

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**PARTICIPACIÓN DE KISSPEPTINA EN LA FUNCIÓN
OVÁRICA Y SUS CAMBIOS DURANTE LA ACTIVACIÓN
DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO INDUCIDA POR EL
ESTRÉS POR FRÍO EN LA RATA**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
académico de Doctor en Farmacología

Por

MANUEL ALEJANDRO RICU MOYA

DIRECTORES DE TESIS

**Profesor Dr. Hernán Lara Peñaloza
Profesor Dr. Alfonso Paredes**

**Santiago - Chile
2013**

FINANCIAMIENTO:

La realización de esta tesis fue financiada por proyectos de investigación y gracias a las becas de mantención de las siguientes instituciones.

Proyectos del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT):

- FONDECYT N° 1090036 “Neonatal exposure to estradiol and stress in rats, activates neural genes and programs sympathetic nerve activity to determine changes in reproductive function and polycystic ovary syndrome”. Investigador Responsable: Dr. Hernán Lara.
- FONDECYT N° 1120147 “Participación de kisspeptina y del sistema nervioso simpático en el desarrollo folicular ovárico de la rata durante la senescencia reproductiva”.

Investigador Responsable: Dr. Alfonso Paredes.

Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT):

- Beca para la mantención Estudiante de Doctorado (2008-2012)
- Beca de apoyo a la realización de la Tesis Doctoral N° 24110140
- Beca de Termino de Tesis Doctoral (2012)

Becario: Manuel Ricu Moya

Programa de Mejoramiento de la Calidad y equidad de la Educación Superior (MECESUP): “Programa de Doctorado en Farmacología de la Universidad de Chile. Hacia un claustro Académico Nacional”

- Beca Para estadía corta en el extranjero. Proyecto MECESUP UCH 0704 (2011). Becario: Manuel Ricu Moya

PUBLICACION:

Parte de los resultados de esta tesis han dado origen a un artículo científico, publicado en la revista internacional "Endocrinology".

Manuel A. Ricu, Víctor D. Ramírez, Alfonso H. Paredes, and Hernán E. Lara.

"Evidence for a Celiac Ganglion-Ovarian Kisspeptin Neural Network in the Rat: Intraovarian Anti-Kisspeptin Delays Vaginal Opening and Alters Estrous Cyclicity".

Endocrinology, 2012, 153(10):4966-77.

Presentación a congresos

Los resultados de esta tesis han sido presentados en los siguientes congresos científicos:

1.- **Ricu, M.** Dorfman, M. Paredes, A. Lara, H. El estrés por frío crónico aumenta la expresión de kisspeptina y su receptor GPR54 en el hipotálamo y ovario de rata.

XXXI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile.

Exposición poster, Concepción, Chile, 2009.

2.- **Ricu, M.** Paredes, A. Lara, H. Cold Stress exposure modifies Kisspeptin/GPR54 system in the rat ovary.

US-Latinoamerican Workshop in Neuroendocrinology.

Exposición poster, Viña del Mar, Chile, 2011.

3.- **Ricu, M.** Paredes, A. Ramírez, V. Lara, H. Kisspeptina en el eje ganglio celíaco-ovario es activada por el sistema nervioso simpático y se requiere para una correcta ciclicidad estral.

XXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y desarrollo.

Exposición poster, Viña del Mar, Chile, 2012.

4.- Paredes A, **Ricu M.** Lara H. PARTICIPACIÓN DE KISSPEPTINA EN EL DESARROLLO FOLICULAR Y LA OVULACIÓN.

XXXIV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile.

Exposición poster, Pucón, Chile, 2012.

Dedicatoria

A mi amada esposa Yenny, quien con sus consejos, fuerza y amor, me ha permitido llegar al final de este camino, y como conversamos un día, realizar ambos el doctorado iba a ser duro, pero si lo llevábamos a cabo juntos podríamos lograr esto y mucho más.

A mis hijos Catalina y Matías, quienes han llegado a nuestras vidas durante el doctorado, acompañándonos e iluminado nuestras vidas.

A mi madre a quien debo todo lo que soy, por su esfuerzo, dedicación y amor, ha sido el pilar fundamental para poder darme las herramientas para desenvolverme.

A Mis suegros Por su cariño y amistad incondicional, desde que nos conocimos, apoyándonos siempre en los caminos que hemos emprendido.

A mi cuñados Por su apoyo durante estos años.

Agradecimientos

- En primer lugar agradezco a mis tutores, Al doctor Hernán Lara, por su inmenso apoyo desde mi llegada al laboratorio en el año 1998, gracias profesor por darme todas las herramientas necesarias para lograr esta gran meta.
- Doctor Alfonso Paredes por sus consejos y apoyo durante todos estos años, y en especial en mi tesis de Doctorado.
- A los miembros de la comisión, por sus consejos siempre constructivos.
- A Gonzalo Cruz y Rafael Barra por su amistad y apoyo en todos estos momentos compartidos.
- A todo el grupo de laboratorio, Monika, Jonathan, Daniela, Michelle, Beatriz, Grisela, Paola, Javier, Daniel, Sergio y Ariel por su apoyo y amistad.
- Al Señor Cortez, por su excelente trabajo, el cual siempre facilito el desarrollo de nuestras tesis.
- A la señora Rafaela por su disposición y buen humor.
- A la comisión nacional de investigación científica y tecnológica (CONICYT) por premiarme con las becas para: Estudios de doctorado en Chile, 2008, apoyo a la realización de tesis doctoral, 2011 y termino de tesis doctoral 2012.
- A MECESUP, por financiar mi viaje de estadía en el Laboratorio del Doctor Sergio Ojeda, en Portland, USA.

Índice

Lista de Abreviaciones.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	6
Introducción.....	9
1.1 Kisspeptina y la función reproductiva.....	9
1.2 Kisspeptina en el hipotálamo.....	11
1.3 Kisspeptina en el Ovario.....	13
1.4 Participación de la inervación simpática en la función ovárica	14
2 Hipótesis de trabajo.....	17
3 Objetivo general.....	17
4 Objetivos específicos.....	18
5 Materiales y métodos.....	19
5.1 Animales	19
5.2 Protocolo de estrés	21
5.2.1 Estrés agudo por frío.....	21
5.2.2 Estrés crónico intermitente por frío.....	21
5.3 Administración hipotalámica de MK801	22
5.4 Sección del nervio ovárico superior (SONX).....	23
5.5 Administración de antagonista de kisspeptina (p234) en el ovario de ratas entre 22 y 50 días de edad	23
5.6 Administración de kisspeptina o un antagonista de kisspeptina en el ovario de ratas sometidas a estrés por frío crónico intermitente.....	24
Procedimientos experimentales realizados al terminar los protocolos experimentales ..	25
5.6.1 PCR en tiempo real para kisspeptina y GPR54.....	25
5.6.2 Medición de hormonas esteroidales y LH plasmáticas de rata.....	27
5.6.3 Determinación de los niveles del péptido kisspeptina	28
5.6.4 Inmunohistoquímica para Kisspeptina en ovario.....	29
5.6.5 Doble inmunofluorescencia para kisspeptina y tirosina hidroxilasa (TH)	30
5.7 Estadística	31

6	Resultados.....	32
6.1	Objetivo 1.....	32
6.1.1	Cambios en la expresión de kisspeptina al llegar a la pubertad. Efectos del bloqueo de kisspeptina sobre la ciclicidad estral y la aparición de la pubertad	32
6.1.2	Presencia de kisspeptina y su receptor en ganglio celiaco y ovario	34
6.1.2.1	Inmunodetección de kisspeptina en ovario y ganglio celiaco	34
6.1.2.2	Kisspeptina y GPR54 se expresan tanto en células de la teca como en células de la granulosa 37	
6.1.2.3	Colocalización de fibras inmunoreactivas para kisspeptina y tirosina hidroxilasa en ganglio celiaco	38
6.1.3	Estudio de la función de kisspeptina en la pubertad.....	40
6.1.3.1	La administración de un antagonista de kisspeptina retrasa la apertura vaginal y altera la ciclicidad estral	40
6.1.3.2	La administración de un antagonista contra kisspeptina disminuye la esteroidogénesis y la concentración de kisspeptina en el eje ganglio celiaco-ovario.	43
6.2	Objetivo 2.....	46
6.2.1	La activación del receptor β -adrenérgico aumenta el contenido de mRNA que codifica para Kisspeptina en ovario	46
6.2.2	Estudios de los efectos del estrés sobre el eje hipotálamo-ganglio celiaco-ovario (HGO)	48
6.2.2.1	El estrés por frío agudo de 64 horas altera de distinta forma la expresión de kisspeptina y su receptor a lo largo del eje HGO	50
6.2.2.2	La sección del nervio ovárico superior (SONX) disminuye significativamente el mRNA para kisspeptina, a lo largo del eje HGO	50
6.2.2.3	La sección del nervio ovárico superior (SONX) modifica el efecto del estrés por frío de 64 horas sobre la expresión de kisspeptina y GPR54 a lo largo del eje HGO	51
6.2.2.4	La administración ICV de MK801 disminuyó la expresión de kisspeptina en ovario de rata 54	
6.3	Objetivo 3.....	56
6.3.1	La aplicación del estrés por frío crónico de 4 semanas afecta la expresión de kisspeptina y GPR54 a lo largo del eje HGO	56
6.3.2	La aplicación del estrés por frío crónico de 8 semanas afecta la expresión de kisspeptina y GPR54 a lo largo del eje HGO	59
6.4	Objetivo 4.....	61
6.4.1	La administración de kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario disminuye la ciclicidad estral.	61
6.4.2	La administración de kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario aumenta el número de cuerpos lúteos y la producción de progesterona y estradiol ..	66
	La administración de antagonista contra kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario revierte los efectos del estrés por frío	69

6.4.3.....	69
6.4.4 La administración de kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario mantiene su efecto aún en presencia del estrés por frío crónico aumentando el número de cuerpos lúteos y modificando los niveles de esteroides plasmáticos.....	74
7 Discusión.....	77
7.1 Kisspeptina en el eje ganglio celiaco-ovario	78
7.2 Kisspeptina en el desarrollo.....	80
7.3 Rol de kisspeptina en la pubertad y la ciclicidad estral	82
7.4 Efecto del estrés por frío sobre la expresión de kisspeptina en el eje ganglio celíaco-ovario.....	84
7.5 Efectos del estrés crónico por frío sobre la expresión de kisspeptina	89
7.6 Efecto de la administración local de kisspeptina sobre el ovario en ratas sometidas a estrés crónico por 4 semanas.....	91
8 Conclusiones	95
8.1 General.....	96
8.2 Proyección	96
9 Modelo Propuesto	97
10 Referencias.....	98

Índice de figuras

Figura 1: Representación gráfica de la secuencia peptídica de kisspeptina.....	10
Figura 2 : Expresión de kisspeptina y su receptor GPR54 durante el desarrollo puberal.....	33
Figura 3: Inmunodetección de kisspeptina en ovario y ganglio celíaco de ratas adultas.....	35
Figura 4: Inmunoreactividad para kisspeptina en folículos de distintas etapas de desarrollo.....	36
Figura 5: Expresión del mRNA para kisspeptina y GPR54 en fracciones ricas en células de la granulosa y en ovario residual (células de la teca e intersticiales) de rata..	37
Figura 6: Inmunoreactividad para kisspeptina y tirosina hidroxilasa en cortes de ganglio celíaco de ratas adultas sometidas a la sección del nervio ovárico superior (SONX).....	39
Figura 7: Efecto de la administración in-vivo de un antagonista para kisspeptina (p234) sobre la edad de la apertura vaginal y la ciclicidad estral..	42
Figura 8: Efectos de la administración de un antagonista contra kisspeptina sobre la concentración de hormonas plasmáticas..	44
Figura 9: Concentración de kisspeptina a lo largo del eje GC-O.....	45
Figura 10: Efecto de la activación de lo receptores β -adrenérgicos sobre la expresión de kisspeptina en ovarios incubados con isoproterenol por 8 horas..	47
Figura 11: Diagrama representativo. Protocolo de estrés agudo, denervación (SONX) y estrés más denervación (SONX).....	49
Figura 12: Efecto de la hiperactivación simpática (estrés agudo por frío) sobre la expresión de kisspeptina y su receptor GPR54 a lo largo del eje HGO.....	53
Figura 13: Diagrama representativo del protocolo de administración de MK801 en la región magnocelular del NPV ..	54
Figura 14: Efecto del bloqueo de los receptor para glutamato (MK-801) de la liberación de TRH en hipotálamo, sobre la expresión de kisspeptina y GPR54 en el ovario de rata.....	55
Figura 15: Diagrama representativo del protocolo de estrés crónico por frío, 5días a la semana por 4 y 8 semanas.....	57

Figura 16: Efecto del estrés por frío crónico (4 y 8 semanas) sobre la expresión de kisspeptina a lo largo del eje ganglio celíaco-ovario..	57
Figura 17: Inmunoreactividad positiva para kisspeptina en ovario de ratas controles y sometidas a estrés crónico por 4 semanas.....	58
Figura 18: Inmunoreactividad para kisspeptina en ovario de ratas controles y sometidas a estrés crónico por 8 semanas.....	60
Figura 19: Grafico representativo de la ciclicidad estral en ratas adultas hemiovariectomizadas... ..	62
Figura 20: Ciclicidad estral (%) en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario.....	63
Figura 21: Cambios en la transición proestro-estro (P-E) y estro-diestro (E-D) en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario.	64
Figura 22: Variación en la concentración plasmática de LH en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario.....	65
Figura 23: Variación en el número de cuerpos lúteos y la concentración de progesterona plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario.....	67
Figura 24: Variación en la concentración de testosterona y estradiol plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario.	68
Figura 25: Grafico representativo de la ciclicidad estral en ratas sometidas a estrés por frío crónico por 4 semanas y administración conjunta de kisspeptina o p234	70
Figura 26: Ciclicidad estral (%) en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas.....	71
Figura 27: Cambios en la transición proestro-estro (P-E) y estro-diestro (E-D) en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas.	72

Figura 28: Variación en la concentración plasmática de LH en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas.....	73
Figura 29: Variación en el número de cuerpos lúteos y la concentración de progesterona plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con el estrés crónico por frío por 4 semanas.	75
Figura 30: Variación en la concentración de testosterona y estradiol plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas.	76
Figura 31: Esquema resumen de los resultados correspondientes a la expresión del mRNA para kisspeptina/GPR54 y del péptido para kisspeptina en los protocolos de estrés por frío agudo de 64 horas.....	88
Figura 32: Esquema resumen de los resultados correspondientes a la expresión del mRNA para kisspeptina/GPR54 y del péptido para kisspeptina en los protocolos de estrés por frío agudo y crónico de 4 y 8 semanas.	90
Figura 33: Esquemas resumen del modelo propuesto.	97

Lista de Abreviaciones

aa	: aminoácidos
Arc	: Núcleo arcuato
DOPA	: aminoácido tirosina a dihidroxifenilalanina
E+SONX	: Estrés por frío agudo por 64 horas en ratas a las cuales se les seccionó el nervio ovárico superior
E4S	: Estrés por frío crónico por 4 semanas
E64	: Estrés por frío agudo por 64 horas
E8S	: Estrés por frío crónico por 8 semanas
GCO	: Eje ganglio celíaco, ovario
GnRH	: Hormona liberadora de gonadotropinas
GPR54	: receptor para kisspeptina
HGCO	: Eje Hipotálamo, ganglio celíaco, ovario
Kiss	: kisspeptina
Kiss1	: Gen de kisspeptina
Kp-10	: Péptido de kisspeptina de 10 aminoácidos
Kp-13	: Péptido de kisspeptina de 13 aminoácidos
Kp-14	: Péptido de kisspeptina de 14 aminoácidos
Kp-145	: Prepropéptido de kisspeptina de 145 aminoácidos
Kp-54	: Péptido de kisspeptina de 54 aminoácidos, llamado metastina
LH	: Hormona luteinizante
METOH	: Metanol
MMP2	: Metaloproteínasa 2

MMP9 : Metaloproteínasa 9
NA : Noradrenalina
NPV-AV : Núcleo paraventricular anteroventral
p234 : antagonista contra kisspeptina
PBS : Buffer fosfato salino
SONX : Sección del nervio ovárico superior
SOP : Síndrome de ovario poliquístico
TH : tirosina hidroxilasa
TRH : Hormona liberadora de tirotrópina

Resumen

Kisspeptina es un péptido de 145 aa. el cual juega un rol clave en la secreción de GnRH, participando en conjunto con las catecolaminas en la regulación de la ovulación a nivel hipotalámico. La mayoría de las neuronas kisspeptinérgicas en el núcleo paraventricular del hipotálamo coexpresan mRNA para tirosina hidroxilasa (TH), lo que sugiere una estrecha relación catecolaminérgica-kisspeptinérgica. El hecho que kisspeptina se exprese en el bulbo raquídeo y en las astas dorsales de la medula espinal, sugiere la existencia de un mecanismo de comunicación hacia y desde los órganos periféricos en el cual participe la kisspeptina. A nivel periférico, se ha descrito que kisspeptina y su receptor es sintetizado en células del ovario (siendo las células de la teca una de las que la expresa) y que aumenta su expresión antes de la ovulación, sin establecer aún la función de kisspeptina intraovárica. Estos antecedentes, sugieren que podría existir un control kisspeptinérgico neuronal que llega al ovario a través del sistema simpático (kisspeptina extraovárica) y por otra parte la kisspeptina intraovárica podría estar bajo control simpático, la cual podría ser importante en la regulación de la función ovárica. Con estos antecedentes, se postuló la hipótesis que: **“Kisspeptina se expresa en el eje ganglio celíaco-ovario y es activado por el sistema simpático. En el ovario kisspeptina activa la esteroidogénesis y regula la función ovárica tanto en la pubertad como durante la etapa adulta”**. Para responder esta hipótesis: se caracterizó la expresión de kisspeptina y su receptor en ganglio celíaco y ovario. Se estudiaron los cambios durante el desarrollo puberal, sobre la apertura vaginal, la ciclicidad estral y la secreción hormonal. Se

determinaron los efectos de la estimulación adrenérgica sobre la expresión de kisspeptina en el ovario *in vitro* y por el estrés por frío crónico de 4 y 8 semanas de duración *in vivo*.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que:

1.- Kisspeptina se sintetiza en ganglio celíaco y en el ovario, el cual fue determinado por PCR en tiempo real y EIA. Además, se colocaliza con neuronas TH positivas como muestran las inmunohistofluorescencia. Más importante aún es que kisspeptina aumenta en el eje ganglio celiaco-ovario al inicio de la pubertad, participando en la regulación del desarrollo folicular y la ciclicidad estral en ratas adultas. Esto fue confirmado al bloquear la acción de kisspeptina (antagonista p234), en el cual se retrasó la apertura vaginal, sugiriendo que kisspeptina podría jugar un rol protector de la ovulación. 2.- Kisspeptina se expresa tanto en células de la granulosa y de la teca en ovarios de rata. La inmunodetección mostró reactividad positiva desde folículos primarios hasta preovulatorios. 3.- Kisspeptina es regulado por el sistema simpático ya que la activación *in vitro* de receptores β -adrenérgica aumenta la expresión de la kisspeptina ovárica. Es así como una sobre activación del sistema simpático (eje hipotálamo-ganglio-ovario) mediante un estrés agudo (64 horas a 4°C) o crónico (3 hrs/día a 4°C durante 5 días a la semana por 4 and 8 semanas) altera el sistema kisspeptinérgico periférico (eje GC-O). 4.- Con respecto a la función ovárica, la administración *in-vivo* de kisspeptina (bomba miniosmótica Alzet) mostró que posee un efecto esteroideogénico, aumentando la concentración plasmática de testosterona y progesterona. Además, favorece la mantención de los cuerpos lúteos,

posiblemente inhibiendo la luteólisis. Esto determinado al administrar directamente en el ovario kisspeptina a través de un minibomba osmótica. Por otro lado el bloqueo de la acción de kisspeptina por el antagonista p234 no mostró efectos significativos en la función reproductiva. En conclusión, los resultados presentados en esta tesis han mostrado que kisspeptina es sintetizada en ganglio celíaco (kisspeptina extraovárica), siendo parte de una vía neuronal (eje H-GC-O) que podría contribuir en la regulación de la función ovárica. Por otra parte, la kisspeptina intraovárica presente en todos los folículos en desarrollo estaría participando en el proceso ovulatorio. Los resultados siguieron que participa en el proceso de ovulación, teniendo una función esteroideogénica y protectora de este proceso.

