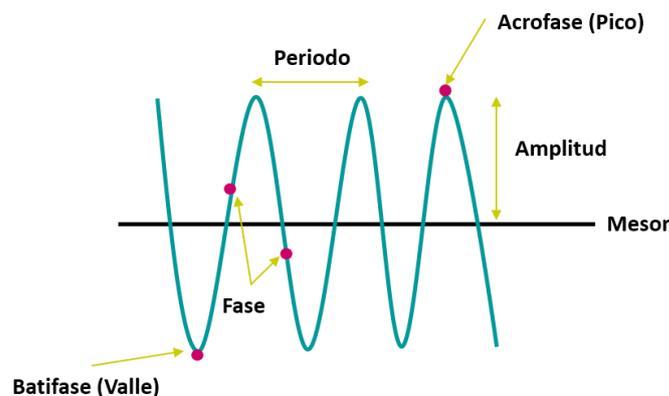


Figura 11. Representación gráfica de los parámetros característicos de un ritmo biológico. Su ciclo puede, en ocasiones, ajustarse a una curva sinusoidal mediante el modelo "cosinor" que atiende a la siguiente expresión: $f(t) = M + A \cdot \cos(\omega t + \phi)$, (donde M es el mesor, A la amplitud, ωt el periodo y ϕ la acrofase del ritmo).

Sin embargo, esta periodicidad puede ser puramente exógena, siendo el ambiente el único motivo de la ritmicidad, o endógena, es decir, causada por el propio organismo. Los ritmos exógenos cesan en condiciones constantes, sin embargo, los ritmos endógenos perduran manteniendo su periodicidad, con una leve desviación/retraso, más o menos constante en cada ciclo. Son los factores periódicos del ambiente o “zeitgebers” (del alemán dadores de tiempo) los encargados de sincronizar la periodicidad de estos ritmos endógenos. De entre todos ellos el ciclo de luz/oscuridad diaria es quizás el zeitgeber más importante y responsable de la sincronización de los ritmos circadianos. Por tanto, la diferencia entre ritmos endógenos y exógenos aparece únicamente bajo condiciones constantes mediante exclusión de todos los posibles “zeitgebers” (Aschoff, 1960). El carácter endógeno de un ritmo indica la existencia de un mecanismo interno capaz de medir el tiempo, es decir, un reloj interno que oscila con una periodicidad determinada y que se mantiene invariable en condiciones de curso libre o “free running”, en ausencia de estímulos externos que actúen como encarriladores o sincronizadores del reloj (zeitgebers). Dichos zeitgebers se encargan de modificar el funcionamiento del reloj interno de forma que su fase se ajuste o sincronice con la fase del estímulo ambiental (Aschoff, 1981). Por lo tanto, para poder generar un ritmo biológico es necesario:

- Una señal de entrada (input) que puede ser endógena o exógena y que se encarga de sincronizar el reloj.
- Un oscilador endógeno, reloj o marcapasos (“pacemaker”), capaz de generar la oscilación por sí mismo.
- Una salida (output) en forma de ritmo cuantificable y observable.

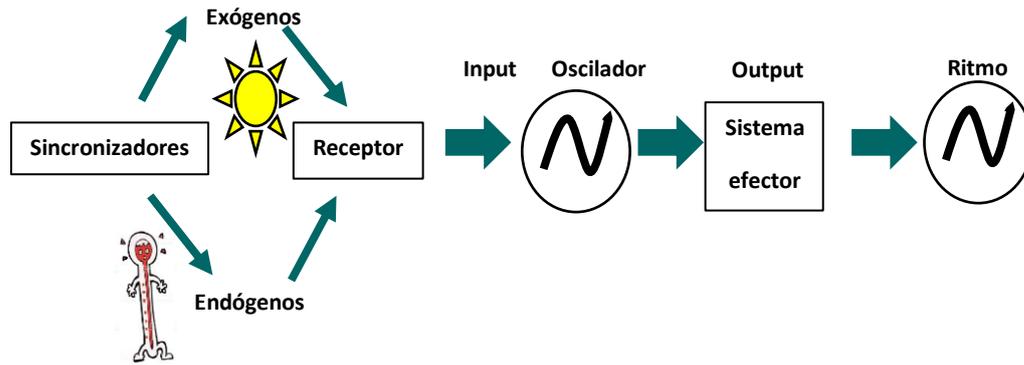


Figura 12. Esquema de la generación de un ritmo biológico incluyendo los elementos que intervienen. Ver texto para mayor descripción del proceso.

1.5.2. Bases moleculares de los relojes endógenos

La mayor parte de estos ritmos y particularmente los ritmos circadianos se generan y/o son controlados en estructuras anatómicas denominadas “pacemakers” u osciladores. En mamíferos, el oscilador principal se sitúa en el núcleo supraquiasmático (NSC) del hipotálamo y se denomina reloj central (Welsh et al., 2010). Este reloj forma parte de una estructura jerarquizada de relojes localizados en el SNC, pero también en los tejidos periféricos (Isorna et al., 2017). El NSC recibe inputs desde las células ganglionares de la retina trasladando esta información en forma de señalización neuronal y hormonal para sincronizar los relojes periféricos situados en la mayor parte de células y tejidos para así controlar los ritmos tisulares (Miller y Hirota, 2020).

El reloj circadiano está genéticamente controlado y altamente conservado a través de la filogenia. Las mutaciones en los denominados “genes reloj” producen cambios en el comportamiento rítmico de los animales. Esencialmente, el reloj circadiano constituye una sucesión autoregulatoria de expresión, acumulación y degradación de proteínas producto de los genes reloj que da lugar, en último término, a un oscilador molecular autónomo. Como obtiene este reloj una periodicidad de 24 horas es todavía una incógnita (Patke et al., 2020). Este reloj molecular controla, a su vez, la expresión de los denominados genes de salida repartidos en los órganos periféricos, controlando, así, la función y actividad de estos, además de transferirles información sobre la hora del día.

El reloj molecular depende de un sistema de “loop” de retroalimentación transcripcional-translacional (TTFL) que funciona gracias a una red de genes reloj circadianos. El primer gen de la familia funcional descubierto fue “*period*” (*per*) responsable del tiempo de eclosión de las larvas de *Drosophila melanogaster*. Junto con el producto del gen *timeless* (*tim*) y mediante interacción física ambas proteínas (PER y TIM) se trasladan al núcleo para reprimir la expresión del gen *clock* (*clk*) y *cycle* (*cyc*) cuyas proteínas dimerizan y se acumulan de forma constitutiva en el núcleo uniéndose a la caja reguladora E-box para estimular la expresión de los represores *per* y *tim*. Los niveles de expresión de *per* y *tim* alcanzan sus máximos al final del día mientras que sus proteínas lo hacen durante la segunda mitad del ciclo nocturno (Patke et al., 2020). Tal cual PER y TIM se acumulan en el núcleo inhiben la función de CLK-CYC (Figura 13).

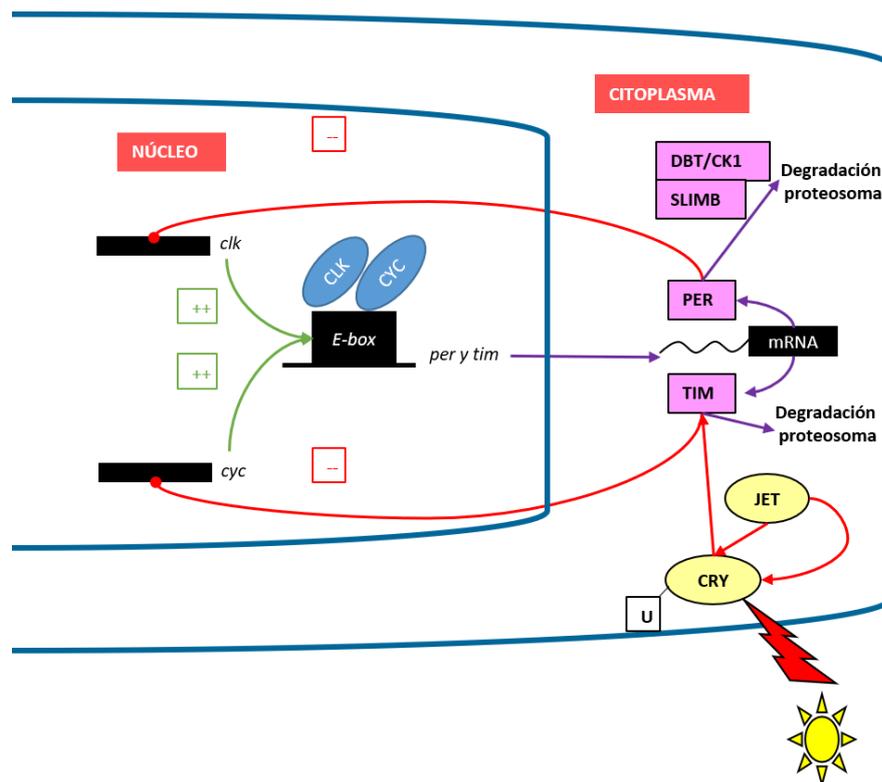


Figura 13. Funcionamiento molecular del oscilador en *Drosophila melanogaster*. Loop principal de retroalimentación transcripcional-translacional (TTFL). CLK proteína “clock”, CRY fotorreceptor criptocromo, CYC proteína “cycle”, E-box caja E con secuencias promotoras reguladoras, DBT/CK1 proteína double-time, JET E3 ubiquitina ligasa jetlag, PER proteína “period”, SLIMB E3 ubiquitina ligasa supernumerary limbs, TIM proteína “timeless”, U ubiquitina, – represión expresión génica, ++ estimulación de la expresión génica. Ver texto para descripción detallada del proceso. Modificado de Patke et al., (2020).

TIM también se degrada de forma dependiente de la luz durante el día, gracias a la activación del fotorreceptor criptocromo (CRY) y la ubiquitina E3 ligasa jetlag (JET). En ausencia de TIM, PER se desestabiliza estructuralmente por double-time (DBT) o sus ortólogos en mamíferos, la caseína quinasa delta y épsilon y la E3 ubiquitina ligasa (SLIMB). La pérdida concomitante de PER y TIM resetea/reinicia el ciclo circadiano.

En *Drosophila* existe un segundo TTFL, que controla la expresión de *clk* mRNA. CLK-CYC se une a las cajas E-box localizados en la región reguladora del promotor de los factores de transcripción Vrille (VRI) y la proteína de dominio PAR 1 epsilon (PDP1 ϵ), que controlan la transcripción de *clk*. VRI se une a las regiones reguladoras VRI/ PDP1 ϵ del promotor de *clk* y reprime su transcripción mientras PDP1 ϵ la activa durante la noche (Figura 14) (revisado por Patke et al., 2020).

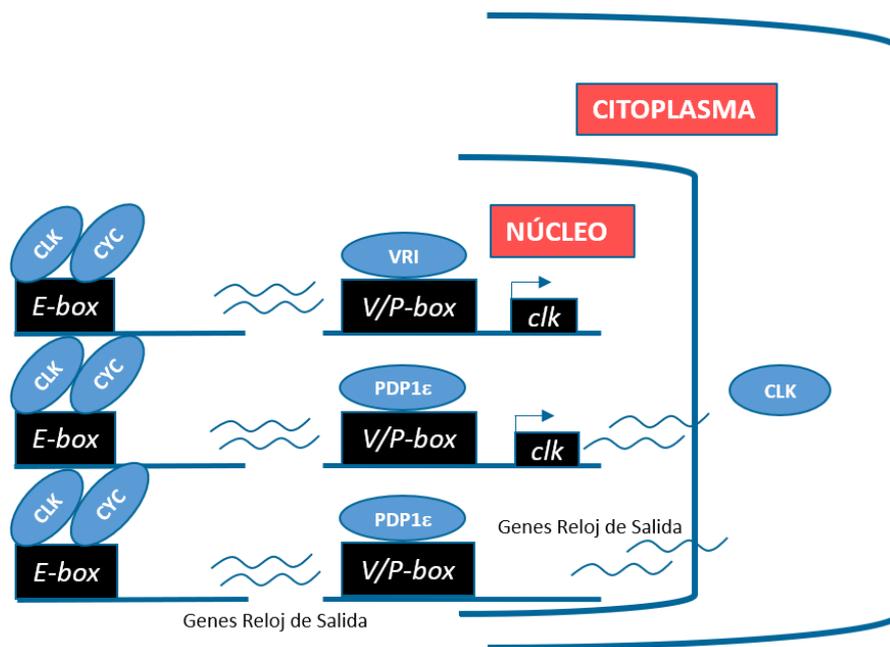


Figura 14. Funcionamiento molecular del oscilador en *Drosophila melanogaster*. Loop secundario de retroalimentación transcripcional-translacional (TTFL). VRI factor de transcripción Vrille, PDP1 ϵ factor de transcripción proteína de dominio PAR 1 epsilon. V/P box caja con secuencias de unión para los factores de transcripción VRI y PDP1 ϵ . Ver Figura 13 para más abreviaturas. Ver texto para descripción detallada del proceso. Modificado de Patke et al., (2020).

Como en *Drosophila melanogaster*, la maquinaria molecular del reloj circadiano de mamíferos está basada en el entrelazamiento de TTFLs. El “loop” principal o primario es dirigido por 4 proteínas reloj, dos activadoras y dos represoras (Partch et al., 2014). Los elementos activadores que dirigen el ciclo circadiano son heterodímeros de la familia de dominios básicos hélice-lazo-hélice [factores de transcripción bHLH-Per-Arnt-Sim (PAS)] (Patke et al., 2020), BMAL1, también conocido como ARNTL y ortólogo de CYC, y CLOCK ortólogo del CLK de *Drosophila*. El heterodímero BMAL-CLOCK dirige la transcripción de genes con cajas E/E' en sus promotores. Las proteínas represoras son PER y CRY ortólogos de sus correspondientes genes en *Drosophila*. Pero a diferencia de esta especie, el gen *per* presenta hasta tres parálogos en el genoma de mamíferos (*per1*, *per2* y *per3*) mientras que *cry* exhibe dos (*cry1* y *cry2*). Si bien estas proteínas son capaces de compensar la función de sus parálogos por ausencia, sus roles no son exactamente redundantes. Por ejemplo, la pérdida individual de CRY1 o CRY2 acorta o alarga el periodo circadiano, respectivamente pero no abole la ritmicidad que solamente desaparece en ausencia de ambos parálogos (Patke et al., 2020). De forma similar a *Drosophila*, en los últimos estados del ciclo, PER y CRY heterodimerizan en el citoplasma, se trasladan al núcleo para reprimir la actividad de CLOCK-BMAL1 previniendo su propia producción, ya que CLOCK –BMAL1 activan la transcripción de *per* y *cry*. Una vez los niveles de PER y CRY descienden lo suficiente gracias a su degradación dependiente de la vía de la ubiquitina y, por tanto, ya no reprimen la actividad de CLOCK-BMAL1, los niveles de PER y CRY vuelven a ascender cerrándose el ciclo (Figura 15).

El segundo TTFL se genera gracias a la activación transcripcional de receptores huérfanos relacionados con el retinoide (ROR α, β, χ) y la represión de REV-ERB α /REV-ERB β . Este segundo TTFL asegura la expresión rítmica de *bmal1* siendo análogo de la regulación de CLK por VRI y PDP1 ϵ descrita anteriormente en *Drosophila*. REV-ERB α /REV-ERB β compiten con ROR α, β, χ por unión a los elementos de respuesta REV-ERB-ROR y potenciadores o “enhancers” en los promotores génicos, incluyendo *bmal1*, para inhibir o promover su transcripción génica. A diferencia del modelo propuesto para *Drosophila* donde la proteína CRY

no forma parte central del TTFL sino que opera a través de la degradación sensible a la luz de TIM, en mamíferos *cry* ha asumido el rol de TIM, actuando como un represor transcripcional de *clock/bmal1* (revisado por Parch et al., 2014; Miller y Hirota, 2020; Patke et al., 2020; Partch, 2020; Pilonz et al., 2020) (Figura 15).

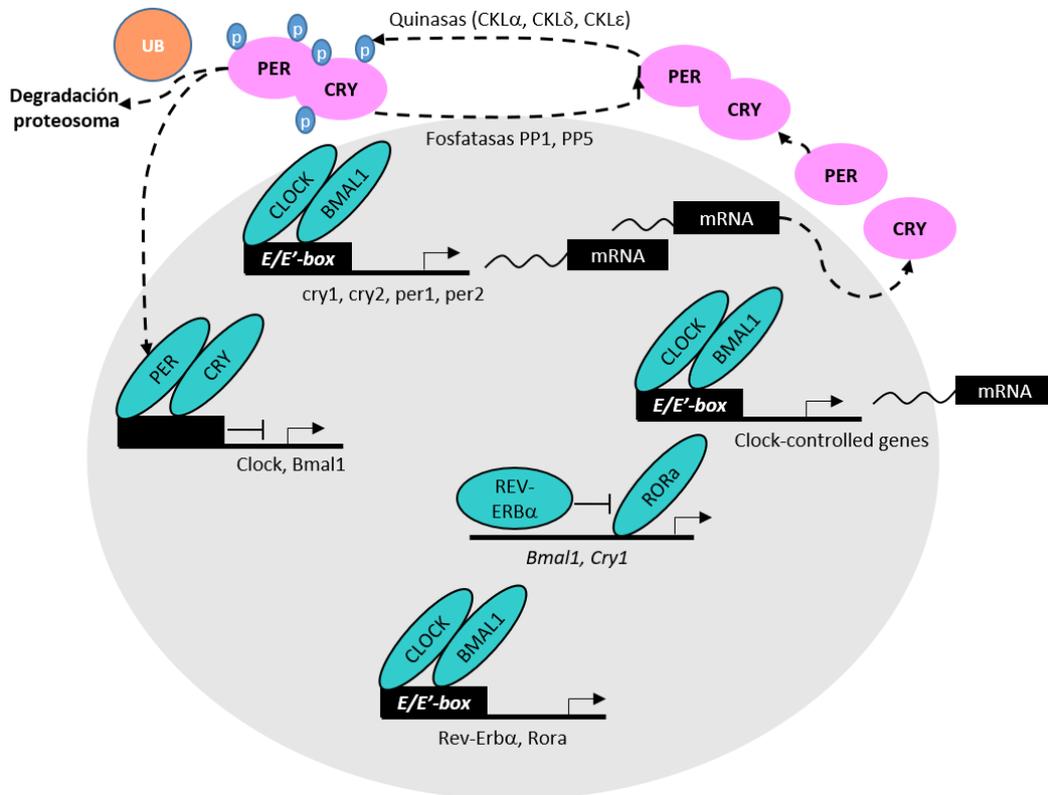


Figura 15. Funcionamiento molecular del oscilador en mamíferos. Loop secundario de retroalimentación transcripcional-translacional (TTFL). Modificado de Parch et al., (2014). Ver Figura 13 para más abreviaturas. Ver texto para descripción detallada del proceso.

1.5.3. Organización del sistema circadiano

El reloj molecular que se ha descrito anteriormente está presente en prácticamente todas las células del individuo y todos estos relojes moleculares, dispuestos en los tejidos centrales y periféricos, forman una red jerarquizada gobernada por el reloj circadiano máster situado en el NSC en mamíferos. Los relojes moleculares del NSC y de las células periféricas tienen exactamente la misma arquitectura y son capaces de generar ritmos circadianos sostenidos. Sin embargo, la diferencia existente entre el NSC y los tejidos periféricos es el grado

de acoplamiento intercelular existente. Además, este reloj máster del NSC es el único que recibe información lumínica desde las células de la retina siendo capaz, por tanto, de sincronizar su periodo con la información ambiental para traspasar, a su vez, la información a los relojes circadianos periféricos. La solidez de la interconexión celular circadiana en el NSC confiere al reloj máster resistencia a las perturbaciones internas. Las casi 20.000 neuronas del NSC oscilan en diferente fase y periodo ensamblándose para determinar un periodo global. Dicha integración de fenotipos rítmicos plurales determina la ritmicidad del NSC y le confiere la capacidad de absorber los ruidos internos que podrían modificar el funcionamiento del reloj molecular. Por el contrario, dicha interconexión reloj-reloj entre las células es más laxa en los tejidos periféricos lo que permite su ajuste de fase desde el reloj central máster mediante el sistema endocrino u otras pistas metabólicas (revisado por Parch et al., 2014; Pilonz et al., 2020). Los estudios *in vitro* han demostrado que las células de los tejidos periféricos muestran ritmos en un ambiente rítmico, pero se de-sincronizan rápidamente cuando las condiciones cíclicas externas cesan (Yamaguchi et al., 2003) lo que parece ser debido a la falta de acoplamiento entre los fenotipos rítmicos celulares.

Este sistema permite, por tanto, que el reloj máster mantenga una temporalidad de aproximadamente 24 horas ajustándose y manteniendo la coordinación temporal con el ciclo solar mientras que los tejidos periféricos se adaptan reflejando el status metabólico del tejido en el cual funcionan (revisado por Parch et al., 2014; Pilonz et al., 2020). Por tanto, el funcionamiento de los relojes moleculares es dependiente del tipo tisular donde se expresen (Cedernaes et al., 2019)

1.5.4. Relojes endógenos y organización circadiana en peces

Los peces son de particular interés en el estudio de los ritmos circadianos por diversos motivos, entre los que destacan: i) la presencia de una glándula pineal fotosensible, fotoreceptores cerebrales y melanóforos dermales fotosensibles (Doyle y Menaker, 2007) ii) a diferencia de mamíferos, los relojes periféricos pueden ser entrenados directamente por la luz, es decir los tejidos se pueden

cultivar *in vitro* y sus relojes se reinician simplemente por exposición a la luz. Incluso las líneas celulares embriónicas de pez cebra son sensibles a la luz (Whitmore et al., 2000). En mamíferos, el único órgano fotosensible es la retina, específicamente las células glanglionares fotosensibles que expresan el fotoreceptor melanopsina, que envía proyecciones al NSC desde donde se transmite la información temporal al resto de relojes centrales y periféricos y iii) los peces son el grupo de vertebrados más diverso desde el punto de vista evolutivo con más de 25.000 especies y sus hábitats difieren considerablemente llegando a colonizar ambientes extremos. Dicha diversidad de hábitats genera diferentes patrones de adaptación evolutiva, entre los que se incluye el sistema circadiano. Por tanto, podemos encontrar diversas adaptaciones del reloj molecular que pueden facilitar el estudio de su plasticidad y la comprensión de su funcionamiento además de la adaptación a diversas condiciones ambientales durante la evolución (Foulkes et al., 2016). Por ejemplo, los peces pueden mostrar un comportamiento circadiano dual, pasando de hábitos nocturnos a diurnos en función de la estación anual o durante la ontogenia (Sánchez-Vázquez et al., 1995, 1998).

En peces, aunque anatómicamente se ha descrito la presencia de un NSC (Cerdá-Reverter et al., 2000) no se ha demostrado su implicación funcional en la regulación de la ritmicidad circadiana y concretamente la presencia de un “pacemaker” o reloj master (Idda et al., 2012). Este oscilador principal parece estar situado en la glándula pineal, una estructura neuroglandular epitalámica que contiene todos los elementos necesarios para el entrenamiento lumínico, así como para la generación de ritmos circadianos (Falcón et al., 2010). La pineal de peces presenta fotoreceptores que comparten características moleculares, estructurales y funcionales con los de la retina y su reloj circadiano gobierna la síntesis periódica de melatonina (Falcón et al., 2010). La hormona se sintetiza por la noche, desde su precursor el triptófano y la serotonina (5-HT) como intermediario, gracias a la activación de la aryl-alkylamine N-acetyl-transferasa (AANAT) (Figura 16), y alcanza niveles mínimos durante el día como resultado de la transcripción de AANAT regulada por la luz (Velarde et al., 2010). El genoma de

peces presenta dos genes parálogos que codifican AANAT1 y AANAT2. AANAT1 se expresa fundamentalmente en la retina mientras que la expresión de AANAT2 queda confinada principalmente en la glándula pineal (Velarde et al., 2010; Falcón et al., 2010). La expresión de AANAT2 es regulada por el reloj circadiano pineal y se suprime rápidamente tras exposición a la luz (Falcón et al., 2010). La síntesis rítmica de melatonina durante el periodo nocturno y su inhibición diurna está altamente conservada en vertebrados, pero la organización del sistema circadiano que controla su síntesis circadiana ha cambiado enormemente.

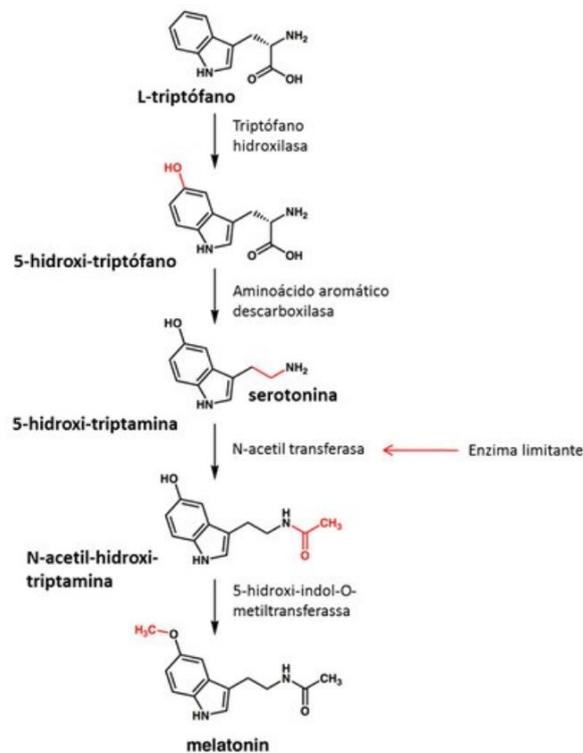


Figura 16. Esquema de la síntesis de melatonina a partir de su precursor el triptófano. 5-Hidroxi-indol-O-metiltransferasas (HIOMT), aminoácido aromático descarboxilasa (AAD), aryl-alkylamine N-acetyl-transferasa (AANAT), triptófano hidroxilasa (TPH).

En mamíferos, la información lumínica alcanza el NSC desde las células ganglionares retinianas. Desde el NSC la información viaja a través del tracto retino-hipotalámico vía el núcleo paraventricular (PVN) para alcanzar la glándula pineal. En peces, y otros vertebrados no mamíferos, tanto la retina como la pineal presentan fotoreceptores sensibles a la luz externa y quizás también existen estructuras fotosensibles en el cerebro presentes en el área preóptica e

hipotálamo tuberal (Doyle y Menaker, 2007). A través de ellos, la luz es capaz de entrenar los osciladores de la retina y pineal los cuales, a su vez, están interconectados. Tras la integración de la información y el diálogo entre los diferentes osciladores la salida hormonal se traduce en variaciones de los niveles de melatonina que reflejan el status circadiano y estacional. La melatonina retinal actúa como un factor paracrino/autocrino y se degrada localmente, por el contrario, la melatonina procedente de la pineal se libera al líquido cerebroespinal o ceforraquídeo alcanzando posteriormente las estructuras centrales o periféricas que expresan receptores de melatonina. Además de la salida hormonal, ambos pineal y retina elaboran otra salida rítmica codificada de forma neural a través de los tractos retino-hipotalámico y pineal para inervar el diencéfalo ventral donde potencialmente existen unidades oscilatorias que serían entrenadas desde la pineal/retina (revisado por Falcón et al., 2010) (Figura 17).

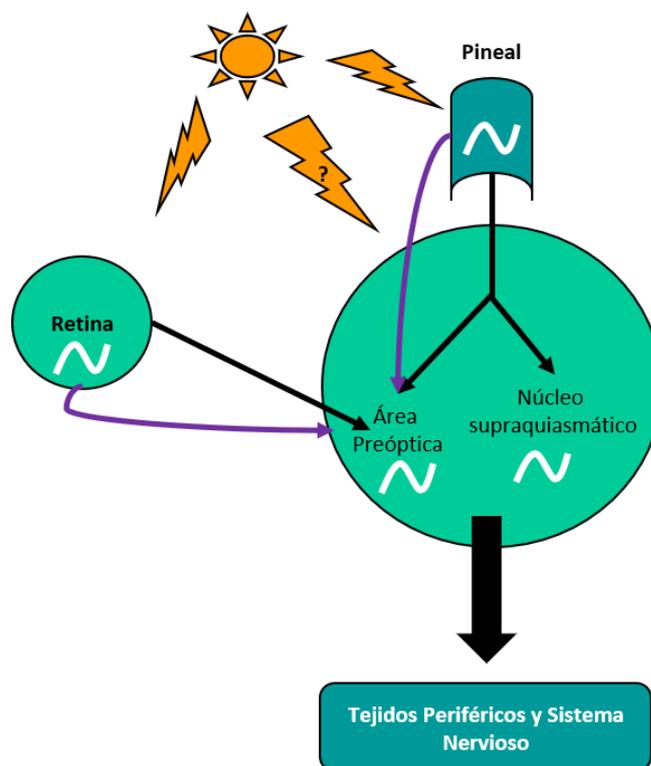


Figura 17. Modificado de Falcón et al., (2010). Las líneas moradas indican transmisión de información rítmica vía neural mientras que las negras indican transmisión hormonal vía receptores de melatonina. El interrogante indica la posibilidad de receptores lumínicos en el propio cerebro. Tras integrarse la información coordinadamente en las tres unidades oscilatorias se elabora una salida que gobierna la fisiología de los tejidos periféricos, incluyendo la secreción hormonal desde la pituitaria.

1.5.5. Alimentación y ritmos circadianos

La simple observación del comportamiento animal, incluyendo nuestros propios hábitos, nos revela que los animales no comen constantemente, sino que aprovechan determinadas horas del día para alimentarse y estas horas suelen repetirse adoptando un patrón cíclico, es decir, un ritmo de alimentación. Evidentemente, las horas de alimentación quedan incluidas dentro del periodo de actividad del organismo y constituyen el periodo de acúmulo de energía. Por el contrario, los periodos de inactividad/sueño se corresponden con periodos de ayuno y movilización de las reservas energéticas. Dicha ritmicidad aparece en la naturaleza en función de la disponibilidad de alimento, la cual no es continua a lo largo del periodo noche/día, pero también en función del riesgo, frente a los potenciales predadores, que supone la búsqueda de alimento y el propio acto de alimentarse.

Al igual que existe un reloj máster situado en el NSC sincronizado por la sucesión de horas de luz, existe también un sistema temporal separado y que participa en los ciclos ayuno/ingesta. En ocasiones, este reloj se le refiere como reloj de la ingesta u oscilador inducible por la alimentación (FEO del inglés “feeding-inducible oscillator”) en contraposición del LEO u oscilador inducible por la luz (LEO del inglés “light-inducible oscillator”). Un desajuste entre alimentación y ciclos de actividad puede re-sincronizar relojes periféricos y centrales (no aquellos localizados en el NSC) y provocar efectos negativos sobre el metabolismo (Challet, 2019). De hecho, la mayor parte de relojes periféricos pueden ser entrenados por estímulos asociados con los ritmos de alimentación como son los niveles de glucosa sanguínea, hormonas periféricas etc. Una particularidad del sistema es que, si se restringe el tiempo de alimentación a una sola toma, los relojes circadianos se desplazarán para acoplarse a este ritmo de alimentación, pero por el contrario el oscilador principal, sito en el NSC, quedará sincronizado al L/O (Mistlberger, 2020). Dicha flexibilidad permite acomodarse a las horas de ingesta sin interferir con el oscilador día/noche preservando la codificación temporal referente al fotoperiodo.

Los primeros estudios sobre ritmos circadianos ya destacaron la aparición de una actividad locomotora anticipatoria (denominada FAA del inglés “food anticipatory activity”) cuando los animales son adaptados a un tiempo de alimentación y este ritmo anticipatorio permanece durante días, aunque los animales ayunen. Estos ritmos anticipatorios no surgen si el patrón de alimentación es muy diferente de 24 horas. Sin embargo, la aparición de la FAA no depende del NSC ya que las ratas a las cuales se les ha ablacionado el NSC siguen exhibiendo FAA tras entrenamiento a un patrón de alimentación cercano a las 24 horas, lo que da consistencia a la existencia de un FEO independiente del LEO (revisado por Mistlberger, 2020).

La localización anatómica del FEO en vertebrados es desconocida, aunque es lógico pensar que, si el LEO se encuentra en el hipotálamo, el FEO también lo haga, concretamente en aquellas células que reciben información metabólica desde los sistemas periféricos. Es cierto, que las lesiones o silenciamiento génico de diversas estructuras hipotalámicas o genes, respectivamente producen alteraciones tanto disminuyendo como aumentado la FAA (Davidson, 2009; Mistlberger, 2011; Challet et al., 2010; Butler et al., 2017). Sin embargo, es cierto que se han detectado efectos similares debidos a lesiones o silenciamiento génico en el cerebro anterior o posterior (Davison et al., 2000; Mendoza et al., 2010; Gallardo et al., 2014). Así pues, no existe un consenso sobre la localización del FEO en mamíferos.

Sin embargo, los experimentos de pérdida de función han revelado la existencia de una clara conexión entre el sistema circadiano, los ritmos de alimentación y la homeostasis energética (Staels et al., 2006; Gatfield et al., 2008). Los ratones portadores de la mutación *Clock Δ 19* exhiben ritmos de actividad reducidos, pero también un ritmo de alimentación alterado con incrementos significativos de la ingesta diurna. Estos ratones son hiperfágicos y desarrollan obesidad inducida por la dieta con mayor facilidad que su contrapartida salvaje (Summa y Turek, 2014). Pero además los ratones deficientes en el gen *per2* también exhiben un ritmo circadiano de alimentación anormal, particularmente tras la ingesta de dietas altas en grasa (Yang et al., 2009). Estos ritmos de

alimentación alterados al igual que la actividad locomotora también ocurren en los ratones deficientes en el gen *bmal1* (Kondratov et al., 2006; Rudic et al., 2004).

Estudios tempranos ya remarcaron la existencia de ritmos diarios de alimentación en peces, pero su estudio siempre ha resultado complejo en virtud de la flexibilidad del sistema circadiano que redundo en variabilidad de respuesta experimental (López-Olmeda y Sánchez-Vázquez, 2011). Dado su carácter poiquilotermo, los peces están, además, expuestos a los cambios estacionales de temperatura que regulan su metabolismo energético e intermediario. Dichas adaptaciones estacionales provocan, en ocasiones, inversiones de fase en los ritmos de alimentación mostrando un comportamiento alimenticio diurno o nocturno en función de la estación del año (Sánchez-Vázquez et al., 1998).

La FAA también ha sido descrita en peces, manifestándose como una actividad natatoria anterior (entre 1-3 horas) a la hora de alimentación habitual. Aunque la aparición de la FAA parece ser independiente de la fase fotoperiódica en la que el alimento se suministra, las condiciones lumínicas influyen los patrones comportamentales de alimentación. Por ejemplo, cuando la alimentación se produce de forma próxima al amanecer o anochecer los periodos de FAA se acortan. Sin embargo, los peces que se alimentan a una hora fija del día en ausencia de información fotoperiódica todavía exhiben FAA indicando que la alimentación actúa *per se* como una señal externa capaz de entrenar la FAA. Es más, si los animales son ayunados en ausencia de información fotoperiódica la FAA persiste con una periodicidad cercana a 24 horas indicando la presencia de un ritmo endógeno responsable de la generación de dicho comportamiento (revisado por del Pozo et al., 2012). La prescripción temporal de la alimentación puede resincronizar el reloj interno cambiando su patrón de alimentación en función de la hora de alimentación, es decir que los peces pueden llegar a ser diurnos cuando se alimentan por el día y nocturnos cuando se alimentan durante el periodo nocturno. Sin embargo, determinadas especies no muestran tanta flexibilidad como por ejemplo la tenca (*Tinca tinca*) que es estrictamente nocturna y rehúye del alimento que se suministra durante la fase lumínica del fotoperiodo (Herrero et al., 2005). Además, de la actividad locomotora otras variables fisiológicas

pueden mostrar ritmicidad y/o anticipación a las horas de alimentación. Por ejemplo, la lubina muestra ritmos diarios de glucosa plasmática durante el ayuno sincronizados por el fotoperiodo (Cerdá-Reverter et al., 1998) mientras que las variaciones diarias de hormonas tiroideas asociadas al fotoperiodo desaparecen durante el ayuno prolongado (Cerdá-Reverter et al., 1996). La anticipación en la expresión de algunas enzimas digestivas y neuropéptidos relacionados con la alimentación también se ha descrito en diversas especies (revisado por del Pozo et al., 2012)

1.5.6. Papel de las melanocortinas en los ritmos circadianos

El papel de las melanocortinas en la regulación de los ritmos circadianos es relativamente desconocido y solamente existen antecedentes de su participación en la regulación de ritmos de FAA (Begrache et al., 2009).

Los ratones carentes del MC3R (-/-) no tienen alteraciones en la ingesta o exhiben una ligera hiperfagia sobre dietas ricas en grasa. Dicha hiperfagia resulta del incremento de niveles de ingesta durante la fase luminosa del fotoperiodo, en unos animales que muestran hábitos de alimentación nocturnos. Estos resultados sugieren que el MC3R podría estar involucrado en la regulación de los ritmos circadianos de alimentación (Butler et al., 2017).

La hipótesis de que el MC3R podría servir como un nexo de unión entre estado energético del organismo y la expresión de los ritmos circadianos de alimentación fue demostrada por Sutton y colaboradores (2008). Los autores demostraron, mediante el uso de protocolos temporales de alimentación asociados a restricción calórica en animales MC3R (-/-), que el receptor es indispensable para la coordinación del desarrollo de FAA y la vigilia asociada con los protocolos de alimentación restrictiva. Así, los animales carentes de un MC3R funcional no exhiben FAA o esta actividad es reducida en comparación con sus congéneres salvajes. Este entrenamiento a la alimentación requiere la expresión de los genes *Npas2* y *Per2*, ambos componentes de la maquinaria transcripcional que mantiene el reloj circadiano (Dudley et al., 2003; Feillet et al., 2006). Ambos genes, junto con *Bmal1* presentan alteración en su expresión cortical bajo

protocolos de alimentación restringida o en animales alimentados *ad libitum* en ratones MC3R (-/-) (Sutton et al., 2008). La ausencia de Bmal1 también provoca, a su vez, una alteración en los patrones rítmicos de expresión de AGRP (Clemenzi et al., 2020) sugiriendo una conexión entre el reloj circadiano y los ritmos de alimentación a través de sistema melanocortinas.



2. Objetivos

La tesis doctoral tiene dos objetivos muy diferenciados y basados en resultados previos obtenidos en el laboratorio de control de ingesta del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal.

Como se ha expuesto en la introducción el MC4R del pez zebra (zfMC4R) es capaz de responder a la ACTH en presencia de la MRAP2a (Agulleiro et al., 2013), pero no así otros receptores de la familia (Agulleiro et al., 2013; Cortés et al., 2014). Evidentemente, la interacción de MRAP2a con el MC4R debe provocar un cambio conformacional en el receptor que permita la unión y/o transducción de señal a través de la vía del AMPc. Como se demostró previamente en el laboratorio esto no ocurre tras interacción con el MC1R o MC5Ra. Nuestra pregunta de partida fue si este fenómeno, observado solamente en el MC4R del pez cebra, esta conservado a través de la evolución. Para ello nos planteamos demostrarlo en humanos utilizando el MC4R (hMC4R) y la MRAP2 (hMRAP2) de la especie, e incluso cruzando las MRAP2, es decir hMC4R-zfMRPA2a y zfMC4R-hMRPA2. Una vez demostramos la conservación evolutiva nos preguntamos qué características estructurales tiene el MC4R que hace posible la respuesta a ACTH tras interacción con la MRAP2. Para ello, diseñamos un experimento de quimeras del MC1R, un receptor que sabemos no responde a ACTH tras interacción. La idea fue traspasar secuencialmente los diferentes dominios transmembrana, giros intracelulares y extracelulares del MC1R al MC4R buscando una pérdida de la función. Una vez identificados los segmentos importantes que confieren la funcionalidad al receptor nos planteamos dotar al MC1R de la capacidad de respuesta a la ACTH tras interacción con la MRAP2a, haciendo el ejercicio contrario, es decir traspasando dominios desde el MC4R al MC1R y por tanto buscando una ganancia de función.

La segunda parte de los objetivos hace hincapié sobre la implicación del sistema de melanocortinas en los ritmos circadianos de los peces. Existe muy poca bibliografía que relaciona a ambos (ver sección 2 de la introducción) pero, nuestros resultados preliminares nos hicieron sospechar de la implicación del sistema en el funcionamiento del reloj circadiano. Por un lado, los resultados que comparaban el transcriptoma del cerebro de peces salvajes (+/+) con peces ASIP1

(*asip1/asip1*) mostraban la existencia de expresión diferencial en genes relacionados con el reloj circadiano (Guillot et al., 2016) pero además también se detectó una posible diferencia en el funcionamiento del reloj central entre machos y hembras. El primer objetivo de esta segunda parte fue, por tanto, demostrar la existencia de un patrón de actividad locomotora dependiente del sexo y evaluar el efecto de los esteroides sexuales sobre el patrón de actividad y la expresión de genes reloj. El segundo objetivo fue estudiar el efecto del sistema de melanocortinas sobre los ritmos de actividad locomotora utilizando una cepa de peces transgénicos que sobre-expresan ASIP1. Esta proteína actúa como agonista inverso de diversos MCRs (Guillot et al., 2016, ver también sección 1.1. de la introducción) y por lo tanto su sobreexpresión resulta en una inhibición de la actividad constitutiva del receptor y por tanto en una depresión de la actividad central melanocortinérgica.

An underwater photograph showing a dense field of bubbles rising from the surface. Light rays penetrate from the top, creating a shimmering effect on the water. The overall color palette is a mix of deep blues and lighter, sunlit blues.

3. Materiales y Métodos

3.1. Manejo de animales de experimentación

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en concordancia con los principios publicados por la directiva europea 86/609/CEE, concerniente a la protección de animales experimentales. Los procedimientos fueron aprobados por el comité interno del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el comité de ética del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) (Número de autorización experimental 021/2013).

Los animales se manipularon siempre bajo anestesia realizada por inmersión en metasulfonato de tricaina (MS-222, Sigma) en dosis de 0.01 mg/mL. Cuando fue necesario, el sacrificio se realizó mediante técnicas indoloras incluyendo la sobredosis de anestésico o la exposición prolongada a bajas temperaturas.

Los peces cebra (*Danio rerio*) de la cepa Tubingen (*Tu*) procedieron siempre de las instalaciones experimentales propias y fueron generados por entrecruzamiento de parentales bien en el laboratorio del IATS o en el laboratorio del Dr. Foulkes (Instituto de Toxicología y Genética del Instituto Tecnológico de Karlsruhe, KIT-ITG, Alemania), respectivamente. Los animales transgénicos ASIP1 (*asip1/asip1*, Ceinos et al., 2015) fueron también generados en las instalaciones del IATS a partir de entrecruzamiento entre animales heterocigotos (*asip1/+*) que generaron tres tipos de poblaciones: 25% *asip1/asip1*, 50% *asip1/+* y 25% *+/+*. Tras el genotipado mediante técnicas de PCR con cebadores específicos (Guillot et al., 2016) se generaron dos subpoblaciones, *asip1/asip1* y *+/+* con el mismo acervo genético para fines comparativos.

