

RESUMEN

El control de la reproducción constituye una piedra angular en la domesticación de las especies acuícolas. Bajo condiciones intensivas de cultivo, la precisa regulación de la gametogénesis y de los ciclos reproductivos resulta esencial para garantizar la producción de gametos y larvas de alta calidad, evitando al mismo tiempo fenómenos indeseados como la maduración precoz. Una comprensión integral de los mecanismos endocrinos y paracrinós/autocrinós que regulan el desarrollo y la función gonadal proporciona no solo un conocimiento fundamental de la fisiología reproductiva, sino también una base práctica para el desarrollo de estrategias biotecnológicas innovadoras del manejo de la reproducción en cautividad.

En este contexto, la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) desempeña un papel clave en la regulación de los procesos reproductivos en vertebrados, incluyendo la diferenciación gonadal, la foliculogénesis y la espermatogénesis. Entre sus numerosos miembros, la **Hormona Anti-Mülleriana (Amh)** y el **Factor Derivado del Soma Gonadal (GsdF)** han suscitado un creciente interés debido a su implicación en la diferenciación sexual y el desarrollo gonadal en peces teleósteos. Sin embargo, sus funciones específicas, mecanismos de regulación y vías de señalización, incluyendo la identificación de sus receptores, así como la diversificación evolutiva de toda la familia tras los eventos de duplicación genómica en teleósteos, permanecen aún poco comprendidos.

Esta tesis doctoral se diseñó con el objetivo de elucidar los **mecanismos moleculares, celulares y funcionales de Amh y GsdF en la fisiología reproductiva de la lubina (*Dicentrarchus labrax*)**, una especie clave en la acuicultura mediterránea y modelo biológico establecido para el estudio de la reproducción en teleósteos. El estudio sigue un **enfoque integrador y multidisciplinario**, combinando análisis de expresión génica y proteica con ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*, además de sistemas celulares heterólogos para explorar la señalización mediada por receptores TGF- β . Los principales objetivos son: (i) caracterizar la expresión y localización de *amh*, *amhr2* y *gsdf* a lo largo de los principales estadios del desarrollo y del ciclo reproductivo en ambos sexos; (ii) evaluar funcionalmente los efectos de Amh sobre la gametogénesis y la esteroidogénesis; (iii) analizar la historia evolutiva y diversificación de los genes que codifican las proteínas GsdF y los receptores TGF- β ; (iv) investigar la regulación transcripcional de *gsdf1* y *gsdf2* mediante análisis de promotores y estudios de modulación hormonal; y (v) caracterizar el repertorio de receptores TGF- β en lubina, identificando emparejamientos funcionales y diversidad en las vías de señalización.

Los principales resultados de la tesis incluyen:

1) Amh: expresión, localización y función. Se han caracterizado la Amh y su receptor Amhr2 a nivel transcripcional y proteico durante el desarrollo gonadal y el ciclo reproductivo de la lubina. Durante la diferenciación sexual (200-250 días post-eclosión), la expresión de *amh* es unas 50 veces mayor en machos que en hembras, lo que concuerda con su papel asociado al sexo masculino. La Amh se localiza en espermatogonias y células de Sertoli, mientras que el Amhr2 muestra una distribución más amplia, presente también en células germinales más avanzadas. En el ovario, la Amh se detecta en células foliculares que rodean los oocitos en fases tempranas o durante la vitelogénesis, y el Amhr2 se localiza tanto en células somáticas como germinales, sugiriendo una actividad coordinada ligando-receptor durante la foliculogénesis.

Estos resultados confirman un papel conservado de la Amh en la diferenciación masculina, pero además revelan una función, hasta ahora poco reconocida, en la gametogénesis en hembras. La detección del péptido maduro de Amh (~25 kDa) en ovarios post-vitelogénicos sugiere la existencia de una forma bioactiva circulante, con un posible papel endocrino más allá de la gónada, potencialmente implicado en la regulación del eje cerebro-hipófisis-gonada (BPG), como se ha descrito en mamíferos y otros teleósteos.

Los experimentos funcionales han demostrado un nuevo **papel esteroideogénico de la Amh** en peces. En cultivos *in vitro* de ovarios pre-vitelogénicos, la Amh potencia la expresión de *cyp19a1a* y la síntesis de estradiol (E₂) inducidas por Fsh, indicando una interacción sinérgica con la señalización gonadotrópica. En testículos pre-meióticos, la Amh estimula significativamente la producción de andrógenos (testosterona, T y 11-cetotestosterona, 11-KT), incluso en ausencia de respuesta a Fsh, estableciendo a la Amh como un estimulador independiente de la esteroideogénesis en etapas tempranas de la espermatogénesis. Estos efectos se confirman *in vivo*, donde la inyección del plásmido que expresa Amh en machos adultos provoca un aumento gradual y significativo de los niveles plasmáticos de 11-KT. En conjunto, estos resultados demuestran que la Amh actúa localmente como regulador positivo de la esteroideogénesis, en contraste con su función inhibitoria en mamíferos.