Abstract

Kisspeptin, is a peptide of 145 aa that has been described as key components in the GnRH secretion playing a complementary role with catecholamines. Studies have shown that most of the kisspeptin neurons in the paraventricular nucleus coexpress the mRNA for tyrosine hydroxylase (TH), suggesting a close kisspeptin-catecholamine relationship. Moreover, kisspeptin is present in other regions in the central nervous system, as the medulla oblongata and the dorsal horn in the bone marrow, suggesting that kisspeptin could be involved in both afferent and efferent pathway. At peripheral level, it has been described that kisspeptin and its receptor GPR54 is expressed in the ovary (especially at the theca cells of the ovarian follicle), and its expression increase before the ovulation without known function in the ovulatory process. Available data suggest that it could exist a neuronal kisspeptinergic network that arrive to the ovary through the sympathetic nervous system (extraovarian kisspeptin) and on the other hand, an intraovarian kisspeptin system without known if they could be controlled by the sympathetic nervous system, and if this control could be important for the ovarian function. Thus, we postulated that: **“Kisspeptin is expressed in the celiac ganglion-ovary axis and it is activated by the sympathetic system. In the ovary, kisspeptin activate the steroidogenesis and regulates the ovary function, both during the pubertal and the adult age”**. To answer this hypothesis the kisspeptin and GPR54 expression was characterized in the celiac ganglion and the ovary. The changes through the pubertal development, vaginal opening and hormonal secretion, were studied, and the adrenergic stimulation effects over the kisspeptin

expression in the ovary in-vitro and the 4 and 8 week of chronic cold stress in-vivo was determined.

The results presented in this thesis were the following:

1.- RT-PCR and EIA determinations showed that kisspeptin is synthesized in the celiac ganglion and the ovary. Furthermore, dual labeled immunofluorescence showed that kisspeptin is probably co-expressed within TH neurons. More important the kisspeptin along the celiac ganglion-ovary axis, increased with the puberty start, and thus, it could participate in the regulation of the follicular development and estrous cyclicity in adults rats. This suggestion was confirmed by blocking the in vivo kisspeptin action with the kisspeptin antagonist, p234, resulting in a delay in the vaginal opening, suggesting that kisspeptin could play a protector role in the ovulation process. 2.- Kisspeptin is expressed in both granulosa and theca cells. The immunodetection shows that kisspeptin is present through primary to preovulatory follicles. 3.- Kisspeptin is regulated by the sympathetic system because the in-vitro incubation of the ovaries with isoproterenol, a β -adrenergic agonist, increased the kisspeptin expression and the presence of the B-blocker propranolol eliminated the action of isoproterenol. Therefore, if this neuronal pathway is activated in the presence of a sympathetic stressor like acute (64 hour at 4°C) or chronic stress (3 hrs/day at 4°C during 5 days a week for 4 and 8 weeks) alter the peripheral kisspeptinergic system. 4.- Respect to ovarian function, in-vivo model (Alzet miniosmotic pumps to deliver Kisspeptin), show the capacity of kisspeptin to stimulate the steroidogenesis, increasing the testosterone and progesterone plasma concentration. The increased levels of plasma progesterone could favor the corpus luteum maintenance, possibly due to the decrease in the

luteolysis process. Moreover, the kisspeptin antagonist administration (p234) don't show significant effects in the reproductive function. In conclusion, in this thesis, the results have shown the existence of an extraovarian (neuronal) pathway (H-GC-O axis) that could contribute to the ovarian function regulation, and a intraovarian kisspeptin system (present in all follicles in development), that could participates in the ovulatory process, stimulating the steroidogenesis and hence regulating the ovulation.

Introducción

1.1 Kisspeptina y la función reproductiva

Kisspeptina es un péptido que posee 145 aminoácidos que – debido a que se asoció inicialmente con la supresión de la metástasis en células cancerígenas - - también se le conoce como metastina. Este péptido es producto del gen kiss-1 y es procesado postraduccionalmente pudiendo dar a lugar a una serie de péptidos de 54, 14, 13 y 10 aminoácidos (fig.1), todos ellos poseen una actividad similar, dado que comparten los 10 aminoácidos en los que reside su actividad biológica (1). Sin embargo, datos obtenidos en experimentos en placenta muestran que posiblemente el principal péptido de la familia kisspeptina sea kisspeptina-10, dado que fue el único que logró activar la liberación de Ca^{2+} intracelular (2), además, es el más conservado a lo largo de las especies. Kisspeptina ejerce su efecto a través de la activación del receptor GPR54, el que está acoplado a proteína G, cuya vía de transducción de señales no está aún bien dilucidada, sin embargo, se le relaciona con una compleja red de señalización, debido a sus múltiples funciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha encontrado que kisspeptina actúa como supresor de metástasis en células de melanoma y cáncer de mama (3, 4). Más tarde, se pudo determinar que el aumento de la expresión del gen kiss-1 o la adición de kisspeptina en distintos modelos experimentales, inhibía la progresión en otros tipos de cáncer, como lo son de pulmón, hígado páncreas, riñón y ovario, encontrando que la magnitud de su efecto es directamente dependiente de su concentración (5-7). Esta acción, se llevaría a cabo por medio

de la inhibición tanto a nivel transcripcional como traduccional de las proteínas metaloproteasas MMP2 y MMP9 (2, 8).

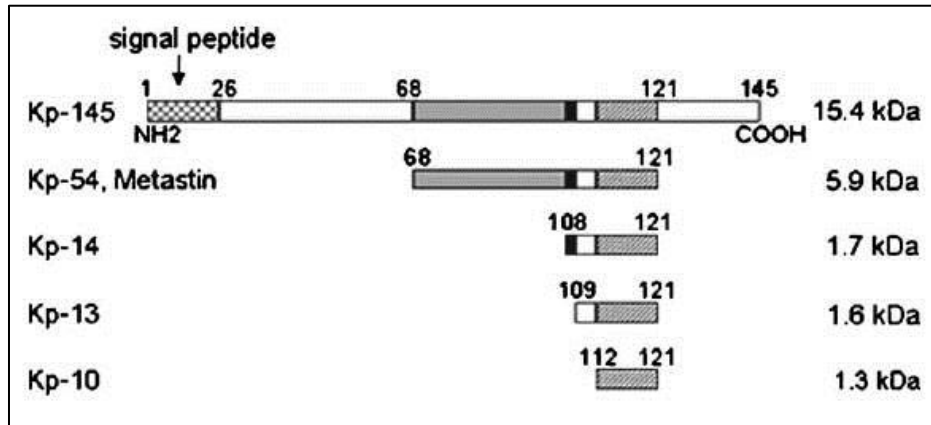


Figura 1: Representación gráfica de la secuencia peptídica de kisspeptina. Productos que se obtienen del procesamiento del péptido de 145 aminoácidos. Figura adaptada del trabajo publicado por Bilban y cols.(2).

En el año 2003 dos grupos independientes mientras realizaban análisis genéticos en familias consanguíneas que presentaban hipogonadismo hipogonadotropo idiopático, descubrieron la presencia de dos mutaciones distintas en el receptor de kiss (L148S, y R331X) (9, 10), que se traducían en una ausencia de los pulsos LH y la consecuente ausencia de rasgos puberales, condición que se revertía al administrar GnRH. Además Seminara y cols., también demostraron en muridos la presencia de una mutación en el receptor de kisspeptina que producía el mismo fenotipo visto en humanos, por lo que se concluyó que este péptido sería vital para el correcto funcionamiento del sistema reproductivo (11-13). Esto permitió iniciar numerosos estudios para comprender la fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y sus implicancias en reproducción e infertilidad, enfocándose principalmente a los estudios sobre las neuronas GnRH.

1.2 Kisspeptina en el hipotálamo

La relación directa entre las mutaciones del receptor de kisspeptina y, el adelanto o retraso de la pubertad, llevó a pensar que kisspeptina podría estar regulando la activación hipotalámica de las neuronas GnRH. Para probar esto, se midió los efectos de la administración central de kisspeptina, encontrando que estimulaba la secreción de GnRH (14), y si esta se realizaba en la etapa prepuberal, se adelantaba la pubertad tanto en rata como en primates (15, 16), con el consecuente aumento de LH por lo que estaría regulando la ovulación (17). Investigaciones posteriores establecieron que más del 90% de las neuronas GnRH expresan GPR54, y la estimulación de estas neuronas por kisspeptina produce una fuerte despolarización (18). Por otra parte, se realizaron estudios en el sistema nervioso central que buscaban determinar la distribución de las neuronas kisspeptinérgicas, encontrando una amplia localización, la que incluye la corteza, cerebro medio, tronco encefálico y medula espinal, pero su más alta expresión se encontró en el hipotálamo (19). Específicamente en el núcleo paraventricular anteroventral (NPV-AV) y el núcleo arcuato (Arc)(14, 20). Interesantemente, se ha llegado a establecer que existen diferentes grupos neuronales kisspeptinérgicos que interaccionarían con los somas o terminales de las neuronas GnRH, demostrándose, que las neuronas originadas del NPV-AV realizan sinapsis con las neuronas GnRH ubicadas en la eminencia media. Al contrario, solo se ha documentado una publicación en la cual se describen interacciones directas entre las neuronas kisspeptinérgicas ubicadas en el núcleo arcuato y los cuerpos neuronales GnRH de la eminencia media. Sin embargo, si se ha descrito

ampliamente la presencia de terminales neuronales kisspeptinérgicos originados en el núcleo arcuato (Arc), que se extienden a la región preóptica donde establecerían contactos sinápticos con los terminales de neuronas GnRH.

Otra característica importante de estas poblaciones neuronales kisspeptinérgicas es el dimorfismo, encontrando un mayor número de fibras en el NPV-AV de hembras que en machos de roedores (21, 22). Descubrimientos que podrían ayudar a entender las diferencias vistas en el desarrollo de hembras y machos, un ejemplo es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en el cual se ha visto que las neuronas kisspeptinérgicas son sensibles a la acción de los esteroides sexuales, tanto en Arc como en NPV-AV, núcleos que dado la respuesta diferencial en machos y hembras, se ha visto que la exposición a altos niveles de andrógenos neonatales a ratas hembras provoca una disminución del número de fibras kisspeptinérgicas similar a lo visto en machos (23). Como se mencionó anteriormente, kisspeptina es el estimulador más potente de las neuronas GnRH y también presentan sensibilidad a los esteroides sexuales, por lo que se analizó la expresión de kisspeptina en ambos núcleos, encontrándose que responden de una manera distinta en Arc y NPV-AV, y por consiguiente podrían generar una respuesta distinta sobre la regulación de la liberación de GnRH. En NPVAV se ha encontrado que responden fuertemente a la acción estrogénica, crucial para gatillar los aumentos en los niveles de GnRH, por lo que se cree que estaría mediando el *feedback* positivo. En cambio, al analizar el núcleo arcuato se vio una respuesta inversa, dado que al gonadectomizar se encontró un aumento de kisspeptina, efecto que se revierte al administrar estrógenos o andrógenos (17, 24). Más interesante aún, es el hecho que las neuronas Kisspeptinérgicas

coexpresan mRNA para tirosina Hidroxilasa (TH), dando cuenta de una relación catecolaminérgica-kisspeptinérgica (25), y como se había demostrado previamente, las catecolaminas son unos de los neurotransmisores que regulan la actividad de las neuronas GnRH (26), se ha llegado a establecer el control kisspeptinérgico sobre la actividad catecolaminérgica sobre la liberación de GnRH. Aparte del rol de kisspeptina a nivel central como regulador de la vía reproductiva, se ha determinado su expresión y participación a nivel periférico en distintos órganos (27).

1.3 Kisspeptina en el Ovario

Castellano y cols. en el año 2006, mostraron la presencia de kisspeptina y su receptor GPR54 en ovario de ratas, primate no humanos y humanos, expresándose específicamente en células de la teca, intersticiales y lúteas (28). Además, mostraron que la expresión del mRNA de kisspeptina en ovario aumenta con la aparición de la pubertad y varía en el ciclo estral, siendo mayor en proestro tardío. Este aumento se podría explicar por la acción de la LH, la cual se demostró que estimula la expresión del mRNA para kisspeptina (28). Estos datos sugieren su participación en los mecanismos asociados al proceso de ovulación, la que podría llevarse a cabo a través de la inhibición de la actividad de las metaloproteasas (MMP). Específicamente a las MMP2 y MMP9, las que también sufren una regulación cíclica de su expresión durante el ciclo estral (29) y se ha demostrado en primate que estas MMP también son reguladas por gonadotropinas y estradiol (30). El mecanismo por el cual kisspeptina regula la

acción de las metaloproteasas son dos: el primero, produce una regulación negativa en la expresión de las metaloproteasas a través de la disminución de la unión de NF- κ B al promotor de MMP (31), y el segundo por medio de su unión ya sea al proMMP o al MMP directamente, inactivándolos. Se ha demostrado, además, que MMP2 y MMP9 también pueden actuar sobre el propéptido de kisspeptina para generar kisspeptina activa (KP-10) (8), por lo que habría un balance entre kisspeptina y MMP, un aumento en los niveles de MMP llevaría a una degradación de kisspeptina con lo cual se desencadenarían los procesos de degradación de la matriz extracelular que llevan finalmente a la ovulación, por el contrario, un aumento de kisspeptina en el ovario detendría estos procesos. La kisspeptina es expresada en células de la teca, las cuales reciben la inervación simpática, lo que me lleva a proponer que el aumento de la expresión de kisspeptina en el ovario puede estar dado por un aumento en la actividad simpática del ovario. Esto induce una disminución de la ovulación y favorece la formación y mantenimiento de quistes.

1.4 Participación de la inervación simpática en la función ovárica

El control del desarrollo folicular y la ovulación, se realiza por dos vías independientes, una nerviosa y otra endocrina, las cuales van a actuar de forma conjunta para coordinar la función ovárica. Varios autores han contribuido a demostrar la participación de la vía nerviosa simpática sobre la función ovárica, induciendo el crecimiento folicular (32). Kawakami y cols. demostraron que el

origen de la inervación simpática que llega al ovario es el hipotálamo (33), y más tarde Gerendai y cols. demostraron a través de marcación viral retrógrada, que el origen neuronal de la inervación simpática ovárica está específicamente en el núcleo paraventricular (34), cuya vía aferente incluye al locus coeruleus y medula espinal, para finalmente realizar el último relevo a nivel del ganglio celiaco, desde el cual se origina el nervio ovárico superior que inerva directamente al ovario, específicamente a las células de la teca, Nuestro laboratorio ha postulado que las alteraciones en el control nervioso del ovario sería un factor importante para el desarrollo de quistes foliculares (35), por ejemplo en el síndrome de ovario poliquístico (SOP), patología que se relaciona con desordenes en el sistema reproductivo, tales como anovulación, amenorrea e hiperandrogenemia, la actividad nerviosa está aumentada (36).

Otro modelo de estudio en ratas que permite activar específicamente los nervios simpáticos, sin afectar la secreción de corticoides adrenales, es el estrés por frío (37). Este protocolo nos ha permitido analizar los cambios en la actividad del eje nervioso que llega al ovario por un procedimiento que se asemeja a un estrés físico en la mujer. Fiedler y cols., en el año 2006, demostraron que las neuronas TRH ubicadas en el NPV, aumentan su actividad por aplicación de este estrés por frío (38), y como se encontró más recientemente, la administración del antagonista reversible de glutamato, MK801, disminuye el recambio de NA en el ovario (39). Estos resultados, si bien nos permiten usar este método para demostrar la participación del sistema nervioso autonómico en la regulación de la función ovárica in vivo, han dado evidencia además de un papel importante de la

TRH hipotalámica como agente estimulador de la actividad noradrenérgica del ovario.

En resumen, considerando los antecedentes descritos, en los cuales vemos que: 1) Kisspeptina juega un rol importante a nivel hipotalámico, siendo el activador más potente de la secreción de GnRH, 2) Las neuronas Kisspeptinérgicas coexpresan mRNA para tirosina Hidroxilasa (TH), sugiriendo una estrecha relación catecolaminérgica-kisspeptinérgica 3) kisspeptina se expresa en bulbo raquídeo y en las astas dorsales de la medula espinal, sugiriendo un mecanismo de comunicación periférica, 4) tanto kisspeptina como su receptor se expresan en el ovario de la rata. Con estos antecedentes, se postula que kisspeptina junto con el sistema nervioso simpático participan en los procesos que regulan la función ovárica y nos dan las bases para la siguiente hipótesis:

2 Hipótesis de trabajo

“Kisspeptina se expresa en el eje ganglio celíaco-ovario y es activado por el sistema simpático. En el ovario, kisspeptina activa la esteroidogénesis y regula la función ovárica, tanto en la pubertad como durante la etapa adulta”.

3 Objetivo general

Determinar la expresión de kisspeptina en el eje ganglio celíaco-ovario (GC-O), su posible regulación por el sistema nervioso simpático y la importancia de kisspeptina en la función ovárica, tanto en el periodo peripuberal como adulto de la rata.

4 Objetivos específicos

1.- Caracterizar la expresión de kisspeptina y su receptor en ganglio celíaco y ovario. Estudiar los cambios durante el desarrollo puberal, y determinar los efectos de la administración directa al ovario de un antagonista contra kisspeptina (p234) sobre la apertura vaginal, la ciclicidad estral y la secreción hormonal.

2.- Determinar los efectos de la estimulación adrenérgica sobre la expresión de kisspeptina en el ovario in vitro, y probar el efecto de la exposición a estrés por frío agudo sobre la expresión de kisspeptina a través del eje GC-O.

3.- Determinar los efectos de la estimulación adrenérgica por el estrés por frío crónico de 4 y 8 semanas sobre la expresión de kisspeptina a través del eje G-O.

4.- a) Determinar el efecto de la administración intraovárica crónica por 4 semanas de kisspeptina o un antagonista contra kisspeptina (p234) sobre la ciclicidad estral y la esteroidogénesis. b) Determinar la participación de Kisspeptina sobre los cambios en la ciclicidad estral y la esteroidogénesis inducidos por el estrés crónico por frío durante 4 semanas.

5 Materiales y métodos

5.1 Animales

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de diferentes edades, tomadas desde el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales fueron mantenidos en condiciones constantes de luz (ciclos de 12h de luz y 12h de oscuridad) y temperatura (23°C) con alimentación y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales que se realizaron en esta investigación están aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y en parte son financiados por el Proyecto Fondecyt 1090036 (Dr Lara) y 1120147 (Dr Paredes).

Se utilizaron 167 animales los cuales fueron separados según el procedimiento experimental a realizar:

Experimento 1: Para la determinación de la expresión de kisspeptina en ganglio celiaco y el ovario a lo largo del desarrollo puberal se utilizaron 30 ratas de 15 (n=10), 30 (n=10) y 60 (n=10) días de edad.

Experimento 2: Para el análisis de los efectos del sistema simpático sobre la expresión de kisspeptina a lo largo del eje H-GC-O se utilizaron 30 ratas separadas en los siguientes grupos experimentales, estrés agudo por frío por 64 horas continuas (n=10), ratas desnervadas (SONX) (n=10) y SONX + estrés agudo por frío por 64 horas continuas (n=10) , como controles para estos experimentos, se utilizaron las mismas ratas de 60 días utilizadas en la curva temporal descrita en el experimento 1.