Para la reproducción de las diferentes cepas se colocaron los parentales en tanques paridera separados por un panel transparente que permite el intercambio de agua entre las dos secciones. Las parideras se mantuvieron en oscuridad durante la tarde y la noche consecutiva. Al día siguiente, las parideras se expusieron a la luz natural, con el fin de sincronizar las puestas de los parentales, momento en el que se retiró la barrera física que separa a ambos parentales. Tras 20-30 minutos se recogieron los huevos fecundados y se colocaron en incubadores con temperatura constante a 28 °C hasta la eclosión de los embriones (48-72h post-puesta). A los 5 días, las larvas se introdujeron en el sistema de re-

circularización, aunque el circuito de renovación de agua se mantuvo cerrado durante la primera semana.

El mantenimiento de los individuos se realizó en un sistema cerrado con recirculación de agua. Los tanques, en los cuales se mantuvieron los ejemplares, variaron en función del tamaño y el objetivo del experimento. Los estadios larvarios y alevines se criaron en acuarios de 6 litros (L), mientras que los adultos se estabularon en acuarios de 20 o 26 L, excepto durante la fase reproductora, en la cual se colocaron individualmente en tanques de 1,5 L durante, al menos, 1 semana antes del apareamiento. El agua del sistema recirculó de forma constante a través de filtros mecánicos y biológicos, siendo renovada parcialmente cada dos días. Los parámetros fisicoquímicos como temperatura (26-28 °C), pH (7-8) y conductividad (entre 300-500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) fueron monitorizados diariamente y corregidos cuando se situaron fuera de los límites establecidos. El fotoperiodo [14 horas de luz, (7:00 h-21:00h) y 10 horas de oscuridad (21:00-7:00h)] se controló mediante un temporizador. La alimentación varió en función de la edad o del experimento realizado. Durante las fases tempranas del desarrollo, la alimentación se inició 6 días después de la puesta, en función del siguiente protocolo: 5 días pienso comercial para larvas (Mikrovit Hi-Protein, Tropical), 5 días pienso comercial para larvas más nauplios de artemia vivos y 5 días con nauplios y pienso comercial en escamas triturado para adultos (Vipan, Sera), finalmente un mes con pienso comercial de adultos triturado. Tras este periodo, los animales adultos se alimentaron de forma rutinaria con una mezcla de piensos en escama para adultos a las 8.00 am (Vipan, Sera-/Gala-Premium, JBL) y nauplios de artemia vivos recién eclosionados (14.00 y 16.30).

3.2. Reactivos

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Merck). Todos los péptidos fueron comprados a Bachem.

3.3. Conservación evolutiva de la respuesta de la sensibilidad del MC4R a la ACTH mediada por MRAP2

La conservación evolutiva de la respuesta del MC4R a ACTH mediada por la MRAP2 se evaluó mediante experimentos *in vitro* utilizando la línea celular HEK-293 sobre la que se transfectaron las diversas construcciones que portan los genes de interés incluidos en vectores de expresión eucariota. La línea celular HEK-293 proviene de células embrionarias de riñón humano. Estas células semi-adherentes se utilizan asiduamente para la síntesis de proteínas recombinantes, especialmente en experimentos farmacológicos, dada su facilidad de cultivo y transfección.

3.3.1. Construcciones plasmídicas

Las construcciones plasmídicas en pcDNA3.1 de los genes de pez cebra utilizadas en los experimentos (zfMC4R, zfMRAP2a y zfMRAP2b) se desarrollaron previamente en el laboratorio (Agulleiro et al., 2010, 2013). Los plásmidos que contienen el MC4R (Clone ID: OHu24975D; ORF: NM_005912.2) y la MRAP2 (Clone ID: OHu17223D; ORF: (NM_138409.2) de humanos (h), también en pcDNA3.1, se obtuvieron de GeneScript.

3.3.2. Cultivo celular

Las células HEK-293 se cultivaron en medio DMEM (del inglés Dulbecco's modified Eagle's médium, Gibco) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y un 1% de una mezcla de penicilina /estreptomicina (Gibco) para evitar la contaminación microbiana. Este medio de cultivo con todos sus compuestos añadidos se ha denominado "medio completo" en el presente trabajo. Los cultivos celulares se mantuvieron siempre a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Para medir la activación del receptor tras estimulación con diferentes agonistas utilizamos el denominado "Clon Q", una línea de células HEK-293 generada en el laboratorio que expresa de forma constitutiva el gen de la β -galactosidasa (GAL) bajo el control del promotor del péptido intestinal

vasoactivo (VIP), localizado a continuación de varias repeticiones en tándem del elemento de respuesta al AMPc (CRE). Este sistema permite cuantificar indirectamente los incrementos intracelulares de AMPc en función de la activación del gen GAL mediada por la proteína CREB, proteína de unión a los sitios CRE. Este clon fue generado por co-transfección (50:1) del plásmido pCRE/ β -galactosidasa (suministrado por Dr. R. Cone, Centro Médico de la Universidad de Vanderbilt) y el plásmido tgCMV/HyTJ, el cual presenta un gen de resistencia a la higromicina, para su selección (Sánchez et al., 2009).

3.3.3. Diseño y dinámica experimental

Acorde al diseño experimental, hMC4R o zfMC4R se transfectaron solos o junto con zfMRAP2a, zfMRAP2b o hMRAP2, respectivamente y se estimularon con concentraciones decrecientes (10^{-6} a 10^{-12}) de ACTH₍₁₋₂₄₎ o α -MSH humanos. El primer día experimental se sembraron células clon Q en placas de cultivo 6 pocillos (Corning) provenientes de una placa Petri que presentaba una confluencia celular entre el 75 y el 95%. Las placas de 6 pocillos se trataron previamente con Poli-L-lisina a una concentración de 0.02 mg/ml en DMEM durante 90 minutos a temperatura ambiente con el fin de aumentar la adherencia celular. Tras 24 horas aproximadamente a 37 °C y 70% de confluencia, las células se transfectaron con las construcciones pertinentes utilizando con lipofectamina LTX (Invitrogen) y siguiendo las indicaciones del proveedor. La cantidad de ADN fue siempre constante, 1 μ g, utilizando 100 ng de cada construcción y ajustando la cantidad de ADN mediante adición del plásmido pBlue-Script SK (+) [pBSSK(+)]. Para poder estandarizar la eficiencia de la transfección se co-transfectó una construcción portadora del gen de la luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo citomegalovirus (pTATA-LUC+, Altschmied y Duschl, 1997). Tras 24 horas desde la transfección, las células se pasaron a placas de 96 pocillos, tratadas también con Poli-L-lisina, utilizando tripsina para despegarlas en caso de ser necesario. Tras el conteo en cámara "Neubauer" se sembró el número adecuado de células (20.000-30.000 por pocillo) para su posterior estimulación con los diferentes agonistas. Tras 24 horas, las células transfectadas se estimularon por cuadruplicado con

concentraciones decrecientes de agonistas. Además, se utilizó la estimulación con 8-bromo-adenosin-3',5'-monofosfato cíclico 10^{-2} M (8-Br-cAMP) como control positivo con el fin de evaluar el estado funcional de las células. Tras 6 horas de estimulación, las células se lisaron con el tampón de lisis (250 mM de Tris-HCl, pH 8 y 0,1% de Triton X-100) y los lisados se almacenaron a -80 °C hasta la determinación de la actividad galactosidasa como se describe en Sánchez y colaboradores (2009). Brevemente, se retiraron 10 μ l de cada pocillo para la determinación del nivel de proteínas, una medida que después se utilizó para estandarizar la actividad de cada estimulación. A los restantes 40 μ l se añadieron otros 40 μ l de albúmina de suero bovino (BSA) 0.5% en tampón fosfato salino y 150 μ l de tampón sustrato [1mM MgCl₂, 10 mM KCl, 5 mM β -mercaptoetanol y 200 mg/ml de orto-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG)]. La placa se incubó a 37 °C durante 5 h y se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placas (Tecan). Las medidas fueron normalizadas por el contenido de proteína que fue determinado mediante el kit de análisis BCA (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad luciferasa de 4 replicados fue determinada mediante el kit de ensayo de la luciferasa (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células se lisaron con tampón de lisis pasivo (Promega) y fueron congeladas a -80 °C, los restos celulares se separaron por centrifugación y la luz generada estimada mediante luminometría (Junior EG&G, Berthold Technologies) y se expresaron como unidades relativas de luz (RLU).

3.3.4. Análisis "in silico" de la expresión tisular del hMC4R y hMRAP2

Con el objetivo de evaluar la posible implicación fisiológica de la interacción entre MC4R/MRAP2 se analizó la expresión tisular de ambos genes junto con la del hMC2R obtenida mediante secuenciación masiva de ARN (RNAseq) a través del portal GTEx (GTEx Analysis Release V7, dbGaP Accession phs000424.v7.p2, <https://www.gtexportal.org/home/>). La expresión se representa como transcritos por millón (TPM). Los patrones de expresión de zfMC4R, zfMC2R, zfMRAP2a y zfMRAP2b fueron publicados previamente en nuestro laboratorio (Agulleiro et al., 2010; Agulleiro et al., 2013).

3.3.5. Alineamiento de secuencias de MRAP

Con el fin de analizar la similitud entre las proteínas de MRAP2 se alinearon las secuencias gracias al uso del software libre Clustall W (<http://www.clustal.org/>) utilizando el algoritmo “Neighborg Joining”.

3.3.6. Expresión de resultados y análisis estadísticos

Los resultados de activación del receptor se ajustaron a curvas logísticas usando el software GraphPad Prism. Para la representación gráfica se seleccionaron experimentos representativos de cada gen o combinación génica. Las actividades basales se compararon mediante ANOVA de una vía tras estandarización por la eficiencia de transfección (niveles de luciferasa) y la condición celular (niveles tras estimulación con 8-Br-cAMP). Se consideraron diferencias significativas para $p < 0.05$ tras análisis de comparaciones múltiples mediante el test de Tukey.

3.4. Requerimientos estructurales de la interacción MRAP2-MC4R frente la respuesta a ACTH

Nuestros experimentos previos demostraron que el receptor zfMC1R no responde a ACTH, en presencia o ausencia de zfMRAP2a (Cortés et al., 2014), mientras que el zfMC4R si lo hace pero únicamente en presencia de la proteína accesoria zfMRAP2a. Para estudiar los dominios que, potencialmente, están implicados en dicha interacción diseñamos quimeras de pérdida de función en las cuales un segmento del zfMC1R substituye a su homólogo posicional en el zfMC4R. Una vez identificados los dominios potenciales diseñamos quimeras con ganancia de función en las que un dominio del zfMC4R substituye a su homólogo posicional en zfMC1R.

3.4.1. Diseño de quimeras con pérdida de función

Previo al diseño se realizó un alineamiento, utilizando los softwares libres “Gene Runner” (<http://www.generunner.net/>) y Clustall W

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), de ambas secuencias (zfMC1R y zfMC4R) junto con sus ortólogos humanos (hMC4R y hMC1R) para analizar la homología entre los siete dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a la proteína G , además de los segmentos intra (ICL) - y extra-celulares (ECL) situados entre dos dominios transmembrana (Figura 18). Las secuencias nucleicas y proteicas de los receptores fueron obtenidas a partir de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). El estudio de los perfiles de hidrofobicidad de ambas proteínas obtenidos con el software libre UGene (<http://ugene.net/>) ayudó a delimitar los diferentes dominios transmembranales, los cuales fueron corroborados con estudios previos en otras especies (Haskell-Luevano et al., 1996; Srinivansan et al., 2004).

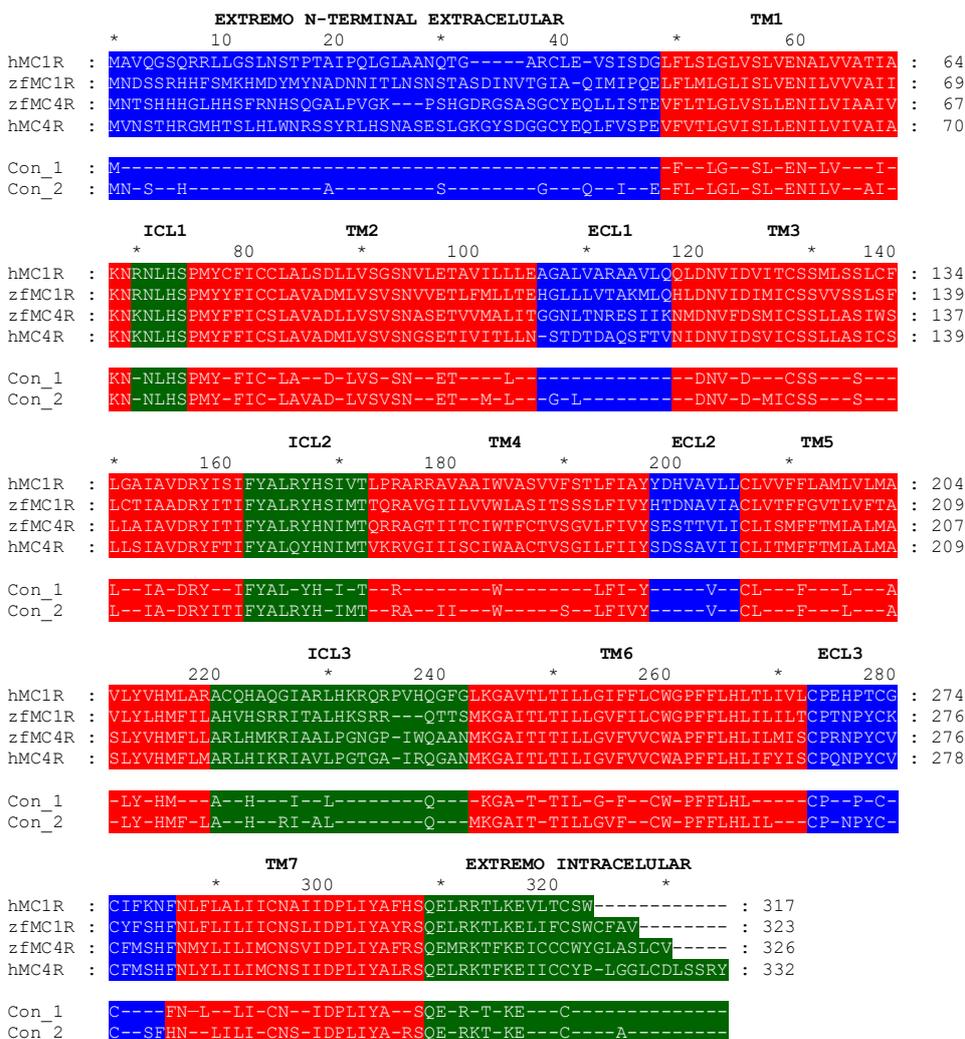


Figura 18. Alineamiento de secuencias de MC1R y MC4R de humanos (h) y pez cebra (zf) para el diseño que quimeras. El alineamiento se realizó con el software “generunner” y se introdujeron guiones para maximizar la tasa de alineamiento entre las secuencias. En la parte inferior aparecen las secuencias consenso de todos los receptores alineados (Con_1) o solamente de aquellos de pez cebra (Con_2). La posición de los dominios transmembranales (TM, rojo), los “loops” intracelulares (ICL, verde) y extracelulares (ECL, azul) queda remarcada en la figura.

El esquema de la Figura 19 recoge la estructura de las quimeras diseñadas para los experimentos farmacológicos. La quimera 1 incorpora el extremo amino terminal del zfMC1R en la estructura del zfMC4R, la quimera 2 incorpora el primer dominio transmembrana del zfMC1R sobre la estructura del zfMC4R y así sucesivamente hasta la quimera 15 donde la secuencia de zfMC4R únicamente incorpora el extremo carboxilo terminal del zfMC1R.

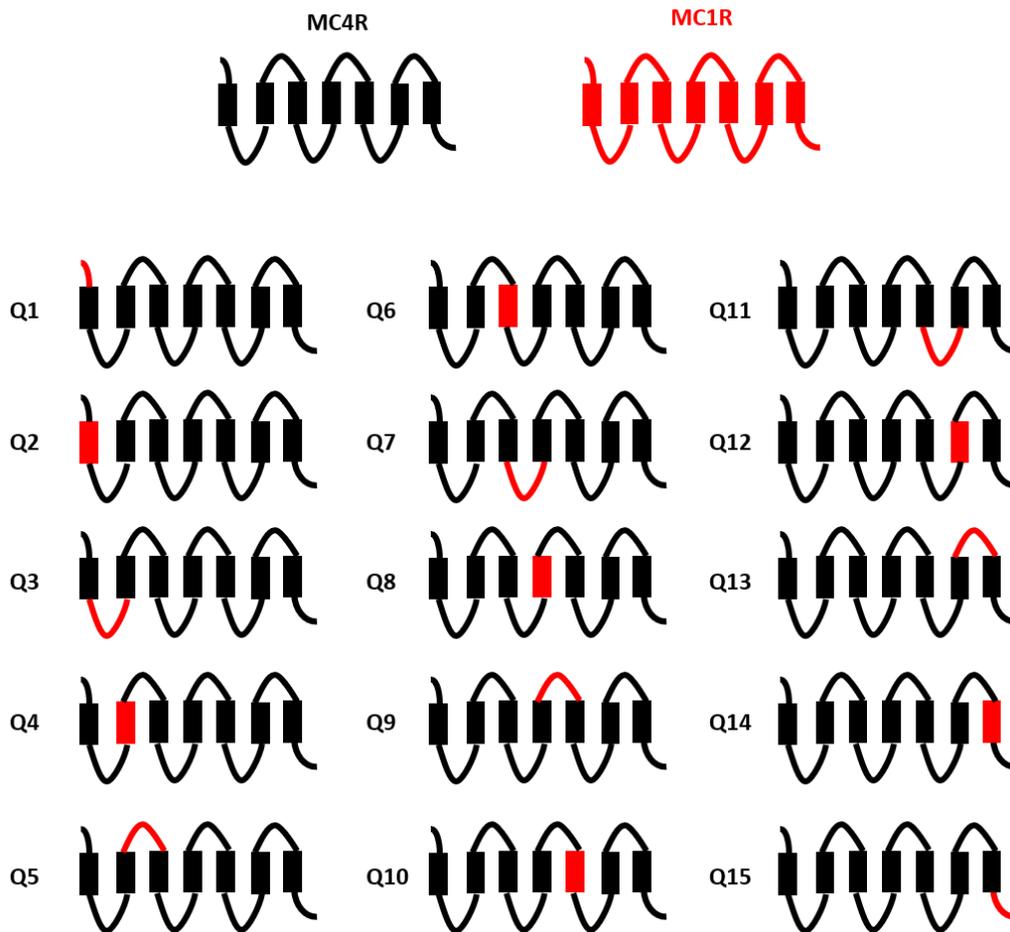


Figura 19. Esquema de las quimeras con pérdida de función utilizadas en los experimentos farmacológicos. En rojo aparecen los fragmentos sustituidos en el zfMC4R originarios del zfMC1R.

Una vez diseñadas las secuencias quiméricas de ADN fueron químicamente sintetizadas e incorporadas en el vector de expresión pcDNA3.1 portando el epítipo c-Myc en el extremo N-terminal (Genescript) (Figura 20). La presencia del epítipo permitirá posteriormente la localización celular de las quimeras tras expresión en células HEK293.

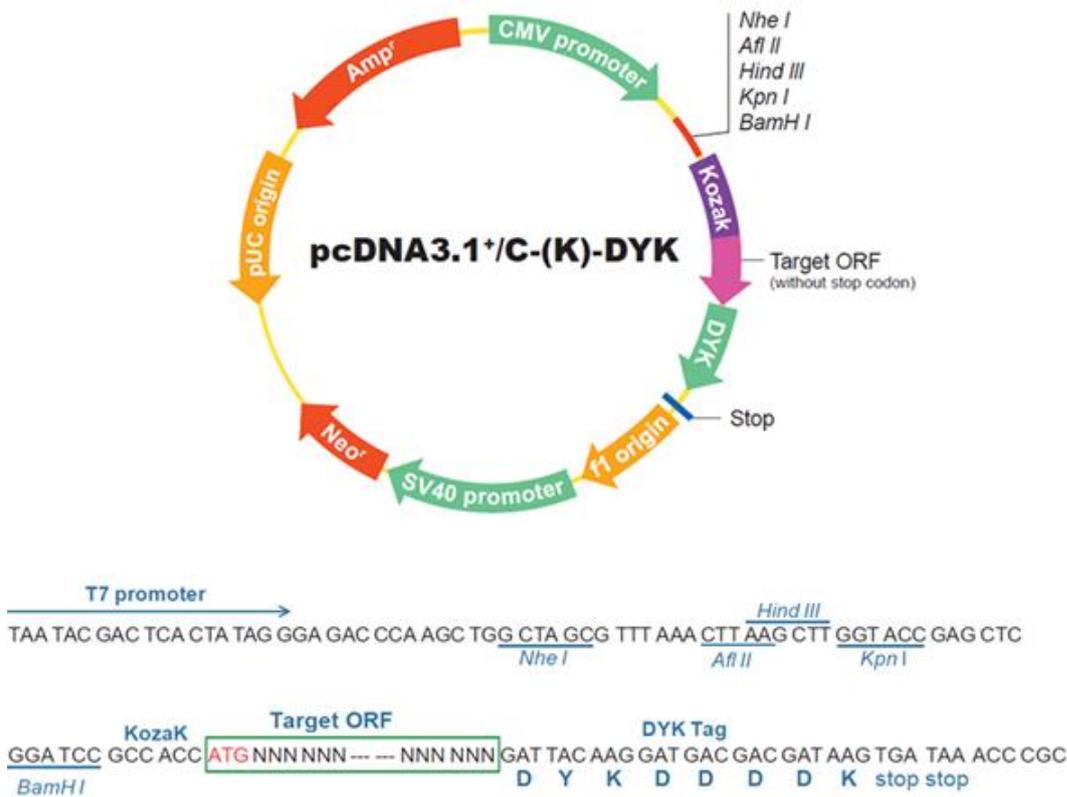


Figura 20. Esquema del vector pcDNA3.1 utilizado para la construcción quimérica de receptores zfMC4R/zfMC1R. La figura se obtuvo de la página de GeneScript (https://www.genscript.com/quick_order/orf). AMP^r gen de resistencia a la ampicilina, “pUC origin” origen de replicación pUC, “SV40 promoter” promotor SV40, “f1 origin” origen de replicación bacteriano, “Stop” codón de parada, DYK epítipo para detección por anticuerpo, Neo^r gen de resistencia a la neomicina, “CMV promoter” promotor génico de citomegalovirus, Kozak secuencia Kozak para la optimización de la expresión génica.

3.4.2. Diseño de quimeras con ganancia de función

Una vez localizados los dominios potenciales responsables de la respuesta a la ACTH del MC4R en presencia de zfMRAP2a intentamos la estrategia opuesta, es decir crear nuevas quimeras basadas en el zfMC1R incorporando aquellos dominios del zfMC4R que potencialmente pudieran conferirle la habilidad de responder a la ACTH en presencia de MRAP2a. La figura 21 recoge las quimeras seleccionadas para posterior análisis farmacológico.



Figura 21. Esquema de las quimeras con ganancia de función utilizadas en los experimentos farmacológicos. En negro aparecen los fragmentos sustituidos en el zfMC1R originarios del zfMC4R.

3.4.3. Amplificación de las construcciones

Los receptores quiméricos proporcionados por Genscript fueron tratados de la siguiente manera: se centrifugaron a 4 °C, 6000g durante 1 minuto y se diluyeron en agua ultra-pura. Posteriormente se realizó una dilución 1/100 de la que se utilizaron 10 µL para realizar la transformación de 100 µl bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5α. Las células competentes se hicieron temporalmente permeables mediante técnicas estandarizadas (Sambrook y Russell, 2001). Tras un choque térmico a 42 °C durante 90 segundos las bacterias se crecieron en 800 µl medio de cultivo Luria Bertani (LB) durante 90 minutos a

37 °C con ligera agitación. Posteriormente una alícuota del cultivo se sembró en placas Petri con LB agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml), para seleccionar las bacterias que hayan incorporado el vector plasmídico, el cual confiere resistencia al antibiótico (ver Figura 20). La obtención del DNA plasmídico, válido para la transfección celular, se realizó a partir de 100 ml de cultivo bacteriano proveniente de un cultivo a 37 °C durante toda la noche (O/N) mediante el uso de kits ya estandarizados (Qiagen). Su cuantificación espectrofotométrica (absorbancia a 260 nm) se realizó mediante el uso del Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). La presencia de fragmento en la construcción se verificó mediante digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*, siguiendo las especificaciones del proveedor. Los fragmentos generados en la digestión se separaron y visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa con tampón TAE [Tris-Acetato-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)].

3.4.4. Desarrollo de experimentos farmacológicos

Los experimentos farmacológicos siguieron las pautas explicadas anteriormente en las secciones 3.3.2 y 3.3.3. Básicamente las construcciones de pérdida o ganancia de función fueron transfectadas en células HEK293-ClonQ de forma transitoria bien solas o conjuntamente con la construcción portadora del gen zfMRAP2a. Tras 24 horas las células transfectadas se sembraron en placas de 96 pocillos y se estimularon con concentraciones decrecientes (10^{-6} - 10^{-12} M] de α MSH o ACTH (1-24) humano. Posteriormente, se determinó la actividad galactosidasa, como medida indirecta de los niveles de AMPc, tras la activación de las diferentes quimeras por los agonistas experimentales. Además, se estimó la actividad luciferasa para evaluar la eficiencia de transfección y poder establecer comparaciones entre los diversos experimentos farmacológicos. Las estimulaciones se realizaron por cuadruplicado y se expresaron como porcentaje de los niveles basales (medio sin agonistas) de su correspondiente control (quimera o quimera+MRAP2a). Los resultados se ajustaron a curvas logísticas para el cálculo de los ED50s.

3.4.5. Presencia de receptores quiméricos en la membrana plasmática

La presencia de los diferentes receptores quiméricos en la membrana celular fue evidenciada mediante técnicas inmunocitoquímicas aprovechando la presencia de un epítipo c-Myc en la región N-terminal de las proteínas recombinantes. Las células HEK293-clonQ se cultivaron en monocapa sobre cubreobjetos de 12 mm en placas de cultivo de 24 pocillos. Previamente, estos cubreobjetos fueron sumergidos en etanol 100% durante 30 minutos para su correcta esterilización y secados a temperatura ambiente. Posteriormente, se esterilizaron por exposición a luz ultravioleta durante 15 minutos y se colocaron con pinzas dentro de los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos. Tras lavado con agua estéril y secado dentro de la cabina de flujo laminar, los cubres fueron tratados con poli-L-lisina como anteriormente se ha descrito (sección 3.3.3) en el interior del pocillo. Una vez preparado el soporte físico de las células se introdujo el volumen de medio y células suficiente para obtener una confluencia del 70% de cultivo al día siguiente, momento en el que se transfectaron los receptores quiméricos correspondientes, siguiendo los métodos descritos (Sección 3.3.3). Tras incubación durante la noche las células se fijaron con paraformaldehído al 3.75% en DPBS durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente el fijador se eliminó mediante tres lavados consecutivos con DPBS durante 5 minutos y se incubaron las células con aglutinina de germen de trigo acoplada al fluorocromo Alexa Fluor 633 en dilución 1/1000. La aglutinina de germen de trigo marca las membranas celulares. Tras 8 minutos a temperatura ambiente se eliminó la solución de marcaje mediante dos lavados de 5 minutos con DPBS y se procedió, subsecuentemente, a la permeabilización de las membranas celulares mediante incubación con 0.2% Triton X-100 durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 5 minutos con DPBS e incubación con 5% suero fetal bovino durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo, las células se incubaron con anticuerpo anti-c-Myc 1:2500 (Sigma) en 1% de FBS en tampón fosfato salino (PBS) y 0.1% Tween 20 durante la noche a 4 °C en una cámara húmeda. Tras 24 horas, las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con PBS y se incubaron con el anticuerpo

secundario de cabra construido frente a las anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 en dilución 1/1000 en 1% FBS durante 1 hora en oscuridad. Tras tres lavados consecutivos con PBS durante 5 minutos las células se incubaron con el fluorocromo Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido a 1:2000 en PBS durante 7 minutos para teñir el DNA y consecuentemente los núcleos celulares. Tras varios lavados con agua estéril y montaje, las células fueron observadas en un microscopio confocal invertido Leica TCS SP8 disponible a través de los servicios de la unidad de Ciencias de la Vida en la Universidad Jaume I de Castellón.

3.5. Efecto del sexo y los esteroides sexuales sobre la actividad circadiana locomotora del pez cebra

3.5.1. Diseño experimental

El experimento constó de 4 grupos experimentales, dos grupos de machos y dos de hembras. Un grupo de cada sexo sirvió como grupo control (control machos y control hembras), mientras que los dos grupos restantes fueron tratados hormonalmente con la hormona característica del sexo opuesto: es decir las hembras con 11-ceto-androstenediona (11-CA) y los machos con 17- β estradiol. Cada grupo estuvo formado por 16 individuos ($n=16$), sexados visualmente en función de su color y forma, de un año de edad con aproximadamente 3 cm de longitud.

Los experimentos fueron llevados a cabo en un cuarto aislado para evitar las interferencias lumínicas y sonoras. Los animales se distribuyeron en tanques de 27 litros provistos de sistemas de filtración y re-circularización de agua, así como sondas térmicas para mantener la temperatura constante a 26 °C bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz (encendido a las 9.00 am) y 12 de oscuridad (apagado a las 21.00h).

3.5.2. Preparación del alimento y alimentación

En esta ocasión se utilizó pienso comercial granulado (Supervit Tropical). La cantidad suficiente de 17- β estradiol (Sigma) o 11-CA para obtener una concentración de 50 $\mu\text{g/g}$ de pienso fue disuelta en etanol 100% (Panreac) y pulverizada sobre la cantidad necesaria de pienso. El pienso control fue pulverizado con el vehículo (etanol 100 %). Los piensos hormonados se secaron a temperatura ambiente durante toda la noche y se incorporaron a comederos automáticos (Eheim) situados en la tapa de los acuarios que suministraron el alimento a las 10.00 am, una hora tras el encendido de las luces (Figura 22) .

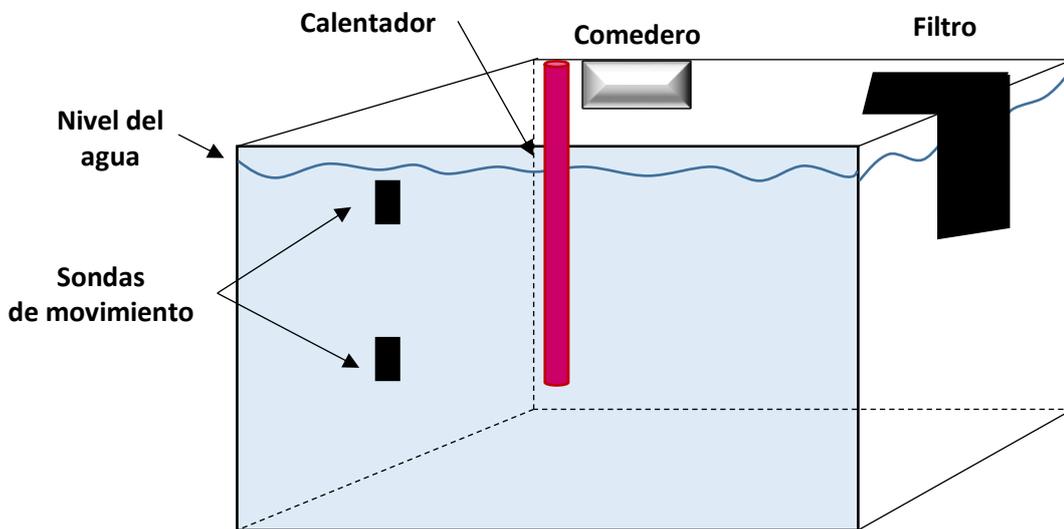


Figura 22. Representación gráfica de los tanques experimentales utilizados en los experimentos de actividad.

3.5.3. Registro de la actividad

La actividad de los peces fue detectada mediante sensores infrarrojos (E3ZD822 Omron, representados como sensores de movimiento en la figura 22) adecuados en sus características a la detección del tamaño de los peces (3 cm aproximadamente). Los sensores se colocaron a 4 centímetros del fondo y la superficie del tanque, respectivamente y se calibraron para detectar el movimiento a 10 cm de su posición. Cada sonda fue conectada a un software de ordenador con el fin de recoger los datos de actividad locomotora (LA) de cada

tanque. Estos datos se integraron cada 5 minutos durante 33 días consecutivos. Al final del periodo experimental, los datos fueron capturados en formato csv y transformados a un archivo de texto para la obtención de los actogramas correspondientes utilizando el software “El Temps” (Prof Diez- Noguera, Facultad de Farmacia y Cc de la Alimentación, Universidad of Barcelona).

3.5.4. Análisis de esteroides plasmáticos

Con el fin de evaluar la captación de esteroides orales se realizó un experimento piloto para evaluar la presencia de esteroides en plasma tras la ingesta de piensos hormonados. Para ello dos grupos de peces control de diferentes sexos fueron alimentados con pienso granulado control mientras que otros dos grupos separados de machos y hembras se alimentaron manualmente con piensos que contenían 17- β estradiol o 11-CA, respectivamente en dosis de 50 $\mu\text{g/g}$ pienso. El tamaño poblacional de cada grupo fue de 5 individuos mientras que el protocolo de alimentación se mantuvo durante 10 días consecutivos.

3.5.4.1. Extracción de plasma sanguíneo en peces cebra

Tras anestesia de los peces la aleta caudal fue amputada con unas tijeras de punta fina previamente heparinizadas. El pez fue colocado con el pedúnculo caudal enfocando hacia la parte inferior de un tubo “eppendorf” de 1.5 ml previamente agujereado en el fondo gracias a una aguja caliente. Este eppendorf perforado que contiene el espécimen amputado, se introdujo, a su vez, en otro eppendorf de mayor volumen (5ml) que contenía 5 μl de heparina y dicho ensamblaje se centrifugó durante 5 minutos a 40g y 11 °C. Seguidamente, con el pez todavía anestesiado, se practicó un segundo corte para eliminar el coagulo formado y se centrifugó en iguales condiciones. Tras la segunda centrifugación, el pez fue decapitado y la sangre obtenida se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm y 4 °C para la separación del plasma sanguíneo que se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

3.5.4.2. Determinación de los niveles de 17- β estradiol y 11-cetotestosterona (11-CT) mediante ELISA

La determinación de los niveles de 17- β estradiol se realizó mediante un ensayo comercial siguiendo las recomendaciones del proveedor (Genosys). Este ensayo está basado en la competencia entre la hormona presente en la muestra y aquella conjugada a un enzima (trazador) presente en el ensayo por un número de sitios de unión limitados al anticuerpo anti 17- β estradiol adherido a la fase sólida del ensayo, (placa de 96 pocillos) (Figura 23). Por tanto, se establece una correlación inversa entre la cantidad de hormona en la muestra y el desarrollo de color enzimático obtenido por adición del sustrato indicado. El desarrollo de color se evalúa mediante la medición de absorbancia en un lector de placas (Tecan). Tras la transformación "logit" de los datos se evalúan por interpolación los niveles de antígeno/hormona en la muestra (Cerdá-Reverter et al., 1996).

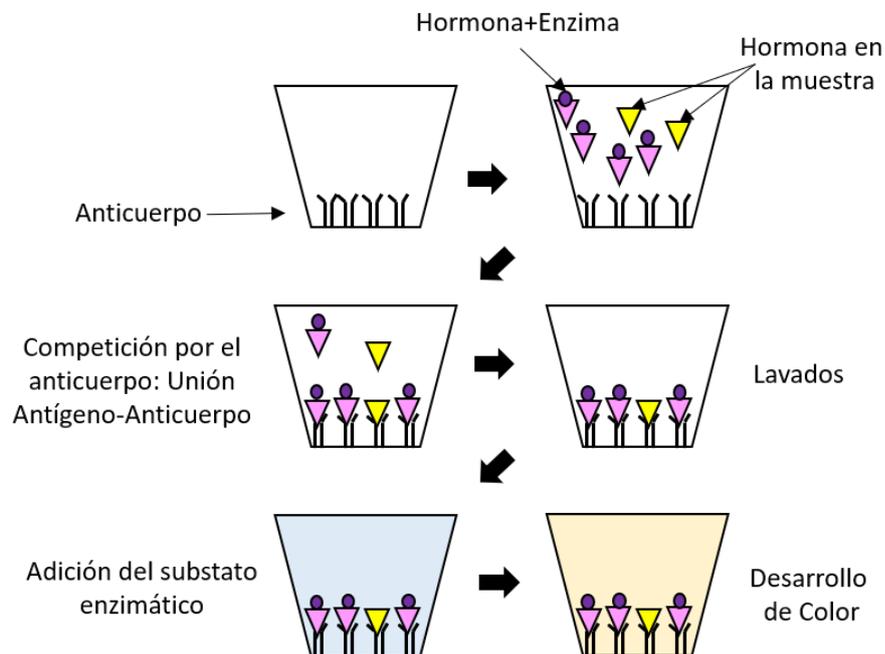


Figura 23. Esquema del desarrollo del Elisa de 17- β estradiol. El anticuerpo anti 17- β estradiol está adherido a las paredes el pocillo. En un paso posterior se añade una cantidad constante de hormona conjugada con un enzima cromogénico y la muestra portadora de 17- β estradiol. Ambas hormonas, nativa (muestra) y conjugada, compiten por unión al anticuerpo en la fase sólida del ensayo y tras lavados para eliminar las moléculas de antígeno no unidas se añade el sustrato de la reacción enzimática. Tras una corta incubación se desarrolla el color que se mide por espectrofotometría a la longitud de onda indicada. De esta forma se establece una relación inversamente proporcional entre la absorbancia y la presencia de antígeno/hormona en la muestra.

La determinación de los niveles de 11-cetotestosterona se realizó según Rodríguez et al., (2005). Este ensayo es sensiblemente diferente ya que a la fase sólida se adhiere un anticuerpo monoclonal que reconoce las inmunoglobulinas de conejo. Sobre el pocillo se incorpora conjuntamente el anticuerpo anti-cetotestosterona en la dilución óptima, el trazador (11-cetotestosterona conjugada con el enzima cromogénico) y la muestra o estándar. Tras una incubación a 4 °C durante la noche se procede a los lavados y revelado de la placa como en el caso anterior.

3.5.5. Efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión de los genes del reloj circadiano

Al final del tratamiento, 12 peces de cada grupo fueron sacrificados mediante una rápida inmersión en agua helada a diferentes horas del día (a 3, 9, 15 y 21 horas después del encendido de las luces) (Zeitgeber (ZT) 3, 9, 15 y 21 corresponden a las 12:00 h, 18:00h, 00:00 h y 6:00h, respectivamente). Varios tejidos incluyendo el cerebro, el hígado y las gónadas fueron diseccionados y las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido para los subsecuentes análisis de expresión génica. La disección de los diferentes tejidos se realizó accediendo por el orificio anal para abrir la cavidad abdominal y seccionar el músculo según se ilustra en la figura 24.

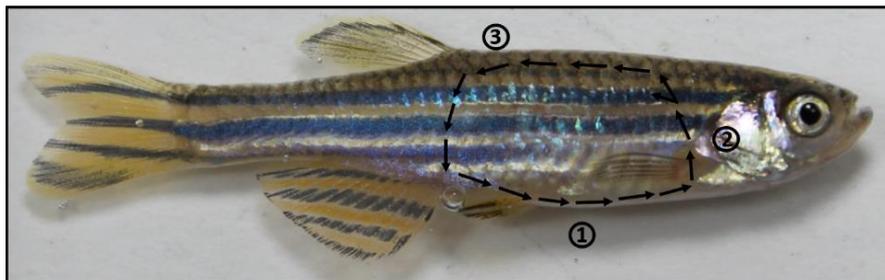


Figura 24. Esquema del sistema de disección del pez cebra para obtener los órganos abdominales diana del experimento (hígado y gónadas).

Para la disección del cerebro se seccionó la parte dorsal del cráneo exponiendo toda la longitud del cerebro, que se alzó desde la medula espinal, seccionando cuidadosamente la entrada de los pares nerviosos y el quiasma óptico (Figura 25).

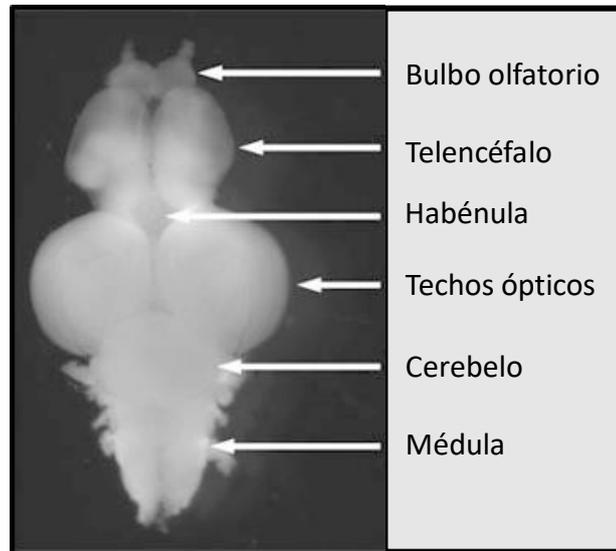


Figura 25. Vista dorsal del cerebro de pez cebra indicando la posición de alguna de sus estructuras.

3.5.5.1. Aislamiento de ARN total, síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (q)

Los niveles de expresión se determinaron mediante PCR cuantitativo en tiempo real utilizando el PCR CFX384 (Biorad). Brevemente, el ARN total se extrajo con Trizol siguiendo las indicaciones del proveedor. Las muestras se homogenizaron en 250 o 500 μ l de Trizol, dependiendo del tejido, utilizando una jeringa para su disgregación mecánica, tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió una quinta parte de cloroformo y tras fuerte agitación, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12000g. Posteriormente los ácidos nucleicos de la muestra se precipitaron por adición de 0.7 volúmenes de isopropanol. Las muestras se trataron con DNAsa I (Promega), antes de la síntesis de cDNA en presencia de RNAsin (Promega). Tras precipitación con etanol 100% y lavado en etanol al 75% frío, para inactivación de la DNAsa I, las

muestras se re-suspendieron en 20 μl de agua estéril y se cuantificaron mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000). Un microgramo de ARN total fue primado con una mezcla de oligo-dT (Isogen) (2.5 μM) y cebadores aleatorios de 6 pares de bases (7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para su transcripción reversa mediante “SuperScript III reverse transcriptase” (0.05 unidades/ μl) (Invitrogen) en presencia de RNAsin (2 unidades/ μl). El ADN complementario (ADNc) se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Previamente a la inclusión en PCR cuantitativo su calidad se testó mediante amplificación por PCR convencional de la β -actina (ver secuencia de los cebadores en tabla 1), un gen de expresión constitutiva en los todos los tejidos. Para el PCR convencional se utilizó 1 mL de ADNc, 2.5 mM dNTP (mezcla de nucleótidos), 1.5 mM MgCl_2 , 2.5 μM de cada cebador y media unidad de Taq ADN polimerasa (Invitrogen).

