

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 708**

21 Número de solicitud: 201400644

51 Int. Cl.:

**C07K 7/23** (2006.01)

**A61K 38/09** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**31.07.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.02.2016**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/000196**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)**

**Ancha, 16**

**11001 Cádiz ES**

72 Inventor/es:

**MUÑOZ CUETO, José Antonio y**

**PAULLADA SALMERON, José Antonio**

54 Título: **La hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) y su uso para controlar la pubertad, la reproducción, la ingesta y el crecimiento en peces**

57 Resumen:

La hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) y su uso para controlar la pubertad, la reproducción, la ingesta y el crecimiento en peces.

La lubina, *Dicentrarchus labrax*, es una de las especies más cultivadas en la UE. Un problema en su cultivo es el adelanto de la pubertad, que conlleva crecimientos pobres y deterioro en la calidad de la carne. La presente invención se enmarca en el sector de Biotecnología (sector de aplicación de Acuicultura). La invención relata la estrategia de clonación de la hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) de la lubina, que contiene dos nuevos péptidos de la familia RFamida. Estos péptidos han sido sintetizados y utilizados para generar anticuerpos específicos y han demostrado tener efectos inhibidores sobre diferentes factores neuroendocrinos y endocrinos que controlan la reproducción de la lubina. Esta invención puede resultar de interés para controlar la pubertad, la reproducción, la ingesta y el crecimiento de peces.

ES 2 561 708 A1

## DESCRIPCIÓN

**LA HORMONA INHIBIDORA DE GONADOTROFINAS (GNIH) Y SU USO PARA CONTROLAR LA PUBERTAD, LA REPRODUCCIÓN, LA INGESTA Y EL CRECIMIENTO EN PECES.**

### 5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

Según el área de la técnica esta invención se encuadra en el sector de la Biotecnología. Según el sector de aplicación, la invención tiene un interés para el sector de la Acuicultura, principalmente para la mejora y optimización de los cultivos de lubina y especies próximas (peces percomorfos).

10

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

En vertebrados, el área preóptica y el hipotálamo representan las principales áreas neuroendocrinas que controlan la reproducción a través de su conexión con la hipófisis y la modulación de la secreción de gonadotrofinas. Los peces teleósteos, a diferencia de los tetrápodos, carecen de eminencia media y de un sistema que ponga en contacto vascular el hipotálamo con la hipófisis, por lo que las poblaciones celulares implicadas en el control neuroendocrino de la reproducción inervan de forma más o menos directa a las células del lóbulo anterior adenohipofisario. Esta inervación directa de la hipófisis de peces teleósteos ha permitido caracterizar que neurohormonas o factores hipotalámicos pueden estar implicados en el control de la secreción de las hormonas adenohipofisarias. La presencia de fibras nerviosas de las células que producen la hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH) en el entorno próximo de las células gonadotropas, constituyó una evidencia clara de la acción de estas neurohormonas sobre el ciclo reproductivo de peces (Kah et al., 1987; 1989; 1992). Estas neurohormonas modulan la actividad de la hipófisis y desencadenan una serie de cascadas endocrinas que conducen a la reproducción (Kah et al., 1993; Trudeau, 1997, Zohar et al., 2010). La GnRH constituye el principal factor inductor del proceso reproductivo en todos los vertebrados, a través de la estimulación de la síntesis y

secreción de gonadotrofinas (GTHs), siendo su antagonista funcional en peces la dopamina, que inhibe la secreción estas hormonas adenohipofisarias que controlan la reproducción (GTHs), como se demostró en el carpín dorado (Peter y Paulencu, 1980; Chang y Peter, 1983; Chang et al., 1983). La existencia de una inhibición

5 dopaminérgica sobre la secreción de gonadotrofinas ha sido demostrada en otras especies de peces teleósteos, tales como la anguila, el pez gato, la trucha, la tilapia, el salmón coho, la carpa o el mujol (Van Asselt et al., 1988; Levavi-Sivan et al., 2003; Vidal et al., 2004; Dufour et al., 2005; Aizen et al., 2005). Estos conocimientos permitieron utilizar la GnRH y desarrollar compuestos agonistas y

10 antagonistas de la GnRH y/o la dopamina (pimozide, domperidona), así como métodos de combinación y administración de los mismos para controlar el proceso reproductivo de peces en la práctica acuícola, como se refleja en las patentes US5288705A, EP0368000B1, US5643877A, WO1996017619A9, US6210927B1, US7958848B2, entre otras. Sin embargo, la dopamina no parece

15 operar en otros peces teleósteos, en particular en peces marinos como la lubina y otros perciformes (Copeland and Thomas, 1989; King et al., 1994; Holland et al., 1998b; Zohar and Mylonas, 2001; Prat et al., 2001).

#### La Hormona Inhibidora de las Gonadotrofinas (GnIH)

20 En el año 2000 se identificó en aves un pequeño péptido hipotalámico de 12 aminoácidos que actuaba directamente sobre la hipófisis inhibiendo la síntesis y liberación de gonadotrofinas (Tsutsui et al., 2000; Tsutsui et al., 2007), por lo que fue denominado hormona inhibidora de las gonadotrofinas o GnIH.

El precursor de la proteína que codifica el gen GnIH origina 2 o 3 posibles

25 péptidos maduros, dependiendo de la especie, caracterizados por un extremo C-terminal que contiene la secuencia de aminoácidos LPQRFamida, que puede variar en uno o dos aminoácidos dependiendo de la especie estudiada. De los posibles péptidos que se encuentran codificados por el gen GnIH, solo aquellos que tienen un papel de inhibición de la secreción de las gonadotrofinas son

30 denominados como GnIH.

La familia de la GnIH incluye diferentes péptidos, que dependiendo del grupo filogenético, han recibido distintos nombres. Así, en mamíferos están caracterizados los péptidos RFRP-1, RFRP-2 y RFRP-3; en aves se ha descrito un péptido GnIH, y dos péptidos relacionados con la GnIH denominados GnIHRP-1  
 5 y GnIHRP-2; en ranas se ha denominado al péptido GnIH como fGRP, y a los péptidos relacionados codificados por este precursor como fGRP-RP-1, fGRP-RP-2; en peces teleósteos, tales como el pez cebra o el carpín dorado, se han descrito tres posibles péptidos GnIH, denominados LPXRFa-1, LPXRFa-2 y LPXRFa-3, pudiendo ser la X=L o Q (Parhar et al., 2012).

10 La identificación y localización cerebral de este neuropéptido, mediante técnicas ELISA, técnicas inmunohistoquímicas, técnicas de hibridación *in situ* (Tsutsui et al., 2000; Tsutsui y Ukena, 2006; Tsutsui et al., 2007), así como la distribución de las fibras en zonas donde se ubican las células liberadoras de gonadotrofinas, sugieren que la GnIH tiene un efecto modulador de la síntesis y liberación de la  
 15 propia GnRH además de ejercer sus efector inhibidores directos sobre la secreción de gonadotrofinas (hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del foliculo (FSH)) como se ha demostrado en vertebrados tales como aves y mamíferos. Además de lo mencionado anteriormente, la GnIH también impide el desarrollo gonadal, la síntesis de esteroides y la actividad espermatogénica en aves, lo que  
 20 sugiere que este neuropéptido puede actuar a distintos niveles del eje reproductivo (Tsutsui et al., 2007; Bentley et al., 2009).

La presencia de células GnIH en el hipotálamo posterior parece ser una característica conservada a lo largo de la evolución de vertebrados (Tsutsui et al., 2007). Así, recientemente se ha puesto también de manifiesto la presencia de un  
 25 péptido similar de tipo LPXRF-amida en peces (Sawada et al., 2002; Osugi et al., 2006; Tsutsui et al., 2007). La localización del péptido del tipo LPXRF-amida (homologo a la GnIH de aves y mamíferos) en peces, incluida la lubina europea, ha permitido caracterizar la presencia del mismo en células de áreas cerebrales tales como el bulbo olfativo/nervio terminal, y en el área preóptica, zonas donde  
 30 se encuentran ubicadas las células de tipo GnRH-III y GnRH-I, respectivamente

(González-Martínez et al., 2001, 2002). También se han localizado células GnIH en la región del tegmento mesencefálico, donde se encuentran las células de tipo GnRH-II (González-Martínez et al., 2001, 2002). La presencia de inervación GnIH en áreas neuroendocrinas relacionadas con la reproducción como el área preóptica y el hipotálamo, la inervación GnIH presente en la hipófisis y la expresión de GnIH en las gónadas de la lubina, hace pensar que la GnIH también puede estar ejerciendo efectos inhibidores a distintos niveles del eje reproductivo en peces perciformes y, mas concretamente, en la lubina europea, donde se ha centrado nuestro estudio.

La relación entre la función reproductiva y el balance energético esta bien establecida y, como regla general, aquellos péptidos que estimulan la ingesta suprimen la función reproductiva y viceversa. Estudios recientes han demostrado que además de sus funciones reproductivas, la GnIH puede también tener un efecto estimulador en la ingesta de alimentos. Este efecto estimulador ha sido observado en diferentes especies de pájaros (Tachaibana et al., 2005, 2008) y roedores (Johnson et al., 2007; Johnson y Fraley, 2008, Murakami et al., 2008). Sin embargo, el tratamiento con GnIH humana en gallos tiene un efecto inhibidor de la ingesta (Cline et al., 2008), lo que sugiere la importancia especie-especifica de la secuencia de aminoácidos de la GnIH para su efecto fisiológico. El hallazgo de proyecciones GnIH en el cerebro de oveja en el entorno de las células secretoras de neuropéptido Y (NPY) y de las propiomelacortinas (POMC), concuerda con el efecto descrito de la GnIH sobre la ingesta de alimento y sugiere que estas interacciones pueden mediar en estos efectos (Qi et al., 2009). Por todo lo dicho anteriormente, la GnIH parece ser un neuropéptido multifuncional, que controla el balance que existe entre reproducción, ingesta y crecimiento.

#### Problemática planteada.

La producción de mundial de alimentos deberá crecer un 70% entre 2010 y 2050. En relación a los alimentos de origen acuáticos, más de la mitad del total consumido hoy en el mundo procede de granjas de acuicultura. En 2030 se estima

que esta producción rondara el 65%. Así, la producción de pescado de acuicultura en la Unión Europea en 2011 fue 647.156 Toneladas, siendo España el Estado miembro de la UE con mayor volumen de producción en acuicultura con 271.963 t. en 2011, un 7,8% más que en 2010 (frente al 2,3% de incremento de la pesca) y con un valor económico de 457 millones de euros, un 9,7% más que en 2010 (Informe APROMAR 2013).

La lubina, *Dicentrarchus labrax*, es junto a la dorada, una de las especies que sostienen la producción de la acuicultura marina en Andalucía, en España y en Europa. Entre las principales especies acuícolas de la Unión Europea, la lubina se situó en el 6º lugar en cuanto a producción (73.196 Tn), y en 5º lugar en cuanto a valor económico (casi 400 millones de euros). En la Comunidad de Andalucía la lubina acumuló en 2012 el 66% de la producción de peces, con 4.150 Toneladas y un valor de 29,4 millones de euros.

No obstante, aunque el cultivo de lubina está en la actualidad ampliamente distribuido, la reproducción controlada de esta especie y su producción son manifiestamente mejorables. En el caso de la lubina, uno de los principales problemas que se presentan es el adelanto de la pubertad y de la primera reproducción en condiciones de cultivo, en particular en machos. Este aspecto debe ser tenido muy en cuenta por su implicación práctica en la productividad de las piscifactorías (Carrillo et al., 1993; 1995; 2009). Un desarrollo gonadal precoz conlleva crecimientos pobres y un deterioro de la calidad de la carne, como se ha puesto de manifiesto en salmónidos, carpas, lubina y bacalao, por lo que en estas especies es conveniente suprimir o retrasar la pubertad para permitir un mayor crecimiento somático adecuado del animal.