Experimento 3: Para el estudio de los efectos del bloqueo de la liberación de TRH con MK801 (bloqueador de los receptores NMDA) sobre la expresión de kisspeptina en el ovario, los 15 animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales: Control salino (n=5), Estrés salino (n=5) y Estrés en presencia de la administración intracerebro ventricular de MK801 (n=5).

Experimento 4: Con el fin de determinar los efectos del estrés por frío crónico sobre la expresión de kisspeptina se separaron los 20 animales según el tiempo de exposición al estrés, 4 semanas de estrés (E4S, n=10) y 8 semanas de estrés (E8S, n=10).

Experimento 5: Para la determinación de la estimulación de los receptores β -adrenérgicos en ovario de ratas adultas, los 15 animales se separaron en los grupos de incubación: 1) Control (n=5), 2) Isoproterenol (n=5) y 3) isoproterenol más propanolol (n=5).

Experimento 6: Dado que se quiere determinar la expresión del mRNA de kisspeptina y su receptor en células de la granulosa y de la teca, se escogieron 5 ratas, de cuyos ovarios se extrajeron las fracciones ricas en células de la granulosa (n=5) y teca (n=5) de acuerdo a lo previamente descrito (40, 41).

Experimento 7: Para determinar si kisspeptina es importante para el inicio de la pubertad, se escogieron 20 ratas de 22 días de edad (un día después del destete), las cuales fueron separadas en 2 grupos, controles a las cuales se les administró suero salino (n=10) y otro grupo con administración intraovárica (usando bombas miniosmóticas Alzet) del antagonista contra kisspeptina (p234).

Experimento 8: los estudios funcionales de kisspeptina se escogieron 32 ratas adultas las cuales recibieron (administración intraovárica) por 4 semanas,

kisspeptina (n=5), o un antagonista contra kisspeptina (n=5). En este grupo de animales, se probó además, si la exposición a un estrés crónico por frío durante 4 semanas (E4S+kisspeptina (n=5), E4S+p234 (n=5)) alteraba la función ovárica. Se administró suero fisiológico (n=6) y estrés crónico por 4 semanas en conjunto con la administración de suero fisiológico (n=6) como grupos controles.

5.2 Protocolo de estrés

Los protocolos se realizaron según lo descrito previamente por el laboratorio (42, 43). Una semana antes del inicio del protocolo de estrés se midió la ciclicidad estral de la rata mediante observación de frotis vaginal al microscopio como un indicador de la función reproductiva. Se incluyó en este estudio todas las ratas que mostraron ciclos estrales regulares de 4 a 5 días.

5.2.1 Estrés agudo por frío

Las ratas fueron separadas en jaulas individuales, sin viruta y colocadas en una cámara a 4°C durante 64 horas continuadas, manteniendo los ciclos de luz y oscuridad previamente descritos (ver más abajo), con disposición de agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron manipulados por el mismo operario durante todo el procedimiento experimental. Las ratas fueron eutanasiadas una hora después del término del protocolo experimental.

5.2.2 Estrés crónico intermitente por frío

El protocolo se ha realizado según lo descrito previamente (43). Las ratas fueron separadas en jaulas individuales y colocadas en una cámara a 4°C, 3 horas

diarias, de lunes a viernes, por 4 u 8 semanas. Los animales fueron manipulados por el mismo operario durante todo el procedimiento experimental y se hizo un seguimiento de la ciclicidad estral durante todo el proceso de estrés. Las ratas fueron eutanasiadas una hora después del término del protocolo experimental.

5.3 Administración hipotalámica de MK801

El procedimiento de implantación de la cánula se realizó siguiendo el protocolo de nuestro laboratorio (35). En detalle, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (60 mg/Kg) y xilasina (10 mg/Kg) administrada vía intraperitoneal. Posteriormente se implantó por vía estereotáxica, una cánula de acero inoxidable 24G con diámetro externo de 0,5 mm y diámetro interno de 0,26 mm (Terumo, Japon), equipada con un estilete para evitar que se tape la cánula. Nos basamos en la coordenadas entregadas por Paxinos (44). Bregma y lambda: lateral: 0,6, antero-posterior: -1,8 y dorso-ventral: 0,81 mm para llegar a la región magnocelular del núcleo paraventricular.

Una vez finalizada la cirugía, las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales y se los dejó una semana para recuperar su peso preoperatorio.

Pasado este tiempo las ratas fueron separadas en 3 grupos, el primer grupo solo recibió una solución salina (NaCl 0,9%), el segundo grupo fue sometido a estrés más la administración de solución salina y el tercer grupo fue sometido a estrés más la administración de MK801 (100µM). Este procedimiento fue repetido a las 24 y 48 horas post operación. Una hora después de terminado el protocolo de estrés las ratas fueron eutanasiadas.

5.4 Sección del nervio ovárico superior (SONX)

La sección del nervio ovárico superior se realizó según lo descrito previamente(36). Las ratas fueron anestesiadas usando una mezcla de ketamina (60 mg/Kg) y xilasina (10 mg/Kg) administrada vía intraperitoneal. Los ovarios fueron expuestos realizando una incisión dorsal y el nervio ovárico superior de cada ovario fue cortado con tijeras. Se ha demostrado que una vez seccionado el SON, el ovario se reinerva a los 21 días post cirugía(45), por esta razón el protocolo de estrés agudo se realizó 15 días post operación. La ciclicidad estral fue monitoreada diariamente entre las 10:00 AM y las 12:00 AM.

5.5 Administración de antagonista de kisspeptina (p234) en el ovario de ratas entre 22 y 50 días de edad

La administración de p234 fue realizada a través de la implantación de minibombas osmóticas según lo descrito previamente por el laboratorio(46). En resumen, una semana antes de la implantación de la minibomba osmótica, se siguió la ciclicidad estral para verificar el correcto funcionamiento ovárico. Las ratas fueron anestesiadas usando una mezcla de ketamina (60 mg/Kg) y xilasina (10 mg/Kg) administrada vía intraperitoneal. Las bombas miniosmóticas ALZET (modelo 2004, 0,25 uL/hr. Alza Corp. Palo alto, CA), fueron implantadas subcutáneamente en la región dorsal, cargadas previamente con 10 nmoles del antagonista de kisspeptina (p234), suficiente para generar un efecto local a nivel de ovario, sin afectar la actividad hipotalámica (17). Para evitar que el ovario derecho, el cual no va a recibir el fármaco compense la función del ovario izquierdo, se realizó una ovarierctomía unilateral de este órgano el mismo día de

la implantación de la minibomba osmótica. Una vez terminada la operación, se monitoreó la edad de apertura vaginal y posteriormente la ciclicidad estral.

5.6 Administración de kisspeptina o un antagonista de kisspeptina en el ovario de ratas sometidas a estrés por frío crónico intermitente

La administración de Kisspeptina o el antagonista de kisspeptina fueron realizados a través de la implantación de minibombas osmóticas según lo descrito anteriormente. Las bombas miniosmóticas ALZET (modelo 2004, 0,25 uL/hr. Alza Corp. Palo alto, CA), fueron implantadas subcutáneamente en la región dorsal, cargadas previamente con kisspeptina-10 (Phoenix pharmaceuticals, Belmont, CA) a una concentración 100^4 nmol/200 μ L . Esta cantidad de kisspeptina – si se vaciara al plasma -- no activa la liberación de GnRH(17). En otra serie experimental, se administró 10 nmoles del antagonista de kisspeptina (p234). Una vez terminada la operación, se esperaron 3 días para que las ratas se recuperaran, procediendo a dar inicio al protocolo de estrés crónico intermitente por 4 semanas Para la realización del protocolo experimental las ratas se dividieron de acuerdo a dos estrategias:

Estrategia 1: Las ratas de 200 gr (60 días de edad). Fueron separadas en 4 grupos. Todas fueron implantadas con la minibomba osmótica con kisspeptina y se separaron de acuerdo a los siguientes grupos: 1) grupo kisspeptina (K), se le implantó la bomba miniosmótica cargada con kisspeptina, no fue sometida al protocolo de estrés, 2) grupo suero (S), se le implantó la bomba miniosmótica cargada con suero fisiológico, no fue sometida al protocolo de estrés 3) grupo

estrés de 4 semanas + kisspeptina (E+K), se le implantó la bomba miniosmótica cargada con kisspeptina, sometiéndose al protocolo de estrés 4 semanas después de la implantación, 4) estrés de 4 semanas + suero, se le implantó la bomba miniosmótica cargada con suero fisiológico, sometiéndola al protocolo de estrés 4 semanas después de la implantación.

Estrategia 2: A las ratas se les administró un antagonista de kisspeptina (p234) y fueron separadas en 4 grupos: 1) Grupo p234, se le implantó la bomba miniosmótica cargada con p234, no fue sometida al protocolo de estrés, 2) suero, se le implantó la bomba miniosmótica cargada con suero fisiológico, no fue sometida al protocolo de estrés 3) estrés de 4 semanas + p234 (E+p234), se le implantó la bomba miniosmótica cargada con p234, sometiéndola al protocolo de estrés 4 días después de la implantación 4) estrés de 4 semanas + suero (E+S), se le implantó la bomba miniosmótica cargada con suero fisiológico, sometiéndola al protocolo de estrés 4 semanas después de la implantación.

Procedimientos experimentales realizados al terminar los protocolos experimentales

5.6.1 PCR en tiempo real para kisspeptina y GPR54

El mRNA total se extrajo desde: ovario completo, células de la granulosa, células teca-intersticial, ganglio celíaco e hipotálamo, mediante el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (47), Para obtener el DNAc, se tomaron 5 ug de mRNA para la reacción de transcriptasa reversa, para ello se utilizó, la enzima SuperScript II 125U (Invitrogen, Carlsbad, CA), en presencia de dNTPs 1,6 mM,

DTT 10 mM, partidores randomizados 176 nM (Invitrogen, Carlsbad, CA), RNaseOUT 25U (Invitrogen, Carlsbad, CA). El volumen final de la reacción fue de 30 μ L. y se realizó a 42°C por 60 minutos. Para detener la reacción, se desnatura la enzima por calor, se incuba a 75°C durante 10 minutos

Una vez obtenido el DNAc, se amplificó 2 μ L de muestra por PCR en tiempo real (Bio-Rad IQ5) en presencia de partidores específicos para el gen de interés (ver tabla adjunta), 0,5 μ L de cada uno (sentido y antisentido), más 12,5 μ L de 2X Brilliant® Platinum SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene®, 1834 State Hwy. 71 West), y 9,5 μ L de agua estéril nanopura, completando un volumen de reacción final de 25 μ L.

Las condiciones del PCR fue el siguiente: 1) 1 ciclo, 10 minutos a 95°C, 2) 40 ciclos para 18S y kiss1 y 45 ciclos para GPR54, 20" a 95°C, 20" a 62,5°C (60" para 18S), 20" a 72°C) 10' a 72.

La intensidad de fluorescencia dada por la unión del SYBR-Green al DNA de doble hebra medida al final de cada ciclo de elongación, se correlacionó directamente con la cantidad de producto amplificado. Para determinar la especificidad del producto formado se realizó una curva de melting entre 72°C y 95°C, bajo continua medición de fluorescencia. Cada amplicón o producto de PCR formado, se puede identificar por su temperatura de desapareamiento específica (melting Point). La cantidad de mRNA inicial de cada gen de interés se calculó, determinando el ciclo en el cual comenzó el aumento lineal del producto PCR (ciclo umbral). El valor de un ciclo se interpoló en una curva estándar obtenida por diluciones seriadas de una muestra conocida.

Para normalizar la cuantificación de los mRNA (mantener formato de escritura del RNA), se midió en cada uno de los tejidos el gen de expresión constitutiva subunidad ribosomal 18S y los resultados se expresaron como la razón entre el gen de interés y el constitutivo. La medición del mRNA para 18S se realizó utilizando partidores disponibles comercialmente (Ambion, Austin, TX, USA) y se llevó a cabo en reacción de PCR independientes para evitar interferencia con la amplificación de los genes de interés.

Gen	Secuencia	Tamaño (pb)	Numero de acceso en el genbank
Kiss1	Sense 5` - CCGGACCCCAGGAACTCGT - 3` Asense 5` - CGTAGCGCAGGCCAAAGGAG - 3`	245	NM_181692.1
GPR54	Sense 5` - TGTGCAAATTCGTCAACTACATCC - 3` Asense 5` - AGCACCGGGGCGGAAACAGCTGC - 3`	194	NM_023992.1
18S	Sense 5` - TCAAGAACGAAAGTCGGAGG - 3` Asense 5` - GGACATCTAAGGGCATCACA - 3`	493	EU139318.1

5.6.2 Medición de hormonas esteroidales y LH plasmáticas de rata

Al momento de eutanasiar las ratas, se colectó la sangre en tubos de vidrio y se centrifugó a 3000g por 5 minutos, las muestras se almacenaron a -80°C. La concentración de LH se midió utilizando un inmunoensayo para rata (EIA, LH detect, Repro PHARM, France), Las concentraciones de estradiol, testosterona y progesterona fueron determinadas utilizando un ensayo ELISA para rata (Alpco Diagnostics, Windham, NH). Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las instrucciones del fabricante. Las variaciones intra e interensayos fueron menores a 10%, 11%, 7%, y 10% para LH, progesterona, testosterona, y estradiol,

respectivamente. El valor mínimo detectable para LH fue 0,2 ng/mL, progesterona fue 2,5 pg, para testosterona fue 1,25 pg, y para estradiol fue 0,5 pg.

5.6.3 Determinación de los niveles del péptido kisspeptina

Una vez terminado el protocolo respectivo. Las ratas fueron eutanasiadas y los ovarios extraídos y congelados a -80°C para la determinación posterior. Se midió la concentración del péptido utilizando un inmunoensayo (EIA, EK048-56, Phoenix pharmaceuticals, Belmont, CA), siguiendo el protocolo entregado por el fabricante (48). En breve, Los ovarios, ganglios celiacos e hipotálamos fueron homogenizados en 250 uL de buffer de lisis (10mMTris, pH 7,4) y centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue cargado en una columna SEP-Pak C18 (RK SEPCOL-1, Phoenix pharmaceutical, Belmont, CA) equilibrada previamente (1 mL of buffer A (RK-BA-1, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) una vez, y 3 veces con 3 mL de buffer B). El péptido fue eluído con 3 mL de buffer B (RK-BB-1, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.). El eluído obtenido fue liofilizado y guardado a -80°C. Al momento de la determinación el pellet es resuspendido en 250 µL de buffer RIA para la determinación. Para la determinación de kisspeptina en suero, la muestra se centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos, y luego se carga la columna con 500 uL de suero, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Probamos además, la reacción cruzada del antagonista del péptido contra kisspeptina a varias concentraciones (200 pg, 2 ng, 20 ng y 200 ng) de antagonista, no encontrando reacción a ninguna de las concentraciones determinadas, sola o en conjunto con la muestra. El valor mínimo detectable para

kisspeptina fue 0,08 ng/ml. La variación intra e interensayo fue 8,6% y 5,5%, respectivamente.

5.6.4 Inmunohistoquímica para Kisspeptina en ovario

Los ovarios y ganglios se fijaron con Dubos Q Brazil, durante 16 horas y posteriormente fijados e incluidos en parafina. Los cortes se realizaron a un grosor de 8 μm y congelados a -50°C . El día del protocolo los cortes fueron hidratados utilizando una batería de alcoholes. Luego se realizó la recuperación antigénica calentando las muestras por 30 minutos a 100°C en buffer citrato 10mM pH 6,0. Terminado este proceso se lava el tejido con PBS 1X por 5 minutos cada uno, y se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de H_2O_2 3% en METOH por 20 minutos a T° ambiente. El tejido se lavó 3 veces con PBS 1X por 5 minutos cada uno, para proceder a bloquear con suero normal de cabra al 5% en PBS 1X por 30 minutos y agregar el anticuerpo primario incubándolo toda la noche a 4°C con anti-kisspeptina-13 (1:800, Bachem AG, Bubendorf, Suiza). Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos cada uno, y se incubó por una hora con anticuerpo contra conejo 1:200 (suero normal de cabra 3% en PBS 1X) por 1 hora. Una vez cumplida la incubación se lavó con PBS 1X por 5 minutos y se incubó con estreptavidina peroxidasa (ABC, kit vector laboratories, Inc. Burlingame, CA. USA) por 1 hora a T° ambiente. Para posteriormente revelar con el sustrato de la peroxidasa DAB (diaminobencidina) (ABC, kit vector laboratorios, Inc. Burlingame, CA. USA), desarrollándose la marca café característica, para contrastar la marca obtenida se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Harris, el

control negativo de los cortes se realizó en las mismas condiciones, sin la incubación del anticuerpo primario anti-kisspeptina o anti-GPR54. Además se realizó como control para probar la especificidad del anticuerpo primario, la preabsorción de los cortes incubándolos toda la noche a 4°C con un péptido para kisspeptina (KiSS-1 (112–121)-NH₂, Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA).

5.6.5 Doble inmunofluorescencia para kisspeptina y tirosina hidroxilasa (TH)

Los procesos de desparafinización, hidratación, y recuperación antigénica, fueron realizados siguiendo el mismo protocolo anteriormente detallado. Las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario para kisspeptina-13 de conejo (Bachem AG), diluido 1:800 en 3% de suero normal de cabra en PBS. Al día siguiente se realizan 3 lavados con PBS, y se procede a agregar el anticuerpo secundario contra conejo [ab6717 (Abcam, Cambridge, MA) conjugado con fluoresceína isotiocianato] diluido 1:200 en suero normal de cabra al 3% en PBS, el cual se incuba toda la noche a 4°C. Luego se realizan 3 lavados con PBS, y se procede a incubar toda la noche con el anticuerpo para tirosina hidroxilasa de ratón (MA118038; Pierce Chemical Co., Rockford, IL) diluido 1:5000 en 3% de suero normal de cabra en PBS. Una vez terminada esta etapa, se lava 3 veces con PBS, y se incuba toda la noche con el anticuerpo secundario de ratón [anticuerpo 6787 (Abcam), conjugado con Texas Red] diluido 1:200 en 3% en suero normal de cabra en PBS. Finalmente, las secciones fueron lavadas en PBS y montadas con PROLONG antifade (P36930; Invitrogen, Carlsbad, CA). La fluorescencia fue observada usando un microscopio de fluorescencia Zeiss

Axioscope 20 (Carl Zeiss, Thornwood, NY), las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa NIH ImageJ para determinar la marca de células doble positiva para kisspeptina y TH. Los controles para del ensayo consistieron en: 1) La incubación de los tejidos sin el anticuerpo primario y 2) el uso de una longitud de onda de excitación inapropiada.

5.7 Estadística

Las diferencias entre los distintos grupos experimentales fueron analizadas usando el test de student para datos pareados. Para grupos independientes se utilizó ANOVA seguido por comparaciones múltiples Newman-Keuls. Fueron consideradas diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$.

6 Resultados

6.1 Objetivo 1

Caracterizar la expresión de kisspeptina y su receptor en ganglio celíaco y ovario en el desarrollo puberal, y determinar los efectos de la administración directa al ovario de un antagonista contra kisspeptina (p234) sobre la apertura vaginal, la ciclicidad estral y la secreción hormonal una vez que se ha llegado a la pubertad.