Para el PCRq se utilizaron cebadores y condiciones específicas validados en el laboratorio del Dr. Foulkes (Mracek et al., 2012) (Ver tabla 1). De forma general, se utilizaron 4 μl de ADNc, 10 pM cebadores y 10 μl de SYBER Green PCR Master Mix (2X) (Thermo-Fisher) sobre un volumen final de 25 μl sometiendo la reacción a 40 ciclos de amplificación con el siguiente patrón: 10 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ iniciales, 40 ciclos de 15 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 30 segundos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras la reacción, la especificidad de la amplificación se corroboró mediante una curva de disociación incrementando $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ cada 5 segundos desde $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. La expresión se normalizó frente al gen de referencia β -actina y los niveles de expresión se calcularon a través del método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak et al., 2001). Donde Ct o ciclo-umbral es el ciclo de amplificación a partir del cual la fluorescencia se sitúa por encima del ruido de fondo estipulado por el sistema o el manipulador. ΔCt representa la diferencia entre el valor Ct del gen de estudio y el gen de normalización y $\Delta\Delta\text{Ct}$ representa la diferencia entre el ΔCt de nuestro grupo experimental y el grupo control o de referencia (Livak et al., 2001). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

TABLA 1. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de genes reloj.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
per1b_forward	GAGAGTTCATTCTGGATACGA
per1b_forward	GAATCTGGGGGAGATTCACA
per1b_reverse	GGGGTGTGACTGGTGGTAAA
per1b_revese	GACAGAGATGCCCTGAAAGC
Clock1_forward	CTGAGATCTCCGCAGACAAGT
Clock1_forward	CTGGAGGATCAGCTGGGTAG
Clock1_reverse	TCGCTCTAGGGCCTCCTT
Clock1_reverse	CACACACAGGCACAGACACA
Bmal1_forward	TAGAGCGCTGTTTGCTGATG
Bmal1_reverse	GACCCGTGGACTTCAGTGAC
Cry1a_forward	GGCTCCACGACAATCCTTCA
Cry1a_reverse	TGGGGAAGACATCGGTAGGT
β -actina_forward	GATGAGGAAATCGCTGCCCT
β -actina_reverse	GTCCTTCTGTCCCATGCCAA

3.5.6. Expresión de resultados y análisis estadístico

Los registros de actividad locomotora de los peces fueron integrados cada 5 minutos y analizados con el software “El Temps” licenciado por el doctor Diez-Noguera (Facultad de Farmacia y Cc de la Alimentación, Universidad de Barcelona) para la obtención de actogramas.

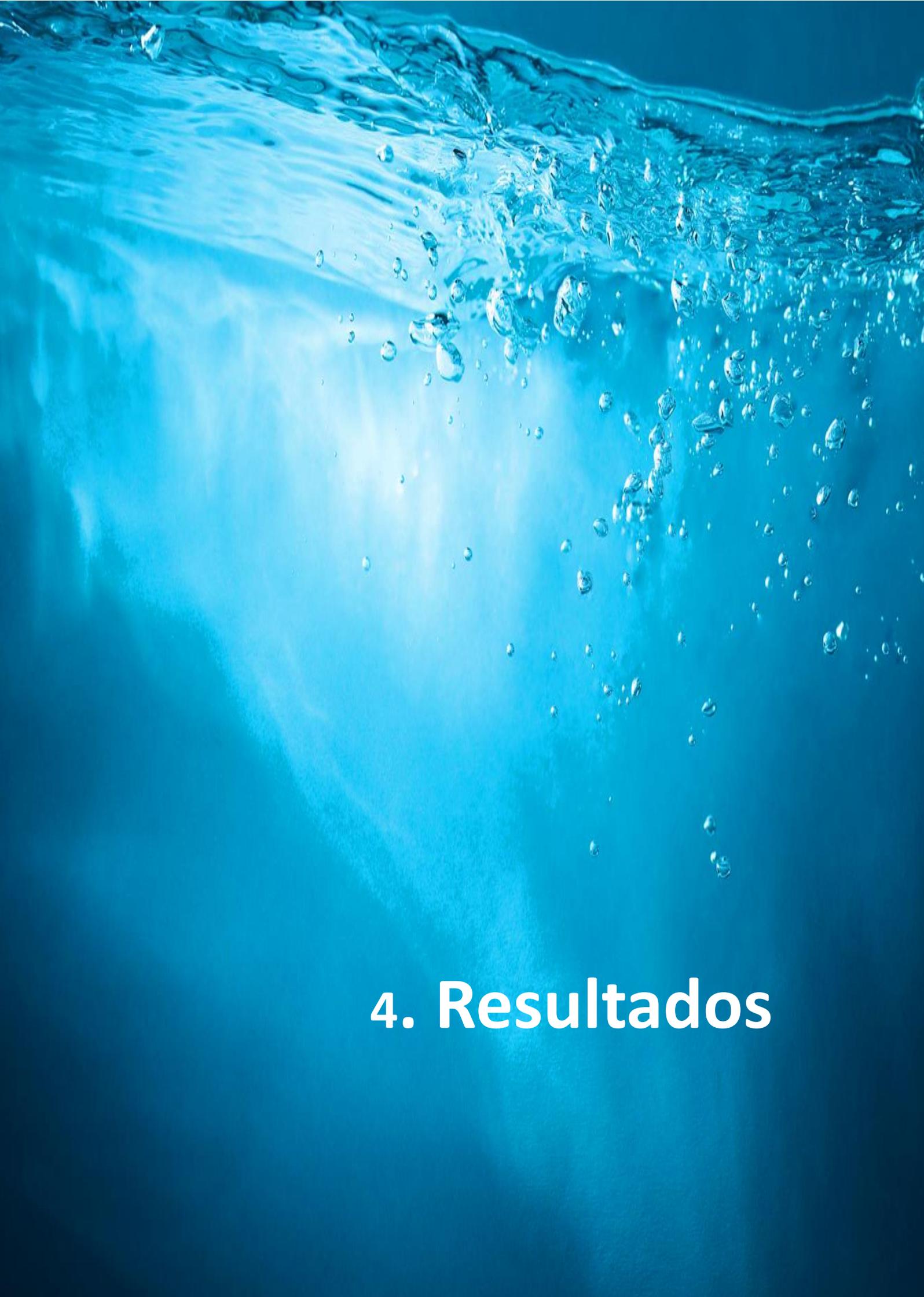
Las diferencias entre los niveles de esteroides de los animales control y tratados se analizaron mediante t-student y se consideró la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0.05$. Las diferencias en los niveles de

expresión de los genes reloj se analizaron mediante ANOVA de una vía y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ tras análisis de comparaciones múltiples mediante el test de Tukey.

3.6. Efecto de la sobreexpresión de ASIP sobre los ritmos de actividad locomotora del pez cebra

Para evaluar el efecto de las melanocortinas sobre los patrones de actividad diseñamos un experimento similar al anterior utilizando 6 tanques de 20 litros provistos de sistema de re-circularización y filtración de agua, así como de comederos automáticos y células fotoeléctricas para la detección del movimiento (Figura 22). El experimento se desarrolló en una sala aislada de las instalaciones del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal provista de un sistema térmico, para mantener constante la temperatura de la sala a 28 °C, y un sistema automático de control de la iluminación para mantener constante el fotoperiodo bajo el régimen de 12L/12O, con encendido a las 8.00 y apagado a las 20.00. La alimentación con pienso en escamas fue programada diariamente a las 10.00. En tres de los tanques se estudió los patrones de actividad de los animales salvajes adultos de ambos sexos ($n=15$ / tanque) de un año de edad (aproximadamente 3 cm), mientras que los otros tres tanques se utilizaron para el estudio comparativo de la actividad de animales transgénicos ASIP, también de un año de edad, en iguales condiciones de estabulación. Estas condiciones fueron mantenidas durante 32 días y los registros de actividad fueron integrados cada 5 minutos. Debido a los problemas eléctricos durante el desarrollo del experimento que provocaron la interrupción en el registro de datos, el análisis de los datos solamente se llevó a cabo durante 21 días después de suprimir completamente todos los días con errores de registro.

Como anteriormente los datos fueron analizados mediante el software “El Temps” para la obtención de actogramas y periodogramas. Las ondas medias se obtuvieron mediante la obtención de la media de actividad para cada punto de integración (5 minutos) y las actividades nocturnas y diurnas de cada genotipo se compararon mediante t-student ($p < 0.05$)



4. Resultados

4.1. Conservación evolutiva de la respuesta de la sensibilidad del MC4R a la ACTH mediada por MRAP2

4.1.1. Perfiles farmacológicos del MC4R inducidos por MRAP2

La co-expresión del hMC4R con hMRAP2 aumentó la sensibilidad del receptor a la ACTH más de 350 veces. La zfMRAP2a tiene un efecto más modesto sobre la versión humana del MC4R induciendo un incremento en la sensibilidad de 32 veces sobre los niveles basales. Por el contrario, la zfMRAP2b solamente produce un incremento en la sensibilidad de 2.5 veces sobre el nivel basal (Figura 26 y Tabla 2A). La co-expresión de cualquier proteína accesoria solamente produjo un incremento de tres veces en la sensibilidad por la α -MSH del receptor (Figura 26C y Tabla 2). Nosotros también estudiamos los efectos farmacológicos de la co-expresión de los diferentes parálogos de zfMRAP2, así como con la hMRAP2 sobre la sensibilidad del zfMC4R (Figura 26B y 26D y Tabla 2B). De forma similar al hMC4R, la co-expresión de la hMRAP2 o zfMRAP2a también incrementó la respuesta del zfMC4R a la ACTH con magnitudes de 100 y 23 veces, respectivamente (Figura 26B y Tabla 2B), pero, otra vez, las MRAPs no tuvieron efecto sobre la respuesta a la α -MSH. La expresión de MRAP2 conjuntamente con el MC4R no tuvo efectos sobre los niveles basales de AMPc, en ninguna de las dos especies (Figura 27).

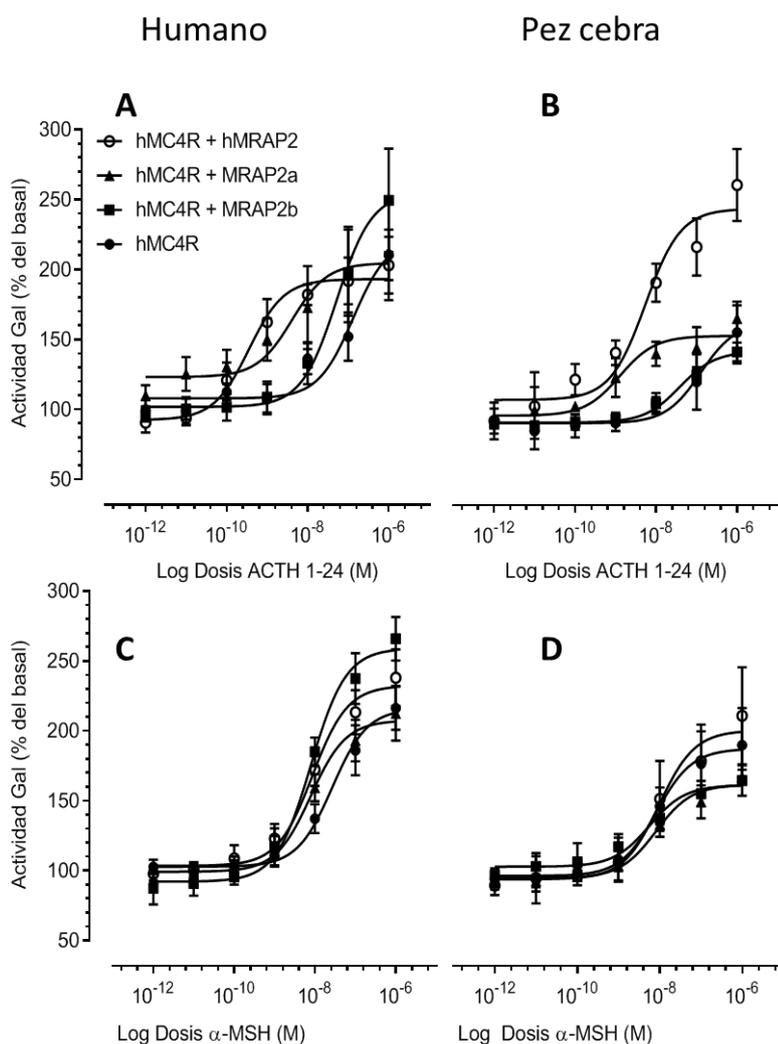


Figura 26. Propiedades farmacológicas de los agonistas de melanocortinas hACTH(1-24) (A, B) and α -MSH (C, D) en células HEK-293 transitoriamente transfectadas con ambos hMC4R (A, C) o zfMC4R (B, D) y diferentes MRAPs (\bullet MC4R, \circ MC4R+hMRAP2, \blacktriangle MC4R+zfMRAP2a, \blacksquare MC4R+zfMRAP2b) pero establemente expresando un gen reportero de β -galactosidasa sensible al AMPc. Los datos fueron normalizados a nivel de proteína y expresados como porcentaje de los niveles basales. Además, se transfectó una construcción portando el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo para evaluar la eficiencia de transfección. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron al menos dos veces independientemente. Los datos representan la media \pm SEM de un experimento representativo.

Tabla 2A. Efecto de la MRAP2 sobre el perfil farmacológico del zfMC4R

	zfMC4R	zfMC4R + hMRAP2	zfMC4R + zfMRAP2a	zfMC4R + zfMRAP2b
α-MSH	8,25 x 10 ⁻⁹ [4,41 x 10 ⁻⁹ - 1,50 x 10 ⁻⁸]	9,60 x 10 ⁻⁹ [4,27 x 10 ⁻⁹ - 2,24 x 10 ⁻⁸]	8,1 x 10 ⁻⁹ [5,32 x 10 ⁻⁹ - 1,22 x 10 ⁻⁸]	5,58 x 10 ⁻⁹ [2,67 x 10 ⁻⁹ - 1,07 x 10 ⁻⁸]
hACTH (1-24)	1,27 x 10 ⁻⁷ [5,42 x 10 ⁻⁸ - 2,92 x 10 ⁻⁷]	5,44 x 10 ⁻⁹ [2,66 x 10 ⁻⁹ - 1,02 x 10 ⁻⁸]	1,27 x 10 ⁻⁹ [4,66 x 10 ⁻¹⁰ - 4,14 x 10 ⁻⁹]	3,81 x 10 ⁻⁸ [2,27 x 10 ⁻⁸ - 6,28 x 10 ⁻⁸]

Tabla 2B. Efecto de la MRAP2 sobre el perfil farmacológico del hMC4R

	hMC4R	hMC4R + hMRAP2	hMC4R + zfMRAP2a	hMC4R + zfMRAP2b
α-MSH	2,66 x 10 ⁻⁸ [1,78 x 10 ⁻⁸ - 4,07 x 10 ⁻⁸]	8,63 x 10 ⁻⁹ [5,97 x 10 ⁻⁹ - 1,23 x 10 ⁻⁸]	7,85 x 10 ⁻⁹ [5,29 x 10 ⁻⁹ - 1,15 x 10 ⁻⁸]	7,93 x 10 ⁻⁹ [5,93 x 10 ⁻⁹ - 1,05 x 10 ⁻⁸]
hACTH (1-24)	1,33 x 10 ⁻⁷ [6,89 x 10 ⁻⁸ - 2,48 x 10 ⁻⁷]	3,52 x 10 ⁻¹⁰ [1,98 x 10 ⁻¹⁰ - 6,34 x 10 ⁻¹⁰]	4,09 x 10 ⁻⁹ [8,79 x 10 ⁻¹⁰ - 1,56 x 10 ⁻⁸]	5,22 x 10 ⁻⁸ [2,91 x 10 ⁻⁸ - 8,87 x 10 ⁻⁸]

Dosis medias efectivas (M) de la activación de β -galactosidasa bajo el control de un promotor con elementos de respuesta al AMPc expresado de forma estable en células HEK-293 y transitoriamente expresando hMC4R o zfMC4R solo o en combinación con diferentes MRAPs tras incubación con agonistas de melanocortinas (hACTH1-24 o α -MSH). La activación media expresada como porcentaje del basal para cada concentración de agonista se calculó a partir de 4 replicados de un experimento representativo, y los datos resultantes se ajustaron a curvas logísticas usando GraphPad Prism software. Números entre paréntesis indican los intervalos de confianza al 95% del ajuste no lineal.

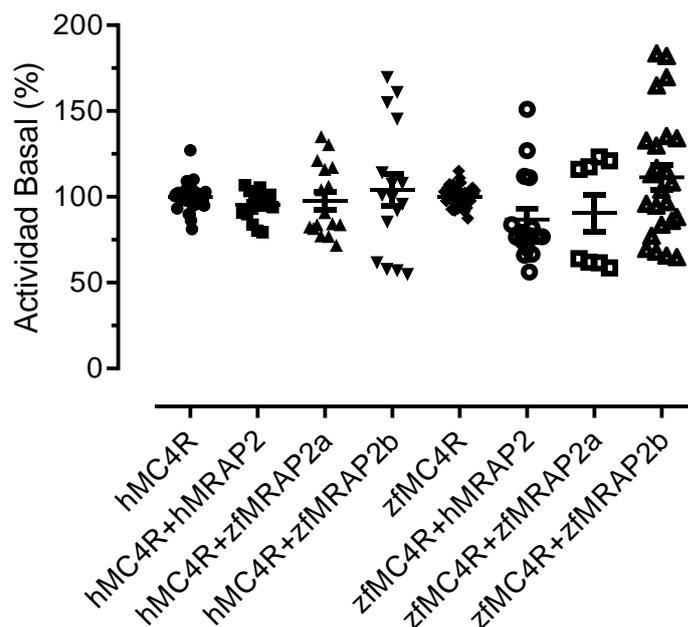


Figura 27. Efecto de las diferentes MRAPs sobre la actividad galactosidasa basal inducida por la expresión de hMC4R o zfMC4R bajo el control de un promotor transportando varios elementos de respuesta al AMPc (CRE). Los datos fueron agrupados de todos los experimentos farmacológicos realizados en este estudio (ver material y métodos para más detalle). No se observaron diferencias significativas tras un ANOVA de una vía ($P < 0.05$).

4.1.2. Expresión tisular

En humanos el MC2R se expresa en la glándula adrenal mostrando niveles residuales en otros tejidos (Figura 28). Por el contrario, el hMC4R se expresa principalmente en el cerebro con algunos niveles de expresión en el esófago, el bazo, las glándulas salivares y el testículo (Figura 28). La hMRAP2 se expresa con mucha intensidad en el tejido arterial pero también en el cerebro, glándulas salivares, bazo, colon transverso y nervio tibial (Figura 28). En el pez cebra los niveles de expresión fueron determinados por PCR cuantitativo en nuestro laboratorio. Los experimentos mostraron que las zfMRPA2 se expresan principalmente en el tejido interrenal y en el cerebro conjuntamente, aunque se detectan también niveles sensibles de expresión en el bazo y las branquias (Agulleiro et al., 2013).

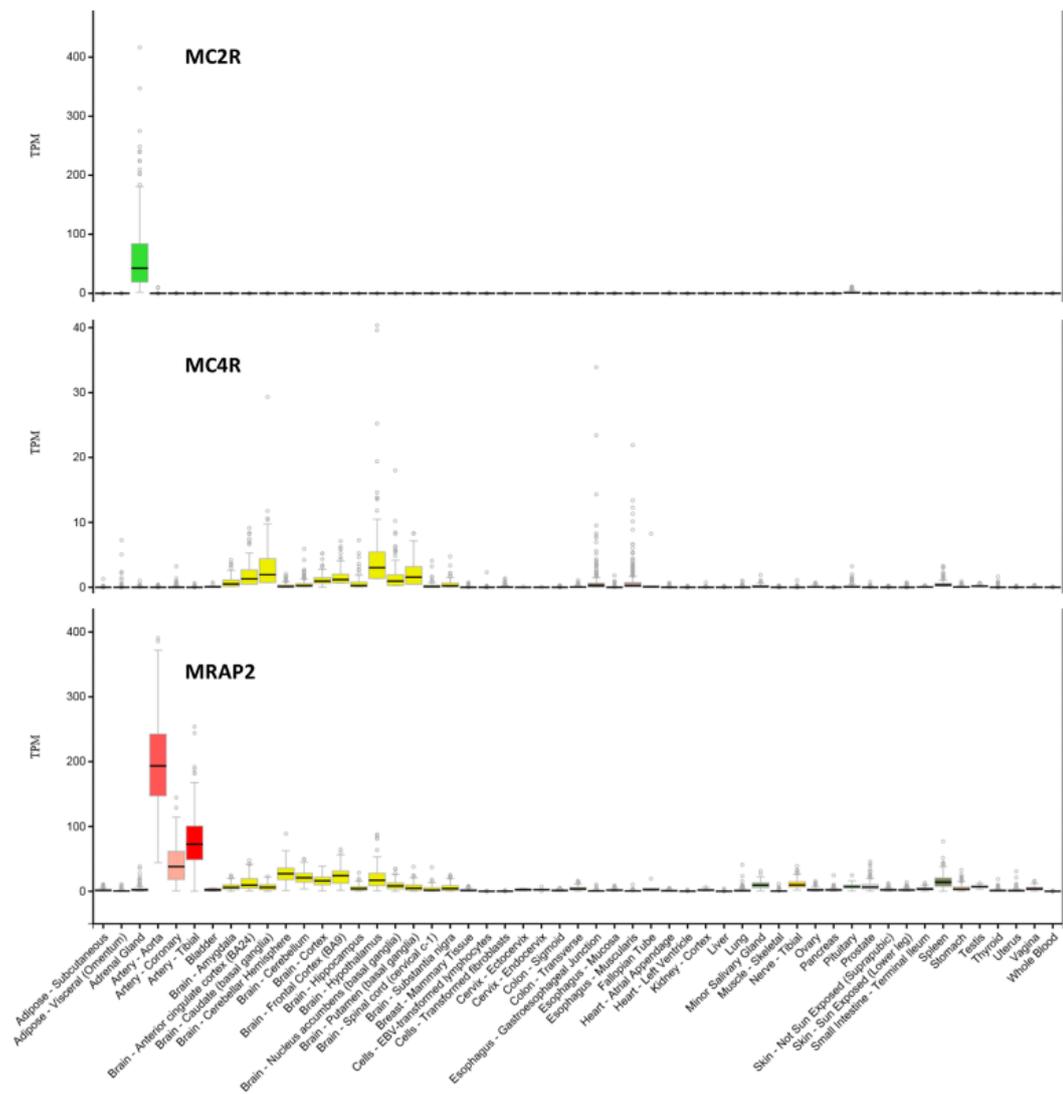


Figura 28. Expresión de los perfiles de MC2R, MC4R y MRAP2 humanas usando secuenciación RNA. Los datos fueron obtenidos de GTExPortal (<https://gtexportal.org>) y expresados como TPM (Transcritos por millón).

4.1.3. La comparación de las secuencias de MRAP revela regiones conservadas y no conservadas potencialmente responsables de las propiedades funcionales específicas

La comparación de secuencias reveló que las secuencias MRAP de tetrápodos exhiben un 73% de identidad, mientras que la identidad de las secuencias de zfMRPA2 comparadas con las de tetrápodos es menor al 50%. La secuencia de zfMRAP2a muestra un 47% de identidad con ambas, la MRAP2 de

pollo (chMRAP2) y la hMRPA2, mientras que la zfMRAP2b exhibe solamente un 40% y 39% de identidad cuando se alinean con la chMRPA2 y la hMRPA2, respectivamente (Figura 29). Basándonos en estas comparaciones es posible identificar aquellos residuos que están conservados en las secuencias de las MRAP2 de tetrápodos y la zfMRAP2a que, a su vez, son diferentes en la zfMRAP2b. Nosotros postulamos que estos residuos aminoácidos pueden ser responsables de la sensibilidad a la ACTH del MC4R inducida por la MRAP2a. De esta forma, zfMRAP2a exhibe 22 residuos idénticos con todas las MRAPs de tetrápodos que difieren de la zfMRAP2b (Figura 29).

```

Homo sapiens 2      : --MSAQRLLSNRTSQSASNSDYTWEEYYY-EIG---PVSFEGLKAHKYSIVIGFWVGLAVFVIFMFFVLTLLTKTGAPHQDNAESSEKRRFRMNSFVSD : 93
Gallus gallus 2    : --MSALRLISNRTSQQALSNSDYTWEEYYY-EYG---PVSFEGLKAHKYSIVIGFWVGLAVFVIFMFFVLTLLTKTGAPHQNTESSEKRRFRMNSFVAD : 93
Danio rerio 2a     : --MRFQLS-NSITS---VPNHNYEWSY EYY-DDEE--PVSFEGLKAHRYISIVIGFWVGLAVFVIFMFFVLTLLTKTGAPHPEAAEPYKRMRLTSCADG : 90
Danio rerio 2b     : --MSEYS---NRSC---ACADYEWHYEYY-EDEE--PVSFEGLRANRYISIVIGFWVGLAVFVIFMFFVLTLLTKTGAPHPEMCDASVKEHMLICELE : 87

Homo sapiens 2      : FGRPLEPD--KVFSR-QGNEE SRSLFHCYINEVERLDRAKACHQTTALDSDVQLQEAIRSSG-----QPEEELNRLMKFDI PNFVNTDQN-Y : 176
Gallus gallus 2    : FGRPLESE--RVFSR-QIAEESRSLFHCYINEVEHLDKAQQSQKGPDESNIHFQEVSRSSG-----TLEEDLNCLAKYNI PNFVNTQNS : 177
Danio rerio 2a     : LCRQRETDGRTGLSR-PLLEESRSLFHCYINEEEREGGRAATDAGALTHGRSGIGNSRGQVEEVGLVQNMVLESRAE REAALLAHFNI PNFVNSEINSA : 189
Danio rerio 2b     : VCG-----GSLAFSLPPLPDCSRSLFHFYIHEER--VKTHKDA---VIGR-GMHCGRGNAE-----RAEDEHFVSSFNIPNFVNSEQSS : 162

Homo sapiens 2      : FGEDDLI ISEPPIVLETKP-----LSQTS HKDLD- : 205
Gallus gallus 2    : LCEGDLLISQPPRVLESKM-----AMQSSHRILD- : 206
Danio rerio 2a     : LGDEDLLCGDPPIMEEAR-----PRCTHHIID- : 217
Danio rerio 2b     : LCHDDFLSEPPITIGQSDELKTAEPALHCVDIIRH : 199

```

Figura 29. Alineamiento de secuencias proteicas de MRAP2. El número de aminoácidos se indica en la parte derecha de la figura. Se han introducido espacios representados por guiones para mejorar el alineamiento de secuencias. El dominio transmembrana se enmarca mediante líneas negras gruesas. Los residuos en marrón son idénticos para todas las secuencias; en azul se marcan los residuos distintos para MRAP2a pero idénticos para las secuencias de tetrápodos y MRAP2b; y en verde se muestran los residuos distintos para MRAP2b, pero idénticos para las secuencias de tetrápodos y MRAP2a.

4.2. Identificación de dominios implicados en la sensibilización del MC4R a la ACTH mediada por la MRAP2

4.2.1. Quimeras con pérdida de función

En esta sección experimental los dominios funcionales del zfMC1R fueron secuencial e independientemente introducidos en el zfMC4R generando receptores quiméricos zfMC1R/zfMC4R. Ya que el zfMC1R no puede responder a la estimulación con ACTH en presencia o ausencia de zfMRAP2a esperamos que la nueva quimera no pueda responder a la estimulación con ACTH. El caso anterior sería indicativo de la importancia de ese dominio/región en la funcionalidad del receptor. El caso contrario, es decir, que la nueva quimera siga respondiendo a la ACTH en función de la presencia de MRAP2a, indicaría la indiferencia del dominio/región en la adquisición de sensibilidad a ACTH mediada por la MRAP2. Además, evaluamos la respuesta a α -MSH o NDP-MSH para constatar la funcionalidad del receptor, su presencia en la membrana plasmática, así como el efecto específico sobre la interacción con ACTH. Sin embargo, este ensayo solamente se realizó en aquellas quimeras que no fueron capaces de responder a ACTH.

La Figura 30 resume los resultados obtenidos indicando el dominio que se ha intercambiado entre los receptores. La tabla 3 recoge los ED50 de los receptores quiméricos tras estimulación con ACTH y/o α -MSH tras ajustes a curvas logísticas (ver material y métodos).

En la quimera 1 se sustituyó el extremo N-terminal extracelular del zfMC4R que mantiene una identidad del 20% aproximadamente con el extremo homólogo del zfMC1R. El receptor quimérico solamente responde a elevadas concentraciones de ACTH y α -MSH y la eficacia máxima de respuesta, representada por el nivel máximo de respuesta a una concentración dada, es reducida. Los ajustes a curvas logísticas no fueron significativos. Un patrón similar ocurre tras intercambiar el primer dominio transmembranal (quimera 2) de los receptores el cual exhibe un 69% de identidad entre ambas moléculas. Sin embargo, en este caso el receptor *per se* no responde en absoluto a la ACTH,

incluso en sus dosis más elevadas. Sin embargo, la co-expresión de zfMRAP2a induce una respuesta moderada a la hormona. El intercambio del primer “loop” intracelular (quimera 3) no produjo ninguna alteración en el funcionamiento del receptor con referencia a la molécula intacta, es decir una respuesta baja a la ACTH y una fuerte estimulación del receptor en presencia de MRAP2a. El dominio intercambiado solamente tiene una extensión de cinco aminoácidos y mantiene una conservación del 80% entre ambos receptores. La quimera 4, en la que se substituye el segundo dominio transmembranal que muestra un 67% de identidad con su homólogo del zfMC1R, es capaz de responder por igual, en presencia o ausencia de zfMRAP2a, a la ACTH con una sensibilidad y eficiencia elevada. La quimera 5 en la que se intercambia el primer giro extracelular, que exhibe un grado de identidad muy bajo (16% con una extensión de 12 aminoácidos), no produce ninguna alteración en la respuesta del receptor mostrando una mayor sensibilidad a la ACTH en cotransfección con zfMRAP2a. La substitución del tercer dominio transmembrana en la quimera 6 genera un comportamiento anómalo del receptor que no es capaz de responder a la ACTH en presencia de zfMRAP2a, pero en su ausencia la actividad del receptor estimulado con ACTH disminuye como si de un agonista inverso se tratase, aunque los ajustes no son significativos. El funcionamiento de las quimeras en las que se ha substituido el segundo giro intracelular (quimera 7), el cuarto dominio transmembranal (quimera 8) o el segundo giro extracelular (quimera 9) no presenta diferencias cualitativas con el funcionamiento de la forma intacta en lo que se refiere a la activación de la quimera por ACTH inducida por la zfMRAP2a. Si bien la eficiencia de respuesta y la sensibilidad adquirida no es tan elevada. Debe destacarse la disfunción de la quimera 9 en respuesta a ACTH cuando se expresa de forma independiente, en ausencia de zfMRAP2a, algo que solventa la co-expresión de la proteína accesoria. Algo similar ocurre tras la substitución del tercer giro intracelular (quimera 11), el dominio transmembranal 6 (TM6, quimera 12) y el extremo intracelular carboxilo terminal (quimera 15). Finalmente, el intercambio de los dominios transmembranales 5 (quimera 10) y 7 (quimera 14) así como el tercer giro extracelular (ECL3, quimera 13) provocaron una pérdida de la funcionalidad del receptor quimérico tanto en ausencia como en presencia de la zfMRA2a.

Con el fin de comprobar la funcionalidad de las quimeras incapaces de responder a ACTH, es decir las quimeras 6, 10, 13 y 14, y comprobar la especificidad sobre la respuesta del receptor a ACTH, estas fueron estimuladas con α -MSH y/o NDP-MSH (Figura 31). Solamente la quimera 13 fue capaz de responder a ambos agonistas mientras que el resto de las quimeras nunca respondieron a α -MSH. En función de los resultados, concluimos que la quimera 13, que intercambia en tercer giro extracelular, es funcional, pero que el intercambio de dominios mitiga la respuesta a ACTH inducida por zfMRAP2a.

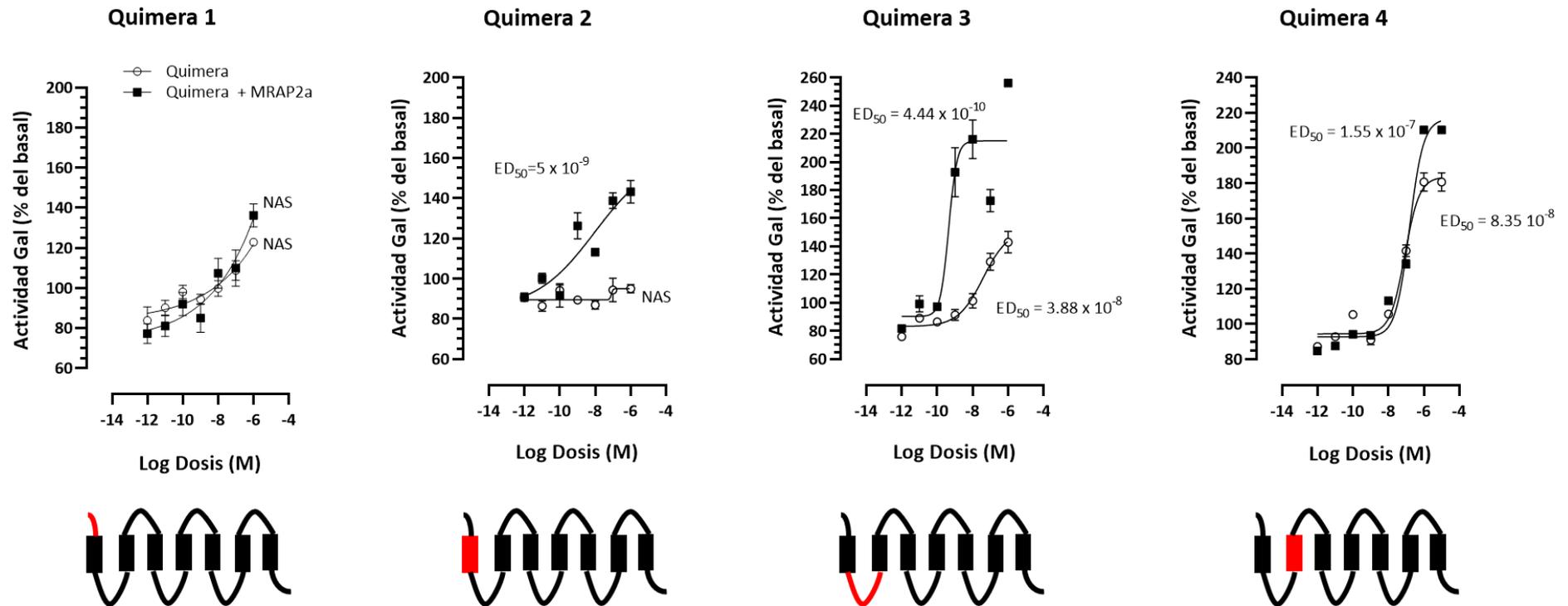


Figura 30. Efectos de ACTH (1-24) sobre actividad galactosidasa en células HEK-293 que expresan de forma transitoria un receptor quimérico MC4R/MC1R (los diagramas a pie de figura indican el dominio intercambiado, en negro MC4R y en rojo MC1R) y con (cuadrado negro) o sin (círculo blanco) co-expresión de zfMRAP2a. La línea celular expresa, además, el gen de la galactosidasa bajo en control de un promotor sensible al AMPc, de forma estable. Los datos se normalizaron a los niveles de proteína y se expresan como porcentaje de los niveles basales. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y al menos dos veces independientemente. NAS (ajuste no significativo), GAL (galactosidasa). Los datos resultantes se ajustaron a curvas logísticas usando GraphPad Prism software. Los datos de ED_{50} se expresan en molaridad (M).

Resultados

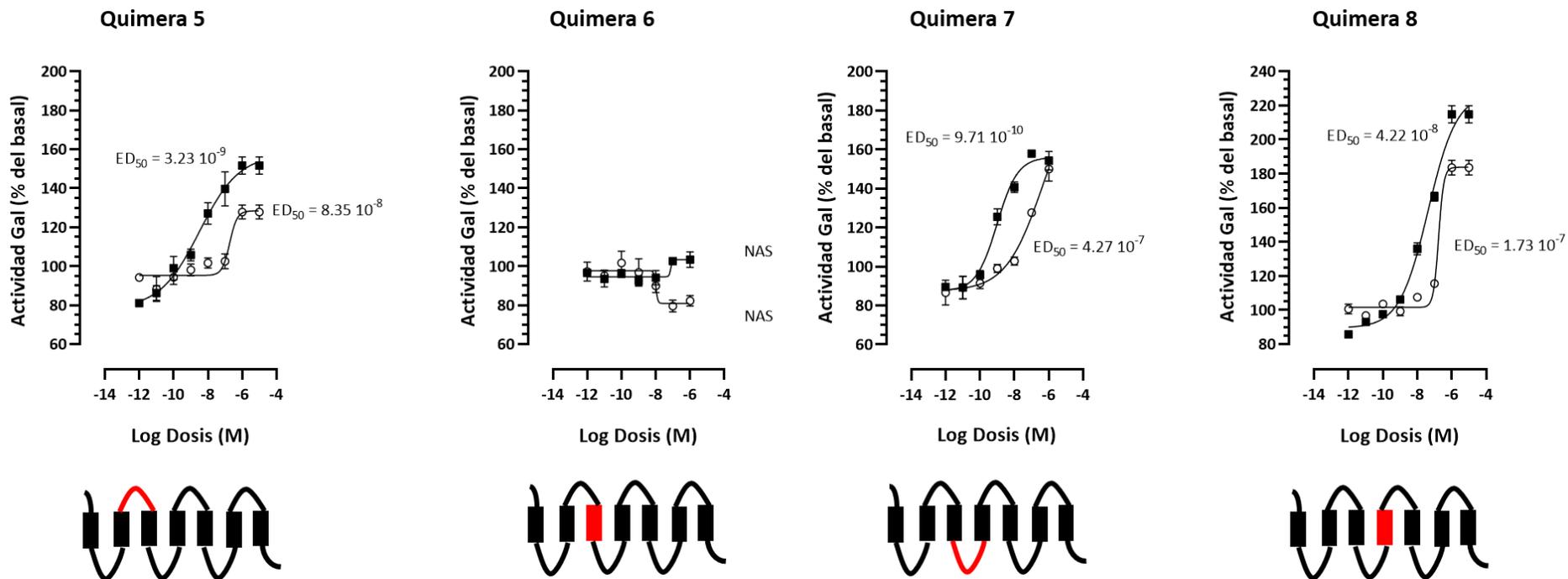


Figura 30 (continuación)

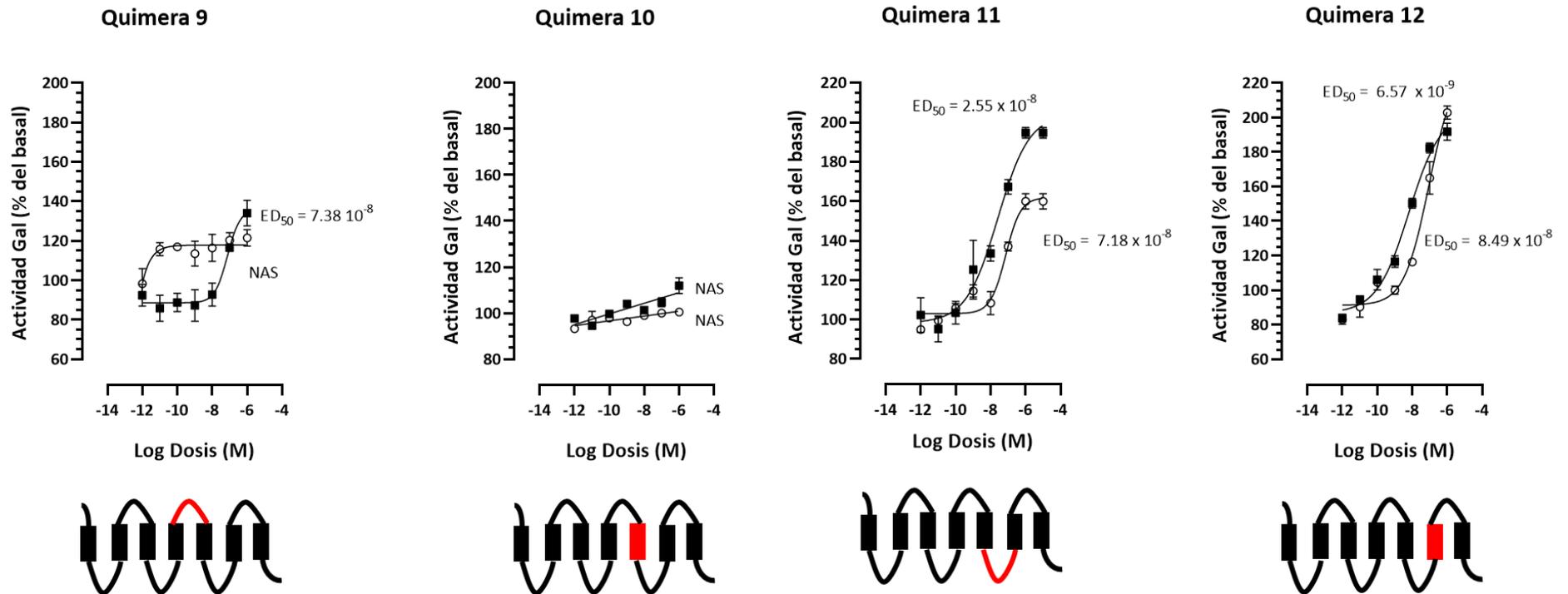


Figura 30 (continuación)

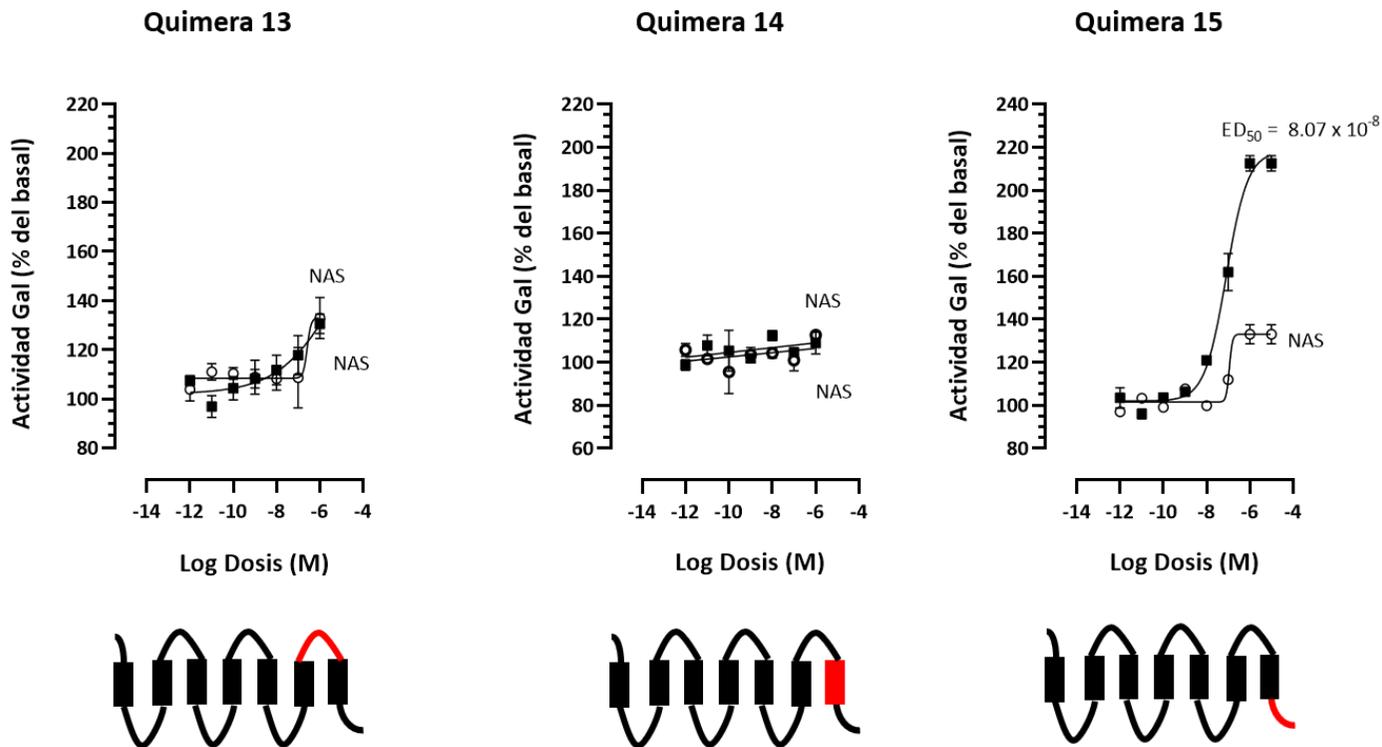


Figura 30 (continuación)

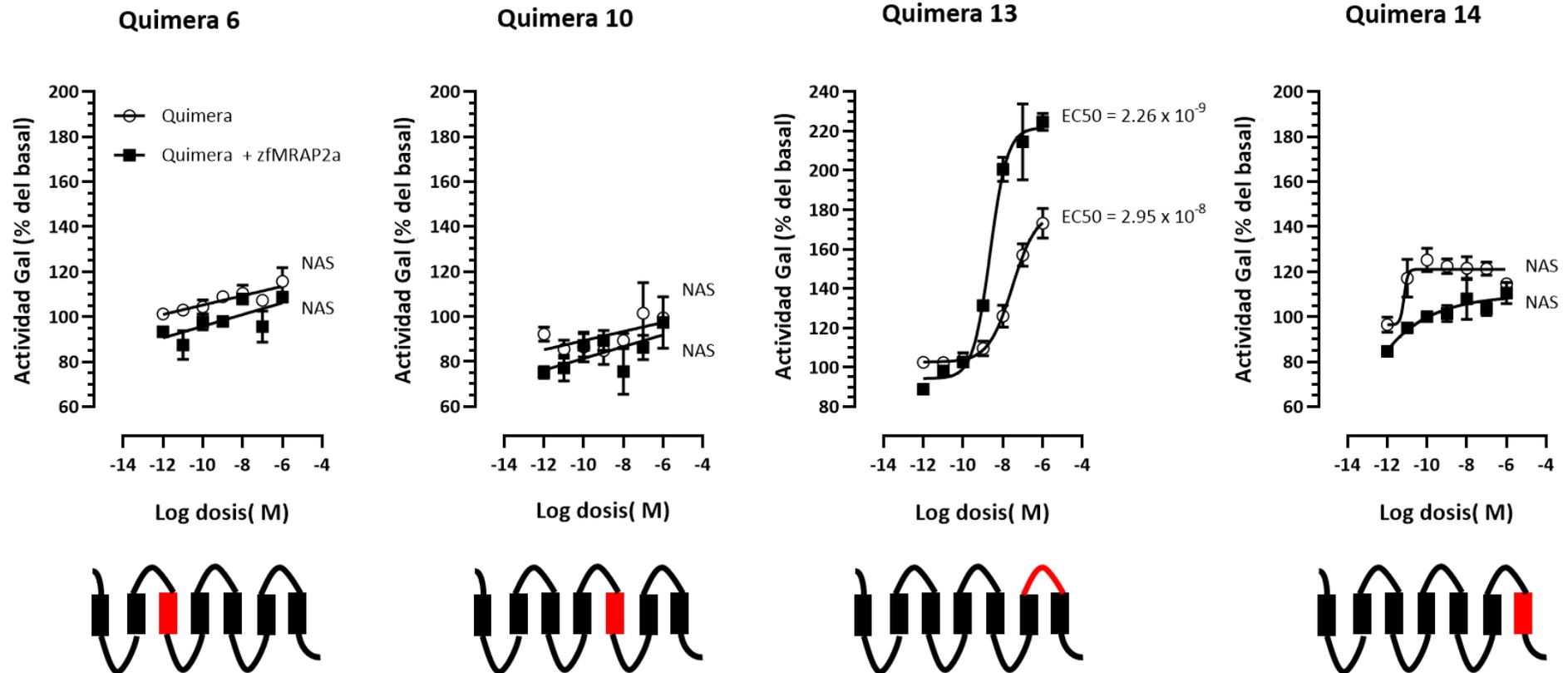


Figura 31. Efectos de α -MSH o NDP-MSH sobre actividad galactosidasa en células HEK-293 que expresan de forma transitoria un receptor quimérico MC4R/MC1R (los diagramas a pie de figura indican el dominio intercambiado, en negro MC4R y en rojo MC1R), con (cuadrado negro) o sin (circulo blanco) co-expresión de zfMRAP2a. Los resultados de la quimera 13 representan la actividad GAL tras estimulación con NDP-MSH, sin embargo, los resultados fueron similares cuando se estimulaba con α -MSH. Ver figura 30 para más información.