A nivel molecular, los mecanismos intracelulares de señalización de la Amh se han investigado utilizando sistemas celulares heterólogos. La Amh recombinante de lubina (sbAmh) activa la vía canónica Smad1/5/8 a través de su receptor específico de tipo II, Amhr2, y mediante el reclutamiento de los receptores de tipo I, Alk2 o Alk3. Esta activación es inhibida por el LDN193189, un inhibidor selectivo de dichos receptores, lo que confirma su participación funcional. Además, la sbAmh también activa la vía cAMP/PKA de manera dependiente del Amhr2, como se ha demostrado mediante la estimulación de la actividad del CRE-Luc, un efecto que es bloqueado por el antagonista de PKA, el Rp-8-CPT-cAMPs. Los

experimentos de inhibición farmacológica han revelado una interacción funcional entre ambas vías, indicando que la señalización de la Amh en la lubina activa simultáneamente vías intracelulares canónicas a través de Smad y no canónicas mediante PKA. La necesidad de una PKA activa para la producción de andrógenos inducida por Amh proporciona una explicación mecanística de sus efectos esteroidogénicos en la gónada. Estos hallazgos establecen, por primera vez en teleósteos, que la Amh activa de forma concurrente las rutas de señalización dependientes de Smad y de PKA, ofreciendo un marco molecular que explica su doble función en la gametogénesis y la esteroidogénesis.

2) Gsdf: divergencia evolutiva y funcional. El segundo eje de esta tesis es la caracterización del Gsdf, otro miembro de la familia TGF- β . En lubina, se han identificado dos parálogos, *gsdf1* y *gsdf2*. Análisis filogenéticos y de sinténia han demostrado que esta duplicación es específica de la especie y no está relacionada con la duplicación genómica completa de los teleósteos. Los perfiles de expresión de *gsdf1* y *gsdf2* son diferentes dependiendo del sexo; el *gsdf1* se expresa predominantemente en machos durante el desarrollo testicular temprano, mientras que el *gsdf2* se expresa sobre todo en células foliculares pre-vitelogénicas. En los machos, el patrón temporal de expresión de *gsdf1* indica su participación en el inicio de la diferenciación testicular y una correlación negativa con la activación de la espermatogénesis durante la pubertad. Los análisis de promotores revelan sitios de unión conservados para Dmrt1 y Sf1/Nr5a1, reguladores clave de la diferenciación sexual y la expresión de genes esteroidogénicos, lo que indica la integración de Gsdf dentro de la red reguladora gonadal. En conjunto, estos resultados sugieren que los parálogos de Gsdf han desarrollado funciones complementarias, sesgadas por el sexo, en la regulación del desarrollo gonadal temprano y la maduración folicular. Además, el Gsdf interactúa con señales endocrinas que rigen las transiciones gonadales. En ambos sexos, su transcripción responde a señales hormonales: los tratamientos con Fsh modulan la expresión de *gsdf1/2* en testículos pre-meióticos y en ovarios atrésicos/pre-vitelogénicos, lo que indica que el Gsdf actúa en etapas tempranas de la gametogénesis, sensibles a Fsh. El estradiol y la Amh también influyen en los niveles de *gsdf*, lo que sugiere que este factor integra la regulación hormonal sistémica y local durante la gametogénesis.

3) Receptores TGF- β y dinámica de señalización. Además de los estudios de ligandos, este trabajo también ha explorado la diversidad y función de los receptores de TGF- β en la lubina. Los análisis filogenéticos y genómicos han identificado múltiples receptores de tipo I y tipo II. Los ensayos de transactivación funcional en células COS-7 y HEK293 revelan un emparejamiento dinámico de receptores y proporcionan evidencia experimental de la activación de las vías Smad1/5/8 o Smad2/3 mediante diversas combinaciones. Estos hallazgos

demuestran plasticidad funcional y redundancia dentro de la red de receptores de TGF- β en teleósteos, lo que podría permitir una regulación precisa de múltiples procesos reproductivos.

En conjunto, este trabajo identifica a la Amh como regulador positivo de la esteroidogénesis en machos y hembras de lubina europea, desafiando la visión clásica de su función inhibitoria en mamíferos. Mecanísticamente, se ha demostrado que la Amh activa tanto las vías canónicas de Smad como las no canónicas de PKA, lo que proporciona una nueva perspectiva sobre su doble función en el control gametogénico y esteroidogénico. Asimismo, la identificación de dos parálogos de *gsdf* con expresión sexualmente diferenciada revela procesos de subfuncionalización evolutiva. Finalmente, la caracterización de la gran diversidad de receptores TGF- β en lubina pone de manifiesto la complejidad y flexibilidad adaptativa de la señalización reproductiva en peces.

Desde una perspectiva fisiológica, estos resultados integran a la Amh y al Gsdf dentro de la red de factores endocrinos y paracrinos que coordinan la gametogénesis. La evidencia de que la Amh puede actuar localmente dentro de la gónada y, potencialmente, ejercer retroalimentación sistémica sobre el eje BPG apunta a su papel como regulador multifacético que garantiza la homeostasis reproductiva.

Desde el punto de vista evolutivo, los resultados ilustran cómo la duplicación génica y la diversificación de receptores han permitido a los teleósteos adquirir nuevas configuraciones funcionales del sistema de señalización TGF- β . La demostración de la acción esteroidogénica de la Amh y el descubrimiento de distintos parálogos del Gsdf contribuyen a redefinir las funciones de esta superfamilia en la reproducción de vertebrados y proporcionan una base molecular para futuras aplicaciones en biotecnología acuícola.