6.1.1 Cambios en la expresión de kisspeptina al llegar a la pubertad. Efectos del bloqueo de kisspeptina sobre la ciclicidad estral y la aparición de la pubertad

Los resultados de la figura 1 muestran que el sistema de kisspeptina se activa al llegar a la pubertad, aumentando significativamente el mRNA para kisspeptina al llegar a la adultez tanto en ganglio celíaco (figura 2A) como en ovario (figura 2D) mientras que para GPR54 el mRNA en el ovario aumenta al llegar a la etapa prepuberal (figura 2E). Al analizar los resultados del péptido para kisspeptina vemos que se comportan de manera inversa en ganglio y en ovario; mientras en ganglio celíaco se mantiene alto hasta llegar a la adultez, donde disminuye significativamente, en el ovario va se mantiene baja en la etapa infantil y juvenil aumentando significativamente la concentración al llegar a la etapa adulta (figuras 2B, 2C). La medición de la concentración plasmática de kisspeptina sigue una correlación similar al ganglio celíaco (2F).

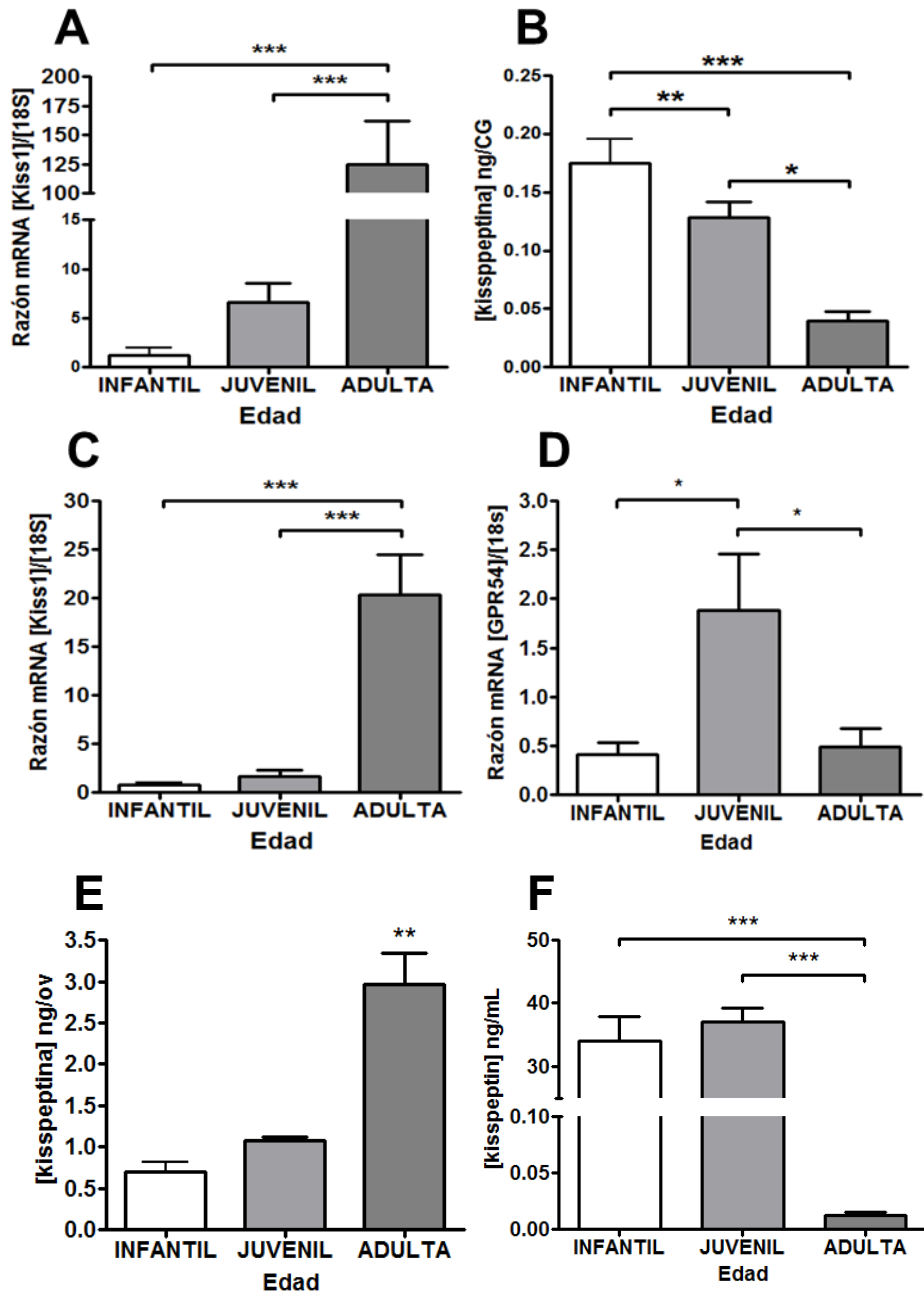


Figura 2 : Expresión de kisspeptina y su receptor GPR54 durante el desarrollo puberal. Se extrajeron los ovarios, ganglio celíaco y suero, de ratas de 15 (infantil), 30 (juvenil) y 60 (adulta) días de edad, de los cuales se usó un ovario para la extracción de mRNA total o para la medición del péptido. A y B, muestran las determinaciones en ganglio celíaco. C, D y E, muestran las determinaciones en ovario. F, muestra la determinación de kisspeptina en suero. Cada barra corresponde al promedio \pm EEM, con un $n=10$ (juvenil y adulta) y $n=10$ (60 días). En A, D y E los resultados están expresados con respecto a la expresión del gen constitutivo de la subunidad ribosomal 18S. *** Corresponde a $p<0,001$. * corresponde a $p<0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de ANOVA seguido por un post test de Newman-Keuls.

6.1.2 Presencia de kisspeptina y su receptor en ganglio celíaco y ovario

6.1.2.1 Inmunodetección de kisspeptina en ovario y ganglio celiaco

El primer paso fue confirmar en ratas Sprague-Dawley la presencia de kisspeptina en ovario y ganglio celíaco y su ubicación a nivel folicular. La figura 3A y 3B muestran la detección por inmunohistoquímica de kisspeptina en ovario (figura 3A) y en somas neuronales en el ganglio celíaco (figura 3B). Al analizar la distribución de la marca de kisspeptina a nivel ovárico, nuestros resultados confirman lo previamente descrito por Castellano y cols. (28), encontrando marca positiva en cuerpo lúteo y glándula intersticial. Al analizar los resultados en el folículo podemos ver una intensa marca en las células de la teca y a diferencia de lo descrito anteriormente por Castellano y cols., vemos la presencia de kisspeptina en las células de la granulosa (figura 3A). Las figura 3C y 3D representan el control negativo (incubación sin anticuerpo primario) de la inmunohistoquímica en ganglio celíaco y ovario. En la figura 3E se presenta la preabsorción del tejido con kisspeptina-10 como control de especificidad del anticuerpo. Figura 4, muestra la inmunoreactividad para kisspeptina en folículos de distintas etapas de desarrollo. Desde folículos primarios, donde se aprecia una marca en células de la granulosa y una marca difusa en las células de la teca (figura 4A), en folículos secundarios secundarios, hay una marca tanto en granulosa como en la teca, en esta última se ve una intensa marca (figura 4B), en folículos antrales la marca en las células de la granulosa es menos intensa que en folículos de menos desarrollo, y en las células de la teca se puede ver una intensa marca comparada con las células de

la granulosa (figura 4C), en folículos preovulatorios la marca en células de la granulosa disminuye, al igual que en las células de la teca con excepción de la zona epitelial en la cual se puede apreciar una intensa inmunotinción (figura 4D), También se puede apreciar inmunotinción en cuerpos lúteos (figura 4E).

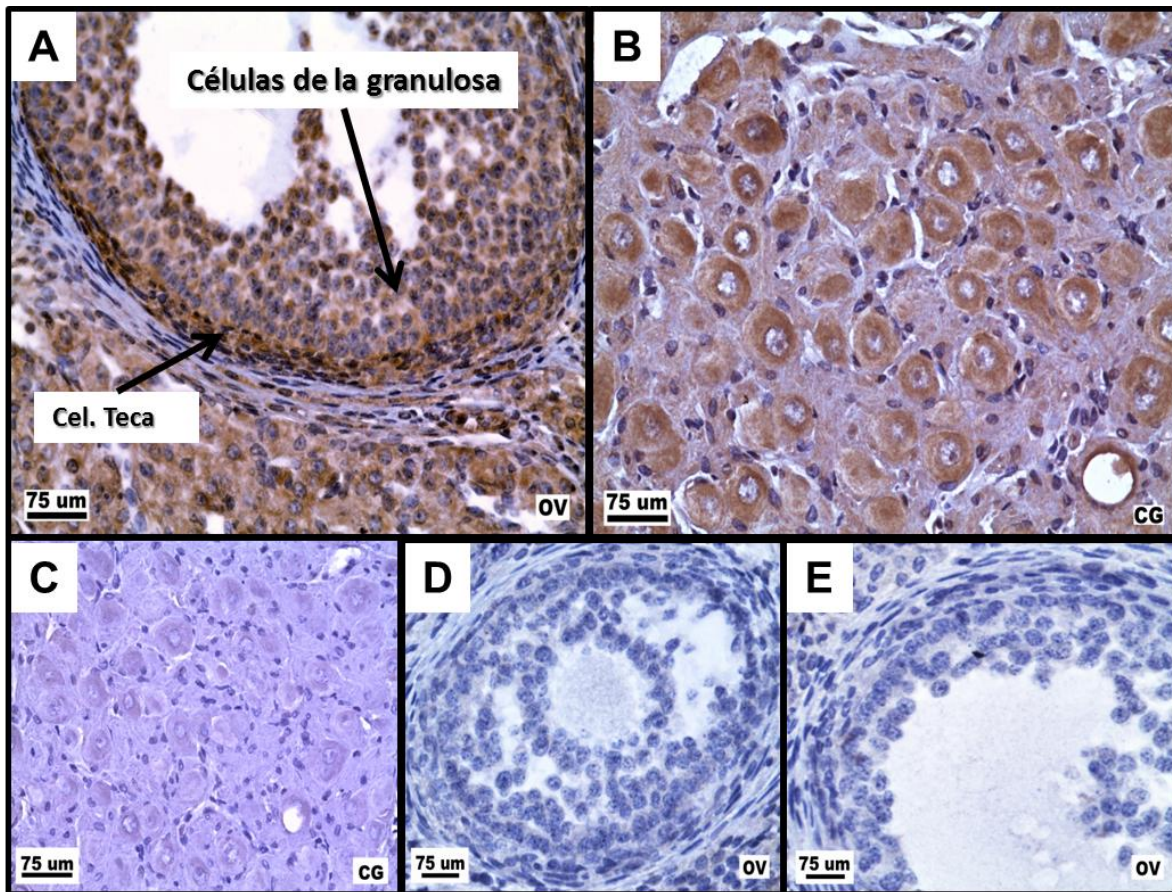


Figura 3: Inmunodetección de kisspeptina en ovario y ganglio celíaco de ratas adultas. Inmunoreactividad positiva para kisspeptina en: Células de la granulosa y teca en ovario (A) y en células neuronales en ganglio celíaco (B), (C) y (D) controles negativos, incubados sin anticuerpo primario, (E) control de especificidad del anticuerpo primario, preabsorción del anticuerpo primario con kisspeptina.

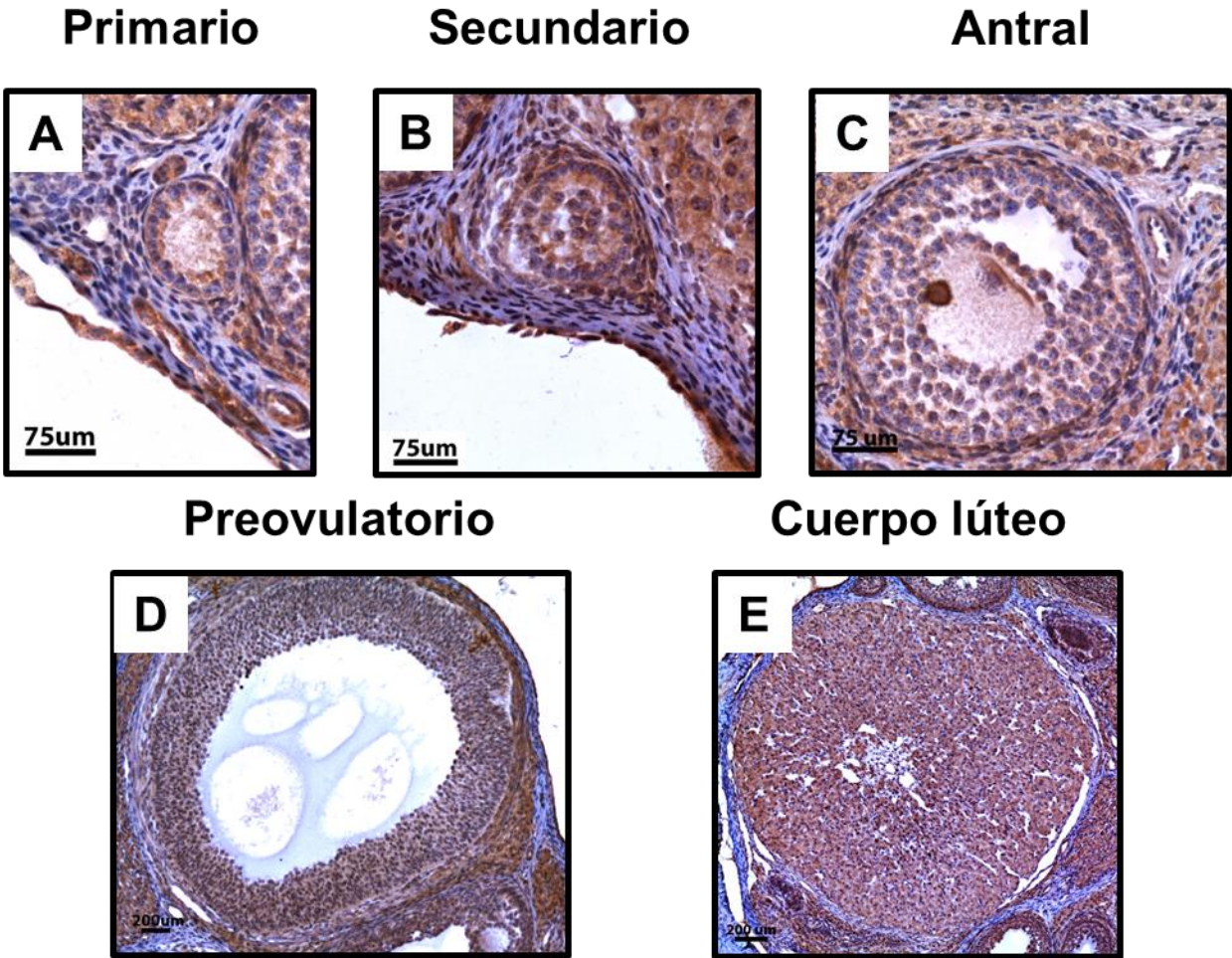


Figura 4: Inmunoreactividad para kisspeptina en folículos de distintas etapas de desarrollo. La figura muestra la inmunoreactividad positiva para kisspeptina en folículos en distintas etapas de desarrollo, en (A) folículos primarios, (B) secundarios, (C) antral, (D) preovulatorios y (E) cuerpos luteos, la barra negra corresponde a 75 μm, la barra negra corresponde a 200 μm.

6.1.2.2 Kisspeptina y GPR54 se expresan tanto en células de la teca como en células de la granulosa

Para comprobar, si el ovario tiene la capacidad de sintetizar kisspeptina y su receptor GPR54, se midió la expresión del mRNA para kisspeptina (figura 5A) y GPR54 (figura 5B), en fracciones ricas en células de la granulosa y ovarios residuales que contienen las células de la teca. Los resultados muestran que la expresión de kisspeptina es significativamente mayor en la fracción rica en células de la granulosa que en la fracción que contiene las células de la teca (figura 5A). Al analizar al receptor para kisspeptina, no se aprecian diferencias significativas en ambas fracciones.

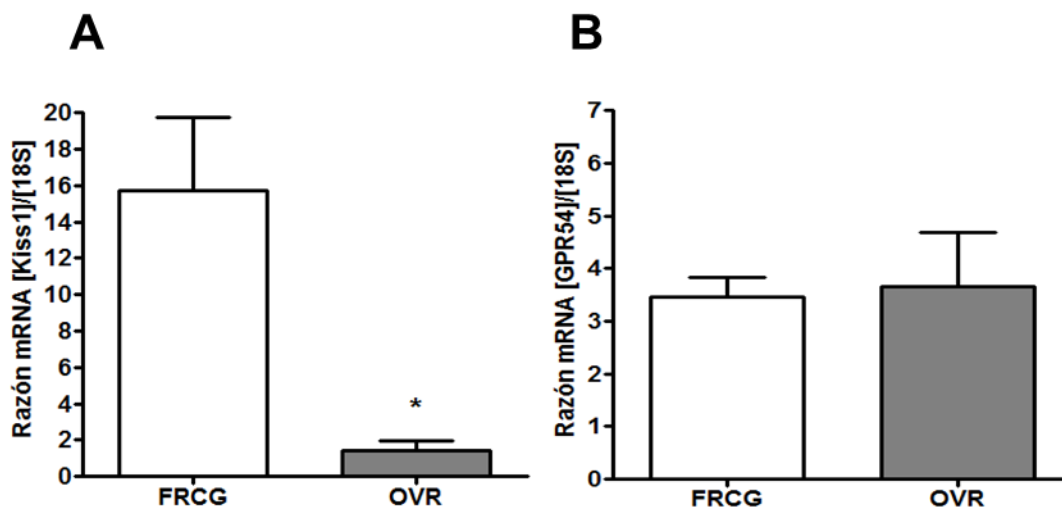


Figura 5: Expresión del mRNA para kisspeptina y GPR54 en fracciones ricas en células de la granulosa y en ovario residual (células de la teca e intersticiales) de rata. A) Se muestra el contenido de mRNA para kisspeptina. B) Se muestra el contenido de mRNA para el receptor de kisspeptina GPR54. A cada ovario se le realizaron repetidas punciones para extraer la fracción rica en células de la granulosa, FRCG, (n=5), el tejido remanente es tomada como tejido residual rico en células de la teca e intersticio, OVR, (n=5). Los datos están expresados como el promedio \pm EEM con respecto a la expresión del gen constitutivo 18S. * corresponde a $p < 0,05$. Analizado por test de student para datos pareados.

6.1.2.3 Colocalización de fibras inmunoreactivas para kisspeptina y tirosina hidroxilasa en ganglio celiaco

Como demostramos anteriormente, kisspeptina se expresa en ganglio celíaco, por lo que el próximo paso fue determinar si el péptido se ubicaba en las fibras simpáticas o en una vía independiente, por lo que podríamos postular que kisspeptina se transportaría por una de estas vías para alcanzar al ovario. Para probarlo se midió la presencia de la enzima tirosina hidroxilasa, la cual es la enzima limitante de la síntesis de las catecolaminas y se encarga de catalizar la conversión del aminoácido tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), por lo que nos sirvió como marcador de células catecolaminérgicas, las que se compararon con la localización de la marca para kisspeptina, a través de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. La figura 6A y 6B corresponden a la determinación por inmunohistoquímica en cortes consecutivos para kisspeptina (A) y tirosina hidroxilasa (B), con flechas negras se muestran ejemplos de somas neuronales que son inmunopositivos para ambos péptidos. La figura 6C y 6D corresponden a la determinación por inmunofluorescencia en cortes consecutivos para kisspeptina (C) y tirosina hidroxilasa (D), en la figura 6E se muestra la superposición (merge) de las imágenes de las figuras 6C y 6D. Ejemplos de la colocalización de los péptidos se muestran con flechas blancas.