Además, hay que tener en cuenta que la temperatura representa un factor limitante en la reproducción de esta especie. Las ovulaciones y las puestas en hembras sólo se producen de forma espontánea cuando el rango de temperatura es 9-17°C, y por encima de 16-17°C la puesta se bloquea a pesar de que las hembras han alcanzado la maduración (Carrillo et al., 2009). Ello implica en muchos casos la necesidad de enfriar el agua en las instalaciones acuícolas, con el consiguiente coste

económico. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales las temperaturas elevadas inhiben el proceso reproductivo están aún sin esclarecer.

Por ello, la presente invención se centra en la clonación y caracterización del precursor de la hormona inhibidora de gonadotrofinas o GnIH, síntesis de los péptidos maduros sbGnIH-1 y sbGnIH-2, generación de anticuerpos específicos  
5 contra los péptidos sbGnIH-1 y sbGnIH-2, su uso para identificar las células GnIH y sus proyecciones, así como en la determinación de los efectos de la GnIH en la lubina europea *Dicentrarchus labrax*. Estas herramientas generadas pueden ser de gran utilidad para solventar estos problemas de pubertad precoz en la lubina  
10 y dilucidar los mecanismos mediante los cuales se inhibe la reproducción en la lubina, proporcionando la posibilidad de generar antagonistas funcionales de la GnIH que sean usados para favorecer la reproducción de esta especie.

**Referencias bibliográficas empleadas**

1. Aizen, J., I. Meiri, I. Tzchori, B. Levavi-Sivan, H. Rosenfeld, 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 142:212-221.
- 5 2. APROMAR. 2013. La Acuicultura Marina de Peces en España 2013. Fondo Europeo de la Pesca (Unión Europea), Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
3. Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Calisi R, Perfito N, Kriegsfeld LJ, Wingfield JC, Tsutsui K. 2009. Gonadotrophin-inhibitory hormone: a multifunctional neuropeptide. *J Neuroendocrinol.* 21: 276-281.
- 10 4. Carrillo, M., S. Zanuy, F. Prat, R. Serrano, N. R. Bromage. 1993. Environmental induction of spawning in sea bass, pp. 43-54 in *Recent advances in Aquaculture*, vol 4, edited by R. J. Roberts and J. Muir. Blackwell Scientific publications, London.
- 15 5. Carrillo, M., S. Zanuy, F. Prat, J. Cerdá, J. Ramos, E. Mañanós, N. Bromage. 1995. Sea bass, pp. 138-168 in *Broodstock management and egg and larval quality*, edited by N. R. Bromage and R. J. Roberts. Blackwell, Oxford, U.K.
- 20 6. Carrillo M., Zanuy S., Bayarri M.J. 2009. El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. Capítulo 3. En “La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura”. Manuel Adrian Carrillo Estévez (Coordinador), Juan Espinosa de los Monteros (Editor científico). Serie: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Fundación Observatorio Español de
- 25 Acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural Marino. Madrid. ISBN: 978-84-00-08836-1. pp: 173-246.
7. Chang, JE, Peter, RE. 1983. Effects of pimozide and Des Gly10, (D Ala6) luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin

- concentration, germinal vesicle migration, and ovulation in female goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol.* 52: 30-37
8. Chang, JP, Cook, RE, Peter, RE. 1983. Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol.* 5 49: 22-31
9. Cline, M.A., Bowden, C.N., Calchary, W.A., Layne, J.E., 2008. Short-term anorexigenic effects of central neuropeptide VF are associated with hypothalamic changes in chicks. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 971–977.
10. 10. Copeland, P.A., Thomas, P. 1989. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker *Micropogonias undulatus*: evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74, 474–483.
11. Dufour, S., F.-A. Weltzien, M.-E. Sebert, N. Le Belle, B. Vidal, P. Vernier, C. Pasqualini. 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Ann NY Acad Sci* 15 1040:9-22.
12. González-Martínez, D., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Muñoz-Cueto, J.A. y Kah, O. 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429:144-155. 20
13. González-Martínez D., Zmora N., Mañanos E., Saligaut D., Zanuy S., Zohar Y., Elizur A., Kah O. and Muñoz-Cueto J. A. 2002. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs (Gonadotrophin-releasing hormones) in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *J. Comp. Neurol.* 446: 95-113. 25
14. Holland, M.C.H., Y. Gothilf, I. Meiri, J.A. King, K. Okuzawa, A. Elizur, Y. Zohar. 1998a. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the

- gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle. *Gen Comp Endocrinol* 112: 394-405.
15. Holland, M.C., S. Hassin, Y. Zohar. 1998b. Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). *Biol Reprod* 59:1153-1162.
16. Johnson, M.A., Tsutsui, K., Fraley, G.S., 2007. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Hormones and Behavior* 51, 171–180.
- 10 17. Johnson, M.A., Fraley, G.S., 2008. Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect KiSS-1 gene expression or the onset of puberty in male rats. *Neuroendocrinology* 88, 305–315.
18. Kah, O., J.G. Dulka, P. Dubourg, J. Thibault, R.E. Peter. 1987. Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotropin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45:451-458.
- 15 19. Kah, O., J.M. Danger, P. Dubourg, G. Pelletier, H. Vaudry, A. Calas. 1989. Characterization, cerebral distribution and gonadotropin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 7: 69-76.
- 20 20. Kah, O., V.L. Trudeau, B.D. Sloley, P. Dubourg, J.P. Chang, K.L. Yu, R.E. Peter. 1992. Involvement of GABA in the neuroendocrine regulation of gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 55: 396-404.
21. Kah, O., I. Anglade, E. Leprêtre, P. Dubourg, D. de Monbrison. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol Biochem* 11:85-98.
- 25 22. King, W.V., Thomas, P., Harrell, R.M., Hodson, R.G., Sullivan, C.V. 1994. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 178–191.

23. Levavi-Sivan, B., A. Avitan, T. Kaniyas, 2003. Characterization of the inhibitory dopamine receptor from the pituitary of tilapia. *Fish Physiol Biochem* 28:73-75.
24. Osugi, T., K. Ukena, S.A. Sower, H. Kawauchi, K. Tsutsui. 2006. Evolutionary origin and divergence of PQRamide peptides and LPXRamide peptides in the RFamide peptide family. Insights from novel lamprey RFamide peptides. *FEBS J.* 273: 1731-1743.
25. Parhar I., Ogawa S., Kitahashi T. 2012 RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Progress in Neurobiology* 98: 176-196.
26. Peter, RE, Paulencu, C. 1980. Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology.* 31: 133-141
27. Prat, F., S. Zanuy, M. Carrillo, 2001 Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue GnRHa and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 198: 325-338
28. Qi, Y., Oldfield, B.J., Clarke, I.J., 2009. Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 690–697.
29. Sawada, K., K. Ukena, H. Satake, E. Iwakoshi, H. Minakata, K. Tsutsui. 2002. Novel fish hypothalamic neuropeptide: Cloning of a cDNA encoding the precursor polypeptide and identification and localization of the mature peptide. *Eur J Biochem* 269:6000-6008.
30. Tachibana, T., Sato, M., Takahashi, H., Ukena, K., Tsutsui, K., Furuse, M., 2005. Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks. *Brain Research* 1050, 94–100.

31. Tachibana, T., Masuda, N., Tsutsui, K., Ukena, K., Ueda, H., 2008. The orexigenic effect of GnIH is mediated by central opioid receptors in chicks. *Comparative Bio- chemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 150, 21–25.
- 5 32. Trudeau, V.L. 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 2: 55-68.
33. Tsutsui, K., and K. Ukena. 2006. Review: Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides* 27: 1121-1129.
- 10 34. Tsutsui, K., E. Saigoh, K. Ukena, H. Teranishi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, S. Ishii, P.J. Sharp. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 661-667.
35. Tsutsui, K., G.E. Bentley, T. Ubuka, E. Saigoh, H. Yin, T. Osugi, K. Inoue, V.S. Chowdhury, K. Ukena, N.Cicccone, P.J. Sharp, J.C. Wingfield. 2007. The  
15 general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Gen Comp Endocrinol* 153: 365-370.
36. Van Asselt, L.A., H.J. Goos, W. Smit-van Dijk, P.A.M. Speetjens, P.G. Van Oordt. 1988. Evidence for the involvement of D2 receptors in the dopaminergic inhibition of gonadotropin release in the African catfish,  
20 *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*; 72:369-378.
37. Vidal, B., C. Pasqualini, N. Le Belle, M.C.H. Holland, M. Sbaihi, P. Vernier, Y. Zohar, S. Dufour, 2004 Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71:1491-1500.
- 25 38. Zohar, Y., C.C. Mylonas. 2001 Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.
39. Zohar Y., Muñoz-Cueto J.A., Elizur A., Kah O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*. 165: 438-455.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención hace referencia al hallazgo y aislamiento del ADN copia de un nuevo neuropéptido correspondiente al precursor de la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH o LPXRFa) en peces perciformes y, mas concretamente, en la lubina europea, *Dicentrarchus labrax*. Además, hemos diseñado y sintetizado a partir de dicho precursor dos péptidos maduros denominados sbGnIH-1 o sbLPXRFa-1 y sbGnIH-2 o sbLPXRFa-2. Estos péptidos han sido modificados con una amidación C-terminal y un residuo de cisteína N-terminal para su acoplamiento a KLH, con objeto de favorecer el proceso de inmunización y la generación de anticuerpos específicos contra la GnIH-1 y la GnIH-2 de lubina en conejos (anti-sbGnIH-1 y anti-sbGnIH-2) y en cabras (anti-sbGnIH-2). Estos anticuerpos han sido utilizados para caracterizar el patrón de localización de las células GnIH-inmunopositivas y sus proyecciones en el cerebro y la hipófisis de la lubina. La invención incluye también ensayos de inyección que ponen de manifiesto un claro efecto inhibidor de la GnIH sobre diferentes factores neuroendocrinos y endocrinos que controlan el proceso reproductivo de la lubina.

Esta invención nos ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales se controla y se inhibe la reproducción en la lubina. Esta invención puede ser de gran utilidad para controlar la pubertad de la lubina y solventar los problemas de pubertad precoz en los machos de esta especie. Dado que el desarrollo gonadal precoz conlleva crecimientos pobres y un deterioro de la calidad de la carne, suprimir o retrasar la pubertad puede permitir un mayor crecimiento somático del animal, con los consiguientes beneficios para la producción en la práctica acuícola. Asimismo, esta invención abre la posibilidad de usar el ADN copia y los anticuerpos específicos generados para bloquear los efectos inhibidores de la GnIH sobre la reproducción, así como generar antagonistas funcionales de la GnIH que sean usados para promover el desarrollo gonadal, la maduración, la puesta y favorecer la reproducción de la lubina. Por tanto, la aplicación de esta invención permitirá resolver problemáticas reales que se presentan en el cultivo acuícola de la lubina y que afectan a la

reproducción y el crecimiento de esta especie. Además, es de esperar que estas herramientas generadas puedan ser de aplicación a especies próximas a la lubina y, en particular, a peces percomorfos como la dorada, la seriola, la corvina o el atún.

5

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### 1. Clonación y caracterización del ADN copia de la GnIH de lubina

Para la clonación de la GnIH de lubina hemos partido de una librería de expresión de cerebro y hemos seguido una estrategia basada en el uso de cebadores degenerados para la amplificación por PCR sobre la misma. La amplificación  
10 mediante PCR y la posterior electroforesis permitieron identificar bandas del tamaño esperado. Estas bandas fueron aisladas, los ácidos nucleicos fueron eluidos y la secuenciación de estos fragmentos de ADN y su posterior comparación y alineamiento con las secuencias GnIH de otras especies  
15 disponibles en las bases de datos nos permitió determinar que se trataba de una secuencia parcial del precursor de la hormona inhibidora de gonadotrofinas de la lubina (GnIH o precursor LPXRFamida).