4.2.2. Quimeras con ganancia de función

Una vez localizadas las regiones/dominios del MC4R importantes para la respuesta a la ACTH inducida por la zfMRAP2a mediante el diseño de quimeras con pérdida de función, adoptamos la estrategia opuesta, es decir trasladar esos dominios al zfMC1R intentado dotar a este de sensibilidad a la ACTH inducida por la zfMRPA2a.

Los resultados de pérdida de función indican que el tercer giro extracelular (quimera 13) es crítico para la respuesta a ACTH inducida por zfMRAP2a. Sin embargo, nosotros decidimos aumentar el estudio a aquellos dominios que habían provocado una pérdida de función en el zfMC4R quimérico, es decir TM3 (quimera 6), TM5 (quimera 10), TM7 (quimera 14). Además, incluimos el segundo giro extracelular (quimera 9) en el estudio ya que, aunque obtuvimos una respuesta significativa tras la co-expresión con zfMRAP2a, esta tuvo una eficiencia muy baja (menor al 140%) y además la quimera, *per se*, no fue capaz de responder a las dosis más elevadas de ACTH. Con este fin, diseñaron 6 nuevas quimeras (quimera 16-21). En todas ellas siempre se intercambiaron el segundo (ECL2) y tercer giro (ECL3) extracelular y combinaciones de los tres dominios transmembrana (Figura 32). El intercambio de los dominios extracelulares 2 y 3 simultáneamente, no produjo ningún efecto sobre la actividad del nuevo receptor quimérico (quimera 16). Algo que tampoco ocurrió tras intercambiar los dos ECLs junto con el TM7 (quimera 17), los dominios TM3 y TM7 (quimera 19) o los dominios TM3 y TM5 (quimera 20), respectivamente. Solamente aquellas quimeras en las cuales se intercambiaron simultáneamente los dominios TM5 y TM7 (quimeras 18 y 21) fueron capaces de responder a la estimulación con ACTH. Sin embargo, el incremento de la sensibilidad a la ACTH mediado por la zfMRAP2a solamente se percibe en la quimera 21 que incluye la substitución de los dos dominios extracelulares dominios extracelulares (ECL2 y ELC3), además de los tres últimos dominios transmembranales impares (TM3, TM5 y TM7) sugiriendo que TM5 y TM7 conjuntamente son requisito para la respuesta a ACTH, pero TM3 es requisito para los efectos de zfMRA2a sobre la sensibilidad a la ACTH del zfMC4R.

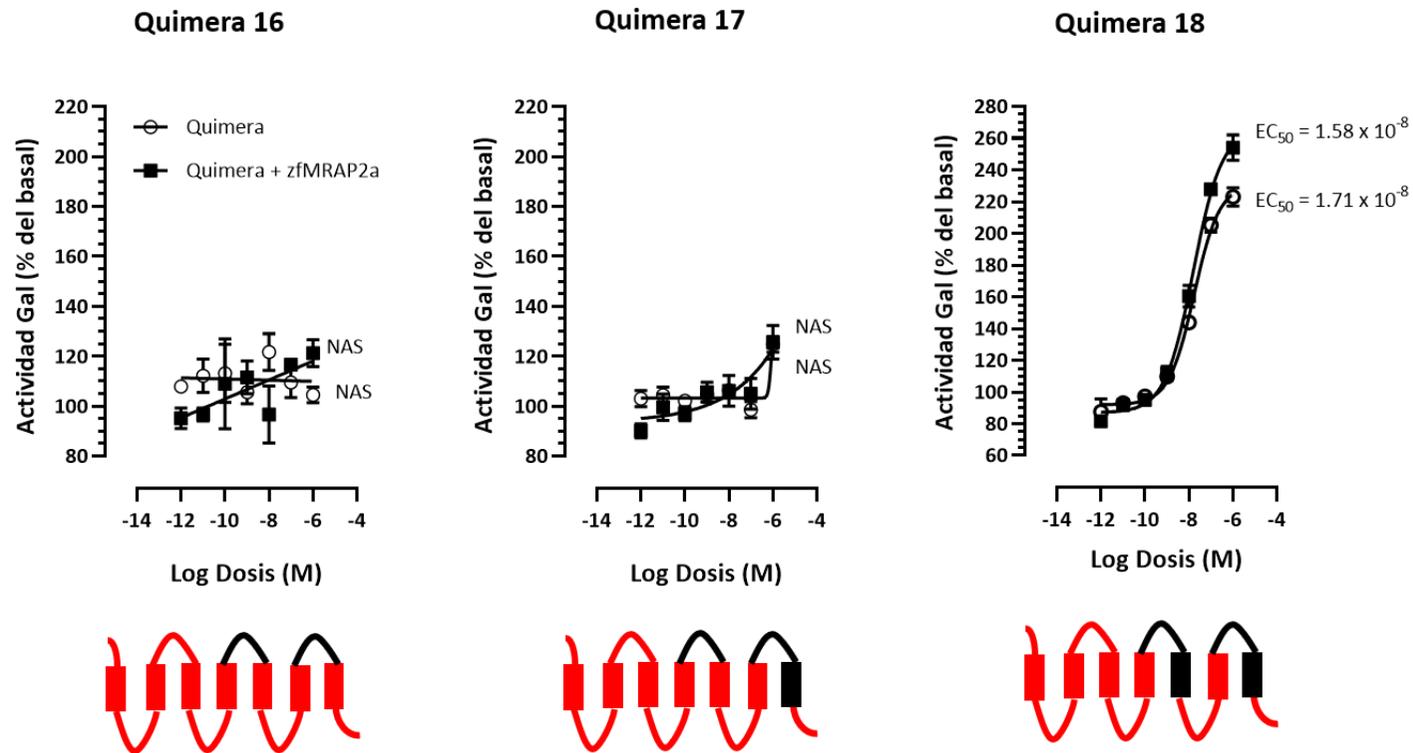


Figura 32. Efectos de ACTH (1-24) sobre actividad galactosidasa en células HEK-293 que expresan de forma transitoria un receptor quimérico MC1R/MC4R (los diagramas a pie de figura indican el dominio intercambiado, en negro MC4R y en rojo MC1R) y con (cuadrado negro) o sin (círculo blanco) co-expresión de zfMRAP2a. La línea celular expresa, además, el gen de la galactosidasa bajo en control de un promotor sensible al AMPC, de forma estable. Los datos se normalizaron a los niveles de proteína y se expresan como porcentaje de los niveles basales. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y al menos dos veces independientemente. NAS (ajuste no significativo), GAL (galactosidasa).

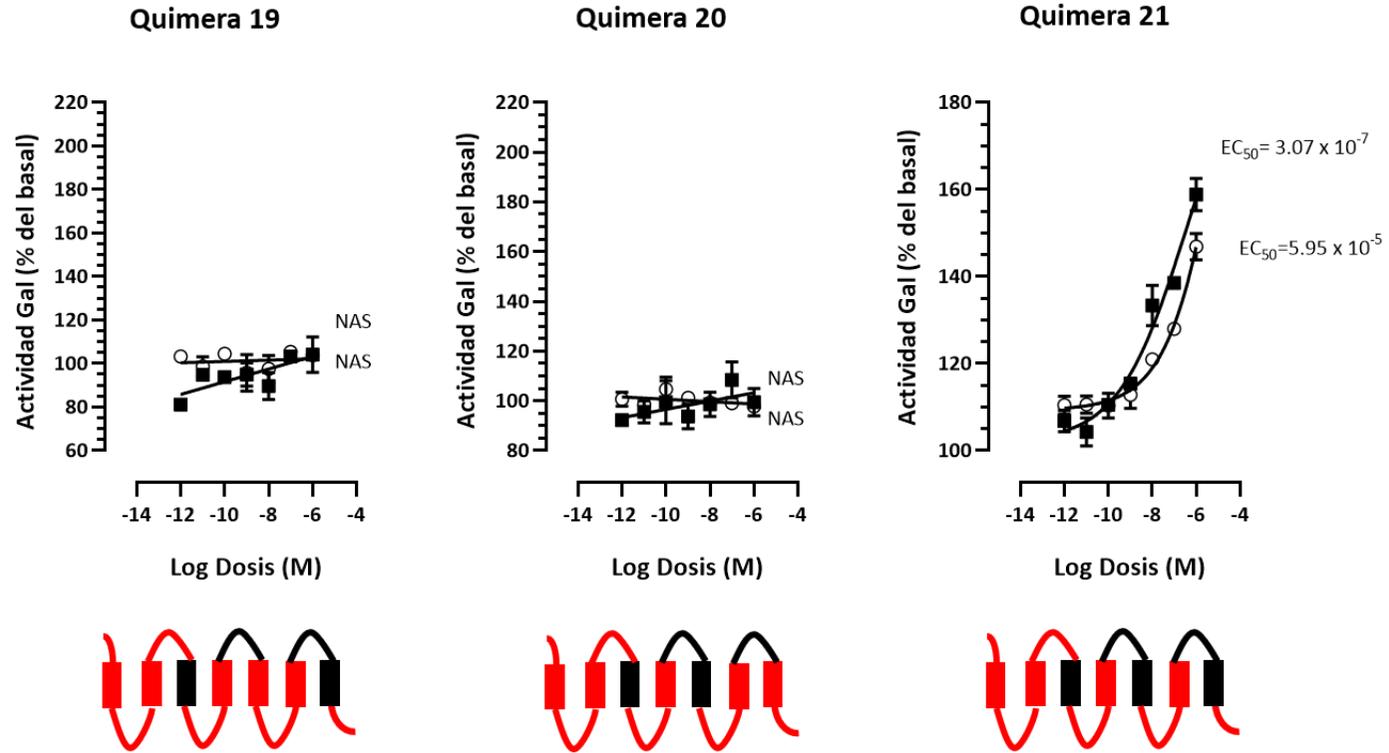


Figura 32 (continuación)

4.2.3. Expresión en membrana de los receptores quiméricos

Una de las posibilidades para la falta de función del receptor quimérico es que el intercambio de dominios haya provocado una alteración de la estructura tridimensional del receptor impidiendo que alcance la membrana plasmática y siendo procesado por los sistemas celulares que velan por la calidad y funcionalidad de las moléculas sintetizadas (proteosoma). Con este fin y aprovechando la presencia de un epítipo c-Myc en la región N-terminal de la quimera recombinante estudiamos la presencia en la membrana plasmática de aquellas quimeras que no respondieron a la ACTH ni α -MSH (quimeras 6, 9, 10, 14 de pérdida de función y 16, 17, 19, 20 de ganancia de función) (Figura 33). La presencia de colocalización entre el receptor y el marcador de membrana plasmática indica que las quimeras 14, 16, 17, 19 y 20 fueron capaces de alcanzar la membrana plasmática y por tanto su presencia permitiría la funcionalidad de la quimera. Los resultados obtenidos sobre las quimeras de pérdida de función (6, 10) corroboran los resultados obtenidos en los experimentos farmacológicos en los que las células que expresan las quimeras se incubaron con α -MSH y donde no encontramos estimulación alguna (Figura 31). Por el contrario, las quimeras 16, 17, 19 y 20 que no fueron capaces de responder a la ACTH si alcanzaron la membrana plasmática, sugiriendo que la pérdida de función fue debida a una alteración estructural que impide la unión del agonista o su acoplamiento con la proteína G tras unión del agonista.

Tabla 3. Efecto de la zfMRAP2a sobre el perfil farmacológico de diferentes quimeras sintéticas entre zfMC4R y zfMC1R en respuesta a la estimulación con ACTH o α -MSH.

		ED 50 (ACTH)(M)		ED50 (α -MSH)(M)	
		Quimera	Quimera+ zfMRAP2a	Quimera	Quimera+ zfMRAP2a
P É R D I D A F U N C I Ó N	Quimera 1	NAS	NAS		
	Quimera 2	NAS	5.0×10^{-9}		
	Quimera 3	3.98×10^{-8}	4.45×10^{-10}		
	Quimera 4	8.55×10^{-8}	1.55×10^{-7}		
	Quimera 5	8.35×10^{-8}	3.23×10^{-9}		
	Quimera 6	NAS	NAS	NAS	NAS
	Quimera 7	4.27×10^{-7}	9.71×10^{-10}		
	Quimera 8	1.73×10^{-7}	4.22×10^{-8}		
	Quimera 9	NAS	7.38×10^{-8}		
	Quimera 10	NAS	NAS	NAS	NAS
	Quimera 11	7.8×10^{-8}	2.55×10^{-8}		
	Quimera 12	8.49×10^{-8}	6.57×10^{-9}		
	Quimera 13	NAS	NAS	2.95×10^{-8}	2.26×10^{-9}
	Quimera 14	NAS	NAS	NAS	NAS
	Quimera 15	NAS	8.07×10^{-8}		
G A N A N CIA	Quimera 16	NAS	NAS		
	Quimera 17	NAS	NAS		
	Quimera 18	1.71×10^{-8}	1.58×10^{-8}		
	Quimera 19	NAS	NAS		
	Quimera 20	NAS	NAS		
	Quimera 21	5.15×10^{-5}	3.07×10^{-7}		

Tabla 3. ED₅₀(M) de las diferentes quimeras [pérdida de función (1-15)] y ganancia de función (16-21)] en ausencia o presencia de zfMRA2a y en respuesta a la estimulación con ACTH o α -MSH. Solamente aquellas quimeras de pérdida de función que nunca respondieron a ACTH fueron ensayadas para α -MSH. Ver texto para más detalles. NAS Ajuste no significativo.

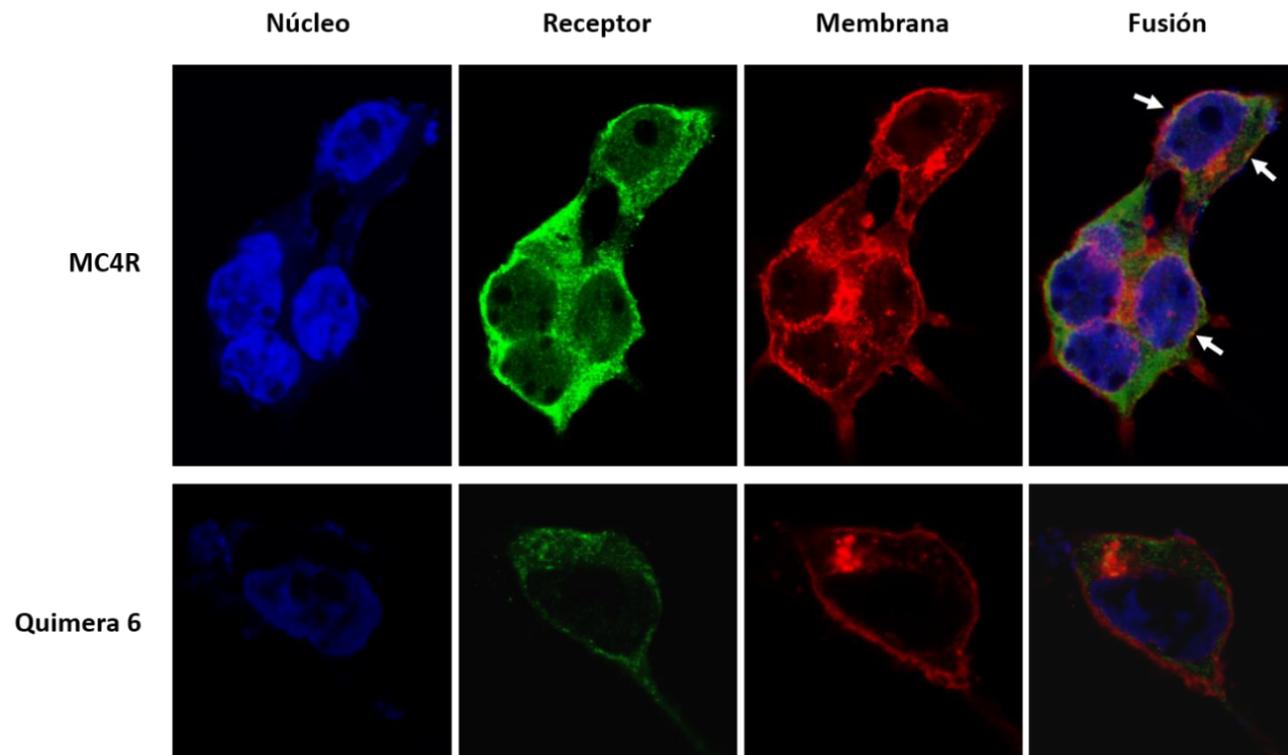


Figura 33. Imágenes de inmunofluorescencia en células vivas obtenidas a través de microscopía confocal. La presencia del receptor en la membrana plasmática se desveló gracias al marcaje del receptor o quimera con un epítipo c-Myc en su región N-terminal y tras expresión transitoria en células HEK-293. Las fotografías se tomaron con un objetivo de 60X y provienen de una única sección óptica tras adquisición de z-stacks con una resolución de 10 μm por corte. La membrana fue marcada con aglutinina de germen de trigo acoplada al fluorocromo Alexa Fluor 633 (rojo), el núcleo se marcó con Hoechst 33342 (azul) y la presencia del receptor se reveló con un anticuerpo secundario de cabra construido frente a las anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (verde). Las flechas indican zonas de colocalización potencial entre el marcador de membrana y el receptor.

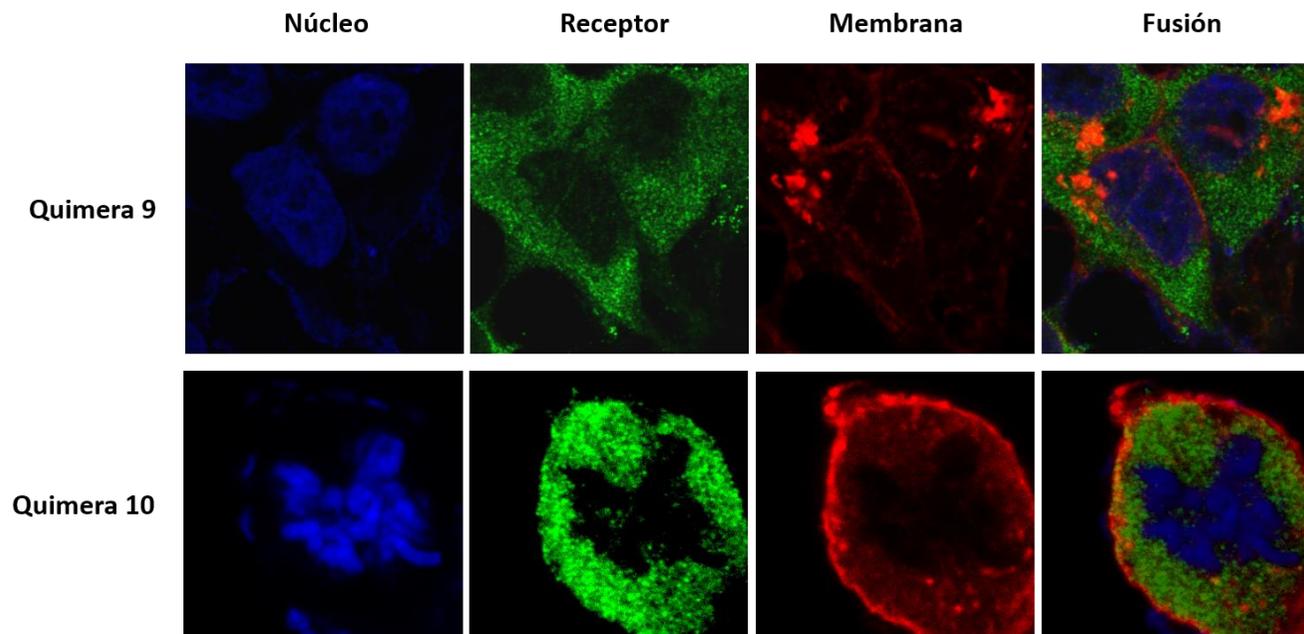


Figura 33 (continuación)

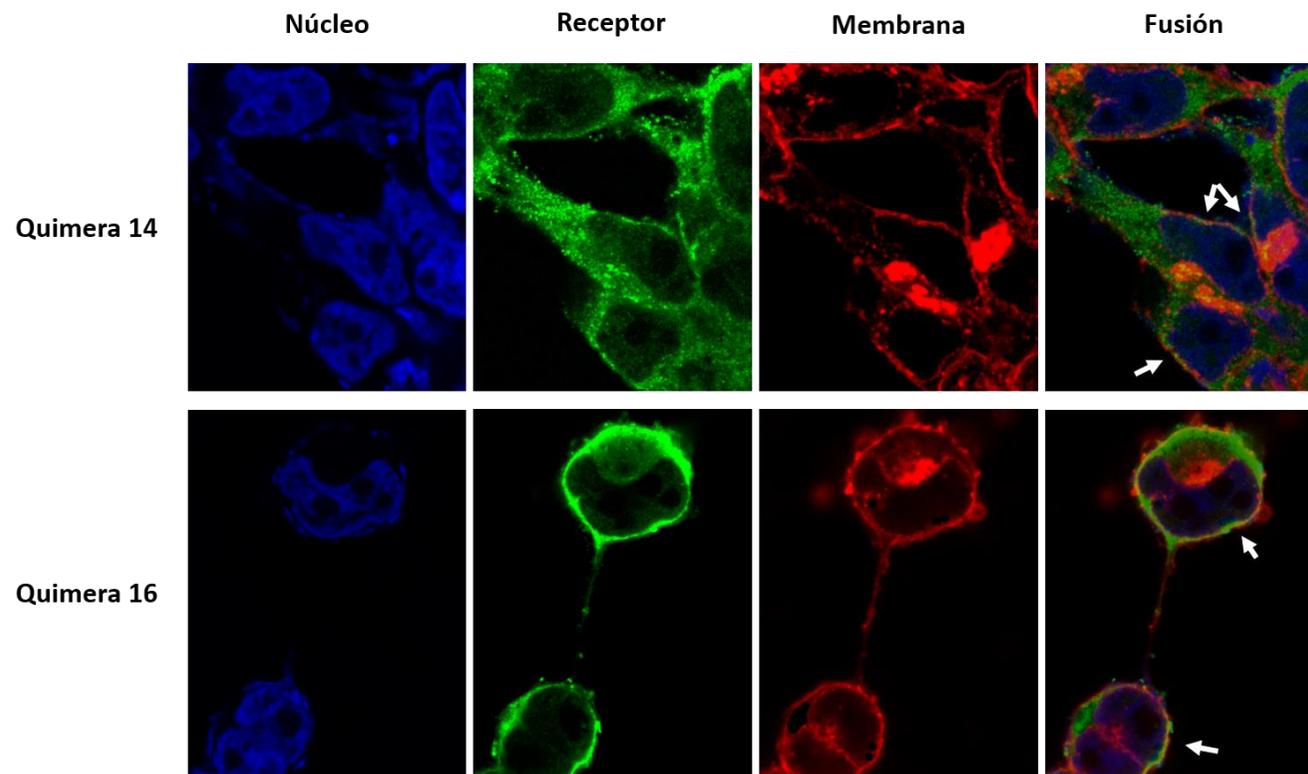


Figura 33 (continuación)

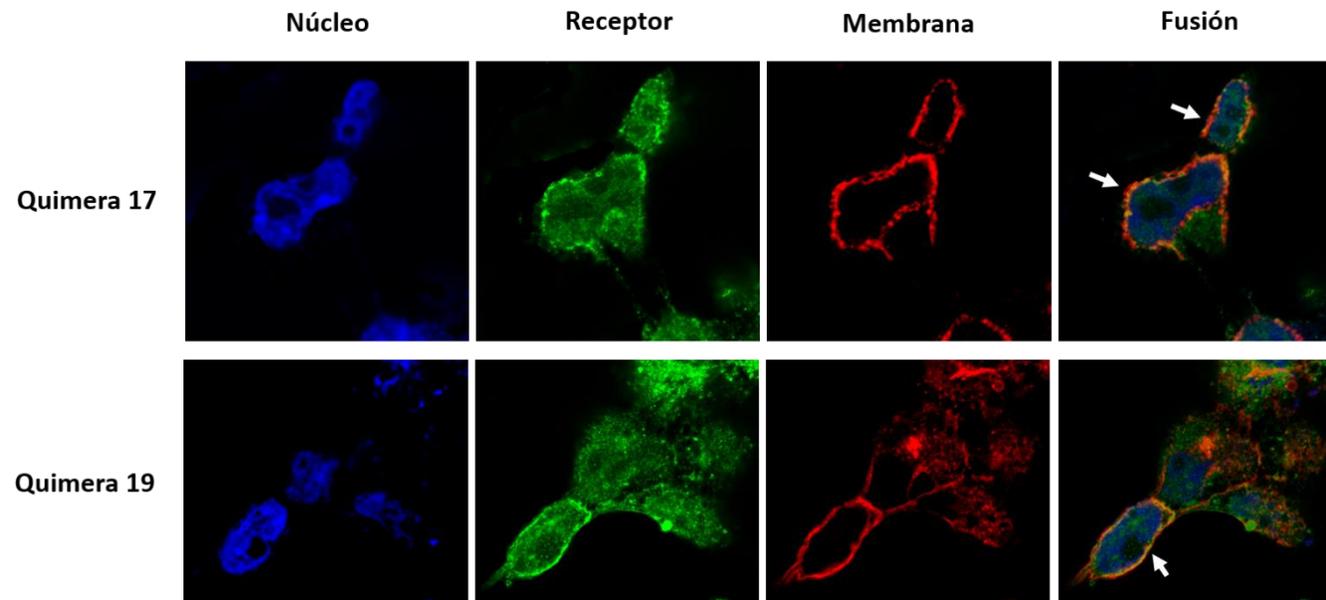


Figura 33 (continuación)

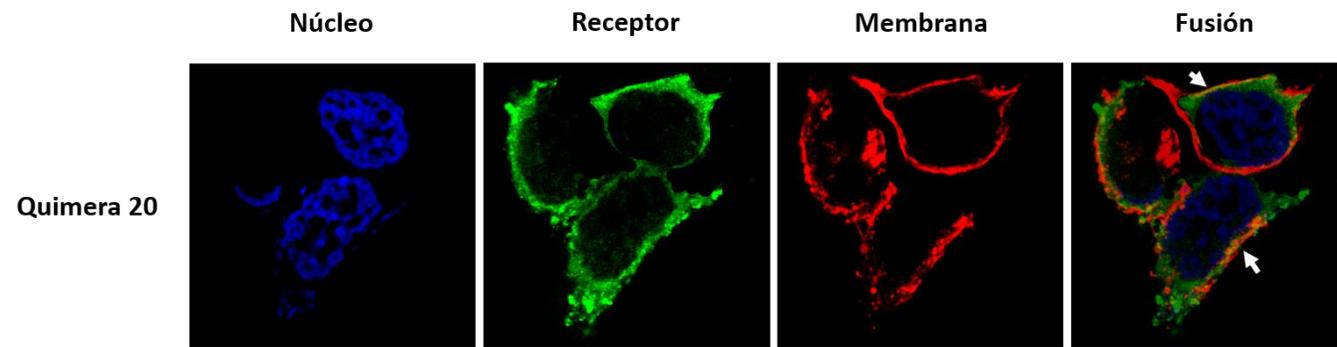


Figura 33 (continuación)

4.3. Efecto del sexo y los esteroides sexuales sobre la actividad circadiana locomotora del pez cebra

4.3.1. Niveles de esteroides sexuales en peces alimentados con piensos hormonados

Para corroborar la presencia en plasma de los esteroides sexuales administrados de forma oral a través del alimento se evaluaron los niveles plasmáticos de 17- β estradiol y 11 cetotestosterona (11-CT), de cinco animales alimentados durante 10 días consecutivos. Como muestra la Figura 34 los niveles de ambas hormonas en los grupos experimentales fueron diferentes de sus grupos control tras el análisis estadístico por t-student $p < 0.05$. Si bien cabe destacar que los niveles basales de 17- β estradiol fueron muy superiores a los niveles basales de 11-CA.

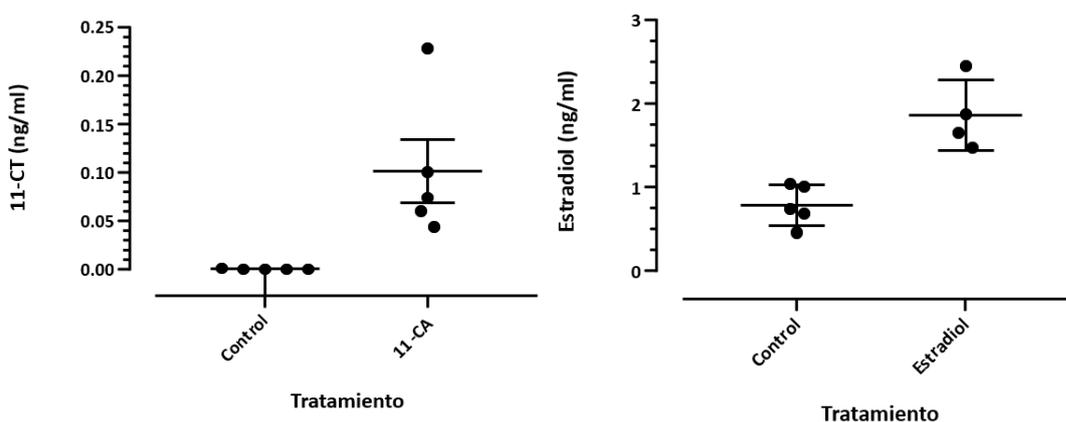


Figura 34. Niveles hormonales plasmáticos en peces cebra tras 10 días consecutivos de alimentación con piensos hormonados conteniendo 11-CA (panel izquierdo) o 17- β estradiol (panel derecho).

4.3.2. Análisis del efecto del sexo y las hormonas esteroideas sobre la actividad locomotora del pez cebra

Durante el periodo de adaptación de 7 días se registró la actividad locomotora de todos los tanques experimentales. A partir de ese momento, las hembras experimentales fueron alimentadas con pienso conteniendo 11-CA mientras que los machos comieron pienso suplementado con estradiol.

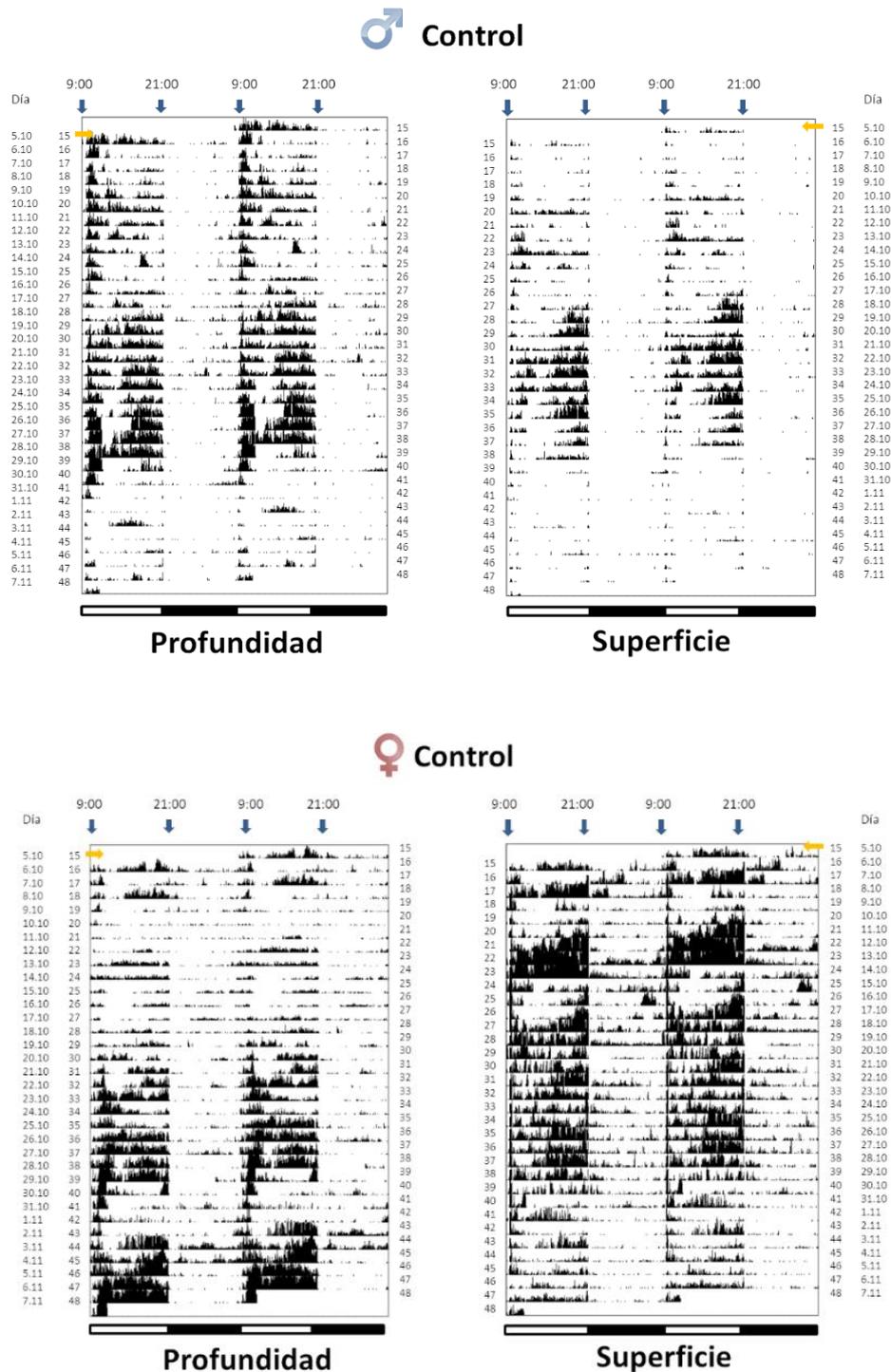


Figura 35. Actograma que refleja la actividad locomotora de machos (paneles superiores) y hembras (paneles inferiores) en profundidad (paneles izquierdos) y superficie (paneles derechos) alimentados con pienso standard durante 33 días consecutivos. Los actogramas son doblemente dibujados para una mejor visualización (escala temporal 48 horas). Cada punto representa el número de interrupciones del haz de luz infrarroja integrados cada 5 minutos. Cada línea horizontal representa un día experimental a lo largo del eje vertical y el Zeitgeber (tiempo) se representa en el eje horizontal. El fotoperiodo se fijó en un régimen 12L/12O y las luces se encendieron y apagaron a las 9.00 y 21.00, respectivamente. Las flechas azules marcan las horas de encendido y apagado de las luces. La flecha amarilla el inicio de la alimentación suplementada en los grupos experimentales.

La actividad de los grupos de peces se registró durante 33 días adicionales. La figura 35 recoge los actogramas de los animales control.

Ambos grupos, machos y hembras, exhiben ritmos circadianos con una actividad fundamentalmente diurna. Las hembras, en general, muestran mayor actividad que los machos ($P < 0.01$), un efecto que es más patente en la superficie del tanque. Además, durante la fase oscura los machos son prácticamente inactivos mientras que las hembras presentan cierto nivel de actividad siendo, otra vez, más patente en la superficie. Paralelamente, las hembras alimentadas con piensos que contienen 11-CA muestran una reducción significativa de su actividad, tanto en superficie como en profundidad, durante ambas fases lumínicas ($P < 0.01$) (Figura 36) comparado con las hembras no tratadas. Este patrón de actividad se asemeja mucho más al observado en los machos control (Figura 35).

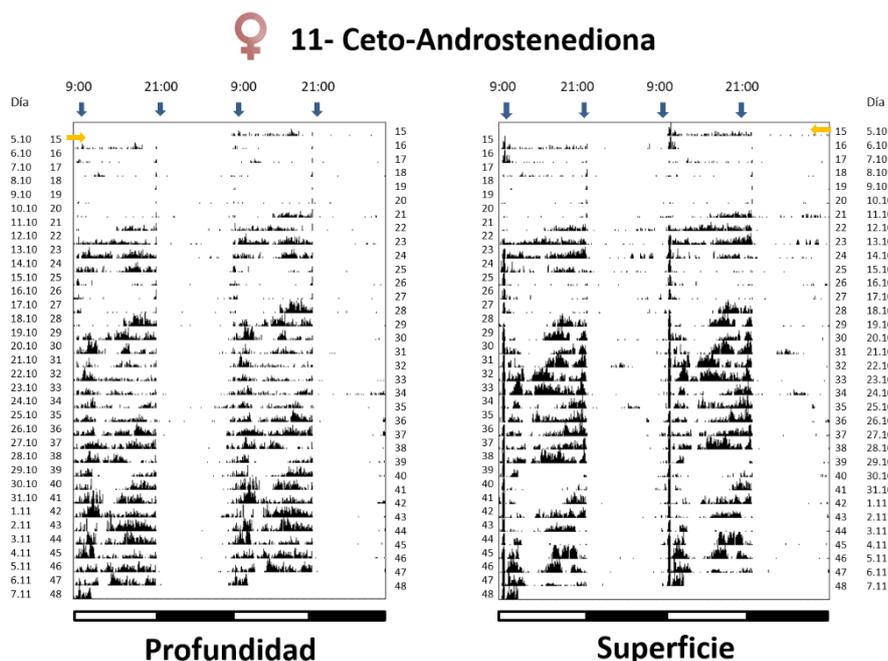


Figura 36. Actograma que refleja la actividad locomotora de hembras en profundidad (panel izquierdo) y superficie (panel derecho) alimentadas con pienso suplementado con 11-CA durante 33 días consecutivos. Las flechas azules marcan las horas de encendido y apagado de las luces. La flecha amarilla el inicio de la alimentación suplementada en los grupos experimentales. Ver Figura 35 para más detalles.