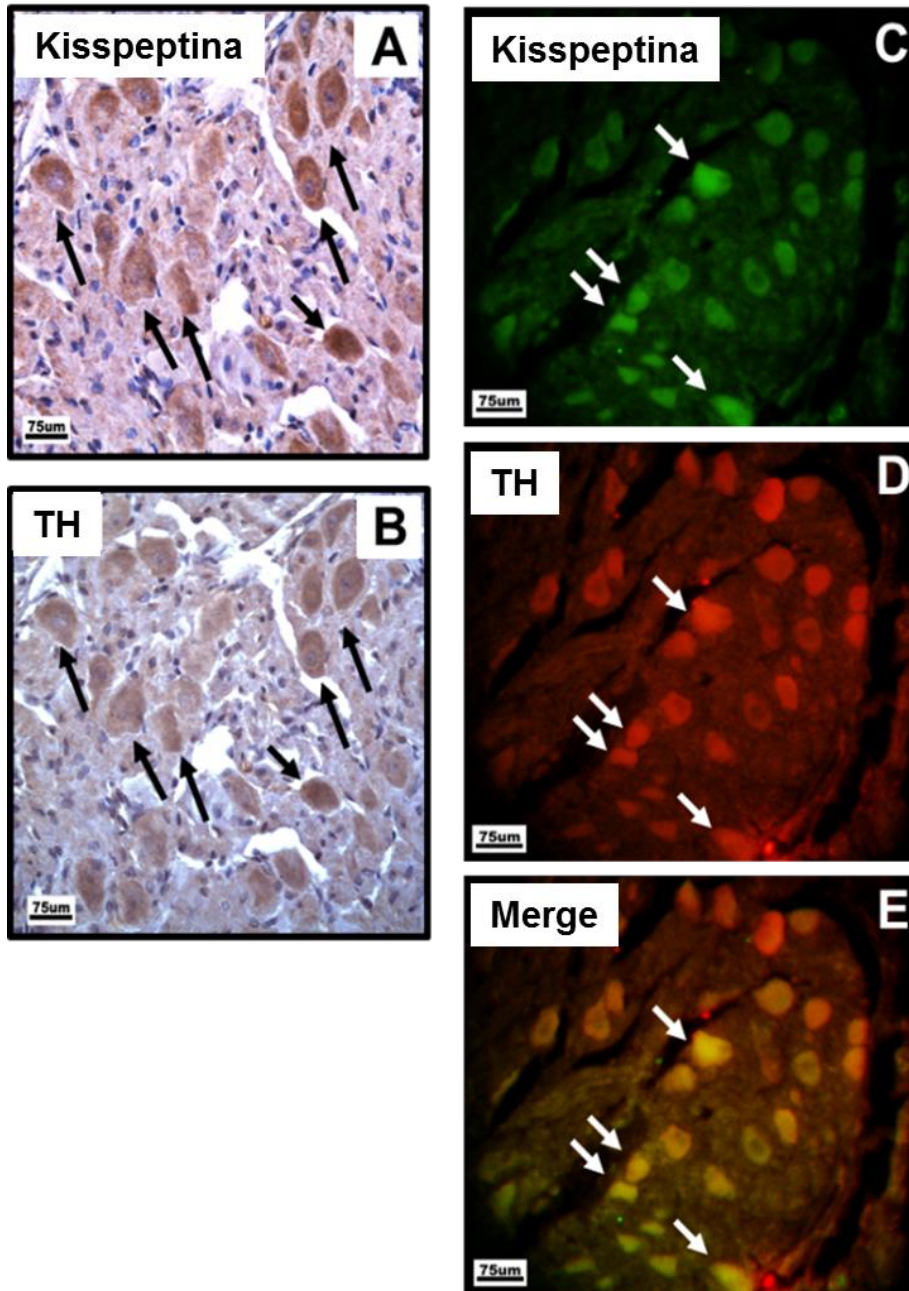


Figura 6: Inmunoreactividad para kisspeptina y tirosina hidroxilasa en cortes de ganglio celíaco de ratas adultas sometidas a la sección del nervio ovárico superior (SONX). Inmunohistoquímica para kisspeptina (A) y Tirosina hidroxilasa (B) en cortes consecutivos de ganglio celíaco. Se aprecia una marca citoplasmática para kisspeptina en somas neuronales (flechas negras) que abarca aparentemente las mismas células que están marcadas para tirosina hidroxilasa. Inmunofluorescencia para kisspeptina (C) y tirosina hidroxilasa (D), en (E) se aprecia la superposición de las imágenes en C y D. El mismo tejido se incubó con los 2 anticuerpos, de tal manera que podemos ver con flechas blancas los somas neuronales marcados positivamente para kisspeptina y TH,

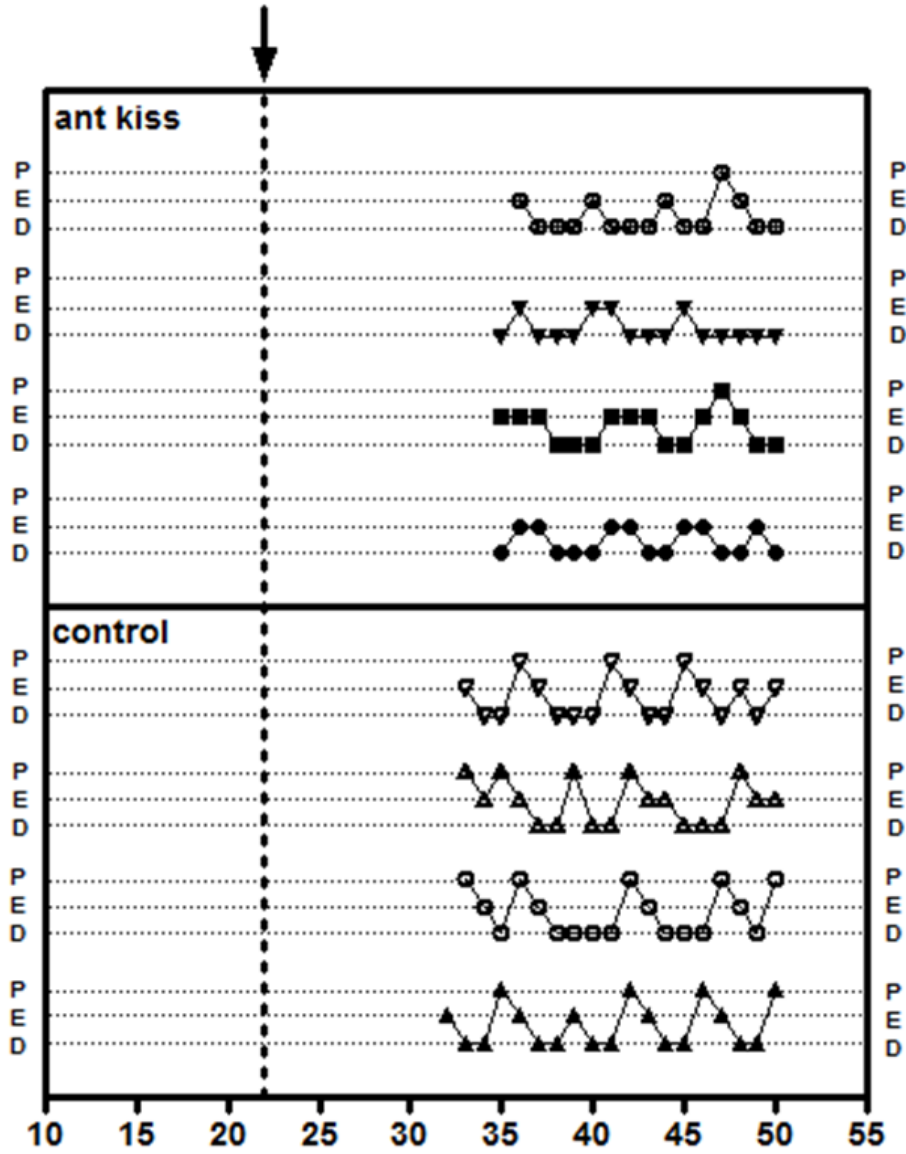
6.1.3 Estudio de la función de kisspeptina en la pubertad.

6.1.3.1 La administración de un antagonista de kisspeptina retrasa la apertura vaginal y altera la ciclicidad estral

Basándonos en evidencias previas que sugieren que kisspeptina podría participar en el desarrollo folicular y la ovulación, analizamos la participación de la kisspeptina ovárica en la pubertad y la ovulación. Para cumplir este objetivo, administramos un antagonista contra kisspeptina o suero salino como control en ovarios de ratas hemiovariectomizadas desde los 22 días hasta los 50 días de edad. Los resultados muestran que la administración de suero salino no produjo alteraciones en la edad de la apertura vaginal (comparándolos con resultados tomados de nuestro laboratorio, utilizando la misma cepa de ratas); sin embargo, las ratas que recibieron el antagonista contra kisspeptina mostraron un retraso significativo, de 2 días en la apertura vaginal (figuras 7A, 7B y 7C). Otro dato importante, se obtuvo al medir el día del primer estro seguido de un diestro, lo que denotaría un inicio de la actividad cíclica ovulatoria, lo cual es un índice de pubertad. Los resultados mostraron un retraso de un 32% para el grupo con anticuerpo contra kisspeptina (Figura 7E), por lo que habría un retraso en el inicio de la actividad reproductiva. También hubo un retraso en la ciclicidad estral (figura 7A, parte inferior y 7D), en cambio, la administración del antagonista contra kisspeptina alteró significativamente la ciclicidad estral (figura 7A y figura 7D). Al medir la concentración plasmática de kisspeptina encontramos una disminución en presencia del antagonista (figura 7F).

implante de la minibomba
administración del ant kiss

A



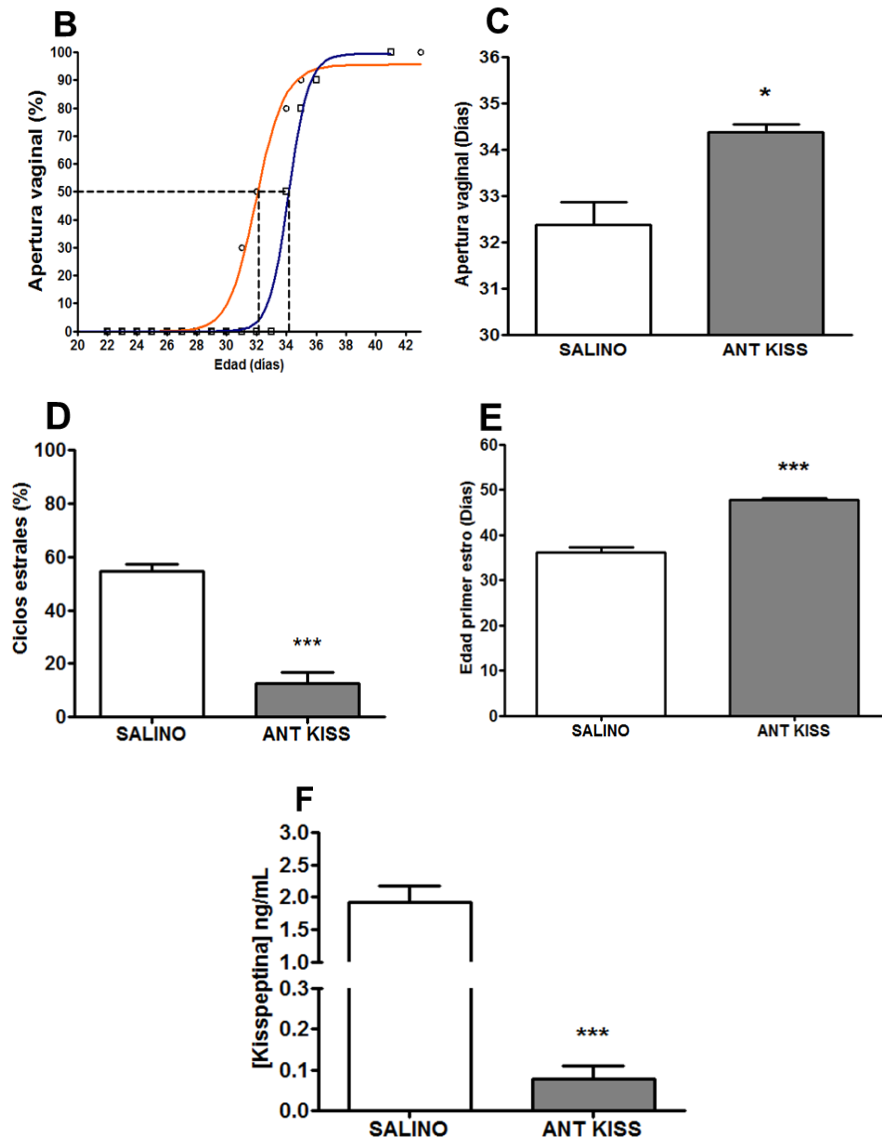


Figura 7: Efecto de la administración in-vivo de un antagonista para kisspeptina (p234) sobre la edad de la apertura vaginal y la ciclicidad estral. Efecto de la administración in-vivo de un antagonista para kisspeptina (p234) sobre la edad de la apertura vaginal y la ciclicidad estral. (A) Patrones representativos de ciclos estrales de ratas entre los 22 y 50 días de edad para grupos control (n=10) y en presencia de un antagonista para kisspeptina (n=10). (B) porcentajes de ratas que muestran una apertura vaginal en ratas controles (salino, color naranja) y con un antagonista para kisspeptina (color azul). (C) Apertura vaginal promedio (días) (n=10). (D) Número de ciclos estrales expresados como porcentaje del número de ciclos teóricos (considerando cada ciclo estral de 4 días) desde la apertura vaginal hasta los 50 días de edad tanto para las ratas controles como para las tratadas con el antagonista contra kisspeptina. (E) Promedio del día del primer estro seguido de un diestro, como indicado de primera ovulación. (F) Concentración de kisspeptina en muestras de suero de ratas controles y tratadas con antagonista contra kisspeptina. D, Diestro; E, estro; P, proestro. Un ciclo teórico corresponde a un P seguido por un E y 2 días en D. Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. *** Corresponde a un $p < 0,001$. * corresponde a $p < 0,05$. Analizado a través del test de student para datos pareados.

6.1.3.2 La administración de un antagonista contra kisspeptina disminuye la esteroidogénesis y la concentración de kisspeptina en el eje ganglio celíaco-ovario.

La administración del antagonista contra kisspeptina en ratas prepuberes (22 días) de manera continua hasta llegar a la adultez (50 días de edad), mostró una alteración de la ciclicidad estral y la apertura vaginal. Para verificar, si estos efectos se deben a una alteración en la esteroidogénesis, se determinó la concentración de progesterona, testosterona y estradiol. Para poder verificar que estos efectos no se debían a un efecto central, que hubiese alterado la secreción de LH, se determinó su concentración plasmática y por último se analizaron los efectos sobre la concentración de kisspeptina a lo largo del eje ganglio celíaco-ovario. Los resultados mostraron que el bloqueo de la acción de kisspeptina disminuyó la concentración plasmática de progesterona y estradiol (figura 8B y 8C) sin alterar la concentración de LH y testosterona (figura 8A y 8B). La figura 9 muestra que la concentración de kisspeptina esta disminuida tanto en ganglio celíaco como en el ovario (figura 9A y 9B).

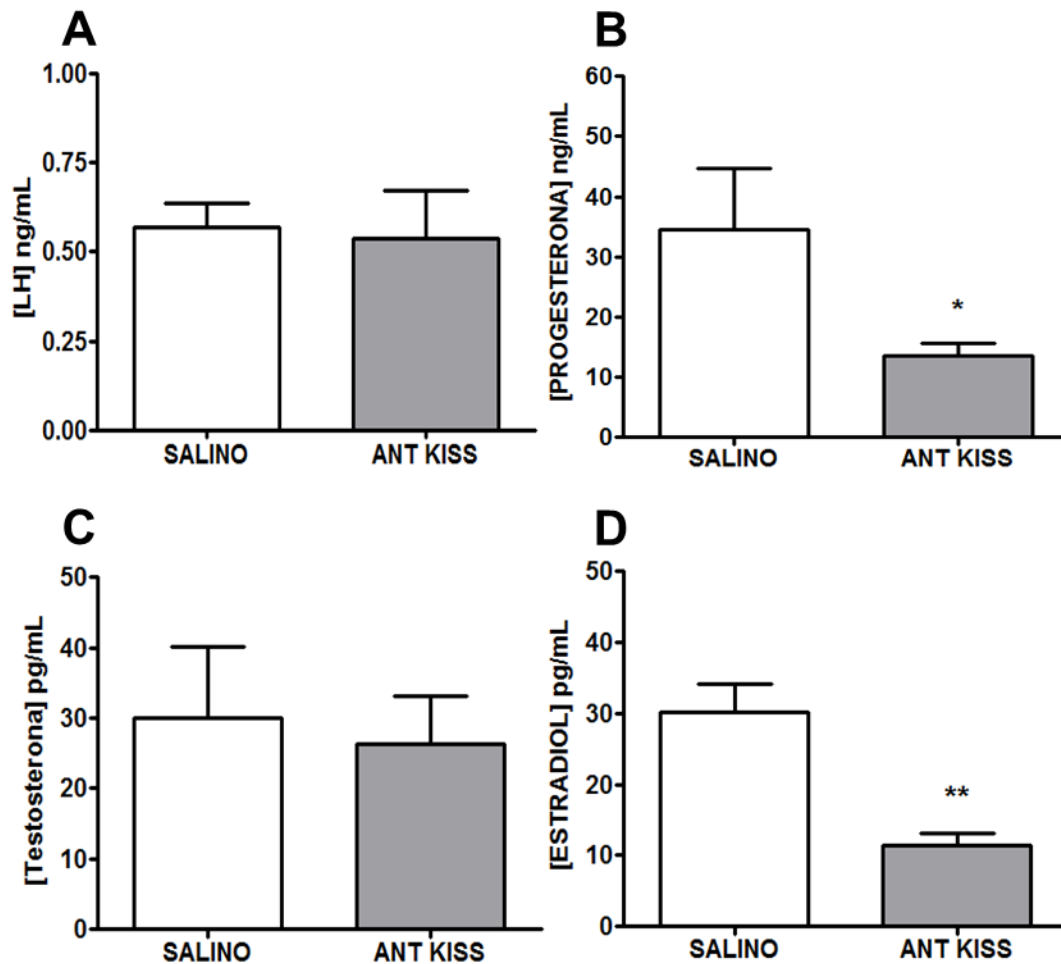


Figura 8: Efectos de la administración de un antagonista contra kisspeptina sobre la concentración de hormonas plasmáticas. Determinación de la concentración plasmática de LH (A), progesterona (B), testosterona (C) y estradiol (D), las determinaciones de LH fueron realizadas por EIA. Progesterona, testosterona y estradiol realizadas por ELISA. Cada barra corresponde al promedio \pm EEM de $n=10$. ** Corresponde a un $p < 0,01$. * corresponde a $p < 0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student.

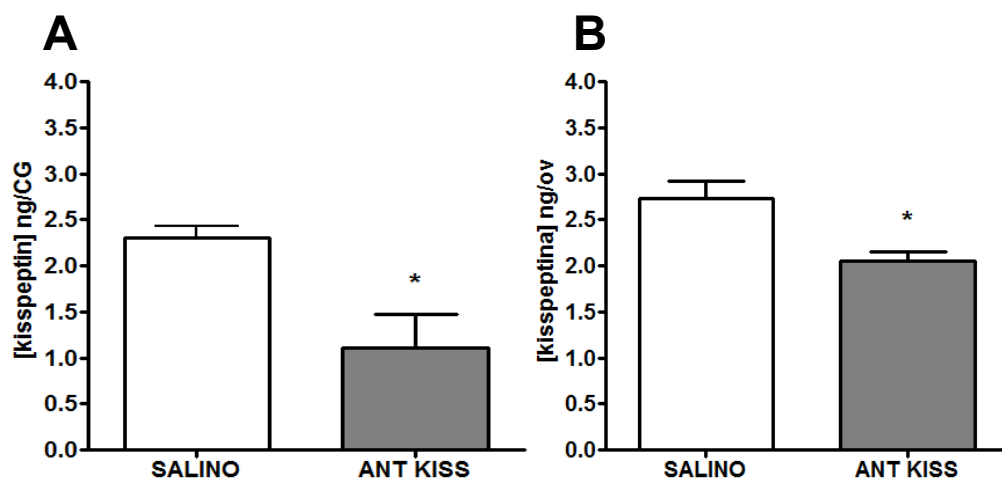


Figura 9: Concentración de kisspeptina a lo largo del eje GC-O. Contenido del péptido para kisspeptina, en muestras de ganglio celiaco (A) y de ovario (B) de ratas controles (SALINO) y tratadas con antagonista contra kisspeptina (ANT KISS). Los resultados se muestran como el promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

6.2 Objetivo 2

Determinar los efectos de la estimulación adrenérgica sobre la expresión de kisspeptina en el ovario in vitro, y medir el efecto de la exposición a estrés por frío agudo sobre la expresión de kisspeptina a través del eje GC-O.