Posteriormente, utilizando oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia parcial clonada de lubina, y mediante la modificación de los extremos  
20 5'y 3' y la utilización de kits comerciales (SMARTer RACE cDNA Clontech), obtuvimos la secuencia completa de nucleótidos que codifican para el precursor de la GnIH (o precursor LPXRFamida) de lubina. La secuencia completa clonada de la GnIH de lubina consta de 878 nucleótidos (SEQ ID NO 1), de los cuales 600 nucleótidos (SEQ ID NO 2) codifican el péptido precursor de la GnIH de lubina  
25 (ORF) de 200 aminoácidos (SEQ ID NO 3), 49 nucleótidos corresponden al extremo 5'UTR y 226 nucleótidos corresponden al extremo 3'UTR y a la cola poli-A. A diferencia de otros vertebrados, en los que se han descrito tres posibles péptidos GnIH, en este precursor de lubina hemos identificado solo dos posibles péptidos funcionales, denominados sbGnIH-1 o sbLPXRFa-1

(PLHLHANMPMRF, SEQ ID NO 4) y sbGnIH-2 o sbLPXRFa-2 (SPNSTPNMPQRF, SEQ ID NO 5) (Figura 1 y 2). El análisis filogenético identificó claramente la secuencia clonada en la lubina dentro de la rama en la que se ubican las secuencias GnIH/LPXRFa de peces y otros vertebrados (Figura 3).

5

## 2. Expresión de la GnIH de lubina en tejidos centrales y periféricos

Una vez clonada e identificada la secuencia, se diseñaron cebadores específicos para estudiar, mediante PCR convencional (RT-PCR), la distribución tisular del ARN mensajero en tejidos centrales (bulbo olfativo, telencéfalo, diencefalo, techo óptico, cerebelo, medula espinal, retina e hipófisis) y periféricos (corazón, hígado, riñón, intestino, músculo, ovario y testículo) de la lubina. En tejidos centrales, la expresión fue muy evidente en telencéfalo, diencefalo, techo óptico, cerebelo y retina (Figura 4). En tejidos periféricos, los ARN mensajero de la GnIH fueron evidenciados en el testículo, ovario, riñón e intestino (Figura 4). La expresión de la GnIH en áreas centrales sensoriales como la retina, el techo óptico y el cerebelo, en áreas neuroendocrinas del telencéfalo y el diencefalo, así como en el ovario y el testículo refuerzan la implicación de la GnIH en el control de la reproducción de la lubina.

## 3. Diseño y síntesis de los péptidos sbGnIH-1 y sbGnIH-2

Como hemos indicado anteriormente, en la secuencia de la GnIH de lubina deducida identificamos dos posibles péptido maduros, a los cuales hemos denominado sbGnIH-1 (sbLPXRFa-1) y sbGnIH-2 (sbLPXRFa-2). El siguiente paso fue sintetizar esos péptidos, que fueron modificados con una amidación en su extremo C-terminal, característica de los péptidos GnIH funcionales. Ambos péptidos fueron utilizados para los ensayos funcionales que se detallarán más adelante.

Las secuencias de los péptidos sintetizados fue la siguiente:

sbGnIH-1: NH<sub>2</sub>-PLHLHANMPMRF-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO 6)

sbGnIH-2: NH<sub>2</sub>-SPNSTPNMPQRF-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO 7)

El péptido sbGnIH-1 sintetizado (12 aminoácidos) tenía un peso molecular estimado de 1462,81 Da y un peso molecular experimental de 1461,75 Da, tal como se observó mediante análisis de espectrofotometría de masas (Figura 5).

5 Este péptido fue purificado mediante HPLC, mostrando un pico principal con un tiempo de retención de 13,75 minutos, y un nivel de pureza del 95,2% (Figura 5). La secuencia fue verificada mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

El péptido sbGnIH-2 sintetizado (12 aminoácidos) tenía un peso molecular

10 estimado de 1374,54 Da y un peso molecular experimental de 1373,65 Da, tal como se observó mediante análisis de espectrofotometría de masas (Figura 6).

Este péptido fue purificado mediante HPLC, mostrando un pico principal con un tiempo de retención de 13,1 minutos, y un nivel de pureza del 95,1% (Figura 6).

15 La secuencia fue verificada mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

#### 4. Generación de anticuerpos anti-sbGnIH-1 y anti-sbGnIH-2

Asimismo, estos péptidos sbGnIH-1 y sbGnIH-2 han sido utilizados para la generación de anticuerpos específicos dirigidos contra los mismos, obtenidos en

20 conejo y cabra. Estos péptidos tenían una amidación C-terminal y un residuo de cisteína N-terminal para su acoplamiento a KLH, con objeto de favorecer el proceso de inmunización. En el caso del péptido sbGnIH-1, los anticuerpos fueron generados en conejo. En el caso del péptido sbGnIH-2, se generaron anticuerpos tanto en conejo como en cabra. El protocolo de inmunización fue el siguiente:

25

<b>Apéndice 1. Producción de anticuerpos en conejo</b>			
<b>Fecha</b>	<b>Inmunización</b>	<b>Sangrado</b>	<b>Suero</b>
Semana 0		Pre-serum	3 ml + test
Semana 1	I		
Semana 5	II		
Semana 9	III		
Semana 11		ELISA + test	
Semana 11		III+2v	≈20 ml
Semana 13	IV		
Semana 15		IV+2v+sangrado final	50-70 ml + test

<b>Apéndice 2. Producción de anticuerpos en cabra</b>			
<b>Fecha</b>	<b>Inmunización</b>	<b>Sangrado</b>	<b>Suero</b>
Semana 0		Pre-serum	3 ml + test
Semana 1	I		
Semana 5	II		
Semana 9	III		
Semana 11		ELISA + test	
Semana 11		III+2v	≈50 ml + test
Semana 13	IV		
Semana 15		IV+2v+sangrado final	50-70 ml + test

- Tras el periodo de inmunización (15 semanas) se procedió al sangrado de los animales, a la obtención del suero con los anticuerpos y a la realización de pruebas de ELISA para su titulación. Se utilizaron placas de ELISA Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface cubiertas con péptido libre (0.004 mg/ml) y proteína (0.002 mg/ml) y un rango de dilución de las muestras de 1:121-1:161051 (suero). Como anticuerpos secundarios se usaron inmunoglobulinas anti-Ig de conejo obtenidas en cabra (Agrisera) a una dilución 1:6667 e inmunoglobulinas anti-Ig de cabra obtenidas en conejo (DAKO) a una dilución 1:10.000.
- 5
- 10 Los ensayos de ELISA obtenidos muestran las respuestas de los anticuerpos generados frente a los antígenos, en relación al suero preinmune (Figuras 7, 8 y 9), en las que se evidencia la curva sigmoidea característica en función de la dilución del suero. Todos los sueros generados mostraron un buen título, con rangos óptimos de dilución entre 1:7000-1:11000 para los anticuerpos generados en conejo (anti-sbGnIH-1 y anti-sbGnIH-2), y de 1:2000-1:6000 para el anticuerpo generado en cabra (anti-sbGnIH-2).
- 15

#### 5. Localización inmunohistoquímica de la GnIH en el cerebro y la hipófisis de la lubina

- 20 La obtención de anticuerpos específicos contra los péptidos sbGnIH-1 y sbGnIH-2 ha permitido esclarecer el patrón de distribución espacial de las células GnIH y sus proyecciones por medio de técnicas inmunohistoquímicas. La tinción inmunohistoquímica reveló una alta señal específica cuando incubamos las secciones con los anticuerpos generados, no mostrando ninguna reacción inespecífica al incubar con el suero pre-inmune o cuando suprimimos los anticuerpos secundarios. Los resultados obtenidos fueron altamente consistentes y no se han encontrado diferencias en el inmunomarcaje entre los anticuerpos contra los péptidos GnIH-1 y GnIH-2 en los ejemplares de lubina analizados.
- 25

Así, los sueros anti-sbGnIH-1 y anti-sbGnIH-2 de lubina nos permitieron realizar un análisis completo en secciones seriadas del cerebro, desde las porciones más rostrales (bulbos olfativos) a las más caudales (médula). Tanto para la forma sbGnIH-1 como sbGnIH-2, hemos detectado la presencia de cuerpos celulares en el bulbo olfativo, en particular en las células ganglionares del nervio terminal, en la transición entre la zona más caudal del bulbo olfativo y la más rostral del telencéfalo, diferenciándose dos poblaciones celulares independientes: una población más rostral y dorsal, en la porción medial de los bulbos y otra población más caudal y ventral en la región del nervio terminal. La inmunoreactividad también fue evidente en células de los núcleos central y lateral del telencéfalo ventral, en el núcleo posterior periventricular del área preóptica. Además, detectamos células inmunorreactivas de gran tamaño en la zona dorsal-lateral del sinencéfalo rostral. También encontramos células inmunorreactivas en el núcleo gustatorio secundario, siendo estas células de la zona central del tegmento mucho más numerosas y de menor tamaño que las descritas anteriormente. Además fueron detectadas células en la pars distal proximal y en la pars intermedia de la adenohipófisis.

En cuanto al patrón de inervación, detectamos fibras sbGnIH-1- y sbGnIH-2- inmunorreactivas principalmente en el cerebro anterior y medio. Las fibras fueron más evidentes en el telencéfalo ventral, área preóptica, tálamo ventral, hipotálamo medio-basal, receso lateral, techo óptico, torus semicircularis, tegmento rostral-lateral y en la región caudal del tegmento (núcleo gustatorio secundario). Además hemos localizado fibras en el telencéfalo dorsal, el romboencéfalo ventral, el nervio óptico y en el órgano pineal, así como en la pars distal proximal y pars intermedia de la adenohipófisis.

Este patrón de distribución de células y fibras GnIH en áreas sensoriales olfativas (bulbo olfativo, nervio terminal), fotosensitivas (nervio óptico, techo óptico) y gustativas (núcleo gustatorio secundario), así como en áreas neuroendocrinas relacionadas con la reproducción (telencéfalo ventral, área preóptica, hipotálamo mediobasal) y en la propia adenohipófisis refuerzan la consideración de la

implicación de la GnIH de lubina en el control de procesos como la reproducción, la ingesta y el metabolismo.

6. Determinación de los efectos de la GnIH en la lubina

5 Una vez caracterizados los posibles péptidos GnIH maduros, se diseñó un experimento para comprobar cual es el efecto in vivo de la GnIH sobre la lubina europea. Los ensayos se realizaron con la forma sbGnIH-2. Los resultados obtenidos nos mostraron un marcado efecto inhibitor de la GnIH sobre diversos genes cerebrales e hipofisarios que se encuentran implicados en la estimulación de la reproducción. Así, pudimos observar una disminución de la expresión del ARN mensajero en la hormona liberadora de las gonadotropinas de tipo II (GnRH-2) a las 6 horas post-inyección (hpi) a todas las dosis analizadas (1, 2 y 4  $\mu$ g) y una inhibición en la expresión de GnRH-1 a las 12 hpi a la dosis más alta (4  $\mu$ g)(Figura 10). No se observaron efectos de la sbGnIH-2 sobre los niveles de ARN mensajero de la forma GnRH-3 de lubina, a ninguna de las dosis y tiempos de post-inyección analizados. Las kisspeptinas también fueron inhibidas tras el tratamiento con sbGnIH-2 a las 6 hpi (Figura 10). La inhibición de las kisspeptinas de tipo 1 (Kiss1) fue evidente con la dosis intermedia (2  $\mu$ g), mientras que en el caso de la Kiss2 esta inhibición tuvo lugar a la dosis más alta de 4  $\mu$ g (Figura 10).