Por el contrario, los machos alimentados con pienso conteniendo estradiol disminuyen su actividad total mostrando diferencias significativas ($p < 0.01$) (Figura 37) con los machos no tratados, pero aumentan su actividad durante el periodo nocturno ($p < 0.05$) comparado con los machos no tratados y asemejándose, en este caso, a las hembras control (Figura 35).

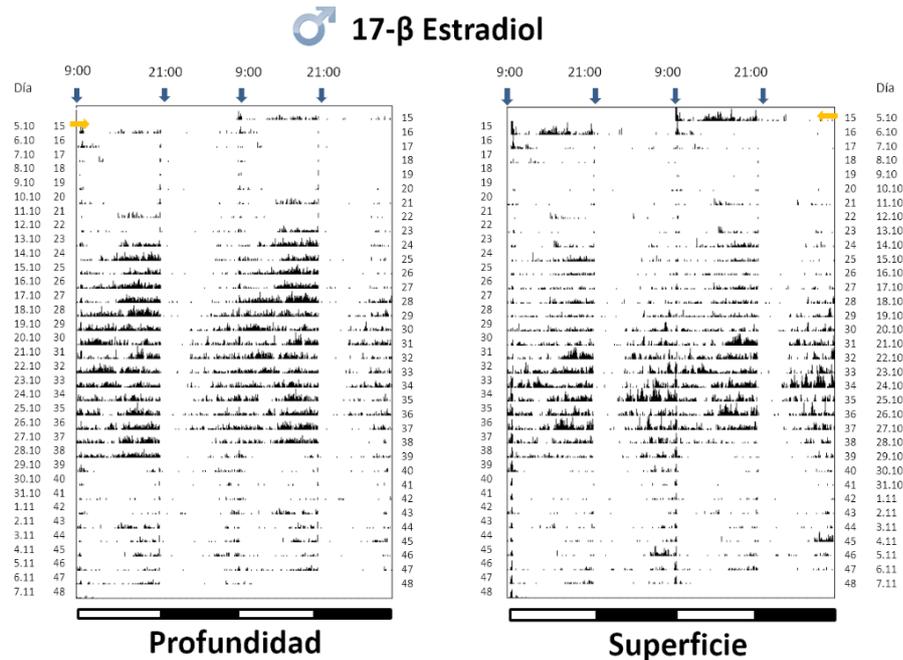


Figura 37. Actograma que refleja la actividad locomotora de machos en profundidad (panel izquierdo) y superficie (panel derecho) alimentados con pienso suplementado con 17-β estradiol durante 33 días consecutivos. Las flechas azules marcan las horas de encendido y apagado de las luces. La flecha amarilla el inicio de la alimentación suplementada en los grupos experimentales. Ver Figura 35 para más detalles.

4.3.3. Análisis del efecto del sexo y las hormonas esteroideas sobre los niveles de expresión génica en diferentes tejidos del pez cebra

Las variaciones en los patrones de actividad locomotora entre machos y hembras y tras la administración de esteroides sexuales hace presuponer la existencia de diferencias de expresión en los componentes génicos del reloj circadiano. Con el fin de evaluar los efectos medimos los niveles de expresión génica de *per1b*, *clock1*, *bmal1* y *cry1a* en diferentes tejidos como son: cerebro, hígado, testículo (machos) y ovario (hembras).

En el **cerebro**, el gen *clock1* no muestra variaciones diarias significativas en machos control o alimentados con 17-β estradiol. Por el contrario, se detectaron variaciones diarias en hembras, tanto control como tratadas con 11-CA, alcanzando niveles pico a ZT 9 (18.00) y ZT 15 (0:00). Además, las hembras tratadas con esteroides masculinos exhibieron una inhibición de la variación diurna manifestada como una disminución significativa de los niveles de expresión en los ZT donde se alcanza los máximos de expresión (ZT 9 y ZT 15).

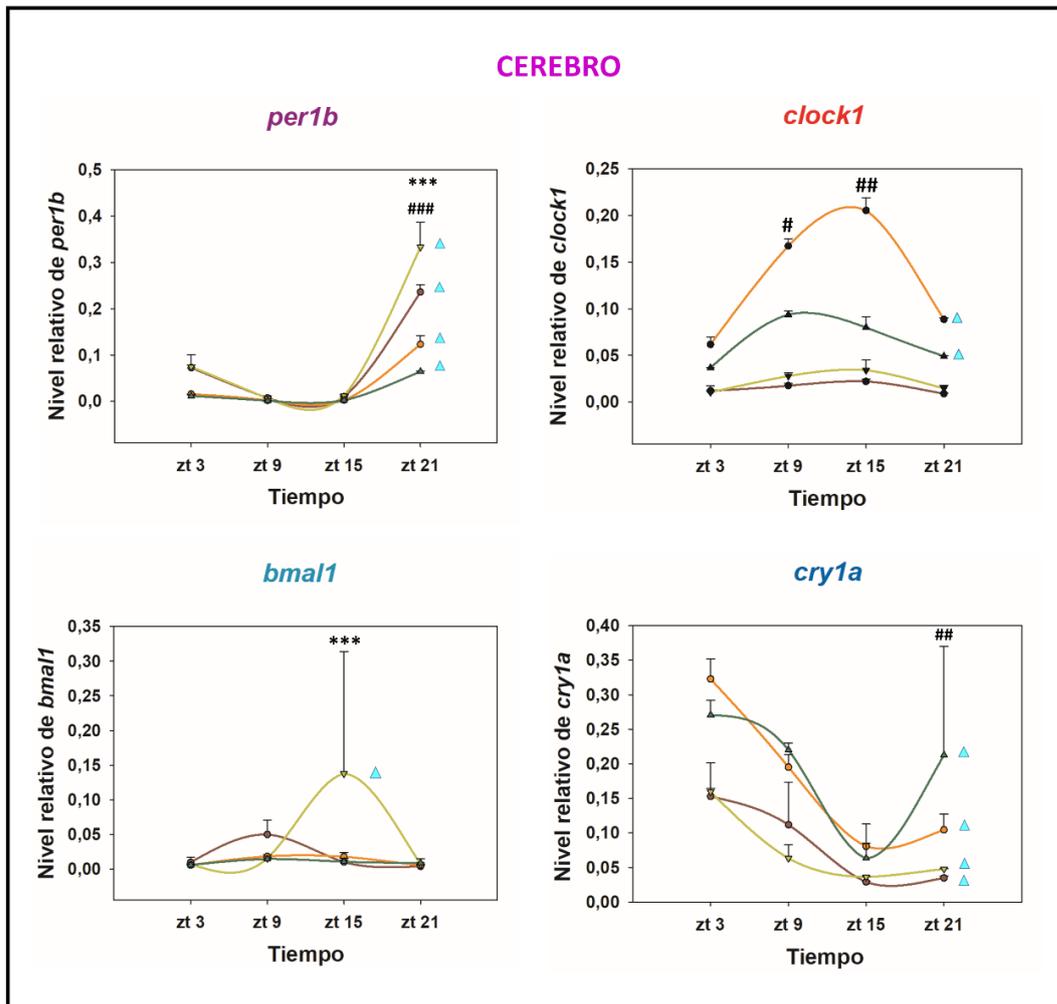


Figura 38. Análisis cuantitativo por qPCR de la expresión de diferentes genes del reloj circadiano: *per1b*, *clock1*, *bmal1* y *cry1a* en cerebro. Los asteriscos y almohadillas indican las diferencias significativas entre el grupo de machos control y tratado con estradiol y el grupo de hembras control y tratadas con 11-ceto-androstenediona respectivamente, tras ANOVA (* / # $p < 0.05$, ** / ## $p < 0.01$ y *** / ### $p < 0.001$). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los triángulos azules indican las diferencias significativas en las variaciones diarias de expresión de cada gen. El color marrón, machos control; amarillo, machos tratados con estradiol; naranja, hembras control y verde, hembras tratadas con 11-CA.

El gen *per1b* mostró variaciones significativas en todos los casos alcanzando los máximos niveles de expresión a ZT 21 (6:00 am). El tratamiento hormonal indujo un incremento significativo de niveles pico de expresión a ZT 21 en el caso de los machos; mientras que en el caso de las hembras, el tratamiento hormonal produjo una disminución de los niveles pico de expresión. Algo similar ocurrió con los niveles de expresión de *cry1a*, el cual mostró siempre variaciones significativas con los niveles inferiores de expresión en ZT 15 (0.00 am). Esta vez, solamente el tratamiento con 11-CA en hembras fue capaz de inducir diferencias significativas respecto a su grupo control. Finalmente, *bmal1* solamente exhibió diferencias significativas en machos tratados con 17- β estradiol y mostró un pico de expresión significativo a ZT 15 (0:00 am) (Figura 38).

A nivel **hepático** los perfiles son similares, pero evidentemente con matizaciones. En el caso del gen *clock1* existen diferencias entre sexos, pero inversas a las detectadas en el cerebro. Es decir, esta vez las variaciones diarias en su expresión aparecen en machos, tanto control como tratados, pero en ningún caso en las hembras. En los machos el tratamiento hormonal incrementa la amplitud de la variación diaria mostrando diferencias significativas con los machos no tratados a ZT 9 (18:00), ZT 15 (0:00) y ZT 21 (6:00) (Figura 39). En el caso del gen *per1b*, solamente los machos presentan variaciones significativas que son potenciadas por el tratamiento hormonal con 17- β estradiol presentando los niveles máximos a ZT 21 (6:00). Por su parte, las variaciones en *bmal1* son similares a las de *per1b*, desde el punto de vista que solamente los machos, bien control o tratados, exhiben variaciones diarias significativas. El tratamiento hormonal potencia la amplitud de la variación, pero también produce una anticipación de los niveles máximos desde ZT 15 (0:00) a ZT 9 (18:00). Finalmente, la expresión hepática del gen *cry1a* presenta variaciones diarias significativas en todos los casos, exhibiendo niveles valle a ZT 15 (0:00). El tratamiento hormonal indujo diferencias significativas a ZT 9 (18) y ZT 21 (6:00) tanto en hembras tratadas con andrógeno como en machos tratados con estrógeno (Figura 39).

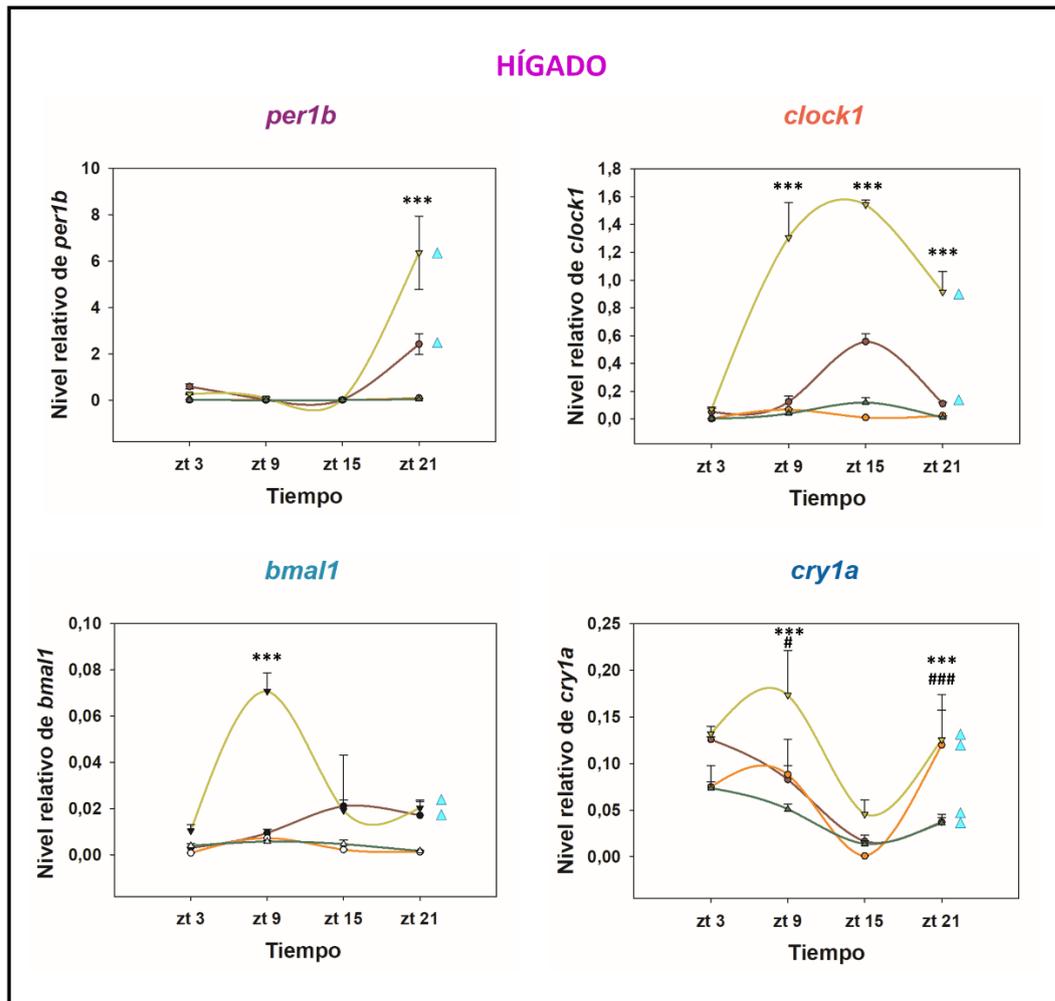


Figura 39. Análisis cuantitativo por qPCR de la expresión de diferentes genes del reloj circadiano: *per1b*, *clock1*, *bmal1* y *cry1a* en el hígado. Ver Figura 38 para más detalles.

A **nivel gonadal** también se detectaron variaciones diarias significativas, así como diferencias inducidas por el tratamiento con esteroides sexuales. En el **ovario**, el gen *clock1* presentó variaciones diarias significativas solamente en los animales tratados con 11-CA, exhibiendo niveles máximos a ZT 9 (18:00) y ZT 15 (0:00). La expresión de *per1b* exhibió variaciones solo en el grupo de las hembras control y el patrón de expresión diario fue diferente en ambos grupos. En las hembras control, el máximo de expresión aparece ZT 3 (12:00) mientras que los niveles valle se detectaron a ZT 15 (0:00), este patrón fue invertido por el tratamiento con 11-CA ya que en las hembras tratadas el pico de expresión

aparece en ZT 15. La expresión de *bmal1* no presentó diferencias significativas. Finalmente, la expresión de *cry1a* exhibió diferencias diarias en ambos casos, hembras tratadas y no tratadas, sin efecto significativo del tratamiento hormonal (Figura 40).

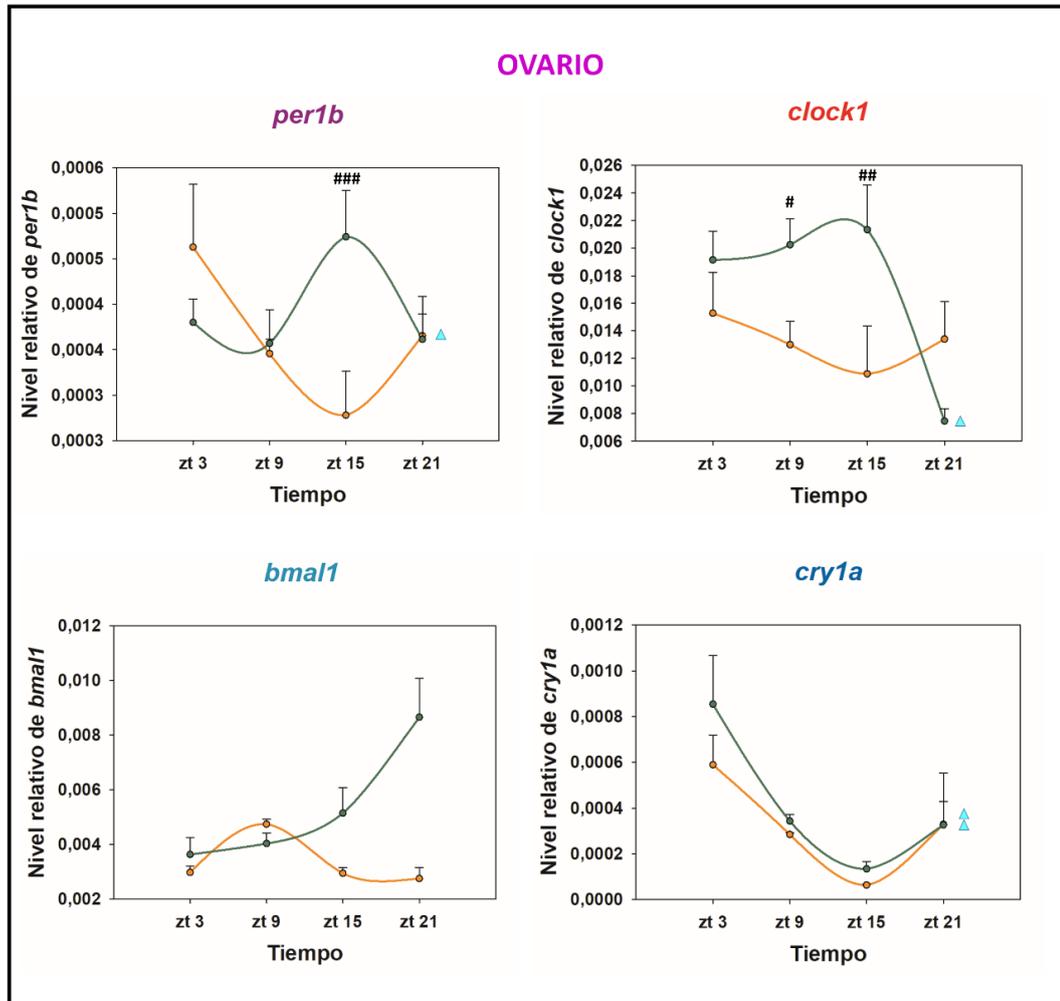


Figura 40. Análisis cuantitativo por qPCR de la expresión de diferentes genes del reloj circadiano: *per1b*, *clock1*, *bmal1* y *cry1a* en el ovario. Ver Figura 38 para más detalles.

En el **testículo**, *clock1* solamente exhibió variaciones diarias en los machos tratados con estradiol, exhibiendo los niveles de expresión máxima a ZT 15 (0:00) (Figura 41). Por el contrario, *per1b* presentó variaciones diarias significativas en ambos casos, machos tratados y no tratados, aunque el tratamiento hormonal indujo un aumento de la amplitud de respuesta a ZT 9 (18:00), ZT 15 (0:00) y ZT 21

(6:00). Los niveles de expresión de *bmal1* solamente presentaron variaciones diarias significativas en los animales sin tratamiento, y por tanto estas variaciones fueron abolidas por el tratamiento hormonal. Finalmente, el perfil de expresión de *cry1a* fue similar al detectado en el ovario con niveles máximos en ZT 3 (12:00) aunque esta vez el tratamiento hormonal indujo una disminución significativa de la expresión en ZT 9 (18:00) (Figura 41).

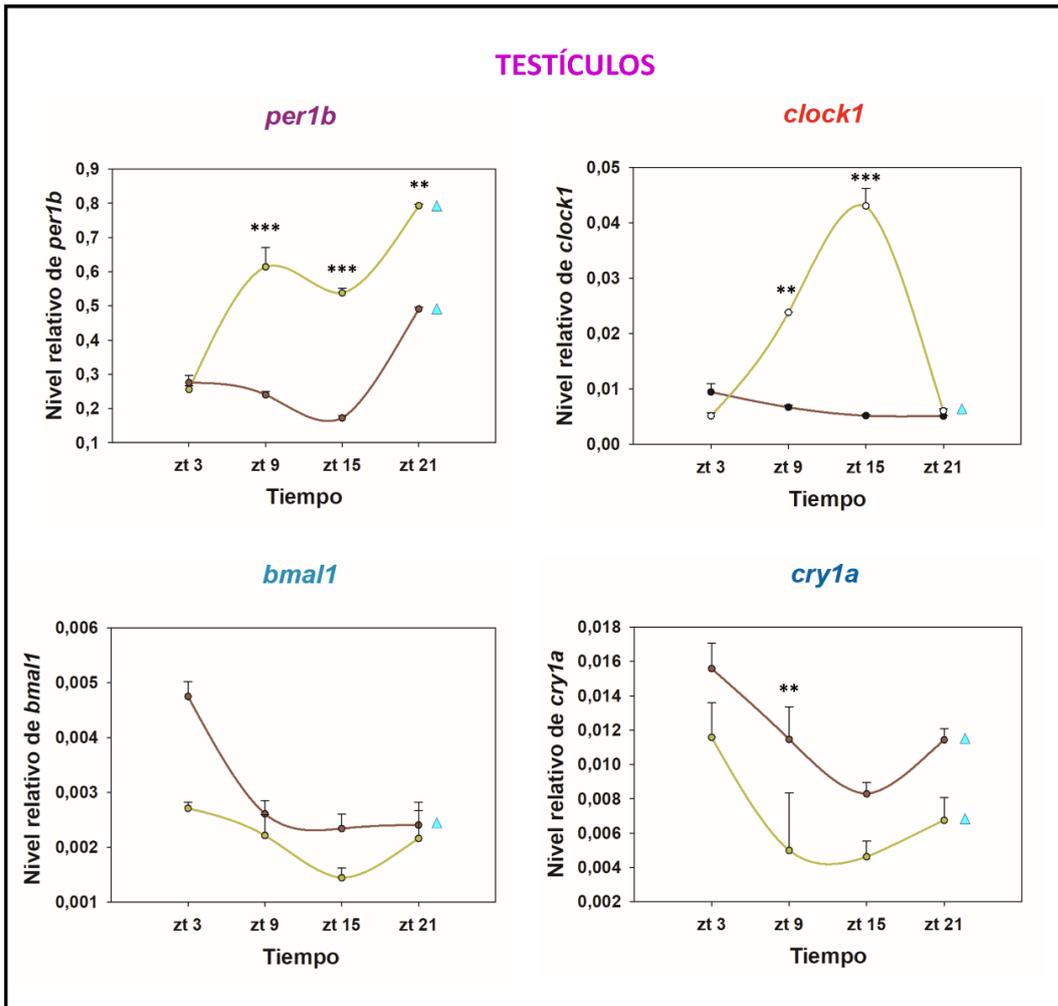


Figura 41. Análisis cuantitativo por qPCR de la expresión de diferentes genes del reloj circadiano: *per1b*, *clock1*, *bmal1* y *cry1a* en testículo. Ver Figura 38 para más detalles.

4.4. Efecto de la sobreexpresión de antagonistas endógenos de melanocortinas sobre la actividad locomotora del pez cebra

Para evaluar el efecto de las melanocortinas sobre la expresión de LARC utilizamos una cepa de peces cebra transgénicos que sobre-expresan el gen *asip1*, un antagonista endógeno de los receptores de melanocortinas.

Para ello analizamos los patrones de actividad locomotora de tres grupos de peces transgénicos (ASIP) y tres grupos de peces salvajes (WT) utilizando un sistema similar al anteriormente empleado para la determinación del efecto de los esteroides sexuales. Como se observa en la Figura 42 los tres grupos de peces salvajes exhiben un ritmo circadiano con un periodo cercano a las 24 horas. Sin embargo, este ritmo se mitiga hasta prácticamente desaparecer, como indican los periodogramas, en los tres grupos de peces transgénicos que exhiben mucha más movilidad durante el periodo nocturno. Algo que se observa con mayor facilidad en la Figura 43 que reúne los datos conjuntos de los tres grupos control y experimentales. En realidad, la comparación de datos mediante *t-student*, demuestra que los animales ASIP se mueven aproximadamente un 10% más durante el periodo de 24 horas ($p=0.0351$). Si analizamos estas diferencias durante el ciclo día/noche se observa que, en realidad, los animales WT se mueven un 25% más que los peces ASIP durante la fase luminosa del fotoperiodo ($p<0.0001$) pero por el contrario los animales ASIP se mueven, aproximadamente, un 300% más durante el periodo nocturno ($p<0.0001$). Las comparaciones cuantitativas se pueden apreciar mejor en la Figura 44.

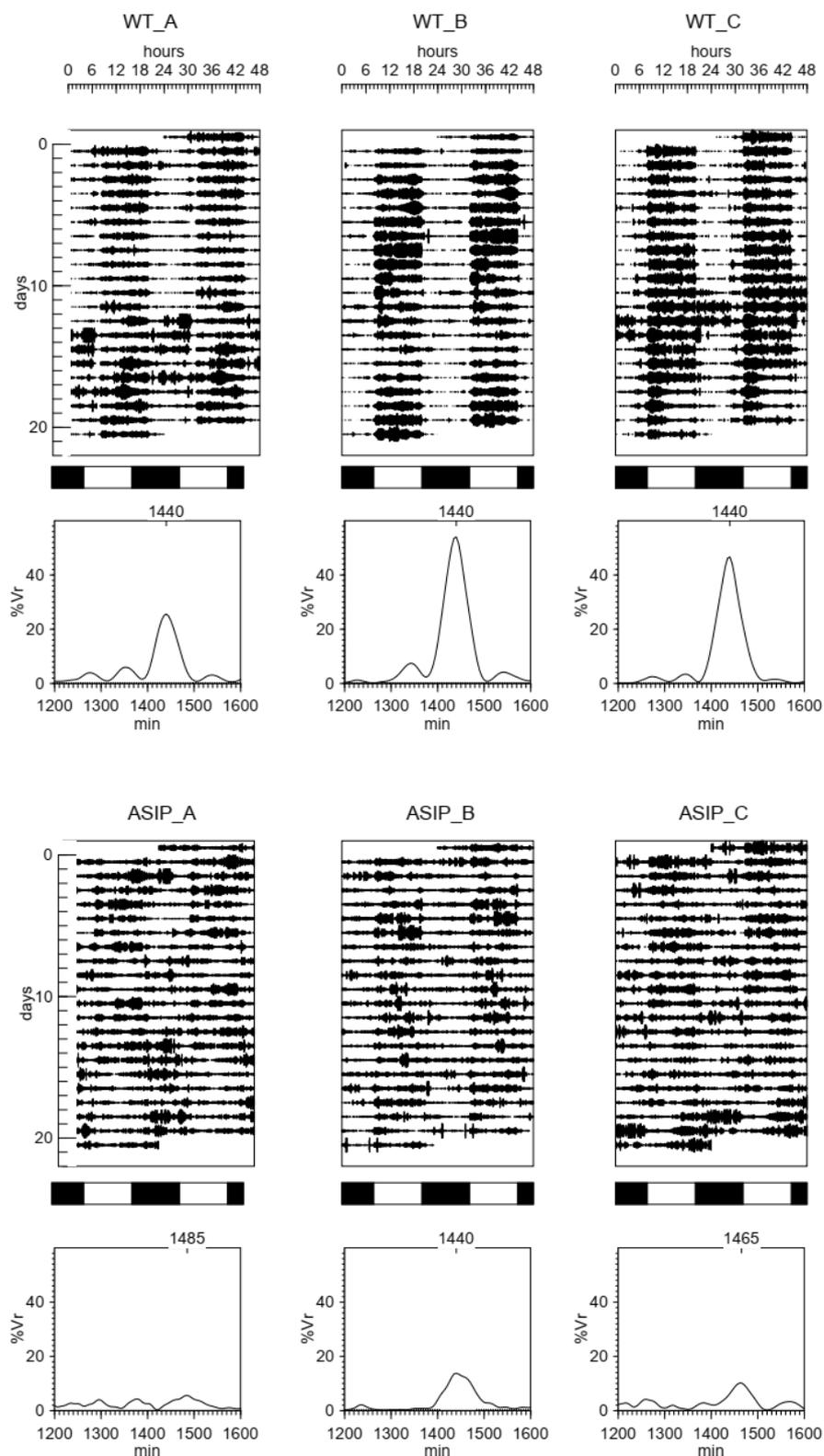


Figura 42. Actogramas que reflejan la actividad locomotora de tres grupos de animales salvajes (WT, paneles superiores) y tres grupos de peces transgénicos sobre-expresando en gen *asip1* (ASIP, paneles inferiores) durante 21 días. Los periodogramas se analizaron con los datos de las figuras superiores, el eje vertical muestra el porcentaje de varianza de los datos que puede ser explicado mediante el ajuste según el método Sokolove-Bushell y en el eje horizontal el tiempo en minutos (1440 min = 24 horas). La barra inferior muestra la fase oscura del fotoperiodo, encendido y apagado a las 8.00 y 20.00, respectivamente.

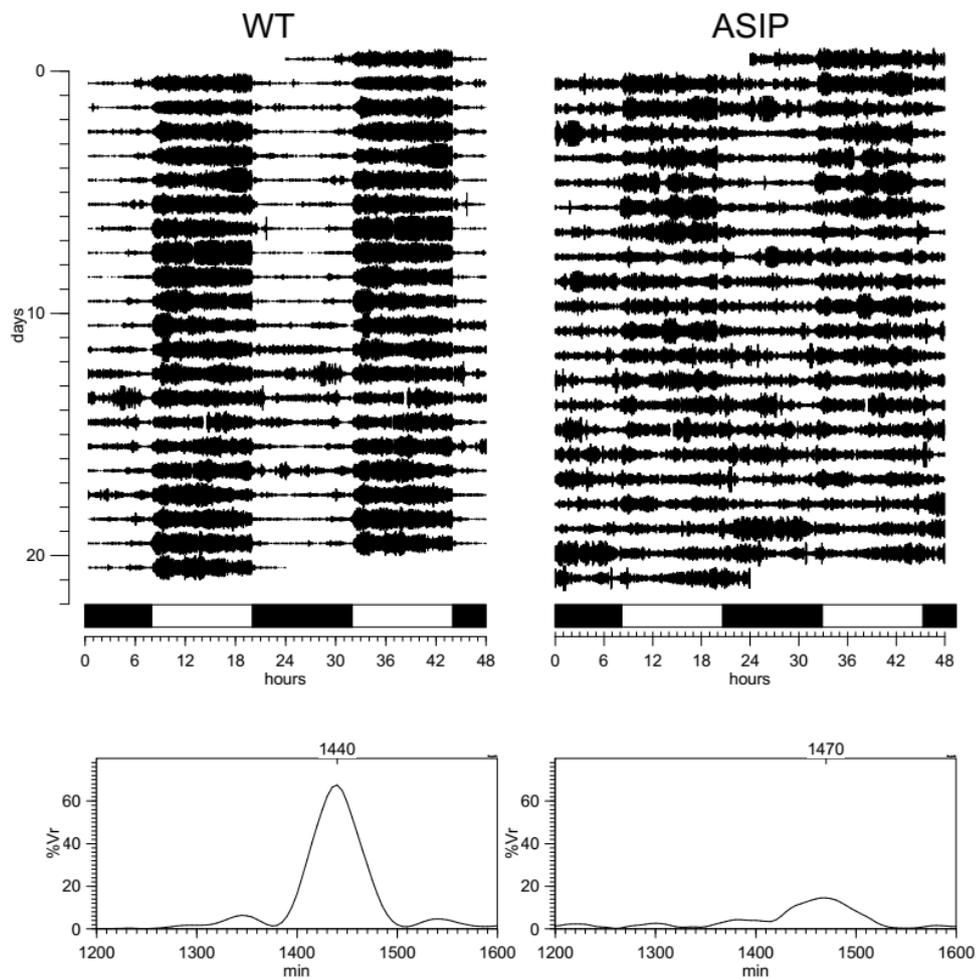


Figura 43. Actogramas (paneles superiores) que reflejan la actividad locomotora media de los grupos de animales salvajes (WT) y transgénicos (ASIP) mostrados en la figura 41 durante 21 días. En los paneles inferiores se muestran los periodogramas obtenidos con los datos mostrados en los actogramas. El eje vertical muestra el porcentaje de varianza de los datos que puede ser explicado mediante el ajuste según el método Sokolove-Bushell y en el eje horizontal el tiempo en minutos (1440 min = 24 horas). Ver Figura 42 para más detalles.

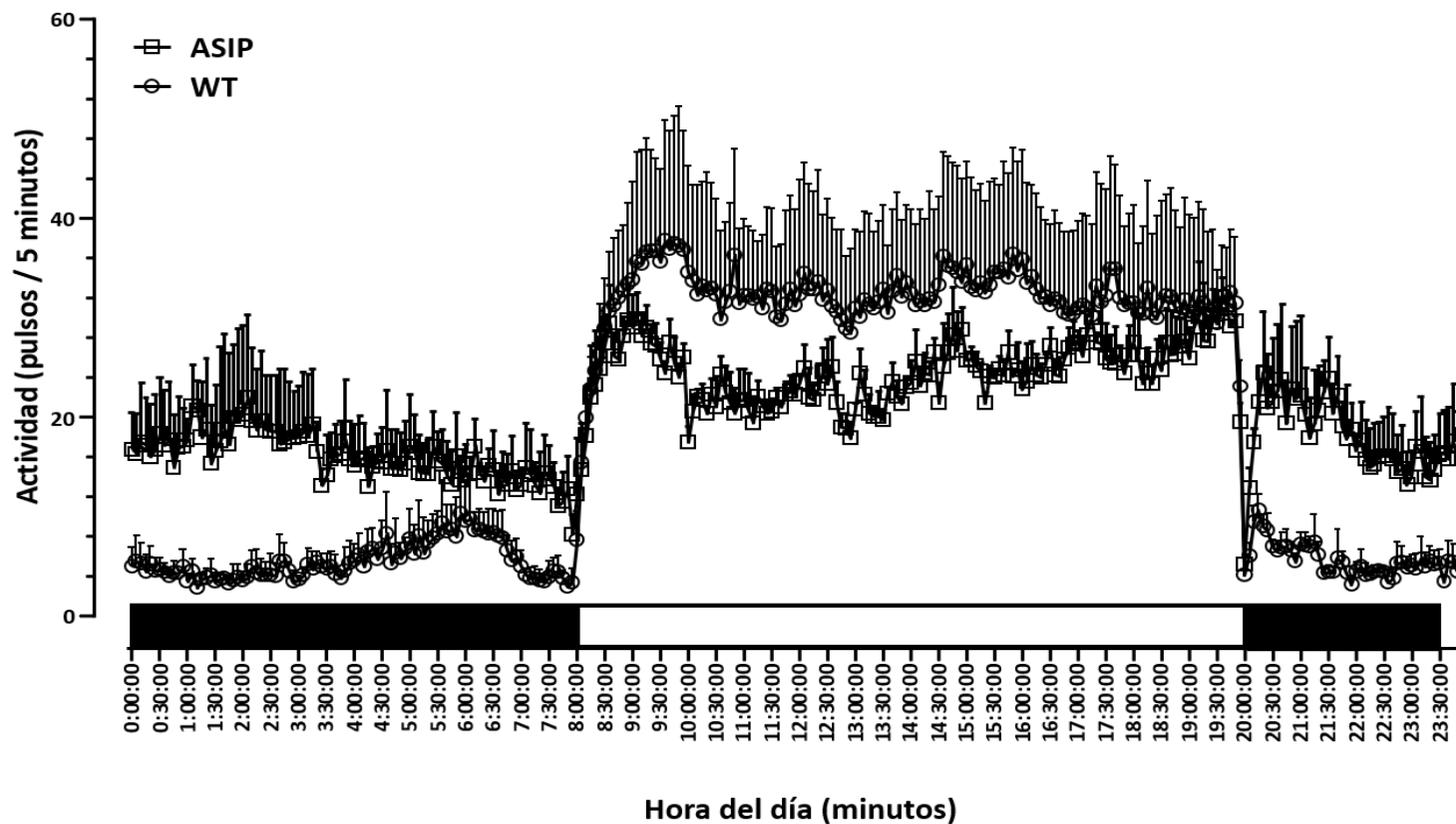


Figura 44. Onda media de la actividad locomotora en los acuarios de animales salvajes (WT) y transgénicos (ASIP) mantenidos durante 21 días bajo fotoperiodo constante (12L/12O). La barra inferior muestra la fase del fotoperiodo, encendido y apagado a las 8.00 y 20.00, respectivamente. Cada punto representa la media del número de interrupciones del haz de luz infrarroja integrados cada 5 minutos durante 21 días + SEM.

An underwater scene with a purple tint. The top of the image shows a surface with many bubbles and ripples. The water below is dark purple, with some light rays or bubbles visible. The overall mood is mysterious and serene.

5. Discusión

5.1. Conservación evolutiva de la respuesta de la sensibilidad del MC4R a la ACTH mediada por MRAP2

Nuestros estudios previos en el pez cebra demostraron que el zfMC4R, un receptor canónico de α -MSH es capaz de unir y responder a la ACTH gracias a la interacción con zfMRAP2a (Agulleiro et al., 2013). Una publicación reciente desarrollada en aves, ha corroborado nuestros estudios previos sugiriendo la conservación evolutiva de la sensibilidad a la ACTH del MC4R inducida por la MRAP2 (Zhang et al., 2017). Los resultados que aportamos demuestran que el hMC4R se comporta de la misma forma tras interacción con la hMRAP2, es decir aumenta su sensibilidad a la ACTH, lo que apoya la existencia de una función diferencial para la interacción MC4R-MRAP2 en vertebrados. Esto significa que, si la ACTH puede unirse y activar el MC4R tras interacción con MRAP2, el receptor podría mediar una respuesta al estrés independiente de la síntesis y liberación de glucocorticoides ofreciendo un sustrato molecular para la unión de la respuesta al estrés y la regulación del balance energético, pero también dotando de funciones adicionales a la ACTH mediadas por el MC4R.

La primera dificultad que se presenta ante esta hipótesis expuesta y derivada de los resultados, es que los efectos del MC4R sobre el balance energético se median a nivel central y la presencia de ACTH en el cerebro es bastante controvertida. En el cerebro de rata, el POMC se expresa fundamentalmente en el núcleo arqueado del hipotálamo y en el núcleo del tracto solitario (Bangol et al., 1999), donde se procesa principalmente hacia la síntesis de α -MSH y β -endorfina (Castro y Morrison, 1997). Algunos estudios han sugerido la presencia de inmunoreactividad a la ACTH en fracciones de cromatografía líquida (HPLC) con tiempos de elución correspondientes a la hormona (Smith y Funder, 1988) sugiriendo su presencia en el cerebro. Paralelamente, algunos estudios han sugerido la presencia de inmunoreactividad anti-ACTH en el núcleo arqueado utilizando anticuerpos específicos contra la ACTH (Hentges et al., 2009). Alternativamente, la ACTH sistémica podría alcanzar las estructuras centrales para activar las neuronas MC4R-ACTH retroalimentando así los circuitos neurales que

regulan el estrés y el balance energético transmitiendo información periférica al cerebro.

La administración de ACTH y “vigabatrina” son las únicas terapias farmacológicas permitidas por la FDA (“US Food and Drug Association”) en el tratamiento de los espasmos infantiles (IS), un síndrome epiléptico que acaece durante el desarrollo del sistema nervioso (Iacobas et al., 2013). Los efectos terapéuticos de la ACTH sistémica o intracerebroventricular persisten tras el bloqueo de los receptores de glucocorticoides, pero no tras la antagonización de los recetores de melanocortinas, lo que demuestra que los efectos de la ACTH son independientes de la liberación de esteroides adrenales generada por la administración de ACTH (Brunson et al., 2001; 2002; Iacobas et al., 2013). El MC2R, receptor natural de la ACTH tras interacción con MRAP1, no se expresa en el cerebro humano, por tanto, las neuronas centrales MC4R- MRAP2 podrían ser las dianas naturales de la ACTH periférica en el tratamiento de los IS y, por extensión, las dianas potenciales para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. La administración periférica de ACTH tiene profundos efectos sobre la actividad del sistema nervioso central. Así, los IS alteran la expresión del 30% de los genes expresados en el núcleo arqueado pero la administración periférica de ACTH es capaz de recuperar el transcriptoma de neurotransmisión a las condiciones de ausencia de IS (Iacobas et al., 2018). Apoyando la funcionalidad central de la ACTH se ha demostrado que su administración periférica reduce en un 35% la expresión de CRF en la amígdala de ratas adrenalectomizadas (Brunson et al., 2002). La administración intracerebroventricular de ACTH (4-10), el cual une el receptor de melanocortinas sin inducción de secreción de glucocorticoides, recapitula los efectos de la ACTH periférica (Brunson et al., 2001). Además, los efectos inhibitorios sobre la ingesta de la administración intracerebroventricular de ACTH en pollos (Shipp et al., 2015) y ratas (Vergoni et al., 1986) siguen abogando por un rol central para la ACTH. En pollos, la administración central de ACTH potencia la inmunoreactividad c-Fos en el núcleo arqueado, así como en el hipotálamo ventral y lateral, ambos implicados en la estimulación del hambre y la saciedad, respectivamente (Shipp et al., 2015). De forma acorde, se sabe que las neuronas

MC4R-MRAP2 están estrechamente asociadas con la regulación de la ingesta y el balance energético ya que los ratones deficientes en MRAP2 [MRAP2 (-/-)] son obesos y las mutaciones disruptivas en el genoma humano están asociadas con obesidad temprana (Asai et al., 2013). Estudios previos han demostrado que la interacción de la MRAP2/MC4R potencia la síntesis de AMPc estimulada por la activación del receptor, sugiriendo que la alteración en la señalización puede ser el mecanismo subyacente inductor de la obesidad en ratones MRAP2 (-/-) (Asai et al., 2013). Nuestros experimentos demuestran que la ACTH potencia severamente la señalización de hMC4R y zfMC4R (30-300 veces) y muy débilmente la señalización inducida por α -MSH (3 veces) y nunca alteró la actividad basal del receptor. Así pues, el complejo MRAP2/MC4R podría mediar los efectos de la ACTH sobre la ingesta, pero también podría segregar dos tipos de neuronas MC4R, aquellas que solamente responden a la α -MSH y aquellas que responden a ambas hormonas, α -MSH y ACTH, dependiendo de la presencia de MRAP2.