6.2.1 La activación del receptor β -adrenérgico aumenta el contenido de mRNA que codifica para Kisspeptina en ovario

El siguiente experimento tuvo como objetivo, determinar si la activación adrenérgica en el ovario aumentaba la expresión del mRNA de kisspeptina, para lo cual se realizó un experimento in-vitro, donde se incubaron los ovarios por 8 horas en presencia de isoproterenol (agonista β -adrenérgico) e isoproterenol más propanolol (antagonista β -adrenérgico). Los resultados (figura 10) de este experimento muestran que la activación de los receptores β -adrenérgicos induce un aumento tanto del mRNA (figura 10A) como del péptido (figura 10B) para kisspeptina, lo que es revertido por el uso de propanolol.

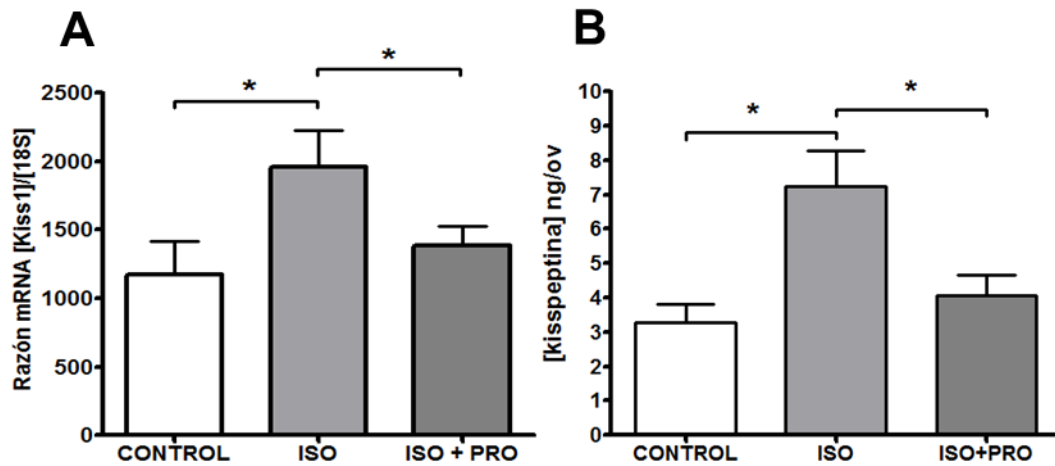


Figura 10: Efecto de la activación de la receptores β -adrenérgicos sobre la expresión de kisspeptina en ovarios incubados con isoproterenol por 8 horas. (A) Contenido del mRNA para kisspeptina, y (B) cuantificación de Kisspeptina por EIA. Cada columna representa 4 ovarios controles, 4 ovarios incubados en presencia de ISO, isoproterenol (20 μ M) y 4 ovarios incubados en presencia de ISO+PRO, isoproterenol (20 μ M) más propanolol (200 μ M), los resultados se muestran como el promedio \pm EEM. El mRNA está expresado con respecto a la expresión del gen constitutivo de la subunidad ribosomal 18S. * corresponde a $p < 0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de ANOVA seguido por un post test de Newman-Keuls.

6.2.2 Estudios de los efectos del estrés sobre el eje hipotálamo-ganglio celíaco-ovario (HGO)

Está descrito en la literatura que el estrés por frío aumenta la actividad simpática del ovario (38, 43), lo que lleva a largo plazo a la generación de quistes ováricos. Con estos antecedentes, postulamos que este procedimiento también podría afectar la expresión de kisspeptina y su receptor GPR54 a lo largo del eje HGO. Para demostrarlo, se realizaron 3 protocolos distintos de estrés por frío: un primer esquema de estrés agudo de 64 horas continuas, y otros dos que consistieron en la aplicación de 3 horas diarias de estrés a 4°C, de lunes a viernes por 4 o por 8 semanas. De esta forma: a) Podremos ver cambios rápidos en el eje simpático que llega al ovario, y b) y c), ver las alteraciones a largo plazo, En estas condiciones estudiamos los cambios en el sistema kisspeptina/GPR54 a lo largo del eje HGO.

La primera parte del objetivo fue probar si la activación de la vía simpática que llega al ovario también alteró la expresión del mRNA y el péptido para kisspeptina y el mRNA para GPR54 en hipotálamo, ganglio celíaco y ovario de ratas sometidas a estrés por frío agudo por 64 horas. Para esto, se diseñaron 4 estrategias, en la primera se aplicó un estrés agudo por frío por 64 horas (figura 11A), luego se procedió a seccionar el nervio ovárico superior (SONX) (figura 11B), para interrumpir la comunicación neuronal con el ovario. La tercera estrategia consistió en aplicar el estrés por frío a ratas previamente desnervadas (figura 11C). Por último se procedió a bloquear la actividad simpática que llega al ovario a nivel hipotalámico mediante la administración de MK801 en la región

magnocelular para medir la expresión del mRNA para kisspeptina y GPR54 en el ovario (figura 13).

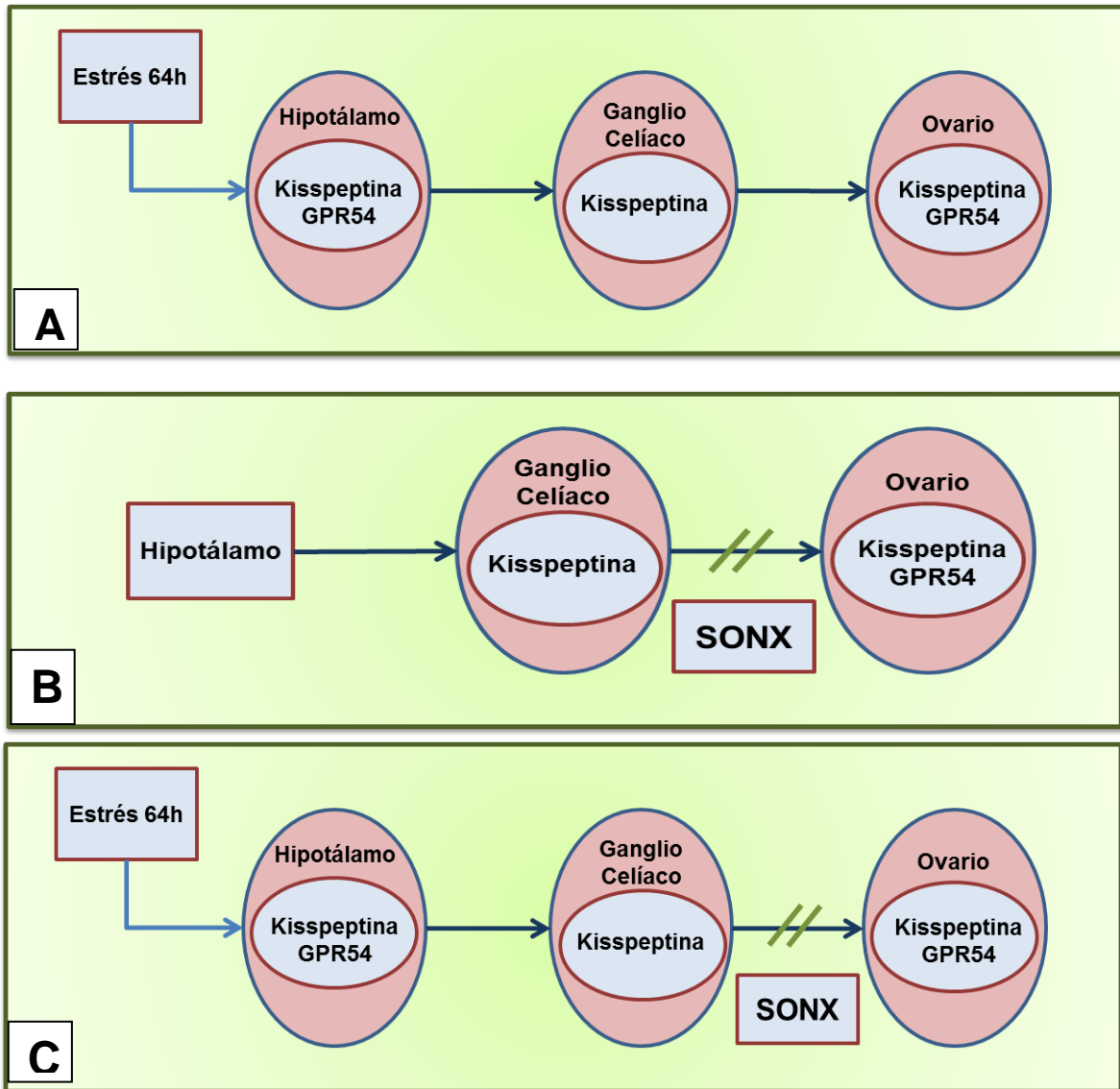


Figura 11: Diagrama representativo. Protocolo de estrés agudo por frío (A), denervación (B) y estrés más denervación (C). En burdeos se muestran los tejidos en los cuales se determinará kisspeptina y GPR

6.2.2.1 El estrés por frío agudo de 64 horas altera de distinta forma la expresión de kisspeptina y su receptor a lo largo del eje HGO

Los resultados muestran que la expresión del mRNA para kisspeptina y su receptor disminuyó significativamente en hipotálamo (figura 12A y 12B), en tanto el péptido para kisspeptina no presentó variaciones significativas (figura 12C). En ganglio celiaco se observó un aumento significativo tanto del mRNA como del péptido para kisspeptina (figura 12D y 12E), el análisis del mRNA para el receptor quedó bajo el nivel de detección. Al analizar el ovario se observó que este tipo de estrés por frío disminuyó significativamente la expresión del mRNA para kisspeptina (figura 12G), mientras que el péptido aumentó significativamente (figura 12I). La determinación del receptor para kisspeptina no mostró variaciones significativas aunque presentó una tendencia a la disminución (figura 12H), mientras que la concentración de kisspeptina plasmática no presentó variaciones significativas (figura 12I).

6.2.2.2 La sección del nervio ovárico superior (SONX) disminuye significativamente el mRNA para kisspeptina, a lo largo del eje HGO

La tercera estrategia tuvo como objetivo seccionar el nervio ovárico superior, para cortar la comunicación simpática con el ovario y por ende interrumpir la activación noradrenérgica y de kisspeptina con el ovario. Nuevamente se analizó por PCR en tiempo real el eje H-GC-O. La expresión del mRNA para kisspeptina disminuyó en

en ganglio celíaco (figura 12D), mientras la concentración del péptido aumentó significativamente (figura 12E). En el ovario la expresión del mRNA disminuyó significativamente (figura 12G), mientras el péptido aumentó (figura 12I), al determinar la expresión del mRNA para el receptor GPR54 encontramos una disminución significativamente en las ratas SONX (figura 12H). La determinación de la concentración plasmática arrojó un aumento en la concentración de kisspeptina (figura 12F).

6.2.2.3 La sección del nervio ovárico superior (SONX) modifica el efecto del estrés por frío de 64 horas sobre la expresión de kisspeptina y GPR54 a lo largo del eje HGO

Los resultados expuestos anteriormente mostraron que el estrés agudo aumenta el contenido de kisspeptina tanto en ganglio celíaco como en ovario, y que al seccionar el nervio ovárico superior el contenido de kisspeptina disminuía río arriba del sitio de corte (ganglio celíaco y el hipotálamo), efectos que no se correlacionaron con lo esperado. Por ello, quisimos ver si aplicando el protocolo de estrés a ratas previamente desnervadas se traduciría en cambios adicionales en la expresión de kisspeptina. Los resultados encontrados al aplicar este doble protocolo muestran en hipotálamo que la expresión de kisspeptina aumenta significativamente respecto a los grupos estrés y SONX (figura 12A), en cambio, su receptor solo aumenta significativamente respecto al grupo SONX (figura 12B), al analizar el péptido no se presentan variaciones significativas (figura 12C). En ganglio celíaco, El mRNA para kisspeptina disminuye respecto al grupo estrés

aunque no es significativo ($p=0,058$) (figura 12D), mientras que el péptido no presenta variaciones con el grupo estrés pero si con el grupo SONX (figura 12E). En el ovario hay un aumento significativo tanto de kisspeptina (figura 12G) y su receptor (figura 12H) respecto al grupo estrés, no así con el grupo SONX, en el cual solo kisspeptina aumentó significativamente. La determinación del péptido en ovario no mostró variaciones significativas (figura 12I). La determinación de la concentración plasmática de kisspeptina no mostró variaciones significativas con el grupo estrés, pero si disminuyó significativamente con el grupo SONX.

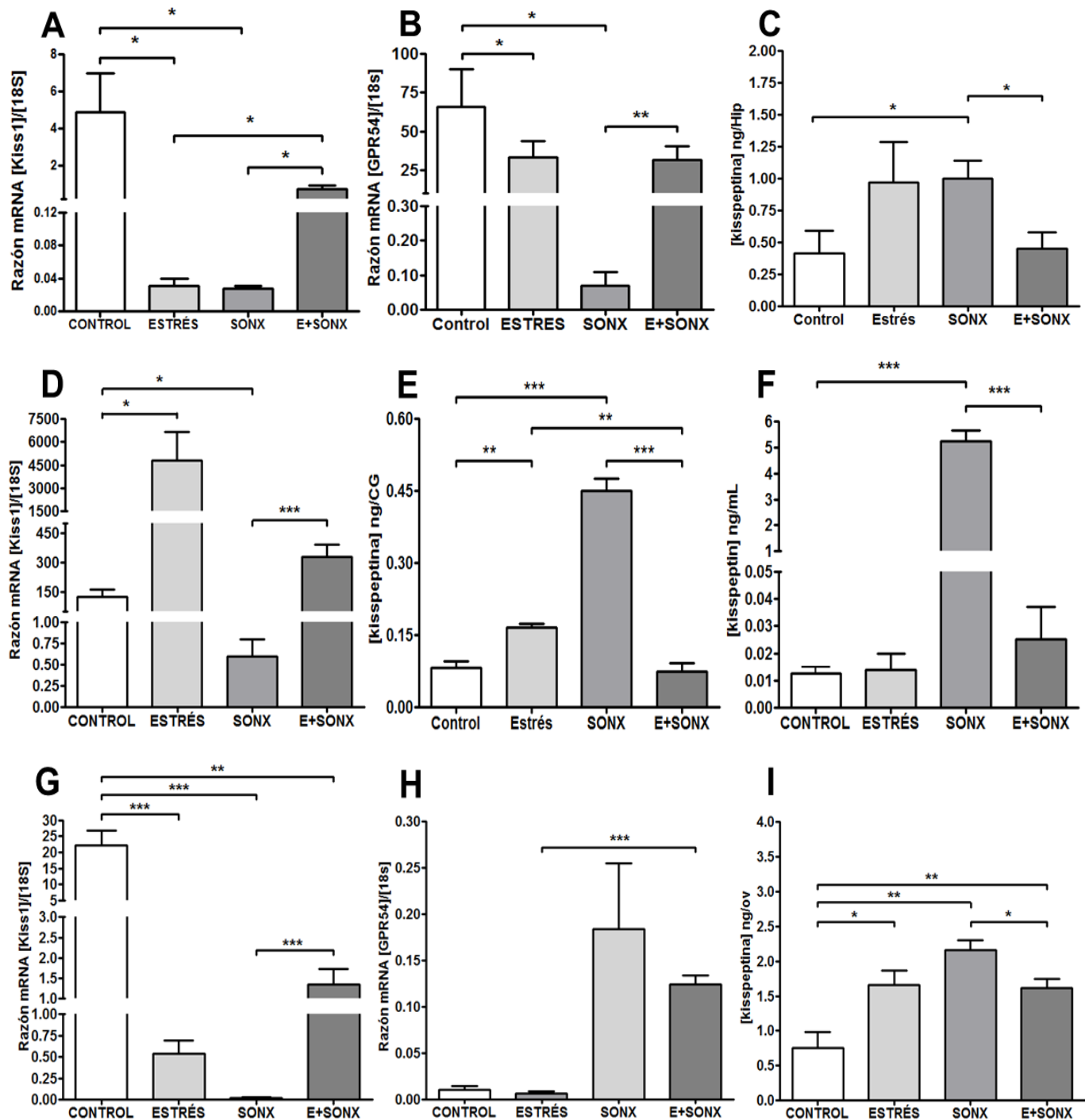
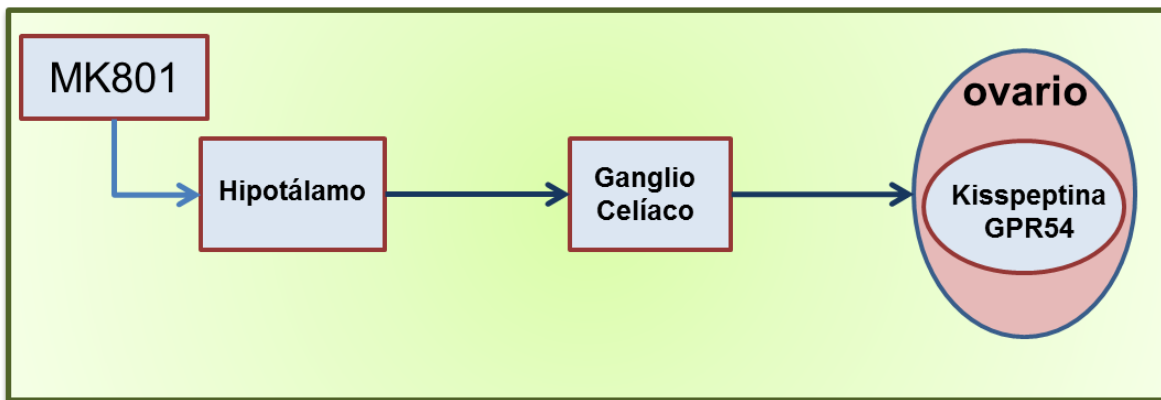


Figura 12: Efecto de la hiperactivación simpática (estrés agudo por frío) sobre la expresión de kisspeptina y su receptor GPR54 a lo largo del eje HGO. Efecto sobre la expresión del mRNA y del péptido para kisspeptina a lo largo del eje hipotálamo (A, B y C), ganglio celíaco (Dy E) y el ovario (G, H y I), además de la determinación de la concentración plasmática de kisspeptina (F) en ratas controles (CONTROL), estrés por frío agudo por 64 hrs (ESTRÉS), ratas desnervadas (SONX) y estrés agudo por 64 horas en ratas desnervadas (SONX). La determinación de la expresión del mRNA fue normalizada utilizando la subunidad ribosomal 18S. La concentración del péptido se expresa respecto al peso total del tejido. Cada barra representa el promedio \pm EEM de 5 ratas. Cada gráfico fue analizado usando el test de student para datos pareados. * corresponde a $p < 0,05$. ** corresponde a $p < 0,01$. *** corresponde a $p < 0,001$.