A nivel hipofisario también se observó un efecto inhibitor de la GnIH sobre la expresión de la hormona estimulante del folículo (FSH), que está implicada en la maduración inicial de los ovocitos y en la vitelogénesis, y sobre la hormona luteinizante (LH), encargada de la maduración final y puesta, siendo más marcados los efectos sobre esta última (Figura 11). Este efecto inhibitor fue evidente tanto a las 6 hpi (a todas las dosis para la LH y a dosis de 2 y 4  $\mu$ g para FSH) como a las 12 hpi (a la dosis de 2  $\mu$ g tanto para FSH como para LH)( Figura 11). Esta inhibición de los ARN mensajeros de estos factores neuroendocrinos y endocrinos estimuladores de la reproducción muestran la inactivación del eje

reproductivo que provoca la GnIH a distintos niveles del eje cerebro-hipófisis-gónada de la lubina.

Por lo tanto, esta invención aborda aspectos novedosos sobre el control neuroendocrino del proceso reproductivo en peces, en general, y en la lubina europea en particular. Como novedades podemos destacar la generación de herramientas para identificar la presencia y los niveles de la hormona inhibidora de las gonadotrofinas en la lubina en distintos estadios (estadios larvarios, juveniles y adultos) y el desarrollo de procedimientos para caracterizar los efectos de este nuevo factor neuroendocrino en peces. Además proponemos una aplicación de esta herramienta, ya que esta invención proporciona una metodología a seguir para inhibir la pubertad precoz de esta especie mediante el uso de inyecciones o implantes de GnIH. Asimismo, esta invención puede permitir la generación de agonistas y/o antagonistas de la GnIH, a través de la modificación de distintos aminoácidos de las secuencias descritas, que pueden ser utilizados para inhibir o estimular la reproducción en animales adultos, respectivamente, con el consiguiente beneficio para el control y la mejora de la productividad de esta especie en acuicultura.

## DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Secuencia de 878 nucleótidos del precursor de GnIH de la lubina europea, *Dicentrarchus labrax* (SEQ ID NO 1). La secuencia presenta extremos 5'UTR y 3'UTR, de 49 nucleótidos y 226 nucleótidos, respectivamente. La secuencia de 600 nucleótidos comprendida entre el atg (primer codon, metionina) y el tga (codón stop) marcados en gris se corresponde con la región codificante u ORF (SEQ ID NO 2). La secuencia de 200 aminoácidos codificada se muestra en mayúsculas con letra cursiva. En negrita y subrayadas se muestran dos posibles señales de poliadenilación (aataaa) presentes en el extremo 3'UTR.

**Figura 2.** Secuencia completa de 200 aminoácidos del precursor de la GnIH de la lubina europea (SEQ ID NO 3). El fragmento que se muestra corresponde a la zona codificante de la secuencia de nucleótidos aislada. Los péptidos maduros sbGnIH-1 o sbLPXRFa-1 (PLHLHANMPMRF, posición 94-105, SEQ ID NO 4) y sbGnIH-2 o sbLPXRFa-2 (SPNSTPNMPQRF, posición 116-127, SEQ ID NO 5) aparecen marcados en negrita y sombreados en color gris. Nótese los aminoácidos de procesamiento de estos péptidos, que son K o R en el extremo 5', y GR en el extremo 3'. El codón stop se encuentra indicado por un asterisco.

**Figura 3.** Árbol filogenético del precursor identificado del péptido LPXRfamida y los posibles péptidos RFamidas de otros vertebrados. El método usado para construir el árbol filogenético fue el "Neighbour-joining method". Los datos fueron obtenidos mediante 1000 repeticiones, para determinar los índices de confianza dentro del árbol filogenético. Los ortólogos de GnIH comparten el extremo C-terminal común LPXRfamida (X = L o Q o M en el caso de peces) el cual ha sido identificado en otros vertebrados desde humanos a peces. Los péptidos de lubina también sustituyen el aminoácido Lisina (L) por el aminoácido metionina (M).

**Figura 4.** Expresión del péptido precursor de la GnIH en tejidos centrales y periféricos de lubina mediante RT-PCR.

**Figura 5.** Síntesis del péptido sbGnIH-1 de lubina, modificado con una amidación en su extremo C-terminal (NH<sub>2</sub>-PLHLHANMPMRF-CONH<sub>2</sub>, SEQ ID NO 6). Se presenta el análisis mediante espectrofotometría de masas, que muestra un pico de peso molecular 1461,75 Da y el análisis de HPLC, que evidencia el  
5 pico correspondiente a la sbGnIH-1 con un tiempo de retención de 13,75 minutos y una pureza del 95,2%. La secuencia fue verificada mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

**Figura 6.** Síntesis del péptido sbGnIH-2 de lubina, modificado con una amidación en su extremo C-terminal (NH<sub>2</sub>-SPNSTPNMPQRF-CONH<sub>2</sub>, SEQ ID  
10 NO 7). Se presenta el análisis mediante espectrofotometría de masas, que muestra un pico de peso molecular 1373,65 Da y el análisis de HPLC, que evidencia el pico correspondiente a la sbGnIH-2 con un tiempo de retención de 13,1 minutos y una pureza del 95,1%. La secuencia fue verificada mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

**Figura 7.** Test de ELISA del suero anti-sbGnIH-1 obtenido en conejo. Se muestra la respuesta obtenida en un ensayo del suero anti-sbGnIH-1 generado frente al suero preinmune del mismo conejo. Se utilizaron placas de ELISA cubiertas con el péptido sbGnIH-1 libre (0.004 mg/ml) y proteína (0.002 mg/ml) y un rango de dilución de los sueros de 1:121-1:161051. El ensayo muestra un título  
15 óptimo a diluciones entre 1:9000 y 1:11500 (parte lineal de la curva entre 1 y 2 de absorbancia a 650 nm).

**Figura 8.** Test de ELISA del suero anti-sbGnIH-2 obtenido en conejo. Se muestra la respuesta obtenida en un ensayo del suero anti-sbGnIH-2 generado frente al suero preinmune del mismo conejo. Se utilizaron placas de ELISA  
25 cubiertas con el péptido sbGnIH-2 libre (0.004 mg/ml) y proteína (0.002 mg/ml) y un rango de dilución de los sueros de 1:121-1:161051. El ensayo muestra un título óptimo a diluciones entre 1:7000 y 1:11000 (parte lineal de la curva entre 1 y 2 de absorbancia a 650 nm).

**Figura 9.** Test de ELISA del suero anti-sbGnIH-2 obtenido en cabra. Se muestra la respuesta obtenida en un ensayo del suero anti-sbGnIH-2 generado frente al suero preimmune de la misma cabra. Se utilizaron placas de ELISA cubiertas con el péptido sbGnIH-2 libre (0.004 mg/ml) y proteína (0.002 mg/ml) y un rango de dilución de los sueros de 1:121-1:161051. El ensayo muestra un título óptimo a diluciones entre 1:2000 y 1:6000 (parte lineal de la curva entre 1 y 2 de absorbancia a 650 nm).

**Figura 10.** Efecto del tratamiento intracerebroventricular (ICV) con el péptido sbGnIH-2 sobre la expresión de GnRH-1, GnRH-2, Kiss-1 y Kiss-2 en el cerebro de ejemplares machos de lubina europea. Las dosis empleadas fueron 1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g y 4 $\mu$ g totales de sbGnIH-2 disuelto en PBS. Los controles fueron tratados solo con vehículo (PBS). Los ejemplares fueron muestreados a las 6 y 12 horas post-inyección (6 hpi y 12 hpi, respectivamente). La expresión relativa para los genes objeto de estudio fue determinada mediante PCR cuantitativa, usando el gen 18s como normalizador. Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 5 individuos diferentes (n=5). Las diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre grupos, tras aplicar ANOVA de una vía ( $p \leq 0.05$ ) seguido del test de Tukey.

**Figura 11.** Efecto del tratamiento intracerebroventricular (ICV) con el péptido sbGnIH-2 sobre la expresión FSH y LH en la hipófisis de ejemplares machos de lubina europea. Las dosis empleadas fueron 1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g y 4 $\mu$ g totales de sbGnIH-2 disuelto en PBS. Los controles fueron tratados solo con vehículo (PBS). Los ejemplares fueron muestreados a las 6 y 12 horas post-inyección (6 hpi y 12 hpi, respectivamente). La expresión relativa para los genes objeto de estudio fue determinada mediante PCR cuantitativa, usando el gen 18s como normalizador. Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de 5 individuos diferentes (n=5). Las diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre grupos, tras aplicar ANOVA de una vía ( $p \leq 0.05$ ) seguido del test de Tukey.

## MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La estrategia de clonación descrita anteriormente nos permitió obtener la secuencia completa de nucleótidos, que codifican para el precursor de la los hormona inhibidora de gonadotrofinas (GnIH) de la lubina *Dicentrarchus labrax*.

- 5 El análisis de la secuencia de aminoácidos de la misma nos ha permitido postular la secuencia de dos péptidos maduros potencialmente funcionales de la familia RF-amida, denominados sbGnIH-1 o sbLPXRFa-1 (secuencia NH<sub>2</sub>-PLHLHANMPMRF-CONH<sub>2</sub>) y sbGnIH-2 o sbLPXRFa-2 (secuencia NH<sub>2</sub>-SPNSTPNMPQRF-CONH<sub>2</sub>). Estos péptidos fueron sintetizados, su peso
- 10 molecular determinado por espectrofotometría de masas, purificados mediante HPLC y su secuencia verificada mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La actividad de estos péptidos en lubina fue determinada mediante ensayos in vivo, tal como se describe a continuación.

### 15 Animales y recogidas de muestras

Un total de 40 lubinas (*Dicentrarchus labrax*), con un peso comprendido 839,03g ± 10,12g se obtuvieron en el "Laboratorio de Cultivos Marinos" de la Universidad de Cádiz (Puerto Real, España), donde se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo natural, temperatura de 19°C ± 1°C y salinidad constante de 39 ppt.

- 20 Los peces fueron distribuidos en 8 tanques (5 ejemplares en cada tanque) con una capacidad total 1,3 m<sup>3</sup> totales, un radio de 61 cm y 90 cm de altura. La cantidad de agua efectiva, teniendo en cuenta la densidad de carga, fue de 1 m<sup>3</sup>.

- Para determinar la funcionalidad de la GnIH sobre el eje reproductivo de la lubina se analizaron sus efectos sobre los niveles de ARN mensajero de diversos genes
- 25 implicados en la estimulación de la reproducción (GnRH-1, GnRH-2, GnRH-3, Kisspeptina-1, Kisspeptina-2, FSH y LH) mediante PCR cuantitativa. Para ello, los peces fueron anestesiados con MS-222 (Sigma St Louis, MO), medidos, y pesados. Se les realizó una pequeña incisión en el cráneo con un microtaladro a modo de vía, y se inyectaron intracerebroventricularmente (ICV) con la ayuda de

un micromanipulador 1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g o 4 $\mu$ g del péptido sbGnIH-2 (NH<sub>2</sub>-SPNSTPNMPQRF-CONH<sub>2</sub>), utilizando como vehículo PBS. Los individuos controles fueron inyectados exclusivamente con PBS. Los individuos tratados y sus controles fueron sacrificados a las 6 horas y 9 horas después de la inyección.