Nosotros también exploramos la co-expresión y localización del MC4R y MRAP2 en diferentes tejidos humanos, poniendo especial atención en aquellos tejidos que no expresan MC2R, es decir aquellos tejidos que *a priori* no pueden responder a la ACTH. La expresión del complejo MC4R/MRAP2 ofrece nuevas vías para la acción de la ACTH y, por extensión, nuevas vías para la transmisión de la información relacionada con el estrés a sistemas biológicos adicionales. El MC2R se expresa de forma cuantitativa únicamente en la glándula adrenal, aunque se pueden detectar niveles muy bajos, mediante secuenciación de RNA, en el testículo y la pituitaria. El MC4R, junto con la MRAP2 se expresan profusamente en el cerebro incluyendo la región hipotalámica. Estudios recientes llevados a cabo mediante secuenciación de RNA en células únicas han demostrado la co-localización de ambos MC3R y MC4R con la MRAP2 en el hipotálamo de ratón (Liang et al., 2018) y nuestros estudios previos en el pez cebra mostraron que ambas zfMRAP2a y zfMRAP2b co-expresan con el MC4R en el núcleo preóptico magnocelular, homólogo del núcleo paraventricular (PVN), y el núcleo lateral tuberal, homólogo del núcleo arqueado de mamíferos (Agulleiro et al., 2013). Así pues, la co-expresión hipotalámica de MC4R y MRAP2 ofrece un substrato

neuronal para los efectos centrales de la ACTH. Además, se han detectado ciertos niveles de expresión de ambos genes (MC4R y MRAP2) en el bazo sugiriendo la implicación del complejo en la regulación de la función inmune y/o hematopoyética. Interesantemente, MRAP2 mostró los niveles de expresión más elevados en el tejido vascular. Su función vascular es totalmente desconocida, pero es cierto que la MRAP2 puede modular la actividad de otros receptores acoplados a proteína G, sugiriendo la existencia de funciones desconocidas para la MRAP (Rouault et al., 2017; Srisai et al., 2017). El fenotipado exhaustivo del ratón MRAP2 (-/-) podría ayudar a desvelar las funciones fisiológicas desconocidas de la MRAP2.

Al análisis comparativo de secuencias revela la existencia de residuos conservados en todas las secuencias proteicas de MRAP2 las cuales confieren sensibilidad a la ACTH, pero no en la MRAP2b. Estos residuos son lugares de interacción potenciales entre la MRAP2 y el MC4R, o incluso la ACTH, aunque se requieren más estudios estructurales para corroborar su importancia en la adquisición de sensibilidad a la hormona mediada por la MRAP2.

En resumen, nosotros demostramos que la ACTH es un potente agonista del MC4R cuando este se co-expresa con la MRAP2. Ambas proteínas co-localizan en las neuronas hipotalámicas ofreciendo un substrato neuronal para la acción central de la ACTH central y/o periférica pero también apoyando la existencia de un substrato neuronal y ofreciendo bases moleculares para la existencia de efectos de la ACTH sobre el estrés independientes de la síntesis de glucocorticoides (Figura 45). Finalmente, también sugerimos que las neuronas MC4R/MRAP podrían ser la diana central de la ACTH periférica suministrada en los tratamientos de la IS, dotando alternativas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos.

5.2. Identificación de dominios implicados en la sensibilización del MC4R a la ACTH mediada por la MRAP2

Las mutaciones en el MC4R son la causa más común de obesidad monogénica en humanos (van der Klaauw y Farooqi, 2015). La importancia e

incidencia económica de dicha enfermedad y la necesidad del conocimiento estructural del receptor para el diseño de agonistas y antagonistas han hecho proliferar estudios sobre la conformación molecular de los receptores de melanocortinas. Estos estudios inicialmente estuvieron basados en el análisis farmacológico de diferentes mutaciones dirigidas a lugares estructurales específicos junto con experimentos de modelación tridimensional basados en la estructura cristalográfica de la bacteriorodopsina (Prusis et al., 1995; Haskell-Luevano et al., 1996). Estudios más recientes han utilizado como molde, en los ajustes de modelación predictivos, la estructura cristalográfica del receptor de esfingosina 1-fosfato (S1PR) S1PR1 que presenta una similitud del 50% con el MC4R en las regiones transmembranales y características estructurales únicas de los dos receptores (Saleh et al., 2018). De forma similar, los estudios de interacción molecular entre la MRAP1 y el MC2R dirigidos a la identificación de regiones críticas en el receptor para la interacción con su proteína accesoria son escasos (Roy et al., 2012; Fridmanis et al., 2010; Cooray et al., 2011; Hinkle et al., 2011; Yang y Harmon, 2020). Y solamente un estudio ha enfocado las interacciones moleculares entre MRAP2 y MC4R (Saleh et al., 2018; Heyder et al., 2019).

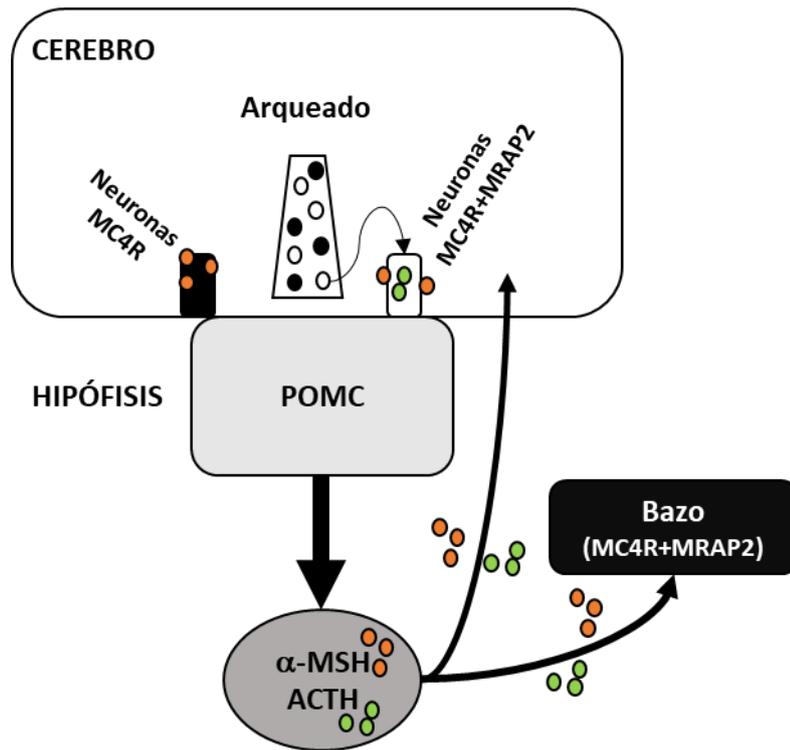


Figura 45. Esquema mostrando las posibles interacciones entre la ACTH y las neuronas MC4R/MRAP2. El POMC se expresa fundamentalmente en la hipófisis y en el núcleo arqueado del hipotálamo. En las células corticotropas de la hipófisis, el POMC se procesa hacia la producción de ACTH mientras que en el núcleo arqueado se escinde en α -MSH y β -endorfina. Sin embargo, algunos estudios cromatográficos e inmunológicos apoyan la presencia de ACTH en el hipotálamo de rata. A causa de que el MC2R no se expresa en el cerebro, las neuronas MC4R/MRAP2 son candidatos para mediar los efectos centrales de la ACTH, como demuestran los efectos inhibitorios de la ingesta de las inyecciones intracerebroventriculares de la hormona en pollo y rata (ver texto para referencias). Alternativamente la ACTH hipofisiaria podría alcanzar las estructuras centrales, activando así las neuronas MC4R/MRAP2 y transmitiendo información periférica relacionada con el estrés. La ACTH es el único tratamiento aprobado por la US-FDA (“Food and Drug Association”) para el síndrome de espasmos infantiles (IS). La administración periférica resulta en cambios transcriptómicos dependientes de las melanocortinas en el núcleo arqueado sugiriendo los efectos centrales de la ACTH periférica. Así pues, nosotros proponemos que las neuronas centrales MC4R/MRAP2 son la diana de la ACTH periférica en el tratamiento de los IS, dotando así de una alternativa para el desarrollo de fármacos terapéuticos de la enfermedad infantil.

Los modelos de unión agonista-receptor generados a partir de la modelación por homología utilizando la estructura cristalina de la bacteriorodopsina, así como estudios de mutagénesis dirigida entre el agonista NDP-MSH y el hMC1R defienden que la secuencia nuclear de las melanocortinas H⁶F⁷R⁸W⁹ es la que realmente interacciona con el receptor quedando los extremos N y C-terminal expuestos al exterior y sin interacción en la formación del complejo ligando-receptor (Haskell-Luevano et al., 1996; Yang et al., 1997). El modelo sugiere que la

carga catiónica del tetrapéptido (arginina, R⁸) establece fuertes enlaces iónicos con las cargas aniónicas de los residuos E⁹⁴ (glutámico), D¹¹⁷ (ácido aspártico, Asp) y D¹²¹ situados en el TM2 (E⁹⁴) y TM3 (D¹¹⁷, D¹²¹) (acorde a la numeración de hMC1R), así mismo, se forman interacciones amino-aromáticas con el residuo F²⁸⁰ (fenilalanina, Phe) y enlaces de hidrógeno con el residuo N²⁸¹ (asparagina, Asn) ambos localizados en el TM7 del hMC1R. Los residuos anteriores constituyen, por tanto, un primer bolsillo de unión hidrofílico formado por los TM2, TM3 y TM7. El modelo también indica que D¹¹⁷ y D¹²¹, localizadas en el TM3, se sitúan próximos al ambiente extracelular sugiriendo que las melanocortinas no pueden penetrar de forma profunda en la porción transmembranal del dominio. Debido a la fuerza de los enlaces iónicos, este bolsillo de unión ha sido propuesto a predominar sobre otro tipo de interacciones existentes. De hecho, los experimentos de mutagénesis dirigida, substituyendo los residuos anteriores por residuos de alanina (A), indican que el agonista todavía puede unirse mínimamente al receptor sugiriendo la existencia de un segundo bolsillo de unión. La modelización tridimensional presupone la existencia de ese segundo bolsillo de unión hidrofóbico formado por los residuos F^{175, 179, 195, 196, 257, 258, 280} e Y^{182, 183} (tirosina, Tyr), situados en los dominios TM4, TM5 y TM7 que interactúan mediante interacciones aromático-aromáticas con los residuos aromáticos adyacentes a la R⁸ en NDP-MSH, es decir F⁷ y W⁹. En la modelización realizada por Pruris et al., (1997), es la H⁶ (histidina, Hys) del tetrapéptido nuclear en NDP-MSH la que interacciona como carga positiva con los aminoácidos aniónicos del bolsillo hidrofílico. Estudios más recientes llevados a cabo mediante unión cruzada covalente o “cross linking” utilizando residuos de cisteína (C) sobre el hMC4R sugieren que, aunque el residuo de H⁶ del NDP-MSH yace cercano a los residuos D¹²² y D¹²⁶ del hMC4R en el TM3, no interacciona con ellos, sino que interacciona con los propios residuos del core melanocortinérgico (F⁷R⁸W⁹) para mantener la estabilidad del péptido en su conformación bioactiva (Chapman et al., 2010).

Los estudios posteriores realizados sobre el hMC4R demostraron, aplicando la estrategia de substitución de dominios entre hMC4R y hMC2R, la importancia compartida del bolsillo hidrofílico formado por los aminoácidos de carga negativa

E¹⁰⁰, D¹²² y D¹²⁶, acorde a la numeración del hMC4R, en el TM2 y TM3 respectivamente. Pero, a diferencia del MC1R solamente los residuos en el TM6 (W²⁵⁸, F²⁶¹, H²⁶⁴) parecen críticos para la unión y activación del receptor inducida por NDP-MSH y son estos los que formarían el bolsillo hidrofóbico de la región C-terminal del hMC4R (Chen et al., 2007). Los estudios de “cross-linking” también sugieren que el residuo F⁷ en el péptido agonista forma una interacción hidrofóbica dentro del TM3 con la I¹²⁵ (Ile), aprovechando la modificación estructural o giro en el dominio inducida por la interacción de R⁸. De hecho, mutaciones naturales en el receptor humano (I125K) producen un descenso en la unión del agonista, debido a que el receptor queda atrapado intracelularmente (revisado por Tao, 2005; Tao et al., 2010). Sin embargo, este modelo no descarta las interacciones del residuo con los residuos F²⁸⁵ y Y²⁸⁷ del TM6 en el hMC4R. Por su parte, estos estudios también identificaron la interacción de los tres residuos F⁷R⁸W⁹ con H²⁶⁴ y M²⁹² (Met) del TM6 y TM7, respectivamente (Chapman et al., 2010). Independientemente, parece claro que los residuos situados en el TM2 y TM3 de los receptores de melanocortinas (hMC1R o hMC4R) son críticos en la unión del agonista NDP-MSH, al igual que en la unión de otros agonistas testados como la γ -MSH y MTII (melanotan) (Haskell-Luevano et al., 1996; Yang et al., 1997; Yang et al., 2000; Chapman et al., 2010) y perfilan a TM2 y TM3 como fundamentales en la unión y activación del receptor tras interacción con el agonista.

Estudios muy recientes realizados mediante simulación, utilizando la estructura cristalográfica del receptor de esfingosina 1-fosfato S1PR1 como molde, han caracterizado la estructura tridimensional en conformación inactiva del hMC4R (Saleh et al., 2018, Figura 46) que, a su vez, ha sido utilizada para modelar los puntos de unión de agonistas como α -MSH o el agonista cíclico RM-493 (setmelanotida) (Clement et al., 2018). Nuestros estudios de simulación han demostrado que el zfMC4R adopta una estructura similar a la del hMC4R y mantiene conservados los principales residuos para la unión de α -MSH como son E¹⁰⁰, D¹²², D¹²⁶, F²⁶¹, H²⁶⁴, y F²⁸⁴ (acorde a la numeración del hMC4R) sugiriendo que los modelos de interacción ligando-receptor establecidos para el hMC4R son perfectamente válidos en el estudio del zfMC4R (Figura 47), al menos en lo que se

refiere al núcleo central de melanocortinas ($H^6F^7R^8W^9$) presente en α -MSH y en el motivo melanocortínico N-terminal de la ACTH.

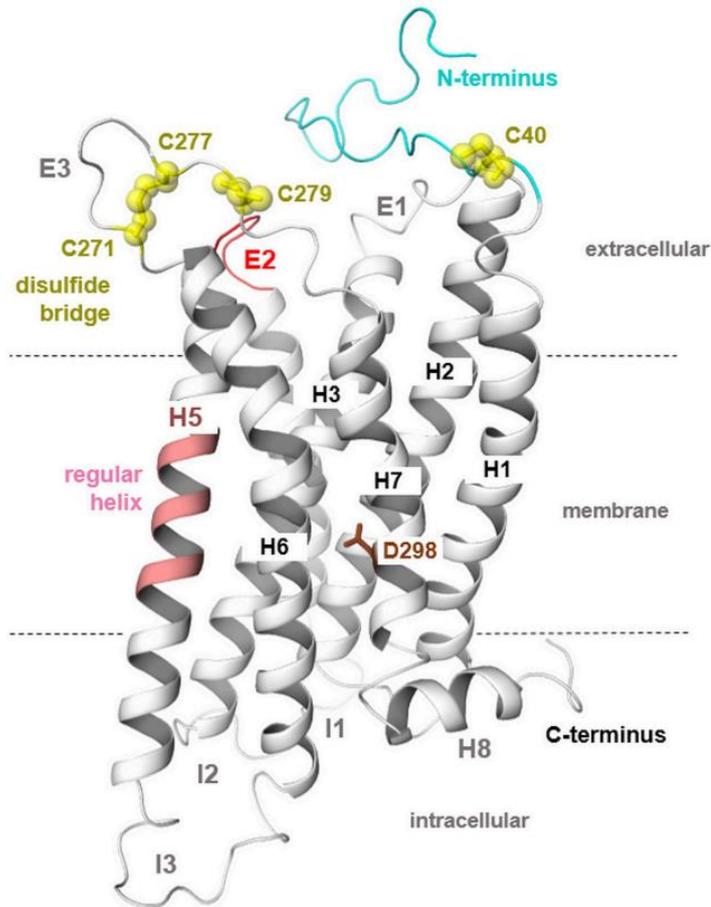


Figura 46. Estructura tridimensional por modelación en conformación inactiva potencial del hMC4R. El hMC4R presenta las características típicas de un receptor acoplado a proteína G tales como 7 dominios transmembrana en α -hélices conectadas por giros intra- y extracelulares, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular. Los residuos conservados de sus hélices están relacionados con sus propiedades estructurales comunes incluyendo pliegues y protuberancias, así como con sus interacciones intramoleculares esenciales para el desarrollo de una señal de transducción. Sin embargo, el MC4R también presenta características particulares. Por ejemplo, el ECL2 es extremadamente corto y carece del residuo de cisteína típico de los GPCRs que permite el establecimiento de un puente disulfuro con el TM3. Los residuos de cisteína (C) en E3 permiten el establecimiento de un puente disulfuro (“disulfide bridge”) en el propio giro extracelular. Además, el TM5 carece del residuo de P (prolina) en posición 50, altamente conservado en los GPCRs, que induce la aparición de un pliegue en la molécula. En su lugar MC4R presenta un residuo de M (metionina) que conlleva la aparición de un TM5 con conformación α -hélice normal (sin plegamiento). Esta característica hace cambiar la orientación del TM5 hacia la membrana afectando a las propiedades de la región de unión del ligando entre el “core” helicoidal y los giros extracelulares. H hélice, I giro intracelular o ICL, E giro extracelular o ECL [(tomado de Heyder et al., (2019)].

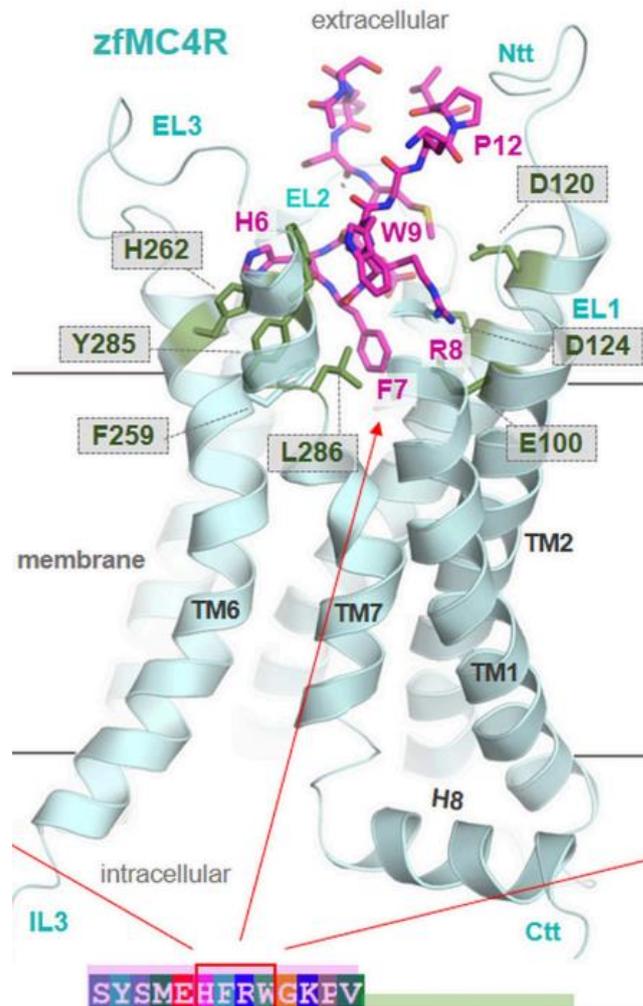


Figura 47. Estructura tridimensional por modelación del zfMC4R en interacción con α -MSH. El modelo asume que el agonista, en magenta, se localiza dentro de una hendidura delimitada por los giros extracelulares (ECL1-ECL3) y en conexión con las hélices transmembranales críticas para su unión. Las articulaciones verdes indican los residuos conservados críticos para la unión del agonista [(tomado de Heyder et al., (2019))].

Nuestro laboratorio fue el primero en describir la activación del MC4R dependiente de MRAP2 por ACTH, utilizando tanto el receptor de pez cebra (Agulleiro et al, 2013) como la variante humana (Soletto et al., 2019), al igual que, la ausencia de activación sobre el zfMC5R (Agulleiro et al., 2013) y el zfMC1R (Cortés et al., 2014). Con el fin de definir las regiones críticas en el MC4R responsables de esta activación dependiente de la MRAP2, diseñamos quimeras substituyendo diferentes dominios del MC4R por aquellos equivalentes del MC1R, esperando una pérdida de función, es decir, una pérdida de la activación por ACTH

dependiente de MRAP2. En el pez cebra existen dos parálogos de la MRAP2, la zfMRAP2a y zfMRAP2b, ambos expresados en el cerebro (Agulleiro et al., 2010) y co-localizando con el receptor en el hipotálamo tuberal, pero solamente zfMRAP2a es capaz de conferir la sensibilidad a ACTH al MC4R (Agulleiro et al., 2013). La aproximación mediante receptores quiméricos es capaz de identificar dominios de los receptores que son importantes para la farmacología única y específica de cada receptor mientras que los estudios de mutagénesis dirigida son importantes para identificar residuos que son invariablemente importantes para las características agonísticas o antagonísticas de un determinado ligando. Esta aproximación quimérica se ha utilizado satisfactoriamente en el estudio de los receptores de melanocortinas desde el axioma que todos los receptores de melanocortinas mantienen una misma arquitectura molecular (Yang et al., 2002; 2003; Chen et al., 2007). Si la sustitución produce una alteración en la activación del receptor significará que el dominio es importante en la unión del agonista y que los residuos no conservados son de especial importancia, por el contrario, una sustitución que no provoque cambios sustanciales aportará información valiosa sobre el valor de los residuos conservados. Nuestros resultados muestran que la sustitución individual de los dominios transmembranales 3, 5 y 7 resulta en una pérdida de función del receptor quimérico pero estos receptores tampoco son capaces de responder a la ACTH *per se*, sugiriendo que la sustitución podría haber provocado un cambio conformacional que inhabilita la funcionalidad del receptor. Algo similar ocurre tras la sustitución del ECL3, pero no al substituir el ECL2. En este último caso, el receptor todavía muestra una leve respuesta a la ACTH, pero no aumenta su respuesta tras interacción con zfMRAP2a. Más bien, esta desaparece. Una primera prueba de la funcionalidad de las quimeras es la actividad frente a su agonista endógeno (α -MSH) o bien algún agonista químico como la NDP-MSH. Solamente la quimera 13, en la cual substituímos el ECL3, fue capaz de responder a la NDP-MSH demostrando la funcionalidad de la quimera y sugiriendo la importancia de este dominio en la respuesta inducida por zfMRAP2a a la ACTH. Los estudios inmunohistológicos sobre la expresión celular solamente se llevaron a cabo en aquellas quimeras no funcionales llegando a la conclusión de

que todas ellas, excepto la quimera 14, que integra la sustitución de TM7, eran incapaces de alcanzar la membrana plasmática. Los resultados sugieren que el TM7 podría ser un dominio importante en la respuesta del receptor a la ACTH ya que la quimera es capaz de alcanzar la membrana plasmática sin responder a la ACTH. Sin embargo, la falta de respuesta a α -MSH y NDP-MSH (datos no mostrados) también hace considerar que la sustitución ha inducido un cambio estructural que no afecta al tráfico a la membrana plasmática, pero si a la capacidad de unión del agonista. Ciertamente, la pérdida de funcionalidad por alteraciones estructurales debidas a la sustitución de dominios es uno de los riesgos que incumbe este tipo de aproximaciones (Yang et al., 2002; 2003; 2005), sin embargo, conjuntamente con la mutagénesis dirigida (Yang et al., 2009) ha sido una de las técnicas más utilizadas para aproximar este tipo de cuestiones. En el caso de la sustitución del TM2, tanto el receptor quimérico (quimera 4) *per se* cómo co-expresado con la zfMRAP2a fue capaz de responder a la ACTH, pero en este caso la interacción con la proteína accesoria no indujo un incremento en la sensibilidad a la hormona, sugiriendo, que el TM2 podría ser un dominio importante en la adquisición de sensibilidad a la ACTH mediada por la proteína accesoria.

Nuestra siguiente aproximación en la interpretación de los datos fue intentar una ganancia de función sobre el zfMC1R transportando aquellos dominios del MC4R que podrían ser importantes sobre la adquisición de sensibilidad a la ACTH. Para ello, seleccionamos algunas combinaciones que incluyesen total o parcialmente aquellos dominios que habían inducido una pérdida de función sobre el MC4R, es decir TM3, TM5 y TM7 y ECL2 y ECL3. La sustitución de ECL2 y ECL3 fue una constante en todas las quimeras. Los resultados demuestran que solamente las quimeras que integran los TM5 y TM7 del zfMC4R, además de ECL2 y ECL3, son funcionales, pero el incremento en la sensibilidad se produce cuando el TM3 de zfMC4R está presente en la sustitución. Los datos sugieren, por tanto, que TM5 y TM7 conjuntamente con ELC2 y ECL3 son un requisito para la respuesta a la ACTH pero que TM2 y TM3 son indispensables para el aumento de la sensibilidad.

5.2.1. Importancia de los dominios extracelulares

La sustitución de la región N-terminal redujo significativamente la activación del receptor mediada por ACTH en presencia o ausencia de MRAP2a y, aunque tal reducción implicó la ausencia de ajustes logísticos significativos, el receptor todavía mostró cierta respuesta a la estimulación con el agonista en las dosis más elevadas. El segmento N-terminal en su región de transición con TM1 (C40) parece formar un puente disulfuro con ECL3 (C279), sin embargo, la mutación de ambos residuos no parece tener consecuencias funcionales para el receptor (Heyder et al., 2019). Estudios previos sugirieron que el segmento N-terminal puede actuar como un agonista intramolecular, es decir uniéndose sobre el propio receptor para inducir su actividad, siendo responsable de la actividad constitutiva del receptor (Srinivasan et al., 2004), sin embargo, las sustituciones naturales en la región N-terminal no parecen tener ninguna implicación funcional por lo que la relevancia del segmento N-terminal en la regulación de la señalización del receptor es improbable aunque se requieren mayor número de estudios (Heyder et al., 2019).

El **ECL1** está muy poco conservado entre los propios MC4R (Figura 48A) aunque presenta una mínima conservación entre las secuencias de zfMC1R y zfMC4R (2/12). El intercambio de dominios no produce ninguna alteración en la unión de ACTH pero tampoco en el descenso de sensibilidad inducido por MRAP2a, por tanto, dado el bajo grado de conservación los datos sugieren que el ECL1 no está implicado en la respuesta al agonista.

El **ECL2** también presenta una extensión muy limitada (8 residuos) con un bajo grado de conservación entre las secuencias de zfMC1R y zfMC4R (1/8), esta conservación aumenta cuando comparamos los MC4Rs (4/8), pero no al comparar los MC1Rs (2/8). La sustitución de este pequeño giro intracelular inhibe cualquier respuesta a la ACTH pero en co-expresión con la MRAP2a, pero sin ella el receptor responde levemente a ACTH. El resultado sugiere que el ECL2 de zfMC4R es importante en la respuesta específica inducida por zfMRAP2a sugiriendo que podría ser un punto de contacto entre ambas proteínas importante para la

configuración tridimensional del MC4R necesaria para la respuesta a la ACTH. Alternativamente, ECL2 podría ser un punto de contacto con el propio agonista ACTH. Sugerentemente, el ECL2 de zfMC1R presenta residuos con carga positiva (H) y negativa como el aspártico (D) en la región N-terminal del dominio ausentes en el zfMC4R donde son substituidos por residuos polares sin carga (serina, S, y treonina T) (Figura 48B).

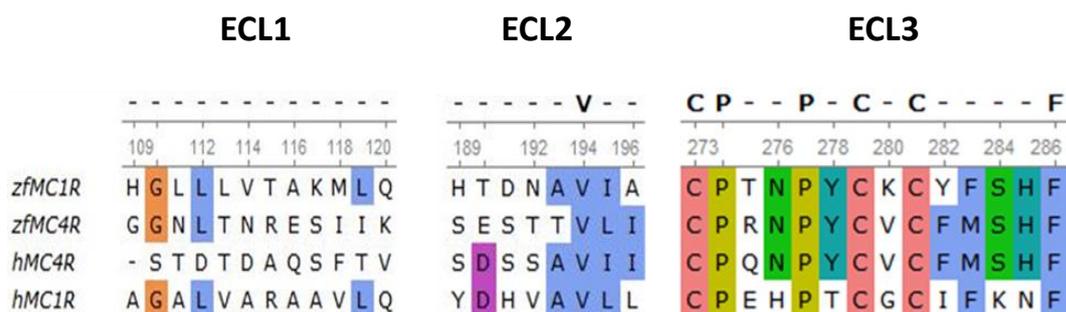


Figura 48. Alineamiento de secuencias de los giros extracelulares (ECL1, ECL2, ECL3) de los receptores MC1R y MC4R de humano (h) y pez cebra (zf). En la parte superior aparece la secuencia consenso para los 4 receptores. Los colores son adaptados del software de alineamiento Clustal X, el color azul indica la presencia de residuos conservados hidrofóbicos, rojo residuos conservados con carga positiva, magenta residuos conservados con carga negativa, verde residuos conservados polares, cian residuos conservados aromáticos, rosa denota los residuos de cisteína, naranja residuos conservados de glicina y amarillo residuos conservados de prolina, en blanco los residuos no conservados.

El último giro extracelular (**ECL3**) presenta un grado de conservación elevado (Figura 48C) entre los MC4R (13/14) y de estos residuos conservados 10 son comunes al zfMC1R, pero solamente 6 quedan conservados en el hMC1R. Se ha sugerido la existencia de un puente disulfuro intra-ECL3 utilizando los residuos conservados de cisteína (C²⁷¹-C²⁷⁷). La desaparición de este puente debido a una mutación natural (C271R) induce obesidad en humanos (Tarnow et al., 2003). La respuesta al intercambio de dominios entre los receptores resultó en una pérdida de la respuesta a ACTH con o sin co-expresión de zfMRAP2a, sin embargo, el receptor quimérico responde perfectamente a la NDP-MSH e incluso la co-expresión de zfMRAP2a aumenta la sensibilidad a NDP-MSH. Este último resultado indica que el receptor puede alcanzar la membrana plasmática y activar la ruta de segundo mensajero, pero no puede responder a la ACTH sugiriendo que el giro

extracelular es crítico en la actividad inducida por ACTH. Nuestros modelos tridimensionales del zfMC4R sugieren interacciones potenciales entre los residuos de ACTH y el ECL3 del zfMC4R (Heyder et al., 2019). Esto sugiere que los residuos no conservados son críticos en la activación dependiente de ACTH. Es muy sugerente la aparición de un residuo con carga positiva en la tercera posición del dominio (R) frente a un dominio polar sin carga (T) en la secuencia de zfMC1R. Por el contrario, en la posición 8 del dominio la secuencia de zfMC1R presenta un residuo polar positivo (K) mientras que el zfMC4R presenta un residuo no polar alifático sin carga (V). Este cambio en la distribución de la carga en el ECL3 podría afectar a la unión y/o activación del receptor.

5.2.2. Importancia de los dominios intracelulares

Los estudios realizados con el hMC4R han demostrado que ICL3 es crucial para el desarrollo de la señal intracelular desde que sus mutaciones reducen la cantidad de AMPc sintetizado sin afectar a la unión del agonista, mientras que las mutaciones en el segmento proximal de la región C-terminal, que incluye los 12 primeros aminoácidos, son cruciales para la señalización, pero también para la unión del agonista NDP-MSH al hMC4R. Sin embargo, los 13 aminoácidos distales no juegan ningún rol en las funciones anteriores (Yang et al., 2005). La comparación de secuencias entre MC1R y MC4R de ambas especies (pez cebra y humanos) indica que 6 de los 12 aminoácidos proximales están totalmente conservados mientras que no existe conservación alguna en la región distal (Figura 49).

Nuestros experimentos farmacológicos indican que el intercambio de los dominios **C-terminales** entre zfMC1R y zfMC4R (quimera 15) provoca una pérdida significativa de respuesta al agonista ACTH sugiriendo que los residuos no conservados entre ambas secuencias son críticos en la señalización y/o unión del ligando. Los estudios en el hMC4R han destacado que los dos primeros residuos de cisteína de la región C-terminal son críticos en la respuesta del receptor a la NDP-MSH siendo susceptibles de palmitoilación. De hecho, los receptores

truncados exhibiendo únicamente un residuo o ninguno de estos dos no son funcionales (Yang et al., 2005), sugiriendo que los dos residuos de cisteínas pueden estar implicados en la estabilización conformacional del receptor permitiendo la unión del ligando. Además, los tres residuos de cisteína de la región C-terminal están implicados en la fosforilación del receptor tras interacción con el agonista (Shinyama et al., 2003), pero parece ser que solamente los dos más proximales son cruciales para la respuesta (Yang et al., 2005). Es más, la propia longitud del extremo C-terminal parece influir sin mucha especificidad por las sustituciones ya que al introducir residuos de alanina para alargar la región C-terminal disminuye la unión y señalización, pero no es abolida completamente (Yang et al., 2005). Ambos residuos de cisteína están conservados entre el zfMC4R y hMC4R, aunque zfMC4R presenta un residuo de cisteína adicional previo a los conservados, pero solamente el último permanece conservado en la región C-terminal de zfMC1R o hMC1R corroborando su importancia estructural y ofreciendo una explicación potencial al carente funcionamiento de la sustitución del dominio C-terminal (Figura 49). Es muy sugerente que la funcionalidad de la quimera 15 se recupera tras la interacción con la proteína accesoria zfMRAP2a en lo que a la respuesta frente a ACTH se refiere. Esto nos permite ver que la interacción de la proteína accesoria con el zfMR4R puede ayudar a estabilizar la configuración del receptor haciendo más fácil la respuesta al agonista de melanocortinas.

C- terminal

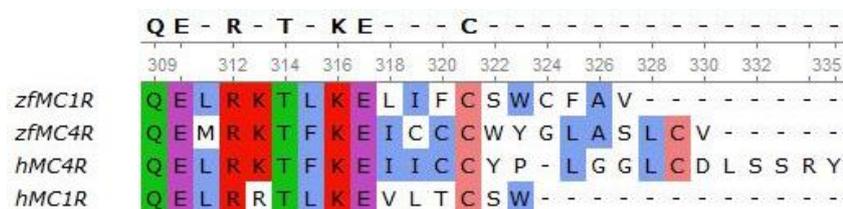


Figura 49. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones C-terminal intracelulares de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores.

Por el contrario, la substitución del **ICL3** en el zfMC4R por la región homóloga del zfMC1R no tuvo ningún efecto sobre la activación del receptor y la co-expresión con zfMRAP2a aumentó la señalización en respuesta a ACTH como lo hace en la versión salvaje del zfMC4R. Esta región muestra una elevada concentración de residuos cargados y su grado de conservación entre los receptores de pez cebra es limitado (7/22), aunque 5 de estos 7 residuos están conservados en los 4 receptores (Figura. 50). La conservación entre los MC4R de ambas especies es mucho más elevada (16/22) mientras que la conservación entre los receptores humanos (hMC1R y hMC4R) es similar a la observada entre los receptores del pez cebra (7/22). Esto sugiere que los residuos conservados en el ICL3 entre las 4 versiones de receptores son críticos en la señalización del receptor y probablemente en la unión a la proteína G. De hecho se ha demostrado que el ICL3 es crítico en la señalización de otros receptores acoplados a proteína G (Dohlman et al., 1991) como en el receptor de hormona tirotrópica, el receptor de glucagón, el péptido similar al glucagón (GLP-1) o el receptor muscarínico (Takhar et al., 1996; Chicchi et al., 1997).

ICL3

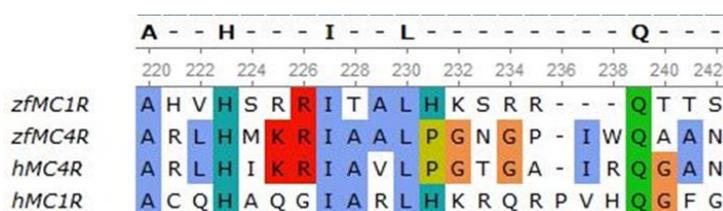


Figura 50. Alineamiento de las secuencias proteicas de los ICL3 de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores.

La substitución de los giros intracelulares precedentes a ICL3 (**ICL1**, quimera 3 e **ICL2**, quimera 7) tampoco tuvieron consecuencias en la señalización del receptor, ni en el efecto de la co-expresión con zfMRAP2a que promovió la sensibilización del zfMC4R por al ACTH. La extensión del ICL1 es limitada (solo 5 residuos) y su conservación muy elevada (4 de 5 aminoácidos). Incluso la única substitución que presenta K/R es totalmente conservativa dada las propiedades

fisicoquímicas similares de los dos aminoácidos. Por tanto, las conclusiones que pueden derivarse de la sustitución son escasas.

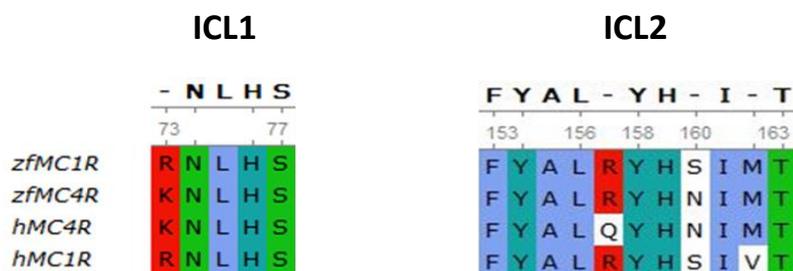


Figura 51. Alineamiento de las secuencias proteicas de los ICL1 e ICL2 de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores.

Algo similar a lo que ocurre con el ICL2, que exhibe una longitud sensiblemente superior (11 residuos) pero un grado de conservación entre los receptores de pez cebra incluso superior (10/11) por lo que, otra vez, las conclusiones son muy limitadas y no diferentes de la importancia de los residuos conservados entre las dos secuencias para la respuesta a la ACTH.

5.2.3. Importancia de los dominios transmembrana

El grado de conservación de los GPCR aumenta considerablemente cuando se trata de los dominios transmembranales debido a su importancia funcional. En nuestro caso experimental observamos que el grado de conservación del **TM1** era elevado, presentando 13 residuos idénticos (13/23, 56%) entre las versiones comparadas de *hMC1R* y *hMC4R*. Los receptores de pez cebra presentan 7/23 diferencias (70% identidad) entre sus dominios con poca relevancia diferencial en sus propiedades químicas (Figura 52). La sustitución de este dominio produce ausencia de respuesta a la ACTH, pero la co-expresión de la proteína accesoria recupera la funcionalidad de la quimera. Esta respuesta es similar a la observada frente a la sustitución del ECL2 y vuelve a sugerir la importancia del dominio en la respuesta a ACTH además de la posible estabilización de su estructura vía interacción con *zfMRA2a*.

TM1

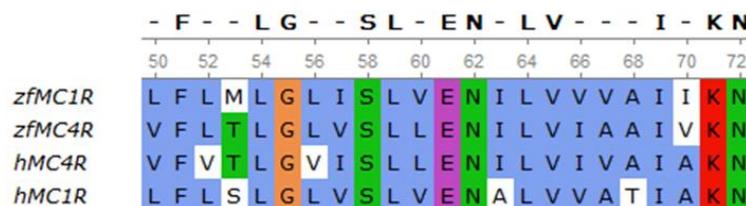


Figura 52. Alineamiento de las secuencias proteicas de TM1 de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores.

Los modelos de estructura/actividad de los receptores de melanocortinas no destacan la importancia del TM1 en la activación por agonistas sugiriendo que su participación en la respuesta es limitada, aunque existen mutaciones naturales que inducen modificaciones en la repuesta del receptor o en la unión del agonista (Tao et al., 2010).

Por su parte **TM2 y TM3** contienen residuos esenciales para la activación del receptor, siendo ambos dominios críticos en la formación del bolsillo hidrofílico que integra las interacciones iónicas con el núcleo melanocortínico (ver anteriormente). Su grado de conservación es elevado, el TM2 exhibe 17/31 residuos idénticos (55%) entre los cuatro receptores, pero los receptores de pez cebra solamente muestran 10 diferencias entre ellos (67%) (Figura 53).

TM2

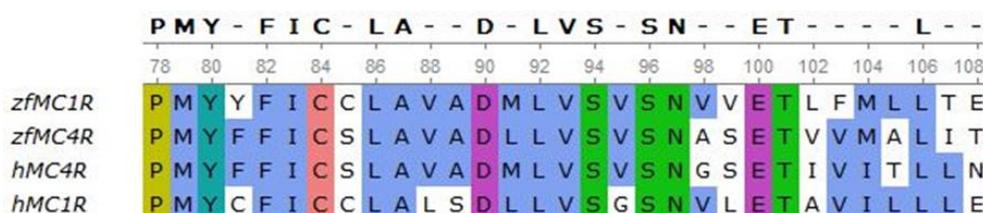


Figura 53. Alineamiento de las secuencias proteicas de TM2 de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores. Destacar la posición del residuo de glutámico (E) crítico para la formación del bolsillo hidrofílico y la interacción iónica con el residuo de arginina del núcleo de melanocortinas (H⁶F⁷R⁸W⁹).

Estas diferencias se acumulan principalmente en la región distal del dominio, aunque los MC1Rs contienen dos residuos contiguos de cisteína (C) conservados en la región N-terminal mientras que los MC4Rs solo muestran un residuo conservado. La substitución de este dominio no produce una inhibición en la repuesta, pero sí que anula el aumento de sensibilidad generado por la interacción de zfMRAP2a. El residuo de glutámico (E) crítico en la interacción con la R⁸ de la secuencia nuclear de las melanocortinas aparece conservado en las 4 formas de receptores.

La comparación de los TM3 en las 4 versiones de MCRs acumula 15 residuos idénticos (15/32, 46%) y 19 (59%) entre las versiones de pez cebra. Entre estos se encuentran los dos residuos de aspártico (D) críticos para la formación del bolsillo hidrofílico, además del integrante de la secuencia consenso DRY característica de los receptores acoplados a proteína G.

TM3

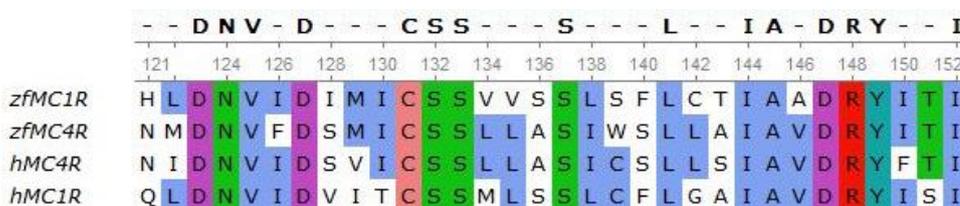


Figura 54. Alineamiento de las secuencias proteicas de TM3 de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores. Destacar la posición de los dos primeros residuos de aspártico (D) críticos en la formación del bolsillo hidrofílico y la interacción iónica con el residuo de arginina del núcleo de melanocortinas (H⁶F⁷R⁸W⁹).