6.2.2.4 La administración ICV de MK801 disminuyó la expresión de kisspeptina en ovario de rata

La siguiente estrategia estuvo dirigida a bloquear la activación hipotalámica producida por el estrés por frío agudo (figura 13). Basándonos en los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio, en los cuales Jara y cols (39) encontraron que la actividad simpática del ovario disminuía después de la exposición a MK801. Este fármaco es un bloqueador de los receptores NMDA para glutamato, el cual administrado en la región magnocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (39), (región que posee una población de neuronas TRH que activan la inervación simpática que llega al ovario (38)), bloquea la actividad nerviosa del ovario. El estrés disminuye la expresión del mRNA tanto de kisspeptina como de su receptor, mientras el bloqueo con MK801 en conjunto con el estrés agudo produjo un bloqueo aun mayor tanto para el mRNA del péptido



como el del receptor (figura 14A y 14B).

Figura 13: Diagrama representativo del protocolo de administración de MK801 en la región magnocelular del NPV. Aumentando la actividad simpática que llega al ovario. En color burdeos se destaca el ovario en el que se realizará las mediciones de kisspeptina y GPR54.

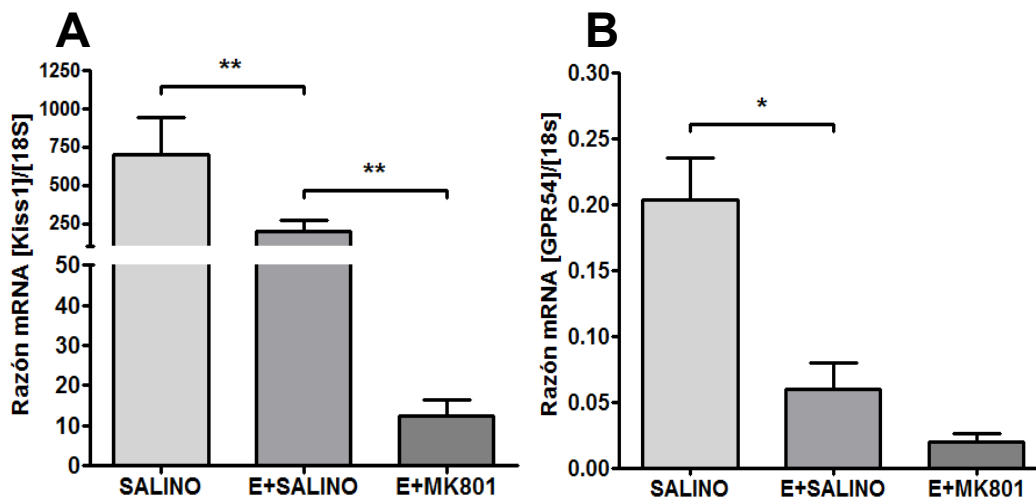


Figura 14: Efecto del bloqueo de los receptor para glutamato (MK-801) de la liberación de TRH en hipotálamo, sobre la expresión de kisspeptina y GPR54 en el ovario de rata. Efecto de la administración de un bloqueador de los receptores de glutamato, MK801, en neuronas TRH de la región magnocelular del hipotálamo, sobre la expresión de kisspeptina y su receptor GPR54 en ovarios de ratas. Los gráficos muestran el Contenido del mRNA para kisspeptina en ovarios ratas controles (salino), estrés agudo por 64 hrs. (salino) y estrés (MK801). En (A) expresión de kisspeptina (n=4) y (B) expresión de GPR54 (n=3-4). La determinación de la expresión del mRNA fue normalizada utilizando la subunidad ribosomal 18S. Los datos están expresados como el promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de ANOVA seguido por un post test de Newman-Keuls.

6.3 Objetivo 3

Determinar los efectos de la estimulación adrenérgica por el estrés por frío crónico de 4 y 8 semanas sobre la expresión de kisspeptina a través del eje G-O.

6.3.1 La aplicación del estrés por frío crónico de 4 semanas afecta la expresión de kisspeptina y GPR54 a lo largo del eje HGO

Habiendo determinado que el estrés a corto plazo activa el eje kisspeptinérgico GC-O, quisimos ver si estos cambios están asociados a variaciones en la expresión de kisspeptina y GPR54 a lo largo del eje GC-O (figura 15). En el ganglio celíaco encontramos una disminución significativa en el mRNA para kisspeptina (figura 16A), mientras que el péptido aumentó significativamente (figura 16B). En el ovario, el mRNA para kisspeptina no mostró variaciones significativas (figura 16D), al igual que el péptido (figura 16F), al analizar al receptor GPR54 encontramos que aumentaba significativamente (figura 16E). Adicionalmente, se midió la concentración plasmática de kisspeptina, encontrando un aumento significativo en las ratas que fueron estresadas por 4 semanas (figura 16C). La inmunohistoquímica del ovario muestra que el estrés aparentemente provocó un aumento de la marca para kisspeptina en células de la granulosa (figura 17B) en comparación con el control (figura 17A), Además, se apreció que en las ratas estresadas la marca en las células de la granulosa fue más intensa que en las células de la teca (figura 17B).

Estrés crónico de 4 y 8 semanas

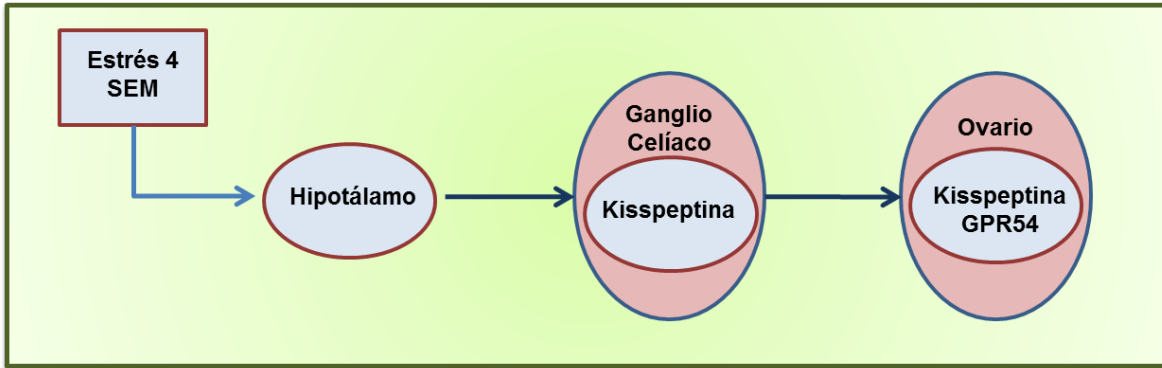


Figura 15: Diagrama representativo del protocolo de estrés crónico por frío, 5 días a la semana por 4 y 8 semanas. En los tejidos marcados en color burdeos se realizará las mediciones de kisspeptina y GPR54.

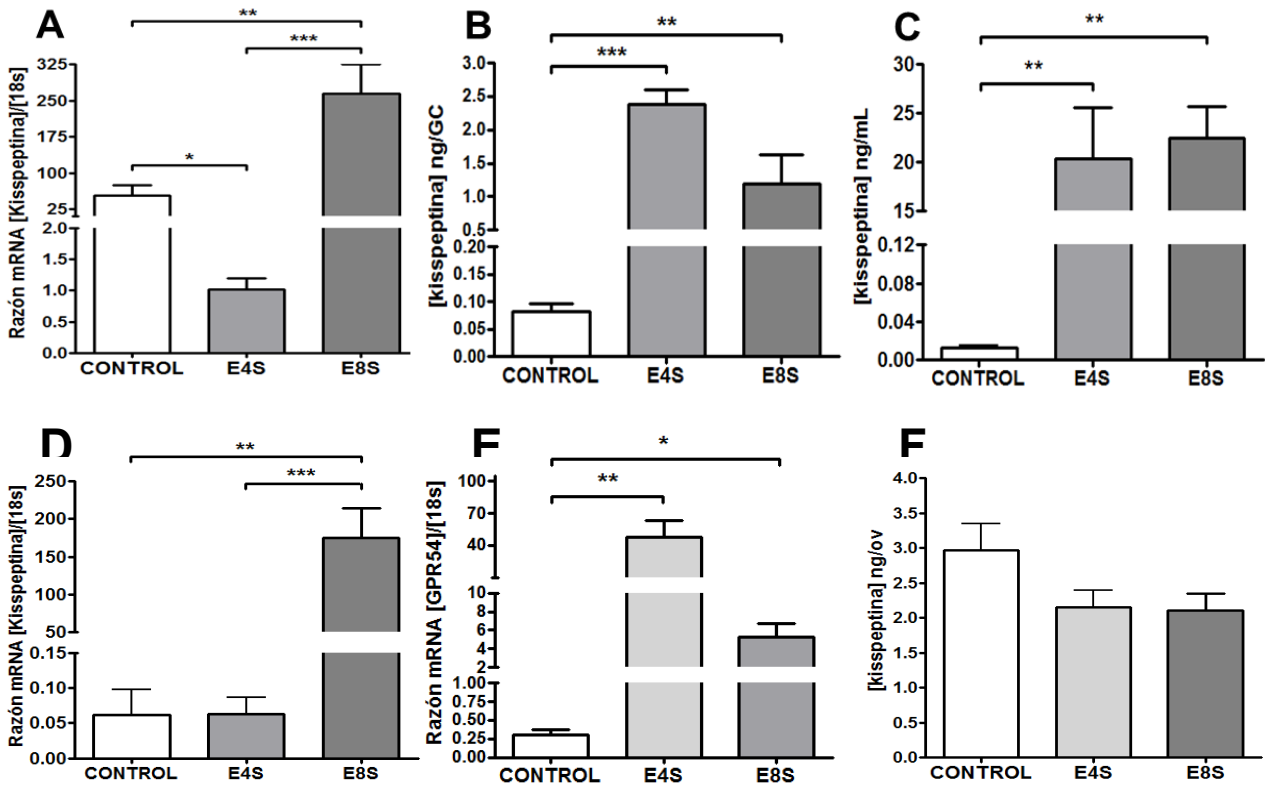


Figura 16: Efecto del estrés por frío crónico (4 y 8 semanas) sobre la expresión de kisspeptina a lo largo del eje ganglio celiaco-ovario. Efecto de la expresión del mRNA, el péptido para kisspeptina y su receptor GPR54 en ratas sometidas a estrés crónico por 4 y 8 semanas a lo largo del eje ganglio celiaco (A y B) y el ovario (D, E y F), además de la determinación de la concentración plasmática de kisspeptina (C). Tomadas de ratas control (n=5) y ratas sometidas a estrés manteniéndolas a 4°C por 3 horas diarias de lunes a viernes (n=5). La determinación de la expresión del mRNA fue normalizada utilizando la subunidad ribosomal 18S. Los datos están expresados como el promedio \pm EEM, seguido de un test de student. * corresponde a $p < 0,05$. ** corresponde a $p < 0,01$. *** corresponde a $p < 0,001$.

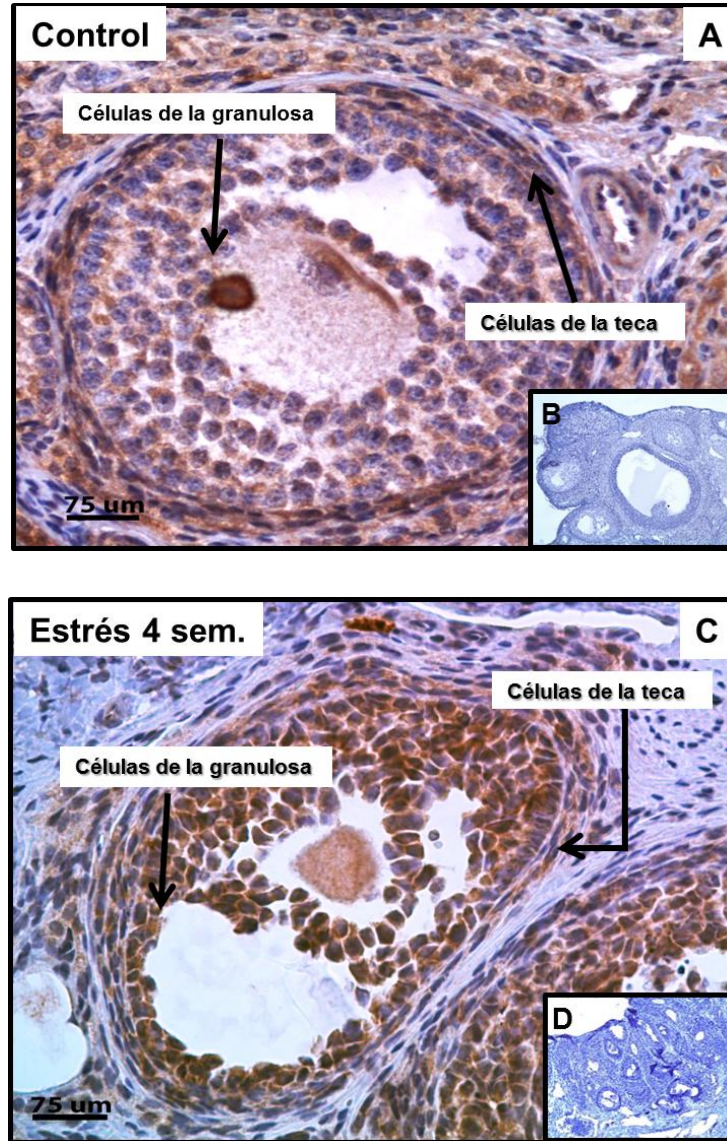


Figura 17: Inmunoreactividad positiva para kisspeptina en ovario de ratas controles y sometidas a estrés crónico por 4 semanas. Inmunohistoquímica para kisspeptina de ratas controles (A) y sometidas a estrés de 4 semanas (C), figuras B y D controles negativos, los cuales no se incubaron con el anticuerpo primario. (B) y (D) fotos tomadas con un aumento de 100X de los mismos tejidos.

6.3.2 La aplicación del estrés por frío crónico de 8 semanas afecta la expresión de kisspeptina y GPR54 a lo largo del eje HGO

Bernuci y cols. (49), demostraron que en ovario de rata sometidas a estrés intermitente durante 8 semanas, la actividad simpática del ovario, si bien no está aumentada, es importante para la generación de quistes foliculares, dado que su bloqueo disminuye los efectos del estrés, como son la generación de quistes y folículos con hipertecosis, por lo que se quiso ver los cambios en la expresión del mRNA y del péptido para kisspeptina y el mRNA para su receptor en este periodo (figura 15). Hubo un aumento de la expresión del mRNA y el péptido de kisspeptina en ganglio celíaco (figura 16A y 16B), mientras que en el ovario se observó que el mRNA para kisspeptina aumentó significativamente (figura 16D) pero el péptido no varió (figura 16F). El análisis de su receptor mostró que aumentó en forma significativa (figura 16E). Adicionalmente se midió la concentración plasmática de kisspeptina, encontrando un aumento significativo en las ratas que fueron estresadas por 8 semanas (figura 16C). La inmunohistoquímica del ovario muestra que el estrés crónico por 8 semanas prácticamente abolió la marca para kisspeptina en células de la granulosa y de la teca (figura 18B) en comparación con el control (figura 18A), no así en cuerpos lúteos y glándulas intersticiales donde la marca permanece (figura 18B).

Ovario

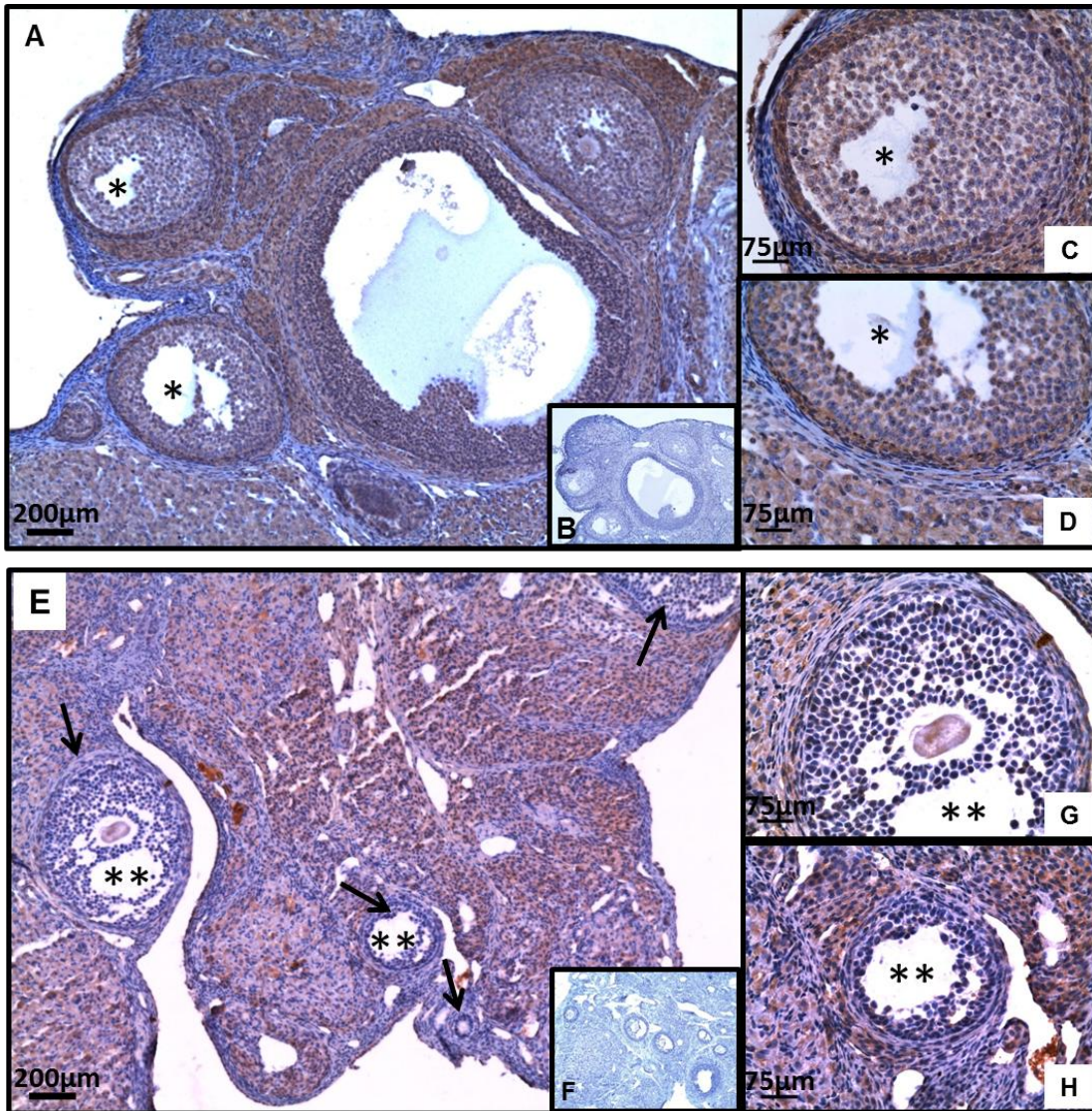


Figura 18: Inmunoreactividad para kisspeptina en ovario de ratas controles y sometidas a estrés crónico por 8 semanas. Inmunohistoquímica para kisspeptina de ratas controles (A) y sometidas a estrés por frío crónico por 8 semanas (E). A y E inmunohistoquímica para kisspeptina, B y F controles negativos. * representa a los folículos controles ampliados, ** representa a los folículos de ratas sometidas a estrés crónico por 8 semanas. En A Se aprecian folículos con una marca citoplasmática para kisspeptina en células de la teca, y en células de la granulosa. En E se marcan con flecha los folículos con escasa marca para kisspeptina.