5 Los cerebros y las hipófisis de los ejemplares se extrajeron mediante disección, y las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron seguidamente a - 80°C hasta su posterior análisis. El ARN total de las muestras fue extraído usando TRIsure (Bioline, Londres, Reino Unido) siguiendo las recomendaciones del fabricante, fue cuantificado mediante espectrofotometría en

10 un equipo NANODROP (Eppendorf) y su pureza fue evaluada por la relación de absorbancias Abs<sub>260</sub> nm/Abs<sub>280</sub> nm. El ARN total (1  $\mu$ g) fue retrotranscrito a ADN copia (ADNc) y el ADN genómico fue eliminado usando el QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). El análisis de la expresión génica se llevó a cabo en un equipo de PCR cuantitativa un equipo CFX96

15 Manager System (Bio-Rad, Alcobendas, España) y el kit SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline, Londres, Reino Unido). Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo por duplicado en un volumen total de 20  $\mu$ l, a partir de 5 ng de ADNc, con cebadores específicos obtenidos a partir de las secuencias GnRH-1, GnRH-2, GnRH-3, Kisspeptina-1, Kisspeptina-2, FSH y LH de lubina disponibles en las

20 bases de datos, usando el gen 18S de lubina como gen normalizador (Ver Tabla). El protocolo seguido en la PCR cuantitativa fue el siguiente: a) Activación de la enzima: 95°C durante 2 minutos; b) 40 ciclos: Desnaturalización a 95°C durante 10 s; Anillamiento y extensión a 60°C (GnRH-1, GnRH-3, FSH, LH, 18S); 61°C (Kiss-1, Kiss-2) y 63°C (GnRH-2), durante 25 segundos; c). Curva de melting de

25 70°C a 95°C cada 0.5°C durante 5 segundos. Se generaron curvas de melting de cada muestra, para corroborar que presentaban un único pico y solo se amplificaba el gen objeto de estudio. Para descartar la posible contaminación del agua se realizaron controles negativos sustituyendo el ADNc por agua DEPC. La expresión de los genes estudiados se calculó mediante el método  $\Delta\Delta$ Ct. Las

30 posibles diferencias significativas en la expresión de los genes objeto de estudio entre los animales inyectados con las distintas dosis de sbGnIH-2 (1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g o

4µg) y los controles (PBS) en los distintos tiempos post-inyección (6 y 12 horas post-inyección), se analizaron mediante el estadístico ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey. Cuando los requerimientos de normalidad y homogeneidad de varianza no fueron satisfechos, se realizaron las transformaciones necesarias (transformación logarítmica o raíz) para cumplir con estos requisitos. Las diferencias se consideraron significativas con P<0.05.

Los resultados obtenidos demostraron el efecto inhibitor de la sbGnIH-2 sobre la GnRH-1, GnRH-2, Kisspeptina-1, Kisspeptina-2, FSH y LH de lubina, mostrando su efectividad para provocar un bloqueo del eje reproductivo en esta especie. Esta evidencia demuestra la utilidad de la GnIH de lubina para reducir la incidencia de la pubertad precoz o frenar el proceso reproductivo en la lubina. Estos efectos inhibitor de la reproducción pueden incidir de forma positiva en el crecimiento y la productividad de esta especie en la práctica acuícola ya que está claramente demostrado que la energía destinada a la reproducción representa un límite para los recursos energéticos destinados al crecimiento.

<b>Tabla: Cebadores usados en PCR cuantitativa</b>	
<b>Nombre del cebador</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
GnRH1(F)	GGTCCTATGGACTGATCCAGG
GnRH1(R)	TGATTCCTCTGCACAACCTAA
GnRH2(F)	TGGGCTGCTTCTATGTGT
GnRH2(R)	CCAGCTCCCTCTTGCCTC
GnRH3(F)	TGTGGGAGAGCTAGAGGCAAC
GnRH3(R)	GTTTGGGCACTCGCCTCTT
Kiss1(F)	GCATCAATACTGGCATCAGCAAAGA
Kiss1(R)	TCAACCATTCTGACCTGGGAACTT
Kiss2(F)	GGGAGGATTCCAGCCCGTGTCT
Kiss2(R)	GAGGCCGAACGGGTTGAAGTTGAA
LHβ (F)	TTGAGCTTCCTGACTGTCCA
LHβ (R)	GCAGGCTCTCGAAGGTACAG
FSHβ (F)	ACCAACATCAGCATCCAAGTG
18S (F)	TCAGACCCAAAACCCATGCG
18S (R)	ACCCTGATTCCCGTTACCC

**REIVINDICACIONES**

1. Un polinucleótido aislado cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de secuencia de al menos un 80% con (a) la SEQ ID NO 1, o (b) la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, o (c) ambos (a) y (b).  
5
  
2. Un polinucleótido aislado cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de secuencia de al menos un 80% con (a) la SEQ ID NO 2, o (b) la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, o (c) ambos (a) y (b).  
10
  
3. Un polinucleótido aislado cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de secuencia de al menos un 80% con (a) la secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO 3 desde el residuo aminoacídico número 1 al 93, o (b) la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, o (c) ambos (a) y (b).  
15
  
4. Un polinucleótido aislado cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de secuencia de al menos un 80% con (a) la secuencia que codifica un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO 3 desde el residuo aminoacídico número 94 al 105, o (b) la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, o (c) ambos (a) y (b).  
20
  
5. Un polinucleótido aislado cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de secuencia de al menos un 80% con (a) la secuencia que codifica un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO 3 desde el residuo aminoacídico número 106 al 115, o (b) la  
25

secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, o (c) ambos (a) y (b).

5 6. Un polinucleótido aislado cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de secuencia de al menos un 80% con (a) la secuencia que codifica un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO 3 desde el residuo aminoacídico número 116 al 127, o (b) la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, o (c) ambos (a) y (b).

10

7. Un polinucleótido aislado cuya secuencia de nucleótidos presenta una identidad de secuencia de al menos un 80% con (a) la secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO 3 desde el residuo aminoacídico número 128 al 200, o 15 (b) la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, o (c) ambos (a) y (b).

20

8. Los polinucleótidos aislados en las reivindicaciones 1 a 7 en forma de ADN

9. Los polinucleótidos aislados en las reivindicaciones 1 a 7 en forma de ARN

25 10. Un polipéptido precursor sbGnIH de 200 aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la secuencia descrita en la figura 2 (SEQ ID NO 3) o una sal no tóxica del mismo.

11. Un péptido sbGnIH-1 de 12 aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la secuencia NH<sub>2</sub>-PLHLHANMPMRF-COOH (SEQ ID NO 4) o una sal no tóxica del mismo.
- 5 12. Un péptido como el descrito en la SEQ ID NO 4, modificado con una amidación en su extremo C-terminal, que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la secuencia NH<sub>2</sub>-PLHLHANMPMRF-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO 6) o una sal no tóxica del mismo.
- 10 13. Un péptido como los descritos en las reivindicaciones 11 y 12, en los cuales se han eliminado 1 o más aminoácidos.
14. Un péptido como los descritos en las reivindicaciones 11 y 12, en los cuales se han añadido 1 o más aminoácidos.
- 15 15. Un péptido como los descritos en las reivindicaciones 11, 12, 13 y 14 en los cuales se han modificado 1 o más aminoácidos.
- 20 16. Un péptido sbGnIH-2 de 12 aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la secuencia NH<sub>2</sub>-SPNSTPNMPQRF-COOH (SEQ ID NO 5) o una sal no tóxica del mismo.
- 25 17. Un péptido como el descrito en la SEQ ID NO 5, modificado con una amidación en su extremo C-terminal, que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con la secuencia NH<sub>2</sub>-SPNSTPNMPQRF-CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO 7) o una sal no tóxica del mismo.

18. Un péptido como los descritos en las reivindicaciones 16 y 17, en los cuales se han eliminado 1 o más aminoácidos.
19. Un péptido como los descritos en las reivindicaciones 16 y 17, en los  
5           cuales se han añadido 1 o más aminoácidos.
20. Un péptido como los descritos en las reivindicaciones 16, 17, 18 y 19, en los cuales se han modificado 1 o más aminoácidos.
- 10       21. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente a péptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% con los péptidos descritos en las reivindicaciones 11 y 12.
- 15       22. El uso del anticuerpo descrito en la reivindicación 21 en técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, de Western-blot, de Dot-Blot, de ELISA y de EIA.
- 20       23. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente a péptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% con los péptidos descritos en las reivindicaciones 16 y 17.
24. El uso del anticuerpo descrito en la reivindicación 23 en técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, de Western-blot, de Dot-Blot, de ELISA y de EIA.
- 25       25. Un método de inhibir o estimular la reproducción de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de un péptido que tiene

una identidad de secuencia de al menos un 80% con el péptido descrito en la reivindicación 12 (NH<sub>2</sub>-PLHLHANMPMRF-CONH<sub>2</sub>, SEQ ID NO 6) o una sal no tóxica del mismo.

5 26. Un método según la reivindicación 25, en el que dicha administración es mediante inyección.

27. Un método según la reivindicación 25, en el que dicha administración es la implantación.

10

28. Un método según la reivindicación 25, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.

15

29. Un método según la reivindicación 25, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.

30. Un método según la reivindicación 25, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho péptido.

20

31. Un método de inhibir la reproducción de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con el péptido descrito en la reivindicación 17 (NH<sub>2</sub>-SPNSTPNMPQRF-CONH<sub>2</sub>, SEQ ID NO 7) o una sal no tóxica del mismo.

25

32. Un método según la reivindicación 31, en el que dicha administración es mediante inyección.
- 5 33. Un método según la reivindicación 31, en el que dicha administración es la implantación.
34. Un método según la reivindicación 31, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
- 10 35. Un método según la reivindicación 31, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.
36. Un método según la reivindicación 31, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho péptido.
- 15 37. Un método de inhibir o estimular la reproducción de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con los péptidos descritos en la reivindicaciones 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19 y 20
- 20 38. Un método según la reivindicación 37, en el que dicha administración es mediante inyección.
- 25 39. Un método según la reivindicación 37, en el que dicha administración es la implantación.

40. Un método según la reivindicación 37, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
- 5 41. Un método según la reivindicación 37, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.
42. Un método según la reivindicación 37, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho péptido.
- 10
43. Un método de inhibir o estimular el crecimiento de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con los péptidos descritos en la reivindicaciones 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20.
- 15
44. Un método según la reivindicación 43, en el que dicha administración es mediante inyección.
- 20
45. Un método según la reivindicación 43, en el que dicha administración es la implantación.
46. Un método según la reivindicación 43, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
- 25

47. Un método según la reivindicación 43, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.
- 5 48. Un método según la reivindicación 43, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho péptido.
- 10 49. Un método de inhibir o estimular la ingesta de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80% con los péptidos descritos en la reivindicaciones 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20.
- 15 50. Un método según la reivindicación 49, en el que dicha administración es mediante inyección.
51. Un método según la reivindicación 49, en el que dicha administración es la implantación.
- 20 52. Un método según la reivindicación 49, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
53. Un método según la reivindicación 49, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.
- 25 54. Un método según la reivindicación 49, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho péptido.

55. Un método de inhibir o estimular la reproducción de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% con los polinucleótidos descritos en las reivindicaciones 8 y 9.
56. Un método según la reivindicación 55, en el que dicha administración es mediante inyección.
57. Un método según la reivindicación 55, en el que dicha administración es la implantación.
58. Un método según la reivindicación 55, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
59. Un método según la reivindicación 55, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.
60. Un método según la reivindicación 55, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho polinucleótido.
61. Un método de inhibir o estimular el crecimiento de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% con los polinucleótidos descritos en las reivindicaciones 8 y 9.