El intercambio del dominio entre los receptores de proteína G provoca la disfunción del receptor siendo incapaz de responder tanto a la ACTH, con o sin co-expresión de zfMRAP2a, como a la α -MSH. Cuando se transpone secuencialmente con TM5 o TM7 no puede dotar de afinidad por la ACTH al MC1R, pero sí que aumenta la sensibilidad una vez TM5 y TM7 junto con ECL2 y ECL3 han permitido la unión de la ACTH. Los resultados sugieren que la interacción de zfMRAP2a con los TM2 y TM3 que forman el bolsillo hidrofílico puede provocar un cambio

conformacional en el receptor que permita el acceso del núcleo melanocortinérgico (H⁶F⁷R⁸W⁹) a los residuos críticos del receptor (E, D, D) para su interacción con los residuos (TM2-E⁹⁴ y TM3-D¹¹⁷, -D¹²¹).

Una situación similar es la que se presupone en las relaciones estructura/función del MC2R en interacción con ACTH. La respuesta del MC2R a la ACTH requiere de la interacción de otra proteína accesoria, la MRAP1 tanto en tetrápodos (Metherell et al., 2005) como en vertebrados no tetrápodos (Agulleiro et al., 2010). Los dos dominios transmembranales TM2 y TM3 son críticos en la unión de la ACTH al MC2R (Hinkle et al., 2011; Yang et al., 2020) y dentro de estos, los mismos residuos aniónicos conservados que se destacan en MC1R y MC4R. De hecho, Hinkle y colaboradores (2011) demostraron que mediante el intercambio en bloque del segmento TM2/ECL/TM3 del hMC2R en la región correspondiente del hMC4R e interacción con MRAP1 se obtiene un receptor quimérico capaz de responder a ambos, NDP-MSH y ACTH. Estudios realizados en el mismo laboratorio demostraron que la interacción de ACTH con el hMC2R requiere la interacción previa de la MRAP1 sobre la superficie extracelular del hMC2R (Malik et al., 2015). Otros estudios han demostrado, además, que la sustitución del residuo L112I en el TM3 permite la respuesta del hMC2R a la α -MSH sugiriendo la importancia del dominio en la adquisición de la configuración tridimensional requerida para la interacción iónica con el núcleo melanocortinérgico (Yang et al., 2019; 2020). Sin embargo, el tetrapéptido nuclear no puede acceder al bolsillo hidrofílico del MC2R, a no ser que la región C-terminal de la ACTH, y particularmente los residuos KKRRP, interactúen previamente con el receptor para inducir un cambio conformacional que permita el acercamiento de los residuos catiónicos al bolsillo hidrofílico (Dores et al., 2014). Malik y colaboradores (2015) sugirieron que la MRAP1 podría participar también en este cambio conformacional por interacción con el hMC2R.

La interacción del motivo C-terminal de la ACTH con el MC2R sugiere la existencia de un segundo lugar de unión en la región C-terminal del receptor donde interactúe el motivo KKRRP de la ACTH. Fridmanis et al., (2010) observaron que la sustitución del TM4 y TM5 en el hMC2R con las contrapartidas del hMC4R

impedía la activación del receptor quimérico y es ahí donde podría estar situado el lugar de unión para el motivo C-terminal de la ACTH. En apoyo de esta hipótesis, se ha observado que las mutaciones naturales o sustituciones puntuales por residuos de alanina producen alteraciones de la actividad del receptor (revisado por Dores et al., 2016).

El dominio **TM4** presenta una baja identidad de secuencias entre las 4 formas comparadas de MCRs exhibiendo solamente 6 residuos comunes de los 25 que corresponden a su extensión completa (6/25=24%). Esta identidad aumenta a 11 residuos cuando comparamos las dos secuencias de pez cebra (42%) y 16 residuos (61%) cuando comparamos las secuencias de MC4R, pero solo 10 (43%) residuos cuando comparamos las secuencias de MC1R.

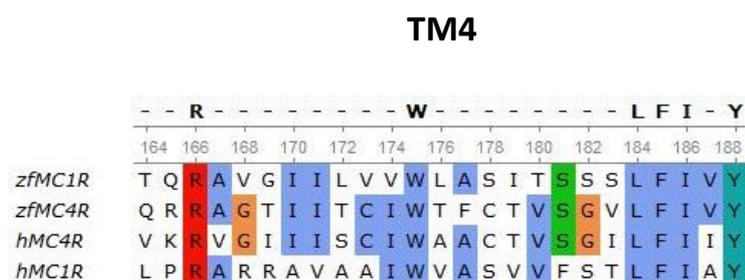


Figura 55. Alineamiento de las secuencias proteicas de TM4 de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores. Destacar la presencia de 6 residuos completamente conservados entre las 4 secuencias.

El intercambio de TM4 entre ambos receptores no indujo ningún cambio en la sensibilidad a la ACTH en la quimera resultante y la co-expresión con MRAP2a aumentó la sensibilidad al agonista. Los resultados sugieren que el TM4 no es imprescindible para la respuesta a la ACTH y si lo es, los residuos conservados son esenciales. Sin embargo, nuestros experimentos de mutagénesis dirigida, en los cuales sustituimos los residuos LFIVY por residuos de alanina (A) no indujeron la pérdida de sensibilidad total a ACTH en presencia de MRAP2a sin embargo la sustitución conjunta de los residuos no contiguos R, I, W provocó una pérdida en la afinidad por ACTH y α -MSH (datos no mostrados). En resumen, el TM4 del zfMC4R no parece ser relevante en la interacción con ACTH.

Una situación similar es la que ocurre con el **TM6**, un dominio que exhibe una elevada conservación mostrando 17 residuos idénticos de 30 (56%) entre los 4 receptores comparados. Esta identidad asciende al 83% cuando comparamos los receptores MC4R y al 76% cuando comparamos los MC1R. La comparación de la identidad entre los receptores del pez cebra rinde valores superiores al 75%. En este dominio se encuentran los residuos clave descritos para la unión del agonista NDP-MSH al hMC4R, concretamente W²⁵⁸, F²⁶¹, H²⁶⁴. Los tres residuos están conservados entre las 4 formas de receptores de melanocortinas.

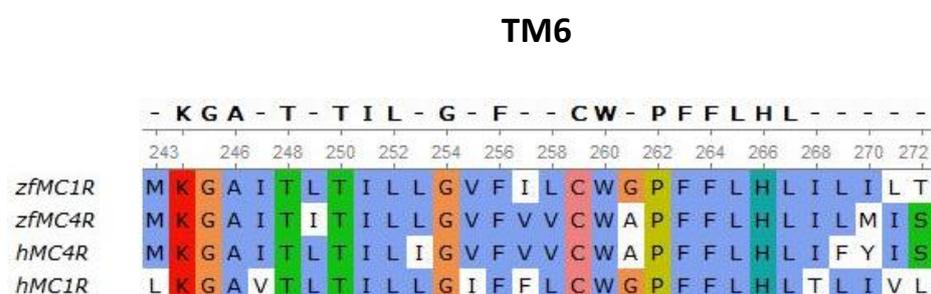


Figura 56. Alineamiento de las secuencias proteicas de TM6 de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores.

El intercambio de dominios tampoco produce una alteración significativa de la respuesta a la ACTH alcanzando, por tanto, una conclusión similar a la adquirida con el TM4, es decir una importancia limitada en la respuesta con significación del grado de conservación del dominio transmembrana.

Finalmente, los resultados defienden que el intercambio independiente de los dominios **TM5** y **TM7** produce una disfunción en la actividad del receptor, anulando su actividad tras estimulación con ambos ACTH y α -MSH. Los datos sugieren que el intercambio de dominios ha provocado un cambio conformacional que impide la función del receptor. El intercambio del TM5 parece impedir la migración a membrana de la quimera, pero no ocurre así tras el intercambio del TM7. La conservación del TM5 es limitada mostrando solamente 9 de 23 residuos idénticos entre las 4 formas de receptor (39%). Sin embargo, la identidad es muy elevada si comparamos las dos formas de MC4R (21/23, 91%), pero solamente de 11/23 residuos (47%) cuando comparamos los dos receptores de pez cebra (Figura

57). Esta falta de identidad y disfuncionalidad tras la substitución del dominio sugiere que los residuos no conservados en el TM5 son críticos en la funcionalidad del receptor sugiriendo que este no adquiere la conformación tridimensional correcta tras el intercambio. Alternativamente, el intercambio puede afectar a la unión de los agonistas tanto ACTH como α -MSH.

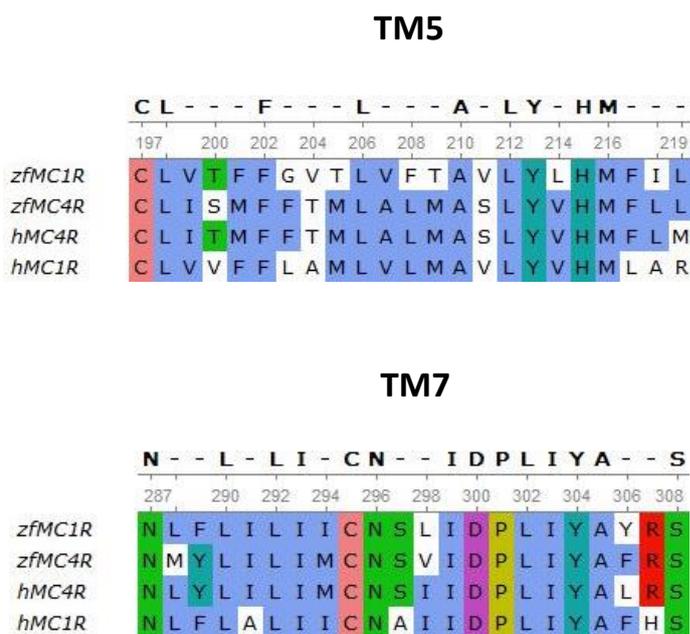


Figura 57. Alineamiento de las secuencias proteicas de TM5 (panel superior) y TM7 (panel inferior) de los receptores MC1R y MC4R de humanos y pez cebra. Ver figura 48 para código de colores.

El dominio TM7 goza de mayor identidad entre las formas de receptores compartiendo 14 de 22 residuos idénticos (63%) y 19/22 (86%) entre los MC4R de ambas especies. Los receptores de pez cebra solo muestran 5 diferencias entre ellos (77% de identidad). Es sorprendente que ante tal grado de identidad la substitución de los dominios cause una disfunción en el receptor destacando la importancia de los residuos no conservados entre *zfMC1R* y *zfMC4R*. Además, estas diferencias son relativamente conservativas ya que se substituyen dos aminoácidos aromáticos neutros (F/Y) o dos neutros apolares [(L/M), (L/V)]. Incluso si asumimos un error en la delimitación de los dominios, la comparación de secuencias muestra que los tres últimos residuos del ECL3 (dominio inmediatamente anterior) son constantes entre los dos receptores (Figura 48). Al

igual ocurre con la identidad de los residuos proximales del extremo C-terminal donde solo encontramos 2 diferencias conservativas entre los 10 primeros residuos (Figura 49). Por tanto, los 5 residuos diferenciales parecen cruciales bien en la conformación de la estructura tridimensional, en la unión del agonista o en el desencadenamiento de la señal intracelular. Cuando TM5 y TM7 son conjuntamente transferidos al zfMC1R conjuntamente con ECL2 y ECL3, el receptor quimérico responde a la ACTH con igual sensibilidad independientemente de la presencia de zfMRAP2a.

5.2.4. Un modelo para la interacción con MRAP2a-ACTH-MC4R

La activación del receptor al igual que la inducción de la síntesis de cAMP requiere un elevado número de interacciones moleculares y el establecimiento de un modelo que explique el aumento de sensibilidad del MC4R resulta muy complejo. En principio, existirían 3 situaciones posibles, i) la unión del agonista al receptor, ii) la interacción de la proteína accesoria y el receptor y iii) una posible interacción directa entre el agonista y la proteína accesoria. Estas interacciones pueden por tanto regular conjunta o independientemente la expresión en superficie del receptor, algo que hemos demostrado previamente que no ocurre tanto en el zfMC4R como en el zfMC1R (Agulleiro et al., 2013; Cortés et al., 2014); la unión del agonista y/o la activación del receptor que nosotros medimos indirectamente como cantidad de AMPc sintetizada. A esta situación debemos añadir, además, la formación potencial de homodímeros o oligómeros entre moléculas de MC4R cuya trascendencia funcional es desconocida. Se sabe que este tipo de asociaciones puede afectar diversos aspectos de la funcionalidad del receptor incluyendo la unión del agonista, el proceso de señalización, la expresión en la superficie celular o incluso la selectividad por diferentes proteínas G (Heyder et al., 2019). De hecho, se ha demostrado que los monómeros de hMC4R son capaces de inducir una señal intracelular casi dos veces superior a las estructuras dimericas sugiriendo que la formación de estructuras supramoleculares incide sobre la estequiometría entre el MC4R y las proteínas G (Gurevich et al., 2018). Además, los receptores acoplados a proteína G parecen expresarse como una

mezcla de monómeros y oligómeros que se inter-convierten dinámicamente en relación a su situación de actividad/estimulación (Heyder et al., 2019). La dinámica podría ser influida por la presencia de proteínas accesorias como se ha demostrado en el zfMC5R (Zhu et al., 2018). Los autores han demostrado mediante experimentos de fluorescencia que los parálogos de zfMC5R (a,b) pueden homodimerizar o heterodimerizar pero que la presencia tanto de MRAP2a como MRAP2b disminuye a niveles casi indetectables la emisión de fluorescencia que se emite durante la formación de los dímeros modificados. Esto demuestra que ambas proteínas accesorias pueden inhibir la formación de dímeros, un efecto similar al que se demostró con hMC5R (Sebag y Hinkle, 2009).

Por el contrario, los modelos moleculares de interacción entre MRAP1 y MC2R obtenidos mediante una técnica similar de bioluminiscencia sugieren que el hMC2R homodimeriza constitutivamente y además forma heterodímeros con la MRAP1 (Cooray et al., 2011). ACTH es capaz de aumentar la tasa de heterodimerización entre MRAP1-MC2R, pero para esto es necesario la activación de la señalización vía AMPc. El modelo propuesto sugiere la formación de homodímeros MC2R en el retículo endoplasmático, bien de forma concomitante o secuencial el homodímero interactúa con dos hélices antiparalelas de MRAP1 que unen a su vez probablemente dos moléculas de ACTH (Cooray et al., 2011; Clark y Chan, 2019)

Ante esta situación multivariante es difícil establecer un modelo para la interacción de MC4R-MRAP2a-ACTH, sin embargo, en la Figura 58 se intenta resumir esquemáticamente las conclusiones experimentales. Bajo un modelo totalmente hipotético y no completamente soportado por los datos aportados sugerimos dos escenarios potenciales. En el primero, la zfMRAP2a interactuaría con el TM2-TM3 para permitir la apertura del bolsillo hidrofílico, por su parte la ACTH interactuaría con los dominios posteriores TM5-ECL2-ECL3-TM7 para anclarse a la molécula del receptor y posicionar el grupo melanocortinérgico hacia el bolsillo para que se produzca la interacción iónica entre la A8 y los residuos de carga negativa. Bajo un segundo escenario la ACTH interactuaría directamente con la MRAP2a exponiendo la molécula al bolsillo hidrofóbico y la proteína accesorias

a su vez interactuaría con los dominios terminales del receptor que provocarían un cambio conformacional abriendo el bolsillo hidrofóbico para un mejor acceso del núcleo melanocortinérgico a los aminoácidos ácidos del TM2-TM3.

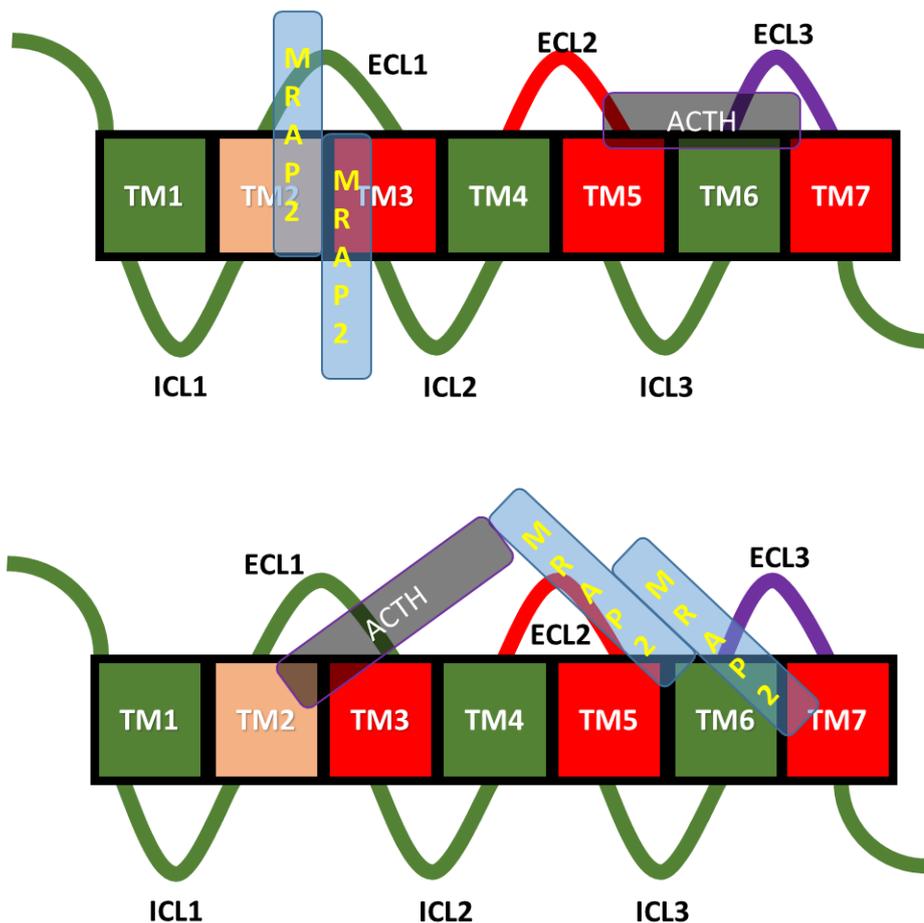


Figura 58. Modelos de interacción activación MC4R-MRAP2a-ACTH. El color verde sobre los TM indica la funcionalidad de la quimera a pesar de su intercambio entre receptores. El color rojo identifica los TM que tras ser sustituidos han provocado una disfunción de la quimera. Los giros intra- o extra-celulares en verde son inocuos tras su intercambio. El intercambio del ECL2, en rojo, produce una disfuncionalidad mientras que el intercambio del ECL3, en morado, produce una pérdida de activación por ACTH, pero no por NDP-MSH sugiriendo su especificidad. Ver texto para descripción.

Alternativamente a estos dos modelos, también deberíamos considerar la posibilidad que la MRAP2a no afecte a la unión con ACTH, sino que únicamente produzca un aumento de la activación mediante la estimulación de la producción de AMPc induciendo una diferente selectividad por proteínas G alternativas.

5.3. Efecto del sexo y los esteroides sexuales sobre la actividad circadiana locomotora del pez cebra

Los ritmos de actividad locomotora circadiana de animales mantenidos bajo condiciones constantes se han utilizado de forma generalizada para monitorizar mutantes del reloj circadiano y testar diferentes hipótesis sobre los genes reloj, así como para analizar la organización fisiológica del sistema circadiano en diversos vertebrados (Konopka et al., 1971; Ralph et al., 1988; 1990; Antoch et al., 1997; King et al., 1997). La existencia de ritmos locomotores circadianos se ha demostrado en diferentes especies de peces (Iigo y Tabata, 1996; Herrero et al., 2007; Cavallari et al., 2011) incluyendo el pez cebra (Hurd et al., 1998; López-Olmeda et al., 2006; del Pozo et al., 2011; Livne et al., 2016; Chen et al., 2016). Nosotros hemos utilizado este paradigma experimental para comprobar la existencia de una diversidad sexual en la organización circadiana del pez cebra. Nuestra hipótesis surge inicialmente tras el análisis diferencial del transcriptoma central entre machos y hembras, realmente originado de la comparación del transcriptoma entre peces ASIP y salvajes (Guillot et al., 2016). Durante este análisis detectamos la expresión diferencial según el sexo de algunos genes de la maquinaria del reloj circadiano lo que nos llevó a hipotetizar la existencia potencial de un efecto del sexo sobre el comportamiento y una posible implicación de los esteroides sexuales.

Con este fin, primero diseñamos una estrategia no invasiva para poder aumentar los niveles de esteroides sexuales en el pez cebra. Nuestros experimentos previos en la lubina habían demostrado que la administración de esteroides sexuales vía implantes de silicona era muy efectiva a la hora de aumentar los niveles plasmáticos de estradiol y testosterona y provocar un efecto comportamental, registrado como una inhibición significativa de los niveles de ingesta (Leal et al., 2009). Sin embargo, este sistema parece un tanto invasivo para especies de pequeño tamaño, como el pez cebra, por lo que optamos por la administración oral de los esteroides. Nuestra experiencia previa en lubina también había demostrado que la inclusión de corticoesteroides en el pienso producía una elevación de los niveles de cortisol plasmático (Leal et al., 2011) o

incluso de los niveles centrales de dopamina tras inclusión de L-DOPA (Leal et al., 2013). Los resultados demuestran que la administración oral de 11-ceto-androstenediona o 17- β estradiol producen una elevación significativa de los niveles plasmáticos de 11-cetotestosterona o 17- β estradiol en hembras y machos de pez cebra, respectivamente. Nuestra intención siempre fue elevar los niveles de 11-cetotestosterona, el principal andrógeno de peces. Este andrógeno es, además, no aromatizable a estrógenos, con lo cual su administración tiene efectos inocuos sobre los niveles endógenos de 17- β estradiol, algo que no ocurre con la testosterona, precursor del 17- β estradiol por aromatización (Leal et al., 2009). La 11-ceto-androstenediona sirve como precursor de la 11-cetotestosterona y su administración conlleva por tanto un aumento de los niveles de 11-cetotestosterona circunvalando, de esta forma solventamos el problema del alto coste del andrógeno sintético (Leal et al., 2009). Ciertamente, los niveles plasmáticos determinados en nuestros ensayos son menores que los reportados para esta especie (Shang et al., 2019; Sun et al., 2019), sin embargo, otros trabajos han reportado niveles similares a nuestras determinaciones basales y estimuladas (Zhao et al., 2017). En conclusión, la elevación de esteroides sexuales producida por la administración oral de esteroides es significativa y está dentro de los niveles fisiológicos caracterizados para la especie, lo que valida nuestra metodología de administración no invasiva para estudios comportamentales.

El análisis de los actogramas muestra que tanto machos como hembras exhiben un claro ritmo circadiano de actividad locomotora con el periodo de actividad durante la fase diurna. Un patrón de actividad diurna similar ha sido ya reportado previamente en el pez cebra (del Pozo et al., 2011), incluso en animales aislados individualmente (Hurd et al., 1998), aunque estos, eventualmente, pueden mostrar patrones de actividad arrítmicos. La comparación visual de los actogramas también evidencia que, aunque las hembras tienen un claro patrón de actividad diurno, su nivel de actividad general es significativamente más elevado durante ambos periodos lumínicos, pero es especialmente llamativo en la sonda de superficie. Debe destacarse que la actividad nocturna de los machos en ambas zonas del tanque, superficie y profundidad, es prácticamente nula mientras que

las hembras exhiben mayor nivel de actividad nocturna en superficie, un hecho claramente patente en la inspección visual de los actogramas. Estas diferencias de actividad fueron analizadas previamente por Hurd y colaboradores (1998) no encontrando un claro patrón diferencial entre machos y hembras mantenidos en aislamiento y en condiciones constantes de oscuridad o luz continua. Sin embargo, los autores si encontraron una interacción positiva entre el sexo y la temperatura en la expresión rítmica de los patrones de actividad de forma que las hembras exhibieron periodos más cortos de actividad a 18 °C pero más largos a 25 °C y 28.5 °C. La diferencia en los diseños experimentales (individual vs grupo y condiciones constantes vs 12L/12O) no permiten alcanzar conclusiones comparativas. Estas diferencias podrían ser impuestas por el carácter gregario de la especie y las relaciones de dominancia y territorialidad entre los organismos de la misma cohorte (Spence et al., 2008). Nosotros no tenemos actualmente un soporte comportamental que explique esta actividad diferencial, si bien es patente que las relaciones comportamentales entre los machos y las hembras pueden ser diferentes, aunque ambos géneros exhiben un comportamiento agresivo con sus congéneres (Oliveira et al., 2011). Por ejemplo, los machos prefieren asociarse con cardúmenes de hembras, frente a los de machos, sin importar el tamaño del cardumen, mientras que las hembras seleccionan el cardumen por el tamaño poblacional sin importar el sexo. Esto sugiere que las cohortes de machos pueden exhibir relaciones de dominancia más fuertes induciendo una disminución de movimientos de los machos sumisos, de hecho, los machos dominantes utilizan una mayor proporción espacial del tanque mientras que los sumisos quedan recluidos en espacios más limitados (ver Spence et al., 2008 para referencias). La administración de 11-ceto-androstenediona a las hembras disminuyó significativamente su actividad general a niveles similares a los presentados por los machos, algo que fue especialmente patente durante el periodo nocturno. Por el contrario, la administración de estradiol a machos provoca un aumento significativo de la actividad nocturna de los animales, resemblando el patrón de las hembras no tratadas, pero sin alcanzar los niveles globales de actividad. Los resultados sugieren que los esteroides sexuales pueden modular el

comportamiento circadiano de los peces siendo responsables de las diferencias encontradas entre los grupos de machos y hembras.

Para corroborar el posible efecto del sexo y/o esteroides sexuales sobre el comportamiento circadiano, analizamos comparativamente la expresión de diversos genes reloj en los diferentes grupos experimentales. Los resultados evidencian la expresión rítmica de estos genes reloj y demuestran la existencia de diferencias de expresión entre los sexos (machos y hembras control), además, del efecto de la administración exógena de esteroides, en diferentes tejidos que incluyen cerebro, hígado y gónadas. El efecto de la administración de progesterona y 17α -etinilestradiol sobre la expresión de diversos genes reloj (*per1a*, *nr1d2a*, *clock1b*, *crya*) se ha estudiado también en larvas de pez cebra de 5 días durante 48 horas. Similar a nuestros resultados, las administraciones exógenas de estrógenos, progestágenos o glucocorticoides provocaron una variación de la expresión circadiana de estos genes en extractos de ARN provenientes de la larva completa y bajo condiciones de oscuridad constante (Zucchi et al. 2013; Zhao et al., 2015; 2018).

En nuestros estudios, el gen que expresó mayor ritmicidad fue *cry1a* ya que exhibió variaciones diarias significativas en todos los tejidos y tratamientos, pero solamente el tratamiento con 17β estradiol indujo alteraciones del patrón circadiano en el testículo e hígado de machos y en cerebro e hígado de hembras tras alimentación con 11-ceto-androstenediona. Sus perfiles se mantienen constantes en todos los casos si bien la amplitud de la oscilación aumenta en el hígado de machos tratados y disminuye en testículos. *Cry1a* es un potente represor de la función del reloj circadiano impidiendo la dimerización de *clock/bmal* para bloquear la transactivación de sus genes diana. Su expresión es robustamente inducida por la luz, existiendo una fuerte correlación entre la intensidad y el desplazamiento de fase en su expresión (Tamai et al., 2007). A diferencia de nuestros resultados, los estudios realizados en ratas ovariectomizadas demuestran que los tratamientos con esteroides no modifican los niveles de expresión de *cry1*, pero si los de *cry2* en el núcleo supraquiasmático (Nakamura et al., 2001). Estudios en el pez cebra indican que *cry1a* junto con *cry2a*

y *per2* son genes reloj inducibles por la luz (Pando et al., 2001; Tamai et al., 2004; 2007), sin embargo también regulan la expresión de genes que controlan el metabolismo energético que probablemente contribuyen a la actividad locomotora de los animales. De hecho, la delección conjunta de los dos genes (*cry1a* y *per2*) provoca arritmias locomotoras y un descenso generalizado de los niveles totales de actividad, indicando su implicación en la regulación de los ritmos locomotores, pero también en la actividad total absoluta (Hirayama et al., 2019). Sin embargo, este control de la actividad no depende de los niveles de melatonina, una hormona conocida por reducir los niveles de actividad en zebrafish (Gandhi et al., 2015), ya que los animales doble mutantes presentan niveles más bajos de melatonina y expresión de *Aanat2*, el enzima crítico en su síntesis (Hirayama et al., 2019). Sin embargo, diversos estudios defienden que la melatonina es esencial para la regulación de los ciclos de sueño/vigilia en el pez cebra (Zhdanova, 2011; Gandhi et al., 2015). Sin embargo, la inactivación específica del gen *clock* en la pineal provoca un descenso de la amplitud del ritmo en larvas de pez cebra, pero no en la periodicidad de este. Estos datos sugieren que el reloj pineal no es el único encargado de la regulación de los ritmos de actividad y muy probablemente otros centros del SNC contribuyan a la generación de estos ritmos (Livne et al., 2016). En nuestros experimentos la expresión del gen *clock1* presentó variaciones diarias significativas en el cerebro de hembras e hígado de machos. En el caso del cerebro de las hembras, la amplitud de la variación fue reducida por el tratamiento hormonal; mientras que en el caso del hígado en los machos, la amplitud de la variación aumentó con el tratamiento hormonal. En gónadas, encontramos una situación opuesta, no hay variaciones diarias en los animales control, pero el tratamiento con esteroides indujo variaciones significativas en ambos sexos. Estas diferencias de expresión en *clock1* podrían estar relacionadas con las diferencias en la actividad locomotora y con la inversión de patrones tras el tratamiento con esteroides.

La actividad locomotora es inversamente proporcional a la cantidad de sueño o de descanso de forma que los mecanismos asociados con la homeostasis energética han sido propuestos a regular la cantidad de sueño/descanso y por

extensión la actividad locomotora de los animales (Willie et al., 2001; Kumar et al., 2015; DiNuzzo y Nedergaard, 2017). La posible diferencia entre la actividad de machos y hembras, así como el efecto de los esteroides, podría estar, por tanto, relacionada con el metabolismo energético diferencial. En nuestros experimentos no hemos considerado la evaluación del metabolismo energético, pero la homeostasis energética diferencial entre sexos y el efecto de los esteroides sexuales sobre el metabolismo energético en vertebrados es bien conocida (Dearden et al., 2018; Isacco y Miles-Chan, 2018; Palmisano et al., 2018; Xu y López, 2018).

En resumen, nuestros experimentos muestran que machos y hembras exhiben diferentes patrones de actividad locomotora. Esto también se refleja en los patrones de expresión de algunos genes de la maquinaria del reloj circadiano. La administración oral de esteroides puede modificar estos patrones de actividad y a su vez la oscilación en la expresión de genes reloj. Las diferencias en el metabolismo energético podrían ser responsables de los cambios en el patrón de actividad y en la expresión génica.

5.4. Efecto de la sobreexpresión de antagonistas endógenos de melanocortinas sobre la actividad locomotora del pez cebra

Nuestros experimentos previos han mostrado que los peces ASIP tienen un metabolismo energético diferente de sus congéneres salvajes, que les permite crecer más en condiciones energéticas similares. Estos animales son capaces, además, de ingerir más alimento que sus congéneres, aunque no desarrollan obesidad asociada a la dieta, medida como niveles totales de grasa corporal (Guillot et al., 2016). Estos niveles de ingesta superiores también sugieren la probable existencia de un comportamiento diferencial, en términos de agresividad, ansiedad alimenticia o competencia por el alimento. Para iniciar un análisis comportamental de estos animales, que exhiben una inhibición parcial del sistema de melanocortinas por sobre-expresión del agonista inverso endógeno, analizamos comparativamente su actividad locomotora bajo un fotoperiodo

constante 12L/12O. Los resultados demuestran que, aunque los animales ASIP mantienen un ritmo circadiano con un periodo cercano a 24h su actividad total es significativamente superior a la de los animales WT. La actividad durante el periodo de luz es significativamente inferior pero su actividad nocturna es muy superior a sus congéneres salvajes. Esto provoca que la expresión del ritmo circadiano sea mucho menos significativa que en el caso de los animales WT.

La implicación del sistema de melanocortinas en los ritmos de actividad locomotora es totalmente desconocida y estos son los primeros datos que aportan luz de su implicación en el sistema circadiano de peces, aunque no en mamíferos donde se conoce que el MC3R está implicado en la actividad alimenticia anticipatoria bajo condiciones de restricción calórica (ver introducción para referencias). El SNC de pez cebra expresa dos péptidos relacionados con agutí, AGRP1 y AGRP2. AGRP1 se expresa exclusivamente en el núcleo lateral tuberal (Cerdá-Reverter y Peter, 2003) mientras que AGRP2 se expresa en la pineal y el área preóptica proyectando a la adenohipófisis (Shainer et al., 2017). La presencia en la pineal de un agonista inverso de melanocortinas sugiere intuitivamente una implicación en el control del reloj circadiano central. Sin embargo, su expresión celular se localiza en un subconjunto de células glandulares no caracterizadas (Shainer et al., 2017) pero con características transcriptómicas similares a las del epitelio pigmentario retiniano (Shainer et al., 2019). Inicialmente estas neuronas pineales fueron implicadas en el control de la pigmentación críptica del pez cebra mediante la regulación de la expresión de la hormona concentradora de los melanocitos (MCH) durante la adaptación a fondos claros (Zhang et al., 2010). Sin embargo, estos datos no pudieron ser corroborados mediante técnicas de edición genómica o ablación neuronal (Shainer et al., 2019). A diferencia de AGRP1, AGRP2 no es necesaria para mantener los niveles de ingesta, pero tampoco para sostener los ritmos de actividad locomotora (Shainer et al., 2019). De forma similar, la ausencia de AGRP1 funcional en el genoma del pez cebra o la ablación de las neuronas tampoco tiene efectos sobre los ritmos de actividad locomotora.

El genoma del pez cebra presenta 3 agonistas inversos de melanocortinas, AGRP1 y AGRP2 y ASIP1, aunque otras especies de teleósteos exhiben un

antagonista adicional ASIP2 (Västermark et al., 2012). Datos obtenidos por qPCR en lubina evidencian la expresión de AGRP2 en la pineal, aunque también existen niveles bajos de expresión de ASIP1. En esta misma especie los 4 agonistas inversos se expresan en el cerebro (Agulleiro et al., 2014). En otras especies como fugu, ASIP1 solamente se expresa en la hipófisis (Kurokawa et al., 2006) mientras que en lenguado y rodaballo hay evidentes niveles de expresión en el cerebro (Guillot et al., 2012). En el pez cebra, ambos AGRP1 y AGRP2 se expresan en el cerebro (Shainer et al., 2019). Técnicas de hibridación *in toto* en larvas fallaron en la detección de expresión central de ASIP1, aunque las técnicas de RT-PCR convencional detectaron bajos niveles de expresión en el cerebro (Cal et al., 2017). En ocasiones, se detectó, de forma inconsistente, expresión de ASIP1 en la pineal de larvas (Josep Rotllant y Jose Miguel Cerdá Reverter comunicación personal). Por tanto, a falta de estudios más concretos que enfoquen la expresión de ASIP1, con diferente sensibilidad, en el cerebro de peces cebra adultos, lo lógico es pensar que el mecanismo neuronal responsable del fenotipo comportamental derivado de la sobreexpresión de ASIP1 debería de ser mediado por AGRP1/AGRP2. Sin embargo, ninguno de los dos es necesario para el desarrollo de los patrones locomotores circadianos (Shainer et al., 2019). Existen diversas posibilidades para explicar esta paradoja: la más directa es que estos efectos fenotípicos sean mediados a nivel central, por los bajos, pero críticos, niveles de expresión de ASIP1 presentes en el cerebro del pez cebra (Cal et al., 2017). En segundo lugar, debemos tener en cuenta que la supresión de la expresión de un gen o expresión de una proteína no funcional no tiene por qué reflejar los efectos contrarios de la sobre-expresión génica. Este supuesto puede ser incluso más cierto en el caso de los agonistas inversos que no requieren la actividad del agonista, sino que reducen la actividad de receptores constitutivamente activados. Por tanto, los efectos que observamos sobre la actividad locomotora, podrían ser mediados por agonistas de melanocortinas derivados del POMC, y la sobre-expresión de ASIP no haría otra cosa más que revelar la implicación de las MSHs en el proceso mediante el antagonismo competitivo. Esta hipótesis requeriría neuronas que expresasen MCRs y fuesen inervadas por terminales

AGRP1 o 2 y MSH. Alternativamente, la sobre-expresión de ASIP podría inhibir la actividad constitutiva de alguno de los MCRs, particularmente el MC4R (Sánchez et al., 2009), una situación que requeriría neuronas únicamente inervadas por AGRP1 o 2. Ambos tipos de poblaciones neuronales existen en el cerebro del pez cebra (Forlano y Cone, 2007). Independientemente del mecanismo utilizado, nuestros experimentos demuestran claramente la implicación del sistema de melanocortinas en el control de la actividad locomotora y el reloj circadiano. Nuestros datos no pueden elucidar si la modificación en los patrones de expresión de los genes reloj son responsables, pero debe tenerse en cuenta que estos organismos presentan condiciones metabólicas diferentes (Guillot et al., 2016), dado que exhiben mayores niveles de ingesta y mayores tasas de crecimiento. Dada la relación existente entre el metabolismo y los ritmos de actividad (Willie et al., 2001; Kumar et al., 2015; DiNuzzo y Nedergaard, 2017) no podemos descartar que estos cambios metabólicos disparados por un exceso de ASIP1 sean los responsables de los cambios de expresión en los genes reloj.



6. Conclusiones

1. La respuesta a ACTH del MC4R inducida por la interacción con MRAP2 está evolutivamente conservada en vertebrados, sugiriendo la existencia de una función fisiológica asociada al mecanismo molecular.
2. La respuesta del receptor MC4R a ACTH abre nuevas vías para la transducción de información referente al estrés, independiente de la síntesis y secreción de glucocorticoides.
3. La respuesta a ACTH mediada por la interacción de MC4R y MRAP2 puede ser el mecanismo molecular responsable del tratamiento de los espasmos infantiles (IS) con ACTH.
4. Mediante la confección de quimeras moleculares entre zfMC1R y zfMC4R, la sensibilidad a la ACTH mediada por la zfMRAP2a puede ser inducida en el zfMC1R.
5. Esta inducción requiere de la presencia de los dominios transmembranales 3, 5 y 7 (TM3, TM5, TM7) además del segundo y tercer giro extracelular (ECL2 y ECL3).
6. La sustitución de TM2 en el zfMC4R con su TM homólogo del zfMC1R produce una disminución en la sensibilidad inducida por zfMRAP2a del zfMC4R demostrando la importancia del dominio transmembrana en la afinidad por el agonista inducida por la proteína accesoria.
7. Los patrones a actividad locomotora en el pez cebra son dependientes del sexo y la administración oral de esteroides sexuales puede modificar estos patrones de actividad.
8. De forma similar, la expresión de genes reloj está regulada de forma diferencial en machos y hembras y los esteroides sexuales pueden modificar su patrón de expresión.
9. El sistema de melanocortinas es capaz de modificar los patrones de actividad de los peces cebra aumentando la actividad locomotora global, especialmente durante el periodo nocturno.



7. Bibliografía

A

- Agulleiro MJ, Cortés R, Fernández Duran B, Navarro S, Guillot R, Meimaridou E, Clark AJ, Cerdá-Reverter JM. Melanocortin 4 receptor becomes an ACTH receptor by coexpression of melanocortin receptor accessory protein2. *Mol Endocrinol*. 2013. 27(11): 1934-1945.
- Agulleiro MJ, Cortés R, Leal E, Ríos D, Sánchez E, Cerdá-Reverter JM. Characterization, tissue distribution and regulation by fasting of the agouti family of peptides in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol*. 2014. 205: 251-259.
- Agulleiro MJ, Roy S, Sánchez E, Puchol S, Gallo-Payet N, Cerdá-Reverter JM. Role of melanocortin receptor accessory proteins in the function of zebrafish melanocortin receptor type 2. *Mol Cell Endocrinol*. 2010. 320(1-2): 145-152.
- Altschmied J, Duschl J. Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Future Science*. 1997. 23(3).
- Aluru N, Vijayan MM. Molecular characterization, tissue-specific expression and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology*. 2008. 149(9): 4577-4588.
- Aluru N, Vijayan MM. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *Gen Comp Endocrinol*. 2009. 164 (2-3): 142-150.
- Amores A, Force A, Yan Y, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland R, Prince V, Wang Y, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*. 1998. 282: 1711-1714.
- Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH, Takahashi JS. Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*. 1997. 89: 655-667.
- Arends RJ, Rotllant J, Metz JR, Mancera JM, Wendelaar Bonga SE, Flik G. α -MSH acetylation in the pituitary gland of the sea bream (*Sparus aurata* L.) in response to different backgrounds, confinement and air exposure. *J Endocrinol*. 2000. 166: 427-435.
- Asai M, Ramachandrapa R, Joachim M, Shen Y, Zhang R, Nuthalapati N, Ramanathan V, Strohlic DE, Ferket P, Linhart K, Ho C, Novoselova TV, Garg S, Ridderstråle M, Marcus C, Hirschhorn JN, Keogh JM, O'Rahill S, Chan LF, Clark AJ, Farooqi IS, Majzoub JA. Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. *Science*. 2013. 341(6143): 275-278.

Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio.* 1960. 25: 11-28.

Aschoff J. A survey of biological rhythms. En: *Handbook of behavioral neurobiology. Biological Rhythms* Plenum Press New York. 1981. pp 3-10.

B

Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu L, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang C, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell.* 2005. 123(3): 495-505.

Bangol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HEW, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson, SJ. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between agouti-related protein and proopiomelanocortin in the brain. *J Neurosci.* 1999. 19: 1-7.

Baron M, Maillet J, Huyvaert M, Dechaume A, Boutry R, Loïselle H, Durand E, Toussaint B, Vaillant E, Philippe J, Thomas J, Ghulam A, Franc S, Charpentier G, Borys JM, Lévy-Marchal C, Tauber M, Scharfmann R, Weill J, Aubert C, Kerr-Conte J, Pattou F, Roussel R, Balkau B, Marre M, Boissel M, Derhourhi M, Gaget S, Canouil M, Froguel P, Bonnefond A. Loss-of-function mutations in MRAP2 are pathogenic in hyperphagic obesity with hyperglycemia and hypertension. *Nat Med.* 2019. 25(11): 1733-1738.

Begrache K, Sutton GM, Fang J, Butler AA. The melanocortin neuronal pathways in circadian biology: a new homeostatic output involving melanocortin-3-receptors?. *Obes Rev.* 2009. 2: 14-24.

Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chrétien M, Seidah NG. PC1 and PC2 are protein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991. 88(9): 3564-3568.

Box NF, Wyeth JR, O'Gorman LE, Martin NG, Sturm RA. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet.* 1997. 6(11): 1891-1897.

Brunson KL, Avishai-Eliner S, Baram TZ. ACTH treatment of infantile spasms: mechanisms of its effects in modulation of neural excitability. *Int Rev Neurobiol.* 2002. 49: 185-197.