62. Un método según la reivindicación 61, en el que dicha administración es mediante inyección.
- 5 63. Un método según la reivindicación 61, en el que dicha administración es la implantación.
64. Un método según la reivindicación 61, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
- 10 65. Un método según la reivindicación 61, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.
- 15 66. Un método según la reivindicación 61, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho polinucleótido.
- 20 67. Un método de inhibir o estimular la ingesta de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% con los polinucleótidos descritos en las reivindicaciones 8 y 9.
- 25 68. Un método según la reivindicación 67, en el que dicha administración es mediante inyección.
69. Un método según la reivindicación 67, en el que dicha administración es la implantación.

70. Un método según la reivindicación 67, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
- 5 71. Un método según la reivindicación 67, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.
72. Un método según la reivindicación 67, en el que dicha administración es por transgénesis a través de un vector que incluye un promotor que permita sobreexpresar o dejar de expresar a voluntad dicho polinucleótido.
- 10 73. Un método de inhibir o estimular la reproducción de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de los anticuerpos descritos en las reivindicaciones 21 y 23.
- 15 74. Un método según la reivindicación 73, en el que dicha administración es mediante inyección.
75. Un método según la reivindicación 73, en el que dicha administración es la implantación.
- 20 76. Un método según la reivindicación 73, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.
- 25 77. Un método según la reivindicación 73, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.

5 78. Un método de inhibir o estimular el crecimiento de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de los anticuerpos descritos en las reivindicaciones 21 y 23.

79. Un método según la reivindicación 78, en el que dicha administración es mediante inyección.

10 80. Un método según la reivindicación 78, en el que dicha administración es la implantación.

81. Un método según la reivindicación 78, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.

15

82. Un método según la reivindicación 78, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.

20 83. Un método de inhibir o estimular la ingesta de los peces mediante la administración a dicho pez de una cantidad eficaz de los anticuerpos descritos en las reivindicaciones 21 y 23.

84. Un método según la reivindicación 83, en el que dicha administración es mediante inyección.

25

85. Un método según la reivindicación 83, en el que dicha administración es la implantación.

5 86. Un método según la reivindicación 83, en el que dicha administración es mediante la disolución en agua en la que los peces están nadando.

87. Un método según la reivindicación 83, en el que dicha administración es por vía oral a través de la alimentación.

```

a 1
2 catggggtcctggtgctgctcctgagagaacgtgtctcctgctgttaac[redacted]ttgaccact 61
1 M L T T 4
62 gtgtttctgtcaacactcctgatgctgggggggcttggaggggcagcagtgctgacttg 121
5 V F L S T L L M L G G L G G A A V S D L 24
122 caggtctatgggaaatcaatccacagtgataagactttgctgagcagcgatgatggaaga 181
25 Q V Y G K S I H S D K T L L S S D D G R 44
182 cacactgtgaggaacagccgcaccaacaggcaaaaaggtgaaatccqaggagtgttgat 241
45 H T V R K Q P H Q Q A K G E I R R S L D 64
242 ctcgagagcttcaacatacacgtgtccccaccaccagcaaaatcagcctcccgaccatc 301
65 L E S F N I H V S P T T S K I S L P T I 84
302 atcaggctctacccgcccacggctaaacctctccacctccacgccaacatgccaatggcg 361
85 I R L Y P P T A K P L H L H A N M P M R 104
362 tttggaagggacagtaatcctggtgatgacaggtccccaactcgaccccaacatgcc 421
105 F G R D S N P G D D R S P N S T P N M P 124
422 cagaggttcggaaggtcctgggaagtgtttcaaatgtgtgctgagtgcctgqgcctcaa 481
125 Q R F G R S W E V F Q M C A E C P G V Q 144
482 qaaccaccgaagtgcgctcagggacttcggagaaccaagtctgtactggagcctcctcagg 541
145 E P P K S P Q G L R R T S L Y W S L L R 164
542 actctggccaatgcagagttattgaacactggcttgactgggctgaaqatattgacttt 601
165 T L A N A E L L N T G L H W A E D I D F 184
602 acaaccagctcggaaagagatgcaqatgcaagaaaaaacctttaatggatgaaagagtatt 661
185 T T S S E E M Q M Q E K T F N G * 200
662 aaataggccaacactgaagtctactatgcatgtaaatataaacacaaagtactgtaag 721
722 acaaatgtttaaggaaaaatgttcaataaatatataagtaagttgaaatatttaattt 781
782 atgagtcctttaataaagttatatcattgttactgaaaatgtatcttaacaataaca 841
842 ataaaagtttcaagcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 878

```

Fig.1

**GnIH lubina (ORF y péptidos GnIH): aminoácidos**

```

1 MLTTVFLSTLLMLGGLGGAAVSDLQVYVGKSIHSDKTLSSDDGRHTVRKQ 50
51 PHQQAQKEIRRSLDLESFNHVSPTTSKISLPTIIRLYPPTAKPLHLHAN 100
101 MPMRFGRDSNPGDDRSPNSTPNMPQRFGRSWEVFQMCAECPGVQEPKSP 150
151 QGLRRTSLYWSLLRRTLANAELLNTGLHWAEDIDFTTSSEEMQMQEKTFNG*200

```

Fig.2

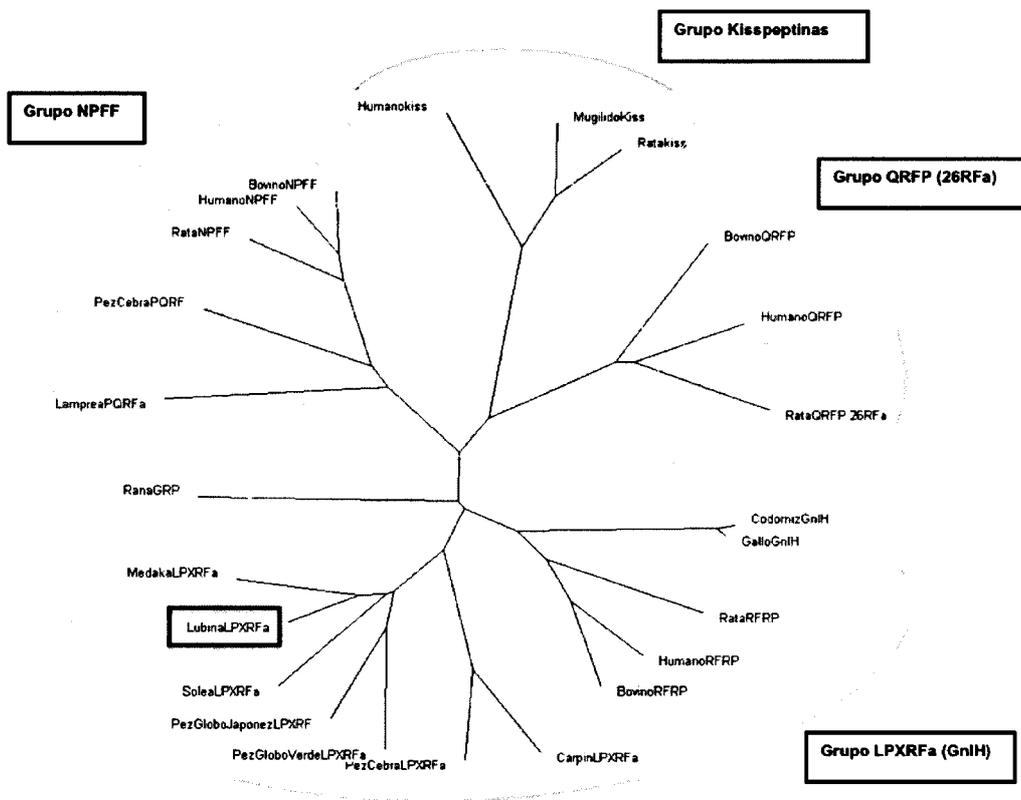


Fig. 3

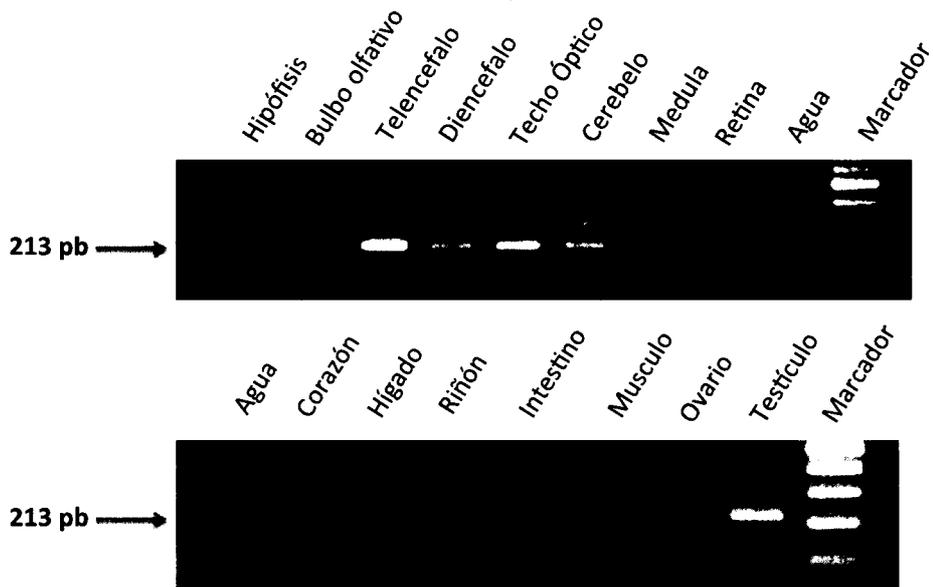


Fig. 4

Péptido **sbGnIH-1**  
 N° de lote **91515.01**  
 Fecha **2013-05-08**  
 Pureza **> 95%**  
 Cantidad **20 mg**  
 Masa molecular real **1462.81 Da**  
 Masa molecular experimental **1461.75 Da**

Secuencia  
**(NH<sub>2</sub>-) PLHLHANMPMRF (-CONH<sub>2</sub>)**

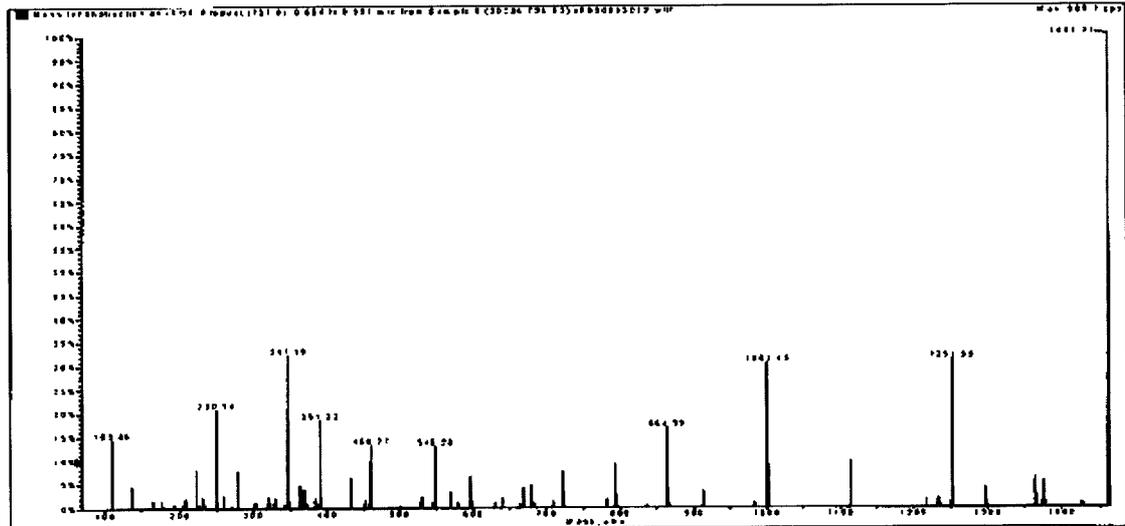
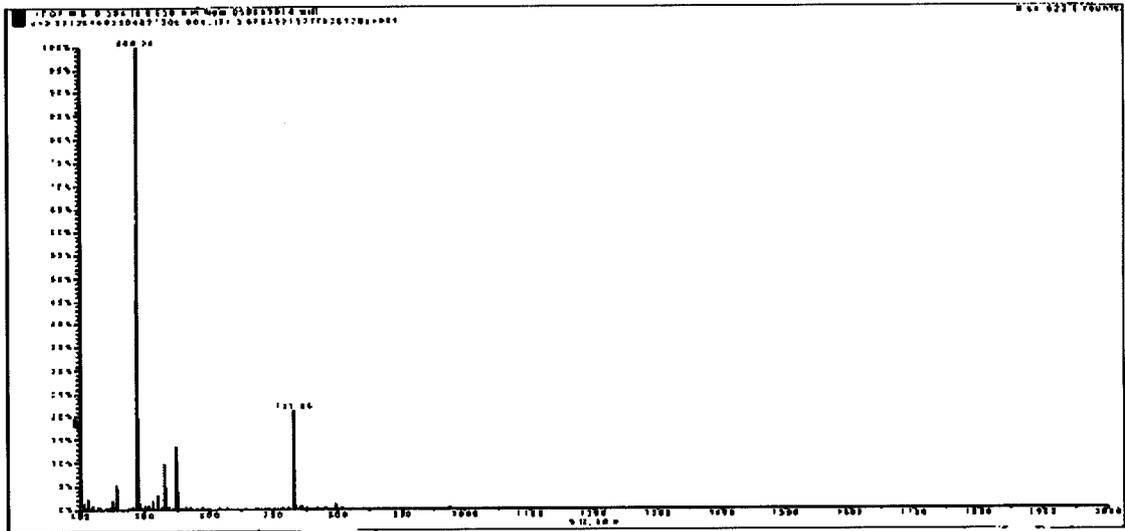
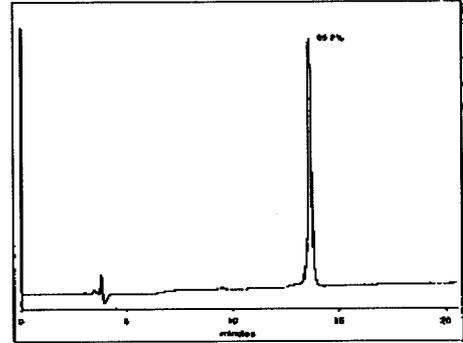


Fig. 5

Péptido **sbGnIH-2**  
 N° de lote **91516.01**  
 Fecha **2013-06-10**  
 Pureza **> 95%**  
 Cantidad **12.2 mg**  
 Masa molecular real **1374.54 Da**  
 Masa molecular experimental **1373.65 Da**

Secuencia  
 (NH<sub>2</sub>-) SPNSTPNMPQRF (-CONH<sub>2</sub>)

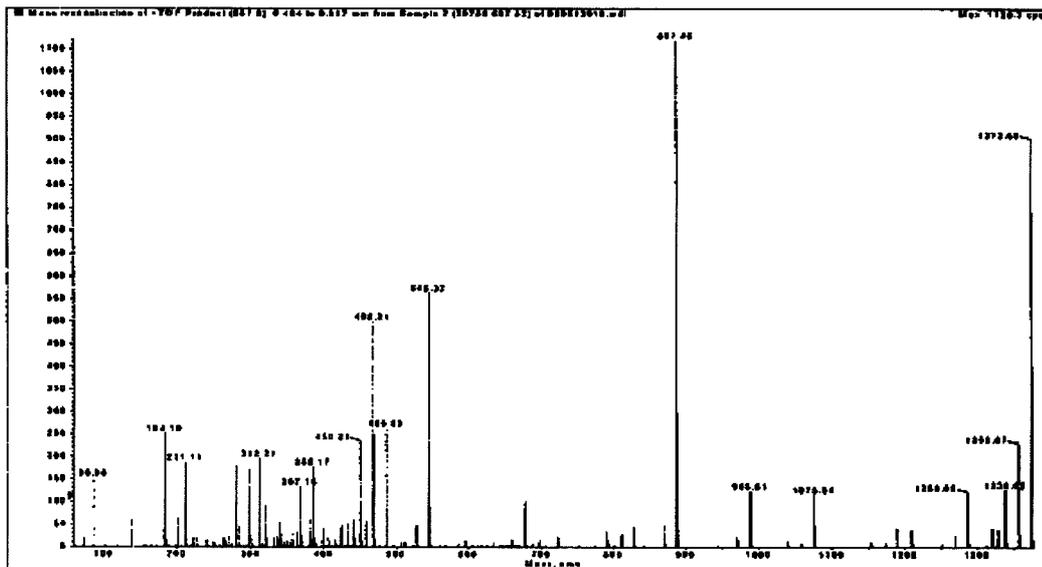
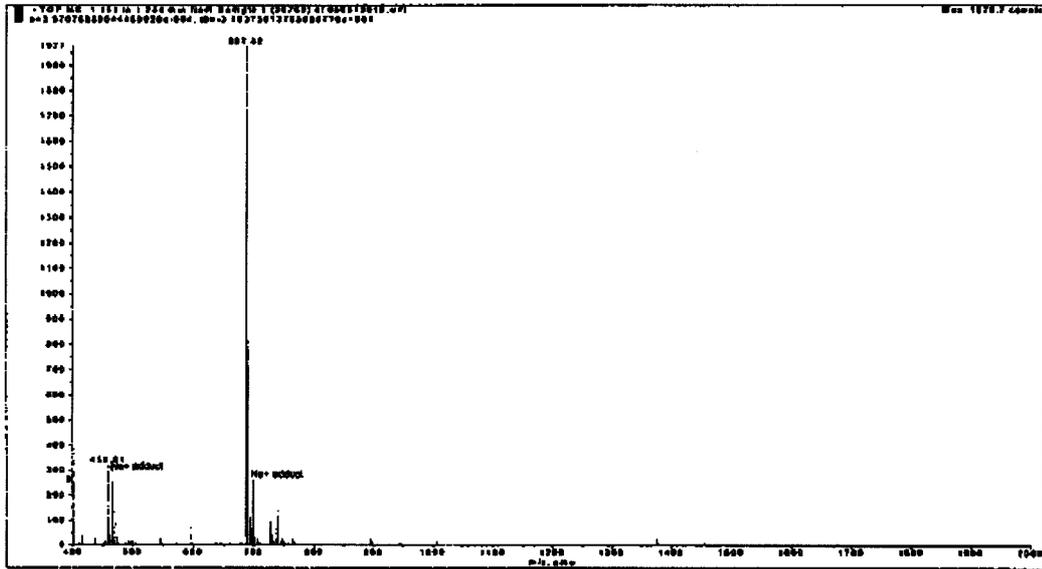
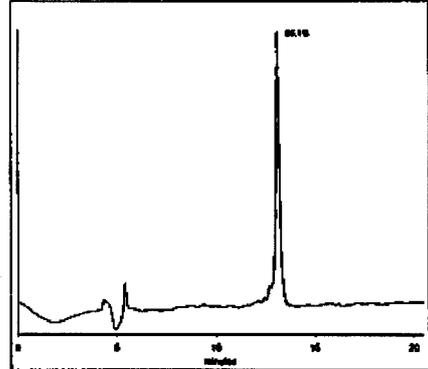
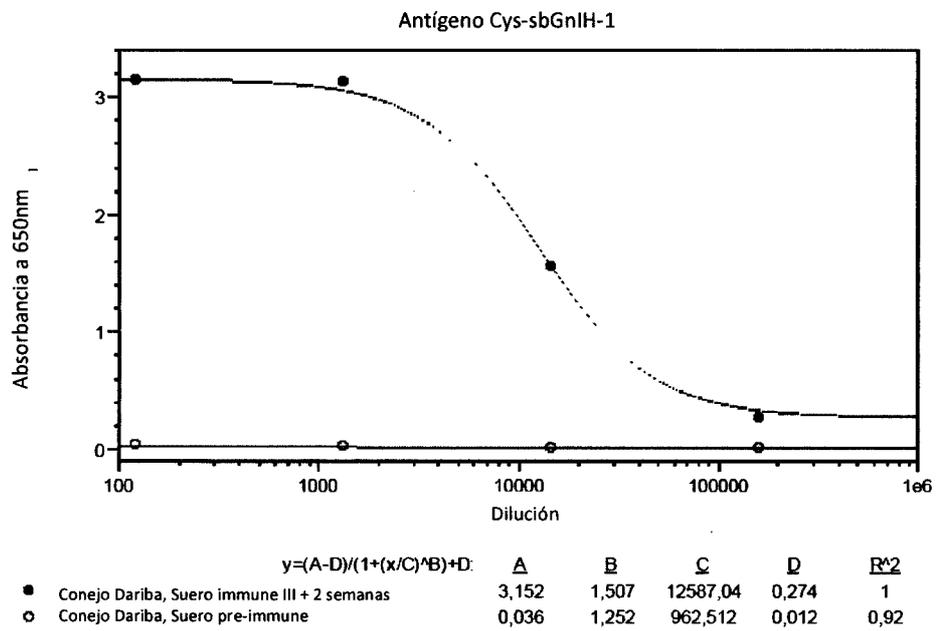


Fig. 6



**Fig. 7**

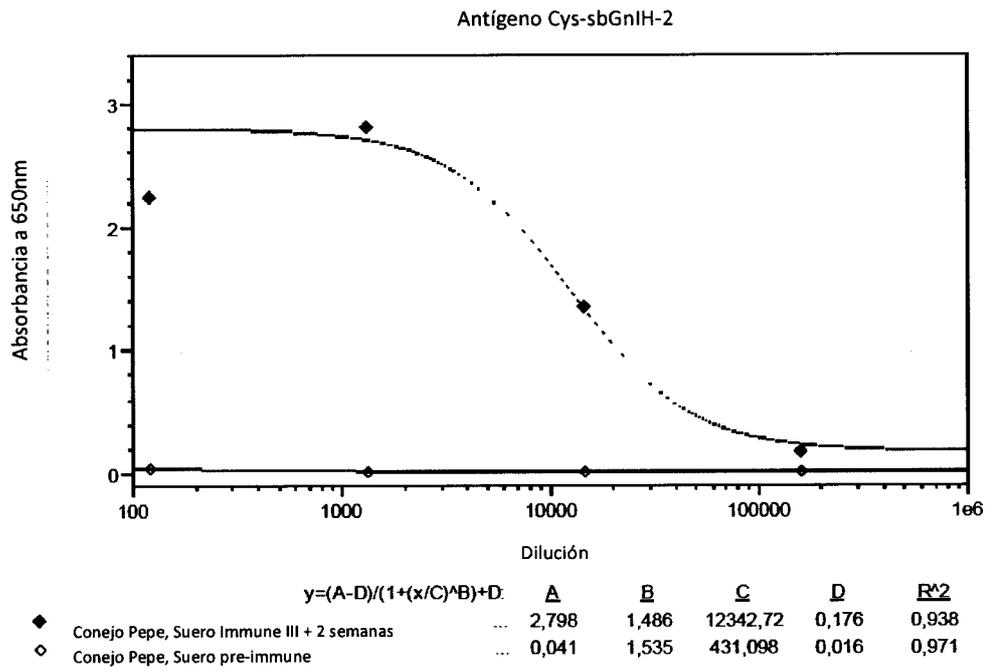
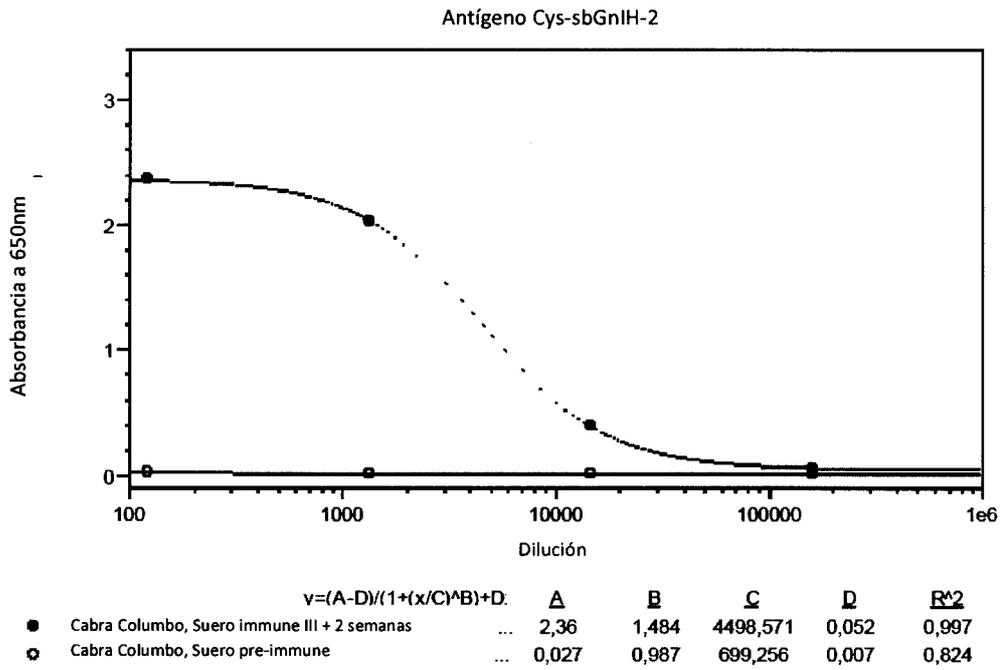