Brunson KL, Khan N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Corticotropin (ACTH) acts directly on amygdala neurons to down regulate corticotropin-releasing hormone gene expression. *Ann Neurol.* 2001. 49: 304-312.

- Bruschetta G, Kim JD, Diano S, Chan LF. Overexpression of melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) in adult paraventricular MC4R neurons regulates energy intake and expenditure. *Mol Metab.* 2018. 18: 79-87.
- Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* 1992. 71: 1195-1204.
- Butler AA, Girardet G, Mavrikaki M, Trevaskis JL, Macarthur H, Marks DL, Farr SA, A life without hunger: The ups (and downs) to modulating melanocortin-3 receptor signaling. *Front Neurosci.* 2017. 11(128): 1-9.

C

- Cal L, Megías M, Cerdá-Reverter JM, Postlethwait JH, Braasch I, Rotllant J. BAC recombineering of the agouti loci from spotted gar and zebrafish reveals the evolutionary ancestry of dorsal-ventral pigment asymmetry in fish. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2017. 328(7): 697-708.
- Cal L, Suarez-Bregua P, Braasch I, Irion U, Kelsh R, Cerdá-Reverter JM, Rotllant J. Loss of function mutations in the melanocortin 1 receptor cause disruption of dorso-ventral countershading in teleost fish. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019. 32(6): 817-828.
- Castro MG, Morrison E. Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and the brain. *Crit Rev Neurobiol.* 1997. 11: 35-57.
- Cavallari N, Frigato E, Vallone D, Fröhlich N, Lopez-Olmeda JF, Foà A, Berti R, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C, Foulkes NS. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *Plos Biol.* 2011. 9(9): e1001142.
- Cawley NX, Li Z, Loh YP. Biosynthesis, trafficking, and secretion of proopiomelanocortin-derived peptides. *Mol Endocrinol.* 2016. 56(4): 77-97.
- Cedernaes J, Waldeck N, Bass J. Neurogenetic basis for circadian regulation of metabolism by the hypothalamus. *Genes Dev.* 2019. 33(17-18): 1136-1158.
- Ceinos RM, Guillot R, Kelsh RN, Cerdá-Reverter JM, Rotllant J. Pigment patterns in adult fish result from superimposition of two largely independent pigmentation mechanisms. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015. 28: 196-209.
- Cerdá-Reverter JM, Agulleiro MJ, Guillot R, Sánchez E, Ceinos R, Rotllant J. Fish melanocortin system. *Eur J pharmacol.* 2011. 660: 53-60.
- Cerdá-Reverter JM, Anglade I, Martínez-Rodríguez G, Mazurais D, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M, Kah O, Zanuy S. Characterization of neuropeptide Y

- expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat.* 2000. 19(4): 197-210.
- Cerdá-Reverter JM, Ling MK, Schiöth HB, Peter RE. Molecular cloning, characterization and brain mapping of the melanocortin 5 receptor in the goldfish. *J Neurochem.* 2003. 87(6): 1354-1367.
- Cerdá-Reverter JM, Peter RE. Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene. *Endocrinology.* 2003. 144(10): 4552-4561.
- Cerdá-Reverter JM, Ringholm A, Schiöth HB, Peter RE. Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: involvement in the control of food intake. *Endocrinology.* 2003b. 144(6): 2336-2349.
- Cerdá-Reverter JM, Schiöth HB, Peter RE. The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regul Pept.* 2003a. 115: 101-113.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Carrillo M, Kah O. Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*L.) and Sea Bream (*Sparus aurata*L.). *Gen Comp Endocrinol.* 1996. 103(3): 290-300.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Carrillo M, Madrid JA. Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiol Behav.* 1998. 64(3): 245-250.
- Challet E. The circadian regulation of food intake. *Nat Rev Endocrinol.* 2019. 15: 393-405.
- Challet E, Mendoza J. Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain. *Cell Tissue Res.* 2010. 341(1): 1-11.
- Chaly AL, Srisai D, Gardner EE, Sebag JA. The melanocortin receptor accessory protein 2 promotes food intake through inhibition of the prokineticin receptor-1. *eLife.* 2016. 5: e12397.
- Chan LF, Metherell LA, Clark AJL. Effects of melanocortins on adrenal gland physiology. *Eur J Pharmacol.* 2011. 660(1): 171-180.
- Chan LF, Webb TR, Chung TT, Meimaridou E, Cooray SN, Guasti L, Chapple JP, Egertová M, Elphick MR, Cheetham ME, Metherell LA, Clark AJL. MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. 106(15): 6146-6151.

- Chapman KL, Kinsella GK, Cox A, Donnelly D, Findlay JBC. Interactions of the melanocortin-4 receptor with the peptide agonist NDP-MSH. *J Mol Biol.* 2010. 401: 433- 450.
- Chen A, Chiu CN, Mosser EA, Khan S, Spence R, Prober DA. QRFP and its receptors regulate locomotor activity and sleep in zebrafish. *J Neurosci.* 2016. 36(6): 1823-1840.
- Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LHT. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet.* 2000. 26(1): 97-102.
- Chen M, Mingyong Cai M, Aprahamian CJ, Georgeson KE, Hruby V, Harmon CM, Yang Y. Contribution of the conserved amino acids of the melanocortin-4 receptorin D-[Nle⁴,Phe⁷]α -melanocyte-stimulating hormone binding and signaling. *J Biol Chem.* 2007. 282 (30): 21712-21719.
- Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, Thomas RE, Low MJ, Cone RD. Exocrine glands dysfunction in MC5R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell.* 1997. 91: 789-798.
- Chhajlani V, Muceniece R, Wikberg JE. Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993. 195(2): 866-873.
- Chicchi GG, Graziano MP, Koch G, Hey P, Sullivan K, Vicario PP, Cascieri MA. Alterations in receptor activation and divalent cation activation of agonist binding by deletion of intracellular domains of the glucagon receptor. *J Biol Chem.* 1997. 272(12): 7765-7769.
- Clark AJL, Chan L. Stability and turnover of the ACTH receptor complex. *Front Endocrinol.* 2019. 10(491): 1-7.
- Clément K, Biebermann H, Farooqi IS, Van der Ploeg L, Wolters B, Poitou C, Puder L, Fiedorek F, Gottesdiener K, Kleinau G, Heyder N, Scheerer P, Blume-Peytavi U, Jahnke I, Sharma S, Mokrosinski J, Wiegand S, Müller A, Weiß K, Mai K, Spranger J, Grüters A, Blankenstein O, Krude H, Kühnen P. MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nat Med.* 2018. 24: 551-555.
- Clemenzia MN, Martchenkoa A, Loganathana N, Tsea EK, Brubakera PL, Belshama DD. Analysis of western diet, palmitate and BMAL1 regulation of neuropeptide Y expression in the murine hypothalamus and BMAL1 knockout cell models. *Mol Cell Endocrinol.* 2020. 507: 110773.

- Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev.* 2006. 27(7): 736-749.
- Cone RD, Mountjou KG. Molecular genetics of the ACTH and melanocyte-stimulating hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 1993. 4(7): 242-247.
- Cooray SN, Almiro Do Vale I, Leung KY, Webb TR, Chapple JP, Egertová M, Cheetham ME, Elphick MR, Clark AJ. The melanocortin 2 receptor accessory protein exist as a homodimer and is essential for the function of the melanocortin 2 receptor in the mouse Y1 cell line. *Endocrinology.* 2008. 149: 1935-1941.
- Cooray SN, Chan L, Webb TR, Metherell L, Clark AJ. Accessory proteins are vital for the functional expression of certain G protein-coupled receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 2009. 300(1-2): 17-24.
- Cooray SN, Chung TT, Mazhar K, Szidonya L, Clark AJL. Bioluminescence resonance energy transfer reveals the adrenocorticotropin (ACTH)-induced conformational change of the activated ACTH receptor complex in living cells. *Endocrinology.* 2011. 152(2): 495-502.
- Cooray SN, Clark AJ. Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol.* 2011. 331(2): 215-221.
- Cortés R, Agulleiro MJ, Navarro S, Guillot R, Sánchez E, Cerdá-Reverter JM. Melanocortin receptor accessory protein 2 (MRAP2) interplays with the zebrafish melanocortin 1 receptor (MC1R) but has no effect on its pharmacological profile. *Gen Comp Endocrinol.* 2014. 201: 30-36.
- Cortés R, Navarro S, Agulleiro MJ, Guillot R, García-Herranz V, Sánchez E, Cerdá-Reverter JM. Evolution of the melanocortin system. *Gen Comp Endocrinol.* 2014. 209: 3-10.
- Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron.* 1999. 24(1): 155-163.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001. 411(6836): 480-484.

D

- Davidson AJ. Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci*. 2009. 30(9): 1658-1664.
- Davidson AJ, Cappendijk SL, Stephan FK. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000. 278(5): R1296-1304.
- Dearden L, Bouret SG, Ozanne SE. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Mol Metab*. 2018. 15: 8-19.
- De Souza FSJ, Bumashny VF, Low MJ, Rubinstein M. Subfunctionalization of expression and peptide domains following the ancient duplication of the proopiomelanocortin gene in teleost fishes. *Mol Biol Evol*. 2005. 22(12): 2417-2427.
- Del Pozo A, Montoya A, Vera LM, Sánchez-Vázquez FJ. Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. *Physiol Behav*. 2012. 106(4): 446- 450.
- Del Pozo A, Sánchez-Férez JA, Sánchez-Vázquez FJ. Circadian rhythms of self-feeding and locomotor activity in zebrafish (*Danio Rerio*). *Chronobiol Int*. 2011. 28(1): 39-47.
- DiNuzzo M, Nedergaard M. Brain energetics during the sleep-wake cycle. *Curr Opin Neurobiol*. 2017. 47: 65-72.
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model Systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*. 1991. 60: 653-688.
- Dores RM, Liang L. Analyzing the activation of the melanocortin-2 receptor of tetrapods. *Gen Comp Endocrinol*. 2014. 203: 3-9.
- Dores RM, Liang L, Davis P, Thomas AL, Petko B. Melanocortin receptors: evolution of ligand selectivity for melanocortin peptides. *J Mol Endocrinol*. 2016. 56 (4): T119–T133.
- Doyle S, Menaker M. Circadian photoreception in vertebrates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007. 72(1): 499-508.
- Dudley CA, Erbel-Sieler C, Jo Estill S, Reick M, Franken P, Pitts S, McKnight SL. Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science*. 2003. 301(5631): 379-383.

E

- Enriori PJ, Chen W, García Rudaz MC, Grayson BE, Evans AE, Comstock SM, Gebhardt U, Müller HL, Reinehr T, Henry BA, Brown RD, Bruce CR, Simonds SE, Litwak SA, McGee SL, Luquet S, Martinez S, Jastroch M, Cowley MA. α -Melanocyte stimulating hormone promotes muscle glucose uptake via melanocortin 5 receptors. *Mol Metab.* 2016. 5(10): 807-822.
- Ersoy BA, Pardo L, Zhang S, Thompson DA, Millhauser G, Govaerts C, Vaisse C. Mechanism of N-terminal modulation of activity at the melanocortin-4 receptor GPCR. *Nat Chem Biol.* 2012. 8: 725-730.

F

- Falcón J, Migaud H, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M. Current knowledge of the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.* 2010. 165(3): 469-482.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ. Role of melancortinergetic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature.* 1997. 385(6612): 165-168.
- Feillet CA, Ripperger JA, Magnone MC, Dulloo A, Albrecht U, Challet E. Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. *Curr Biol.* 2006. 16 (20): 2016-2022.
- Forlano PM, Cone RD. Conserved neurochemical pathways involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J Comp Neurol.* 2007. 505(3): 235-248.
- Foulkes NS, Whitmore D, Vallone D, Bertolucci C. Chapter one- Studying the evolution of the vertebrate circadian clock: the power of fish as comparative models. *Adv Genet.* 2016. 95: 1-30.
- Fridmanis D, Petrovska R, Kalnina I, Slaidina M, Peculis R, Schiöth HB, Klovins J. Identification of domains responsible for specific membrane transport and ligand specificity of the ACTH receptor (MC2R). *Mol Cell Endocrinol.* 2010. 321(2): 175-183.

G

- Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P. Synaptic physiology of central CRH system. *Eur J Pharmacol.* 2008. 583(2-3): 215-225.
- Gallardo CM, Darvas M, Oviatt M, Chang CH, Michalik M, Huddy TF, Meyer EE, Shuster SA, Aguayo A, Hill EM, Kiani K, Ikpeazu J, Martinez JS, Purpura M, Smit AN, Patton DF, Mistlberger RE, Palmiter RD, Steele AD. Dopamine

- receptor 1 neurons in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice. *eLife*. 2014. 3: e03781.
- Gandhi AV, Mosser EA, Oikonomou G, Prober DA. Melatonin Is Required for the Circadian Regulation of Sleep. *Neuron*. 2015. 85(6): 1193-1199.
- Gantz I, Shimoto Y, Konda Y, Miwa H, Dickinson CJ, Yamada T. Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994. 200(3): 1214-1220.
- García-Borrón JC, Sánchez-Laorden BL, Jiménez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res*. 2005. 18(6): 393-410.
- Gatfield D, Schibler U. Circadian glucose homeostasis requires compensatory interference between brain and liver clocks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105(39): 14753-14754.
- Ghamari-Langroudi M, Digby GJ, Sebag JA, Millhauser GL, Palomino R, Matthews R, Gillyard T, Panaro BL, Tough IR, Cox HM, Denton JS, Cone RD. G-protein-independent coupling of MC4R to Kir7.1 in hypothalamic neurons. *Nature*. 2015. 520: 94-98.
- Giraldet C, Marks DL, Butler AA. Melanocortin-3 receptors expressed on agouti-related peptide neurons inhibit feeding behaviour in female mice. *Obesity*. 2018. 26(12): 1849-1855.
- Gross JB, Borowsky R, Tabin CJ. A novel role for MC1R in the parallel evolution of depigmentation in independent poblations of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *Plos Genet*. 2009. 5: e1000326.
- Guillot R, Ceinos RM, Cal R, Rotllant J, Cerdá-Reverter JM. Transient ectopic overexpression of agouti-signalling protein 1 (asip1) induces pigment anomalies in flatfish. *PLoS One*. 2012. 7(12): e48526.
- Guillot R, Cortés R, Navarro S, Mischitelli M, García-Herranz V, Sánchez E, Cal L, Navarro JC, Míguez JM, Afanasyev S, Krasnov A, Cone RD, Rotllant J, Cerdá-Reverter JM. Behind melanocortin antagonist overexpression in the zebrafish brain: A behavioral and transcriptomic approach. *Horm Behav*. 2016. 82: 87-100.
- Gurevich VV, Gurevich EV. GPCRs and signal trnsducers: interaction stoichiometry. *Trends Pharmacol Sci*. 2018. 39: 672–684.

H

- Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ. Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000. 279(1): R47-52.
- Hannah-Shmouni F, Faucz FR, Stratakis CA. Alterations of Phosphodiesterases in adrenocortical tumors. *Front Endocrinol*. 2016. 7(111): 1-9.
- Haskell-Luevano C, Sawyer TK, Trumpp-Kallmeyer S, Bikker JA, Humblet C, Gantz I, Hruby VJ. Three-dimensional molecular models of the hMC1R melanocortin receptor: complexes with melanotropin peptide agonists. *Drug Des Discov*. 1996. 14(3): 197-211.
- Hentges ST, Otero-Corchon V, Pennock RL, King CM, Low MJ. Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *J Neurosci*. 2009. 29(43): 13684-13690.
- Herraiz C, García-Borrón JC, Jiménez-Cervantes C, Olivares C. MC1R signaling. Intracellular partners and pathophysiological implications. *BBA Mol Basis Dis*. 2017. 1863(10): 2448-2461.
- Herraiz C, Jiménez-Cervantes C, Sánchez-Loarden B, García-Borrón J. Functional interplay between secreted ligands and receptors in melanoma. *Semin Cell Dev Biol*. 2018. 78: 73-84.
- Herrero MJ, Martínez FJ, Míguez MJ, Madrid JA. Response of plasma and gastrointestinal melatonin, plasma cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to dietary supplementation with tryptophan and melatonin. *J Comp Physiol B*. 2007. 177: 319-326.
- Herrero MJ, Pascual M, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Demand-feeding rhythms and feeding-entrainment of locomotor activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Physiol Behav*. 2005. 84(4): 595-605.
- Heyder N, Kleinau G, Szczepek M, Kwiatkowski D, Speck D, Soletto L, Cerdá-Reverter JM, Krude H, Kühnen P, Biebermann H, Scheerer P. Signal transduction and pathogenic modifications at the melanocortin-4 receptor: a structural perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019. 10(515): 1-18.
- Hinkle PM, Serasinghe MN, Jakabowski A, Sebag JA, Wilson KR, Haskell-Luevano C. Use of chimeric melanocortin-2 and -4 receptors to identify regions responsible for ligand specificity and dependence on melanocortin 2 receptor accessory protein. *Eur J Pharmacol*. 2011. 660(1): 94-102.

Hirayama J, Alifu Y, Hamabe R, Yamaguchi S, Tomita J, Maruyama Y, Asaoka Y, Nakahama KI, Tamaru T, Takamatsu K, Takamatsu N, Hattori A, Nishina S, Azuma N, Kawahara A, Kume K, Nishina H. The clock components Period2, Cryptochrome1a, and Cryptochrome2a function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish. *Sci Rep.* 2019. 9(1): 196.

Hurd MW, Debruyne J, Straume M, Cahill GM. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav.* 1998. 65(3): 465-472.

Hurd MW, Ralph MR. The significance of circadian organization for longevity in the golden hamster. *J Biol Rhythms.* 1998. 13(5): 430-436.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 1997. 88(1): 131-141.

I

Iacobaş DA, Chachua T, Iacobaş S, Benson MJ, Borges K, Velíšková J, Velíšek L. ACTH and PMX53 recover synaptic transcriptome alterations in a rat model of infantile spasms. *Nature.* 2018. 8: 5722.

Iacobaş DA, Iacobas S, Chachua T, Goletiani C, Sidyelyeva G, Velíšková J, Velíšek L. Prenatal corticosteroids modify glutamatergic and GABAergic synapse genomic fabric: insights from a novel animal model of infantile spasms. *J Neuroendocrinol.* 2013. 25: 964-979.

Idda ML, Bertolucci C, Vallone D, Gothilf Y, Sánchez-Vázquez FJ, Foulkes NS. Chapter 3-Circadian clocks: lessons from fish. *Prog Brain Res.* 2012. 199: 41-57.

Iigo M, Tabata M. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. 1996. 60(3): 775-781.

Isacco L, Miles-Chan JL. Gender-specific considerations in physical activity, thermogenesis and fat oxidation: implications for obesity management. *Obes Rev.* 2018. 19(1): 73-83.

Isorna E, de Pedro N, Valenciano AI, Alonso-Gómez ÁL, Delgado MJ. Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. *J Endocrinol.* 2017. 232(3): R141-R159.

J

Ji LQ, Rao YZ, Zhang Y, Chen R, Tao YX. Regulation of melanocortin-1 receptor pharmacology by melanocortin receptor accessory protein 2 in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gen Comp Endocrinol*. 2019. 285: 113291.

K

King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher MT, Antoch MP, Steeves TDL, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*. 1997. 89: 641-653.

Klovins J, Haitina T, Fridmanis D, Kilianova Z, Kapa I, Fredriksson R, Gallo-Payet N, Schiöth HB. The melanocortin system in Fugu: determination of POMC/AGRP/MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs. *Mol Biol Evol*. 2004. 21: 563-579.

Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VI, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in *BMAL1*, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*. 2006. 20(14): 1868-1873.

Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1971. 68(9): 2112-2116.

Kumar A, Bhandari A, Sinha R, Goyal P, Grapputo A. Spliceosomal intron insertions in genome compacted ray-finned fishes as evident from phylogeny of MC receptors, also supported by a few other GPCRs. *Plos One*. 2011. 6(8): e22046.

Kumar D, Mains RE, Elipper BA. 60 years of POMC: From POMC and α -MSH to PAM, molecular oxygen, copper, and vitamin C. *J Mol Endocrinol*. 2016. 56(4): 63-76.

Kumar Jha P, Challet E, Kalsbeek A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Mol Cell Endocrinol*. 2015. 418(Pt 1): 74-88.

Kurokawa T, Murashita K, Uji S. Characterization and tissue distribution of multiple agouti-family genes in pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*. 2006. 27(12): 3165-3175.

L

- Leal E, Fernández-Durán B, Agulleiro MJ, Conde-Siera M, Míguez M, Cerdá-Reverter JM. Effects of dopaminergic system activation on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A self-feeding approach. *Horm Behav.* 2013. 64(1): 113-121.
- Leal E, Fernández-Durán B, Guillot R, Ríos D, Cerdá-Reverter JM. Stress-induced effects on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach. *J Comp Physiol B.* 2011. 181(8): 1035-1044.
- Leal E, Sánchez E, Muriach B, Cerdá-Reverter JM. Sex steroid-induced inhibition of food intake in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Physiol B.* 2009. 179(1): 77-86.
- Liang J, Li L, Jin X, Xu B, Pi L, Liu S, Zhu W, Zhang C, Luan B, Gong L, Zhang C. Pharmacological effect of human melanocortin-2 receptor accessory protein 2 variants on hypothalamic melanocortin receptors. *Endocrine.* 2018. 68(1): 94-104.
- Lima LB, Pedroso JAB, Metzger M, Gautron L, Donato J. Relationship of α -MSH and AgRP axons to the perikarya of melanocortin-4 receptor neurons. *Jr Brain Res.* 2019. 1717: 136-146.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods.* 2001. 25: 402-408.
- Livne ZBM, Alon S, Vallone D, Bayleyen Y, Tovín A, Shainer I, Nisembaum LG, Aviram I, Smadja-Storz S, Fuentes M, Falcón J, Eisenberg E, Klein DC, Burgess HA, Foulkes NS, Gothilf Y. Genetically blocking the zebrafish pineal clock affects circadian behavior. *PLoS Genet.* 2016. 12(11): e1006445.
- Lopes JP, Palmer D, Meldal M. MC4R agonists: structural overview on antiobesity therapeutics. *Cell Press.* 2018. 1501: 1-22.
- López-Olmeda JF, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Light and temperature cycles as zeitgebers of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms. *Chronobiol Int.* 2006. 23(3): 537-550.
- López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J Therm Biol.* 2011. 36(2): 91-104.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luhter M, Chen W, Woychik RP, Wilkinson WO. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature.* 1994. 371: 799-802.

M

- Madrid JA, Rol MA. Ritmos, relojes y relojeros. Una introducción a la cronobiología. *Eubacteria*. 2015. 33: 1-8.
- Malik S, Dolan TM, Maben ZJ, Hinkle PM. Adrenocorticotropic hormone (ACTH) responses require actions of the melanocortin-2 receptor accessory protein on the extracellular surface of the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2015. 290 (46): 27972-27985.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet*. 1999. 1: 119-122.
- Mavrikaki M, Girardet C, Kern A, Faruzzi Brantley A, Miller CA, Macarthur H, Marks DL, Butler AA. Melanocortin-3 receptors in the limbic system mediate feeding-related motivational responses during weight loss. *Mol Metab*. 2016. 5(7): 566-579.
- Meimaridou E, Gooljar SB, Ramnarace N, Anthonypillai L, Clark A J, y Chapple JP. The cytosolic chaperone Hsc70 promotes traffic to the cell surface of intracellular retained melanocortin-4 receptor mutants. *Mol Endocrinol*. 2011. 25(9): 1650-1660.
- Mendoza J, Pévet P, Felder-Schmittbuhl MP, Bailly Y, Challet E. The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J Neurosci*. 2010. 30(5): 1894-1904.
- Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Rüschemdorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nürnberg P, Huebner A, Cheetham ME, Clark AJL. Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet*. 2005. 37(2): 166-170.
- Michaud EJ, Bultman SJ, Stubbs LJ, Woychik RP. The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (Ay/Ay) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein. *Genes Dev*. 1993. 7: 1203-1213.
- Miller MW, Duhl DMJ, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM, Barsh GS. Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying a lethal yellow mutation. *Genes Dev*. 1993. 7: 454-467.
- Miller S, Hirota T. Pharmacological interventions to circadian clocks and their molecular bases. *J Mol Biol*. 2020. 1-17.

- Millington GW. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin Exp Dermatol*. 2006. 31(3): 407-412.
- Mistlberger RE. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav*. 2011. 104(4): 535-545.
- Mistlberger RE. Food as circadian time cue for appetitive behavior. *F1000Res*. 2020. 9: 61.
- Morgan C, Cone RD. Melanocortin-5 receptor deficiency in mice blocks a novel pathway influencing pheromone-induced aggression. *Behav Genet*. 2006. 36(2): 291-300.
- Mosialou I, Shikhel S, Liu JM, Maurizi A, Luo N, He Z, Huang Y, Zong H, Friedman RA, Barasch J, Lanzano P, Deng L, Leibel RL, Rubin M, Nickolas T, Chung W, Zeltser LM, Williams KW, Pessin JE, Kousteni S. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2. *Nature*. 2017. 543(7645): 385-390.
- Mountjoy KG. Distribution and function of melanocortin receptors within the brain. *Adv Exp Med Biol*. 2010. 681: 29-48.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*. 1992. 257(5074): 1248-1251.
- Mracek P, Santoriello C, Idda ML, Pagano C, Ben-Moshe Z, Gothilf Y, Vallone D, Foulkes NS. Regulation of per and cry genes reveals a central role for the D-Box enhancer in light- dependent gene expression. *Plos One*. 2012. 7 (12): 1-12.

N

- Nakamura TJ, Shinohara K, Funabashi T, Kimura F. Effect of estrogen on the expression of *Cry1* and *Cry2* mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neurosci Res*. 2001. 41(3): 251-255.
- Nakane Y, Yoshimura T. Photoperiodic regulation of reproduction in vertebrates. *Annu Rev Anim Biosci*. 2019. 15(7): 173-194.
- Navarro S, Soletto L, Puchol S, Rotllant J, Soengas JL, Cerdá-Reverter JM. 60 YEARS OF POMC: POMC: An evolutionary perspective. *J Mol Endocrinol*. 2016. 56(4): T113-T118.
- Nijenhuis WA, Oosterom J, Adam RA. Agrp (83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol*. 2001. 15: 164-171.

Noon LA, Franklin JM, King PJ, Goulding NJ, Hunyady L, Clark AJ. Failed export of the adrenocorticotrophin receptor from the endoplasmic reticulum in non-adrenal cells: evidence in support of a requirement for a specific adrenal accessory factor. *J Endocrinol.* 2002. 174(1): 17-25.

O

Oliveira RF, Silva JF, Simões JM. Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. *Zebrafish.* 2011. 8(2): 73-81.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen I, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science.* 1997. 278(5335): 135-138.

P

Padilla SL, Carmody JS, Zeltser LM. Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamis feeding circuits. *Nat Med.* 2010. 16(4): 403-405.

Palmisano BT, Zhu L, Eckel RH, Stafford JM. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism. *Mol Metab.* 2018. 15: 45-55.

Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001. 98(18): 10178-10183.

Partch CL. Orchestration of circadian timing by macromolecular protein assemblies. *J Mol Biol.* 2020.

Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* 2014. 24(2): 90-99.

Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020. 21(2): 67-84.

Pilorz V, Astiz M, Heinen KO, Rawashdeh O, Oster H. The concept of coupling in the mammalian circadian clock network. *J Mol Biol.* 2020. 1-29.

Prusis P, Frandberg PA, Muceniece R, Kalvinsh I, Wikberg JES. A Three-dimensional model for the interaction of MSH with the melanocortin-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. 210(1): 205-210.

Prusis P, Schiöth HB, Muceniece R, Herzyk P, Afshar M, Hubbard RE, Wikberg JES. Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic

melanocyte-stimulating hormone core peptid. *J Mol Graph*. 1997. 15: 307-317.

R

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 1990. 247: 975-978.

Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*. 1988. 241: 1225-1227.

Rao YZ, Chen R, Zhang Y, Tao YX. Orange-spotted grouper melanocortin-4 receptor: Modulation of signaling by MRAP2. *Gen Comp Endocrinol*. 2019. 284: 113234.

Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*. 1993. 72(6): 827-834.

Rodrigues AR, Ameida H, Gouveia AM. α -Msh signalling via melanocortin 5 receptor promotes lipolysis and impairs re-esterification in adipocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2013. 1831(7): 1267-1275.

Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L): hormonal aspects. *Gen Comp Endocrinol*. 2005. 140(2): 116-125.

Roselli- Rehfuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB, Cone RD. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90(19): 8856-8860.

Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*. 1998. 139(10): 4428-4431.

Rouault AA, Srinivasan DK, Yin TC, Lee AA, Sebag JA. Melanocortin receptor accessory proteins (MRAPs): functions in the melanocortin system and beyond. *BBA Mol Basis Dis*. 2017. 1863(10): 2462-2467.

Rouault AAJ, Lee AA, Sebag JA. Regions of MRAP2 required for the inhibition of orexin and prokineticin receptor signaling. *BBA Mol Cell Res*. 2017. 1864 (12): 2322-2329.

Roy S, Rached M, Galoo-Payet N. Differential regulation of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin-2 receptor (MC2R)) by human MC2R accessory protein isoform alpha and beta in isogenic human embryonic kidney 293 cells. *Mol Endocrinol*. 2007. 21(7): 1656-1669.

Roy S, Roy SJ, Pinard S, Agulleiro MJ, Cerdá-Reverter JM, Parent JL, Gallo-Payet N. The C-terminal domains of melanocortin-2 receptor (MC2R) accessory proteins (MRAP1) influence their localization and ACTH-induced cAMP production. *Gen Comp Endocrinol*. 2012. 176(2): 265-274.

Rudic RD, McNamara P, Curtis A, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, FitzGerald GA. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *Plos Biol*. 2004. 2(11): 1893- 1899.

S

Saleh N, Kleinau G, Heyder N, Clark T, Hildebrand PW, Scheerer P. Binding, thermodynamics, and selectivity of a non-peptide antagonist to the melanocortin-4 receptor. *Front Pharmacol*. 2018. 9: 560.

Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harb Lab Press. 2001.

Sánchez E, Rubio VC, Cerdá-Reverter JM. Characterization of the sea bass melanocortin 5 receptor: a putative role in hepatic lipid metabolism. *J Exp Biol*. 2009. 212: 3901-3910.

Sánchez E, Rubio VC, Thompsin D, Metz J, Flik G, Millhauser GL, Cerdá-Reverter JM. Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Am J Physiol Regul Integrand Comp Physiol*. 2009a. 296(5): R1293-R1306.

Sánchez-Vázquez FJ, Azzaydi M, Martínez FJ, Zamora S Madrid JA. Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiol Int*. 1998. 15(6): 607–622.

Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass *Dicentrarchus labrax* L.: Dual phasing capacity of diel-demand feeding pattern. *J Biol Rhythms*. 1995. 10: 256–266.

Schimmer BP, Kwan WK, Tsao J, Qiu R. Adrenocorticotropin-resistant mutants of the Y1 adrenal cell line fail to express the adrenocorticotropin receptor. *J Cell Physiol*. 1995. 163: 164-171.

Schiöth HB, Haitina T, Ling MK, Ringholm A, Fredriksson R, Cerdá-Reverter JM, Klovins J. Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes. *Peptides*. 2005. 26: 1886-1900.

- Schwyzler R. ACTH: a short introductory review. *Ann N Y Acad Sci.* 1977. 297: 3-26.
- Sebag JA, Hinkle PM. Melanocortin - 2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007. 104(51): 20244-20249.
- Sebag JA, Hinkle PM. Opposite effects of the melanocortin-2 (MC2) receptor accessory protein MRAP on MC2 and MC5 receptor dimerization and trafficking. *J Biol Chem.* 2009. 284 (34): 22641-22648.
- Sebag JA, Hinkle PM. Regions of melanocortin 2 (MC2) receptor accessory protein necessary for dual topology and MC2 receptor trafficking and signalling. *J Biol Chem.* 2009. 284: 610-618.
- Sebag JA, Zhang C, Hinkle PM, Bradshaw AM, Cone RD. Developmental control of the melanocortin-4 receptor by MRAP2 proteins in zebrafish. *Science.* 2013: 341(6143): 278- 281.
- Shainer I, Buchshtab A, Hawkins TA, Wilson SW, Cone RD, Gothilf Y. Novel hypophysiotropic AgRP2 neurons and pineal cells revealed by BAC transgenesis in zebrafish. *Sci Rep.* 2017. 7: 44777.
- Shainer I, Michel M, Marquart GD, Bhandiwad AA, Zmora N, Ben-Moshe Livne Z, Zohar Y, Hazak A, Mazon Y, Förster D, Hollander-Cohen L, Cone RD, Burgess HA, Gothilf Y. Agouti-related protein 2 is a new player in the teleost stress response system. *Curr Biol.* 2019. 29(12): 2009-2019.
- Shang G, Peng X, Ji C, Zhai G, Ruan Y, Lou Q, Jin X, He J, Wang H, Yin Z. Steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone are required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation in zebrafish. *Biol Reprod.* 2019. 101(4): 760-770.
- Shinyama H, Masuzaki H, Fang H, Flie JS. Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology.* 2003. 144(4): 1301-1314.
- Shipp SL, Yi J, Dridi S, Gilbert ER, Cline MA. The central anorexigenic mechanism of adrenocorticotrophic hormone involves the caudal hypothalamus in chicks. *Neuropeptides.* 2015. 53: 29-35.
- Smith T, Funder JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrin Rev.* 1988. 9(1): 159-179.
- Soletto L, Hernández-Balfagó S, Rocha A, Scheerer P, Kleinau G, Cerdá-Reverter JM. Melanocortin receptor accessory protein 2-induced adrenocorticotrophic hormone response of human melanocortin 4 receptor. *J Endocr Soc.* 2019. 3(2): 314-323.

- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2008. 83(1): 13-34.
- Springer MS, Gatesy J. Evolution of the MC5R gene in placental mammals with evidence for its inactivation in multiple lineages that lack sebaceous glands. *Mol Phylogenet Evol*. 2018. 120: 364-374.
- Srinivasan S, Lubrano-Berthelier C, Govaerts C, Picard Franck, Santiago P, Conklin BR, Vaisse C. Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest*. 2004. 114(8): 1158-1164.
- Srisai D, Yin TC, Lee AA, Rouault AAJ, Pearson NA, Grobe JL, Sebag JA. MRAP2 regulates ghrelin receptor signaling and hunger sensing. *Nat Commun*. 2017. 8(1): 713.
- Staels B. When clock stops ticking, metabolic syndrome explodes. *Nat med*. 2006. 12: 54-55.
- Summa K, Turek FW. Chronobiology and obesity: interactions between circadian rhythms and energy regulation. *Adv Nutr*. 2014. 5(3): 312S- 319S.
- Sun W, Jia Y, Ding X, Dai L, Liu C, Wang J, Zhao G, Zhou H, Yu L. Combined effects of pentachlorophenol and its by product hexachlorobenzene on endocrine and reproduction in zebrafish. *Chemosphere*. 2019. 220: 216-226.
- Sutton GM, Perez-Tilve D, Nogueiras R, Fang J, Kim JK, Cone RD, Gimble JM, Tschöp MH, Butler AA. The melanocortin-3 receptor is required for entrainment to meal intake. *J Neurosci*. 2008. 28(48): 12946-12955.

T

- Takhar S, Gyomerey S, Su R, Mathi SK, Li X, Wheeler MB. The third cytoplasmic domain of the GLP-1[7-36 amide] receptor is required for coupling to the adenylyl cyclase system. *Endocrinology*. 1996. 137(5): 2175-2178.
- Tamai TK, Vardhanabhuti V, Foulkes NS, Whitmore D. Early embryonic light detection improves survival. *Curr Biol*. 2004. 14: R104-105.
- Tamai TK, Young LC, Whitmore D. Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007. 104(37): 14712-14717.
- Tao Y, Huang H, Wang Z, Yang F, Williams JN, Nikiforovich GV. Chapter Fourteen - Constitutive activity of neural melanocortin receptors. *Meth Enzymol*. 2010. 484: 267- 279.
- Tao YX. Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2005. 239: 1-14.

Tarnow P, Schöneberg T, Krude H, Grüters A, Biebermann H. Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. *J Biol Chem*. 2003. 278(49): 48666-48673.

Tolle V, Low MJ. In vivo evidence for inverse agonism of Agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice. *Diabetes*. 2008. 57: 86-94.

Tsigos C, Arai K, Hung W, Chrousos GP. Hereditary isolated glucocorticoid deficiency is associated with abnormalities of the adrenocorticotropin receptor gene. *J Clin Invest*. 1993. 92(5): 2458-2461.

V

Valsalan R, Krishnan A, Almén MS, Fredriksson R, Schiöth HB. Early vertebrate origin of melanocortin 2 receptor accessory proteins (MRPAPs). *Gen Comp Endocrinol*. 2013. 188: 123-132.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet*. 1995. 11(3): 328-330.

Van de Klaauw AA, Farooqi IS. The hunger genes: pathways to obesity. *Cell*. 2015. 161(1): 119-132.

Västermark Å, Krishnan A, Houle ME, Fredriksson R, Cerdá-Reverter JM, Schiöth HB. Identification of distant Agouti-like sequences and re-evaluation of the evolutionary history of the Agouti-related peptide (AgRP). *PLoS One*. 2012. 7(7): e40982.

Velarde E, Cerdá-Reverter JM, Alonso-Gómez AL, Sánchez E, Isorna E, Delgado MJ. Melatonin-synthesizing enzymes in pineal, retina, liver, and gut of the goldfish (*Carassius*): mRNA expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions. *Chronobiol Int*. 2010. 27(6): 1178-201.

Vergoni AV, Poggioli R, Bertolini A. Corticotropin inhibits food intake in rats. *Neuropeptides*. 1986. 7(2): 153-158.

Vrieling H, Duhl DM, Millar SE, Miller KA, Barsh GS. Differences in dorsal and ventral pigmentation result from regional expression of the mouse agouti gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91(12): 5667-5671.

W

- Wang M, Chen Y, Zhu M, Xu B, Guo W, Lyu Y, Zhang C. Pharmacological modulation of melanocortin-4 receptor by melanocortin receptor accessory protein 2 in Nile tilapia. *Gen Comp Endocrinol.* 2019. 282: 113219.
- Webb TR, Chan L, Cooray SN, Cheetham ME, Chapple JP, Clark AJ. Distinct melanocortin 2 receptor accessory protein domains are required for melanocortin 2 receptor interaction and promotion of receptor trafficking. *Endocrinology.* 2009. 150(2): 720-726.
- Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol.* 2010. 72: B551-577.
- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev.* 1997. 77(3): 591-625.
- Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature.* 2000. 404(6773): 87-91.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci.* 2001. 24: 429-458.

X

- Xu Y, López M. Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Mol Metab.* 2018. 15: 104-115.

Y

- Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science.* 2003. 302(5649): 1408-1412.
- Yang Y, Cai M, Chen M, Qu H, McPherson D, Hruby, Harmon CM. Key amino acid residues in the melanocortin-4 receptor for nonpeptide THIQ specific binding and signaling. *Regul Pept.* 2009. 155: 46-54.
- Yang Y, Chen M, Lai Y, Gantz I, Georgeson KE, Harmon CM. Molecular determinants of human melanocortin-4 receptor responsible for antagonist SHU9119 selective activity. *J Biol Chem.* 2002. 277(23): 20328-20335.

- Yang Y, Chen M, Loux TJ, Georgeson KE, Harmon CM. Molecular mechanism of the intracellular segments of the melanocortin-4 receptor for NDP-MSH signaling. *Biochemistry*. 2005. 44: 6971-6979.
- Yang Y, Chen M, Ventro G, Harmon CM. Amino acid residue L112 in the ACTH receptor plays a key role in ATCH or α -MSH selectivity. *Mol Cell Endocrinol*. 2019. 482: 11-17.
- Yang Y, Dickinson C, Haskell-Luevano C, Gantz I. Molecular basis for the interaction of [Nle⁴,D-Phe⁷] melanocyte stimulating hormone with the human melanocortin-1 receptor (melanocyte α -MSH receptor). *J Biol Chem*. 1997. 272 (37): 23000-23010.
- Yang Y, Fong TM, Dickinson CJ, Mao C, Li J, Tota MR, Mosley R, Van der Ploeg LHT, Gantz I. Molecular determinants of ligand binding to the human melanocortin-4 receptor. *Biochemistry*. 2000. 39(48): 14900-14911.
- Yang Y, Harmon CM. Molecular determinants of ACTH receptor for ligand selectivity. *Mol Cell Endocrinol*. 2020. 503: 110688.
- Yang YK, Thompson DA, Dickinson CJ, Wilken J, Barsh GS, Kent SB, Gantz I. Characterization of agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Mol Endocrinol*. 1999. 13(1): 148-155.
- Yang X, Wang Z, Dong W, Ling L, Yang H, Chen R. Modeling and docking of the three-dimensional structure of the human melanocortin 4 receptor. *J Protein Chem*. 2003. 22(4): 335-344.

Z

- Zhang C, Song Y, Thompson DA, Madonna MA, Millhauser GL, Toro S, Varga Z, Westerfield M, Gamse J, Chen W, Cone RD. Pineal-specific agouti protein regulates teleost background adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010. 107(47): 20164-20171.
- Zhang J, Li X, Zhou Y, Cui L, Li J, Wu C, Wan Y, Li J, Wang, Y. The interaction of MC3R and MC4R with MRAP2, ACTH, α -MSH and AGRP in chickens. *J Endocrinol*. 2017. 234(2): 155-174.
- Zhao F, Wei P, Wang J, Yu M, Zhang X, Tian H, Wang W, Ru S. Estrogenic effects associated with bisphenol A exposure in male zebrafish (*Danio rerio*) is associated with changes of endogenous 17- β estradiol and gene specific DNA methylation levels. *Gen Comp Endocrinol*. 2017. 252: 27-35.

- Zhao Y, Castiglioni S, Fent K. Environmental progestins progesterone and drospirenone alter the circadian rhythm network in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*. 2015. 49(16): 10155-10164.
- Zhao Y, Zhang K, Fent K. Regulation of zebrafish (*Danio rerio*) locomotor behavior and circadian rhythm network by environmental steroid hormones. *Environ Pollut*. 2018. 232: 422-429.
- Zhdanova IV. Sleep and its regulation in zebrafish. *Rev Neurosci*. 2011. 22(1): 27-36.
- Zhu M, Wang M, Chen Y, Zhang C. Pharmacological modulation of two melanocortin-5 receptors by MRAP2 proteins in zebrafish. *J Mol Endocrinol*. 2018. 62(1): 27-36.
- Zucchi S, Castiglioni S, Fent K. Progesterone alters global transcription profiles at environmental concentrations in brain and ovary of female zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol*. 2013. 47(21): 12548-12556.
- Zulley J, Wever R, Aschoff J. The dependence of onset and duration of sleep on the circadian rhythm of rectal temperature. *Pflugers Arch*. 1981. 391: 314-318.