Fig. 8



**Fig. 9**

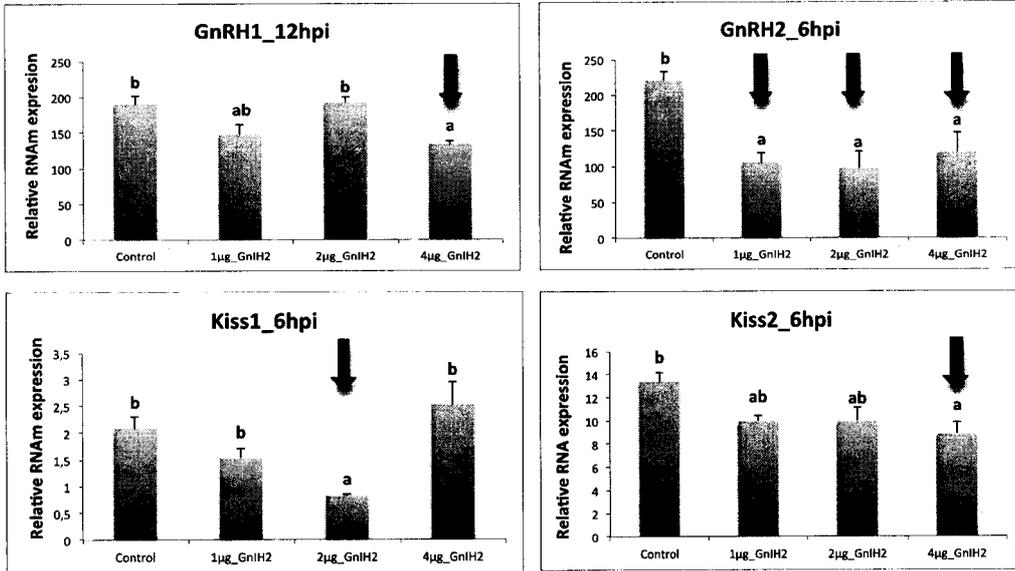


Fig. 10

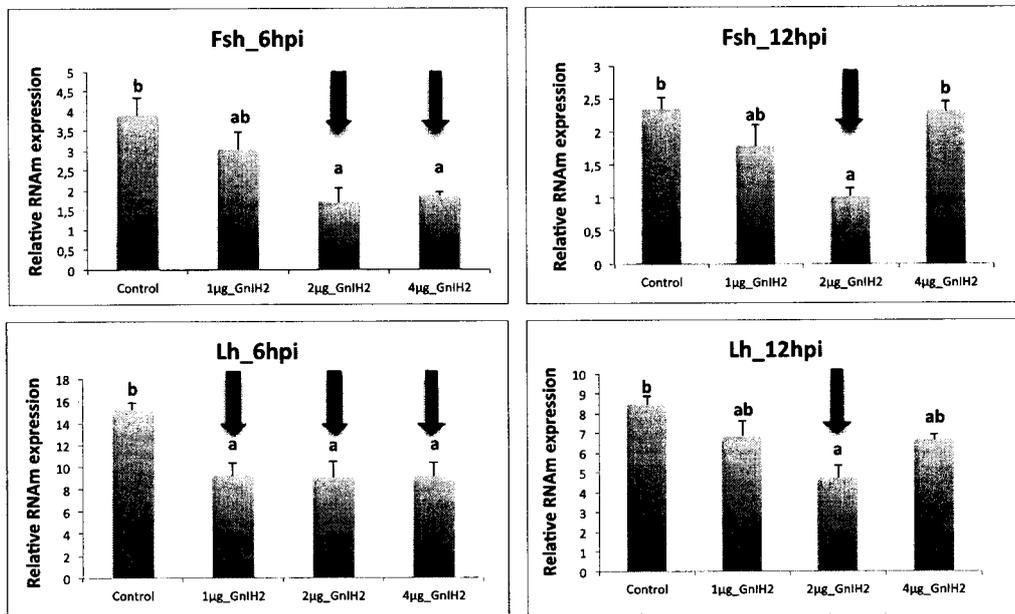


Fig. 11

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Cádiz

<120> La hormona inhibidora de gonadotrofinas (GnIH) y su uso para controlar la pubertad, la reproducción, la ingesta y el crecimiento en peces.

<130> AN2014-14

<141> 2014-07-28

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 878

<212> DNA

<213> Dicentrarchus labrax

<400> 1

acatgggggtc ctggtgctgt cctgagagaa cgtgtctcct gctgttaaca tgttgaccac	60
tgtgtttctg tcaaacctcc tgatgctggg ggggcttggg ggggcagcag tgtctgactt	120
gcaggtctat gggaaatcaa tccacagtga taagactttg ctgagcagcg atgatggaag	180
acacactgtg aggaaacagc cgcaccaaca ggcaaaaggt gaaatccgca ggagtttggg	240
tctcgagagc ttcaacatac acgtgtcccc caccaccagc aaaatcagcc tcccgaccat	300
catcaggctc taccgcccc cggttaaacc tctccacctc cacgccaaca tgccaatgcg	360

ES 2 561 708 A1

ctttggaagg gacagtaatc ctggtgatga cagggtcccca aactcgaccc ccaacatgcc 420

ccagaggttc ggaaggtctt gggaagtgtt tcaaattgtgt gctgagtgcc ctggcgtcca 480

agaaccaccg aagtcgcctc agggacttcg gagaaccagt ctgtactgga gcctcctcag 540

gactctggcc aatgcagagt tattgaacac tggcttgac tgggctgaag atattgactt 600

tacaaccagc tcggaagaga tgcagatgca agaaaaaacc tttaatggat gaaagagtat 660

taaataggcc aactactgaag tctactatag catgtaaata taaacacaaa gtactgtaaa 720

gacaaatggt taaaggaaaa atgttcaata aatatataag taagttgaaa tatttaaatt 780

tatgagtccc tttaaataaa gttatatcat tgttactgaa aatgtatctt aaacaataac 840

aataaaagtt tcaagcgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 878

<210> 2

<211> 600

<212> DNA

<213> Dicentrarchus labrax

<400> 2

atgttgacca ctgtgtttct gtcaacactc ctgatgctgg gggggcttgg aggggcagca 60

gtgtctgact tgcaggtcta tgggaaatca atccacagtg ataagacttt gctgagcagc 120

gatgatggaa gacacactgt gaggaacag ccgcaccaac aggcaaaagg tgaaatccgc 180

aggagtttgg atctcgagag ctcaacata cacgtgtccc ccaccaccag caaatcagc 240

ctccccacca tcatcaggct ctacccgcc acggctaaac ctctccacct ccacgccaac 300

ES 2 561 708 A1

atgccaatgc gctttggaag ggacagtaat cctggatgatg acagggtcccc aaactcgacc 360  
cccaacatgc cccagagggtt cggaaggtct tgggaagtgt ttcaaagtgt tgctgagtgc 420  
cctggcgtcc aagaaccacc gaagtcgcct cagggacttc ggagaaccag tctgtactgg 480  
agcctcctca ggactctggc caatgcagag ttattgaaca ctggcttgca ctgggctgaa 540  
gatattgact ttacaaccag ctcggaagag atgcagatgc aagaaaaaac ctttaatgga 600

<210> 3

<211> 200

<212> PRT

<213> Dicentrarchus labrax

<220>

<221> PROPEP

<222> (1)..(200)

<400> 3

Met Leu Thr Thr Val Phe Leu Ser Thr Leu Leu Met Leu Gly Gly Leu  
1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Val Ser Asp Leu Gln Val Tyr Gly Lys Ser Ile His  
20 25 30

Ser Asp Lys Thr Leu Leu Ser Ser Asp Asp Gly Arg His Thr Val Arg  
35 40 45

ES 2 561 708 A1

Lys Gln Pro His Gln Gln Ala Lys Gly Glu Ile Arg Arg Ser Leu Asp  
50 55 60

Leu Glu Ser Phe Asn Ile His Val Ser Pro Thr Thr Ser Lys Ile Ser  
65 70 75 80

Leu Pro Thr Ile Ile Arg Leu Tyr Pro Pro Thr Ala Lys Pro Leu His  
85 90 95

Leu His Ala Asn Met Pro Met Arg Phe Gly Arg Asp Ser Asn Pro Gly  
100 105 110

Asp Asp Arg Ser Pro Asn Ser Thr Pro Asn Met Pro Gln Arg Phe Gly  
115 120 125

Arg Ser Trp Glu Val Phe Gln Met Cys Ala Glu Cys Pro Gly Val Gln  
130 135 140

Glu Pro Pro Lys Ser Pro Gln Gly Leu Arg Arg Thr Ser Leu Tyr Trp  
145 150 155 160

Ser Leu Leu Arg Thr Leu Ala Asn Ala Glu Leu Leu Asn Thr Gly Leu  
165 170 175

ES 2 561 708 A1

His Trp Ala Glu Asp Ile Asp Phe Thr Thr Ser Ser Glu Glu Met Gln  
180 185 190

Met Gln Glu Lys Thr Phe Asn Gly  
195 200

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Dicentrarchus labrax

<400> 4

Pro Leu His Leu His Ala Asn Met Pro Met Arg Phe  
1 5 10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Dicentrarchus labrax

<400> 5

Ser Pro Asn Ser Thr Pro Asn Met Pro Gln Arg Phe  
1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Dicentrarchus labrax

<220>

<221> AMIDATION

<222> (12)..(12)

<400> 6

Pro Leu His Leu His Ala Asn Met Pro Met Arg Phe

1

5

10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Dicentrarchus labrax

<220>

<221> AMIDATION

<222> (12)..(12)

<400> 7

Ser Pro Asn Ser Thr Pro Asn Met Pro Gln Arg Phe

1

5

10