6.4 Objetivo 4

a) Determinar el efecto sobre la ciclicidad estral y la esteroidogénesis de la administración crónica por 4 semanas de kisspeptina o un antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario de ratas adultas. b) Determinar el efecto del estrés crónico intermitente por 4 semanas, sobre la ciclicidad estral y la esteroidogénesis mientras se administra kisspeptina o un antagonista contra kisspeptina, en el ovario de ratas adultas.

6.4.1 La administración de kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario disminuye la ciclicidad estral.

El efecto de kisspeptina sobre la ciclicidad estral, se determinó mediante la administración de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina, P234, directamente en el ovario por un período de 4 semanas. Los resultados muestran que la administración de kisspeptina en el ovario, produjo una disminución significativa en la ciclicidad estral (Figura 19 y 20), mientras que el bloqueo de kisspeptina con la administración del antagonista P234, no produjo variaciones significativas (figura 19 y 20). Al realizar un análisis más detallado del comportamiento de cada grupo experimental a lo largo del ciclo estral, encontramos que la administración de kisspeptina aumentó el número de días que permanecieron en diestro y disminuyen los días en estro (figura 21A), en cambio no hubo diferencias al administrar el antagonista contra kisspeptina (figura 21A). Al analizar las transiciones entre proestro-estro, y las de estro-diestro, encontramos que la administración de kisspeptina disminuyó la transición tanto de proestro-estro (figura 21B) como de estro-diestro (figura 21C). Mientras que la administración del antagonista contra kisspeptina no tuvo efectos significativos.

Para verificar que el tratamiento no hubiese tenido un efecto central alterando la secreción de LH, se midió su concentración plasmática, encontrando que ni la administración de kisspeptina ni la del antagonista mostraron cambios significativos (figura 22).

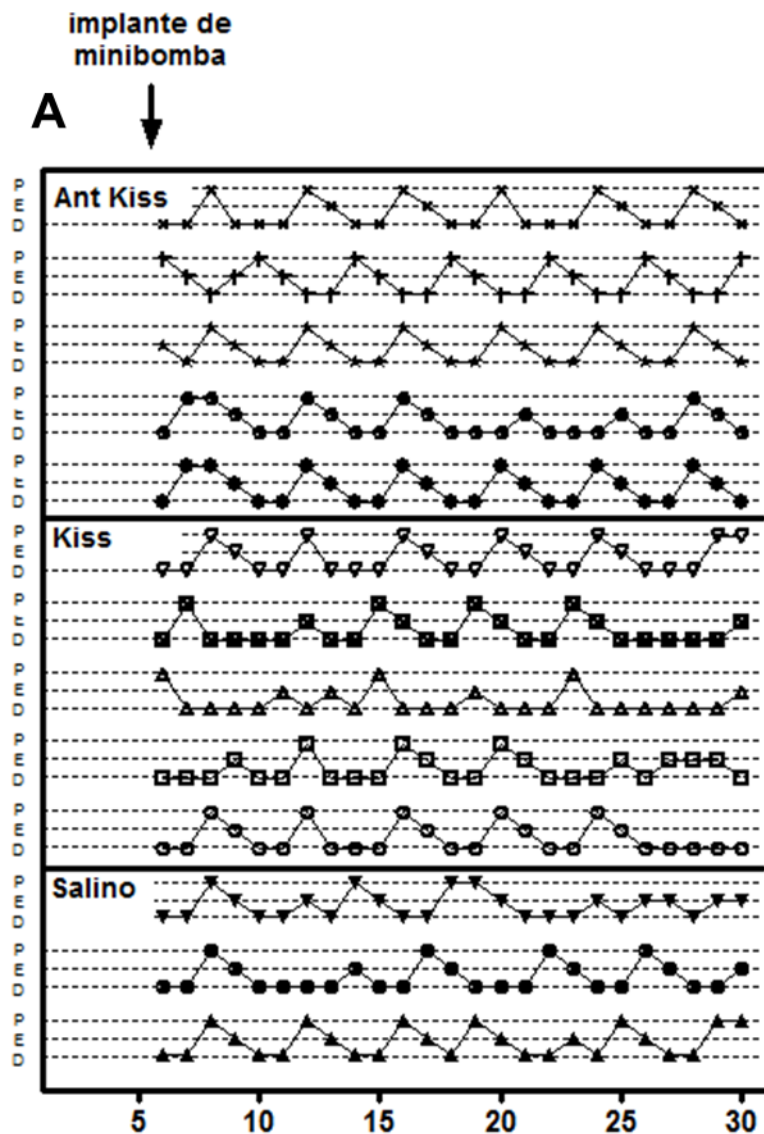


Figura 19: Gráfico representativo de la ciclicidad estral en ratas adultas hemiovariectomizadas. Efecto de la administración de kisspeptina y un antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en ratas adultas sobre la ciclicidad estral durante los 28 días de administración por medio de la bomba osmótica. A todas las ratas al momento de la instalación de la minibomba seccionó el ovario derecho separándolas en los siguientes grupos: salino (n=6), kisspeptina (kiss) (n=5), antagonista contra kisspeptina (ant kiss) (n=5).

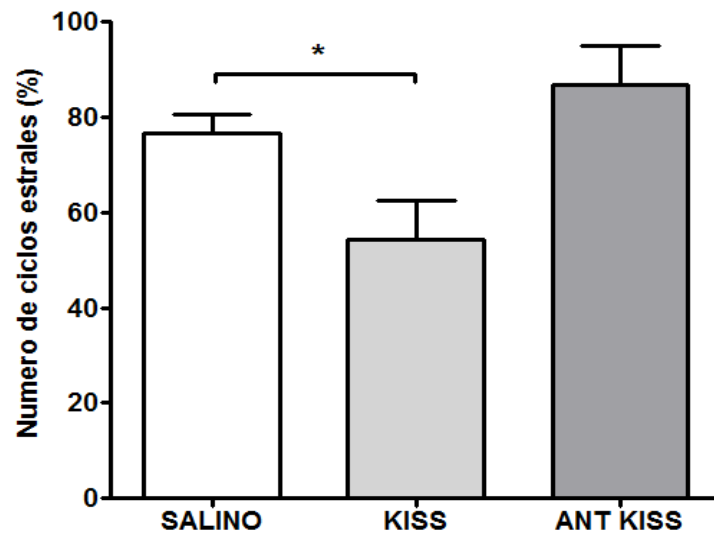


Figura 20: Ciclicidad estral en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (o234) en el ovario. Efecto de la administración de kisspeptina en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas. A) Ciclicidad estral representada como el número de ciclos estrales normales expresados con respecto a los ciclos estrales teóricos (considerando cada ciclo estral de 4 días). Un ciclo teórico corresponde a un P seguido por un E y 2 días en D. D, Diestro; E, estro; P, proestro. Grupos: salino (n=6), kisspeptina (kiss) (n=5), ant kiss (p234)(n=5). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$. El gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

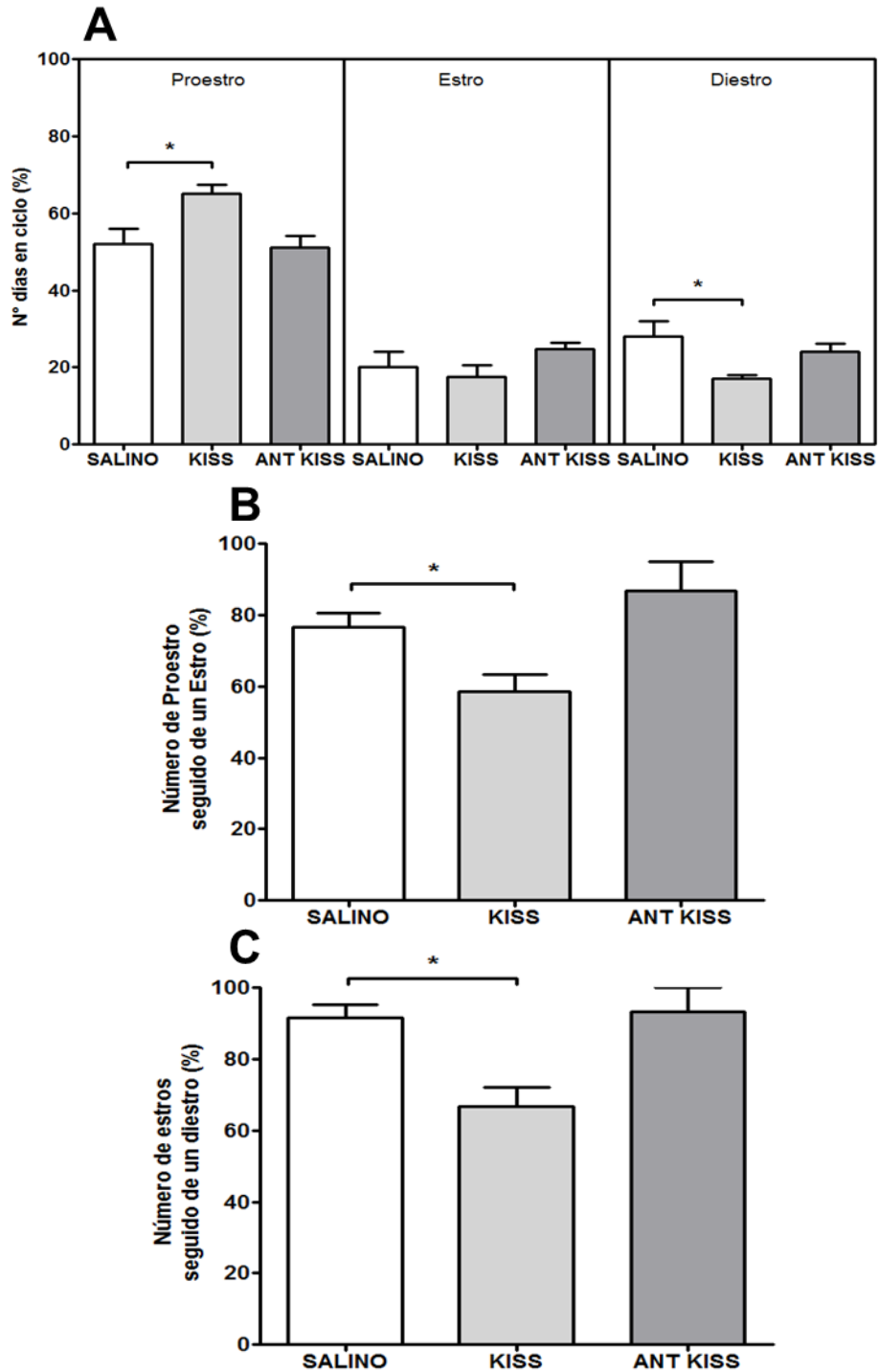


Figura 21: Cambios en la transición proestro-estro (P-E) y estro-diestro (E-D) en ratas adultas bajo administración de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario. Efecto de la administración de kisspeptina en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas. Con el fin de determinar como afectó la disminución en la ciclicidad estral sobre el numero de días que permanecen en cada etapa del ciclo estral, se muestra como porcentaje de días que permanecen en cada etapa (A). La transición proestro-estro (B), y la transición estro-proestro (C). Grupos: salino (n=6), kisspeptina (kiss) (n=5), antagonista contra kisspeptina (p234) (n=5). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

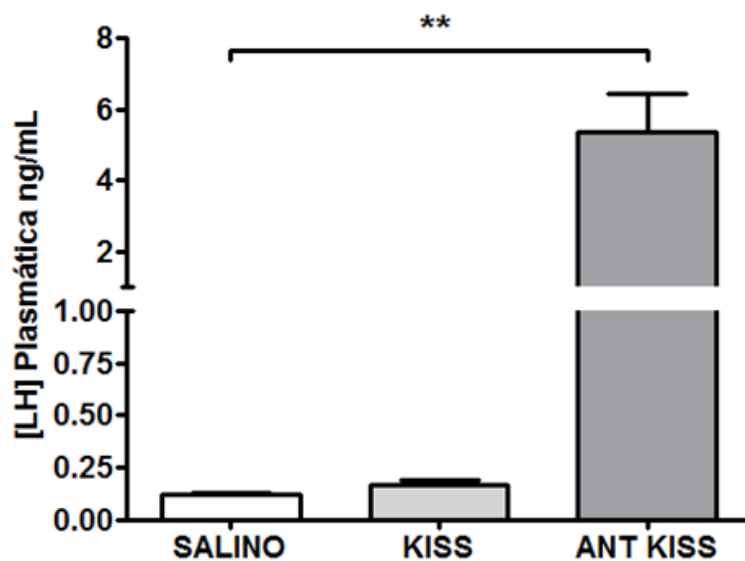


Figura 22: Variación en la concentración plasmática de LH en ratas adultas bajo administración de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario. Efecto de la administración de kisspeptina en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas sobre la concentración plasmática de LH. Grupos: salino (n=6), kisspeptina (kiss) (n=5), antagonista contra kisspeptina (p234) (n=5). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. ** corresponde a $p < 0,01$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

6.4.2 La administración de kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario aumenta el número de cuerpos lúteos y la producción de progesterona y estradiol

Para confirmar los resultados iniciales, en los cuales se encontró una disminución en la ciclicidad estral, se contaron los cuerpos lúteos por ovario. Encontrando que paradójicamente la administración de kisspeptina aumentó los cuerpos lúteos (figura 23A), en cambio la administración del antagonista contra kisspeptina no produjo efectos (figura 23A). Para confirmar estos resultados se midió la concentración plasmática de progesterona, encontrando que tanto kisspeptina como el antagonista contra kisspeptina la aumentaron (figura 23B). Adicionalmente para determinar la capacidad de síntesis de las otras hormonas sexuales ováricas, se midió la concentración plasmática de testosterona (figura 24A) y estradiol (figura 24B). Los resultados muestran que la administración de kisspeptina aumentó significativamente la concentración de testosterona no así la de estradiol, en cambio no hubo efectos significativos al bloquear la acción de kisspeptina (p234)

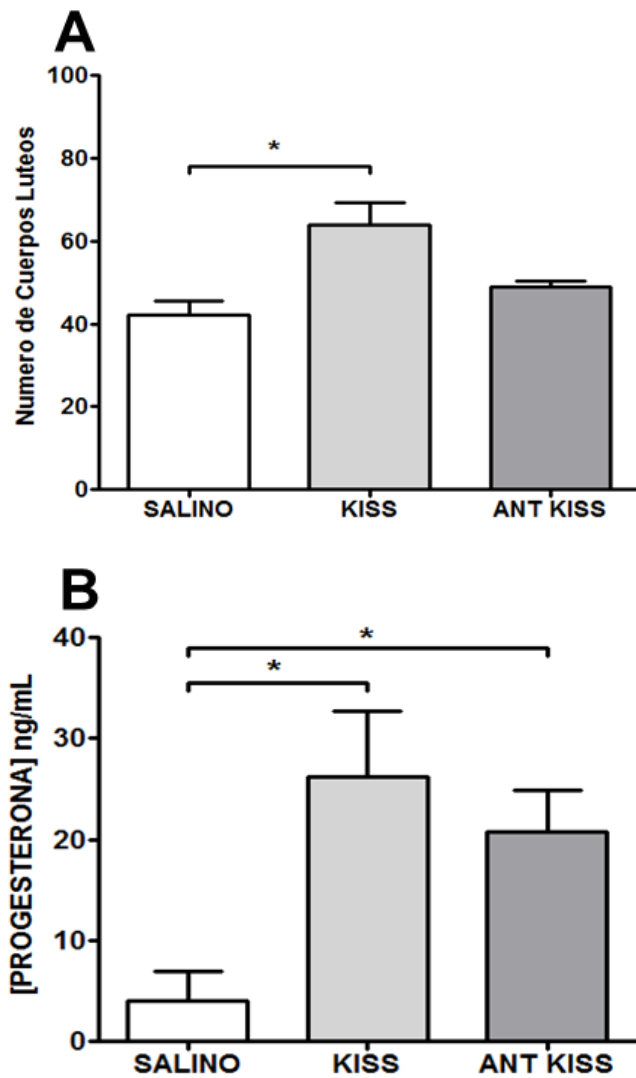


Figura 23: Variación en el número de cuerpos lúteos y la concentración de progesterona plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el. Efecto de la administración de kisspeptina o de un antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas. A) Número de cuerpos lúteos por ovario y B) Concentración plasmática de progesterona. Grupos: salino (n=6), kisspeptina (kiss) (n=5), antagonista contra kisspeptina (p234) (n=5). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

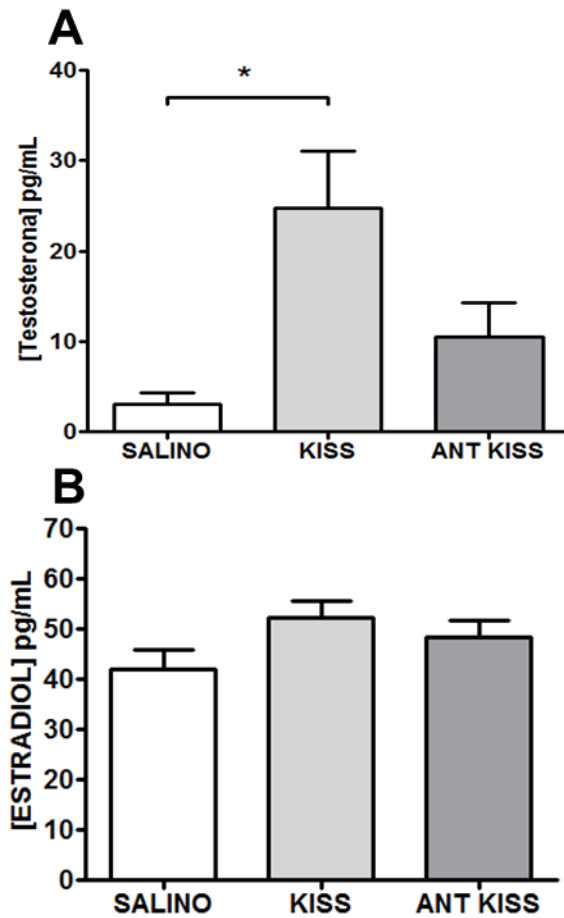


Figura 24: Variación en la concentración de testosterona y estradiol plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario. Efecto de la administración de kisspeptina o de un antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas, sobre la concentración. Con el fin de determinar como afectó la disminución en la ciclicidad estral sobre la concentración plasmática de testosterona (A) y estradiol (B). Grupos: salino (n=6), kisspeptina (kiss) (n=5), antagonista contra kisspeptina (p234) (n=5). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

6.4.3 La administración de antagonista contra kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario revierte los efectos del estrés por frío

El siguiente paso fue ver si la administración de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina P234 directamente en el ovario alteran los efectos del estrés por frío crónico intermitente de 4 semanas. Los resultados muestran que la ciclicidad estral en ratas sujetas al protocolo de estrés crónico mas la administración de kisspeptina no presentan cambios significativos (figuras 25 y 26), sin embargo la administración del antagonista contra kisspeptina disminuye significativamente la ciclicidad estral (figura 25 y 26). Al realizar un análisis más detallado del comportamiento de cada grupo experimental a lo largo del ciclo estral, encontramos que la administración tanto de kisspeptina como del antagonista contra kisspeptina en conjunto con el estrés crónico no presenta cambios significativos en los días que pasó en cada etapa del ciclo (figura 27A). También se analizó las transiciones entre proestro-estro, y las de estro-diestro y encontramos que la administración de kisspeptina en conjunto con la aplicación del estrés crónico disminuyó la transición de proestro-estro (figura 27B) no así la de estro-diestro (figura 27C). Mientras que la administración del antagonista contra kisspeptina en conjunto con el estrés crónico disminuyó significativamente el número de proestro-estro no así la de estro-diestro en los cuales no se vieron efectos significativos. Para verificar que el tratamiento no hubiese tenido un efecto central alterando la secreción de LH, se midió su concentración plasmática, encontrando que ni la administración de kisspeptina ni la del antagonista mostraron cambios significativos (figura 28).

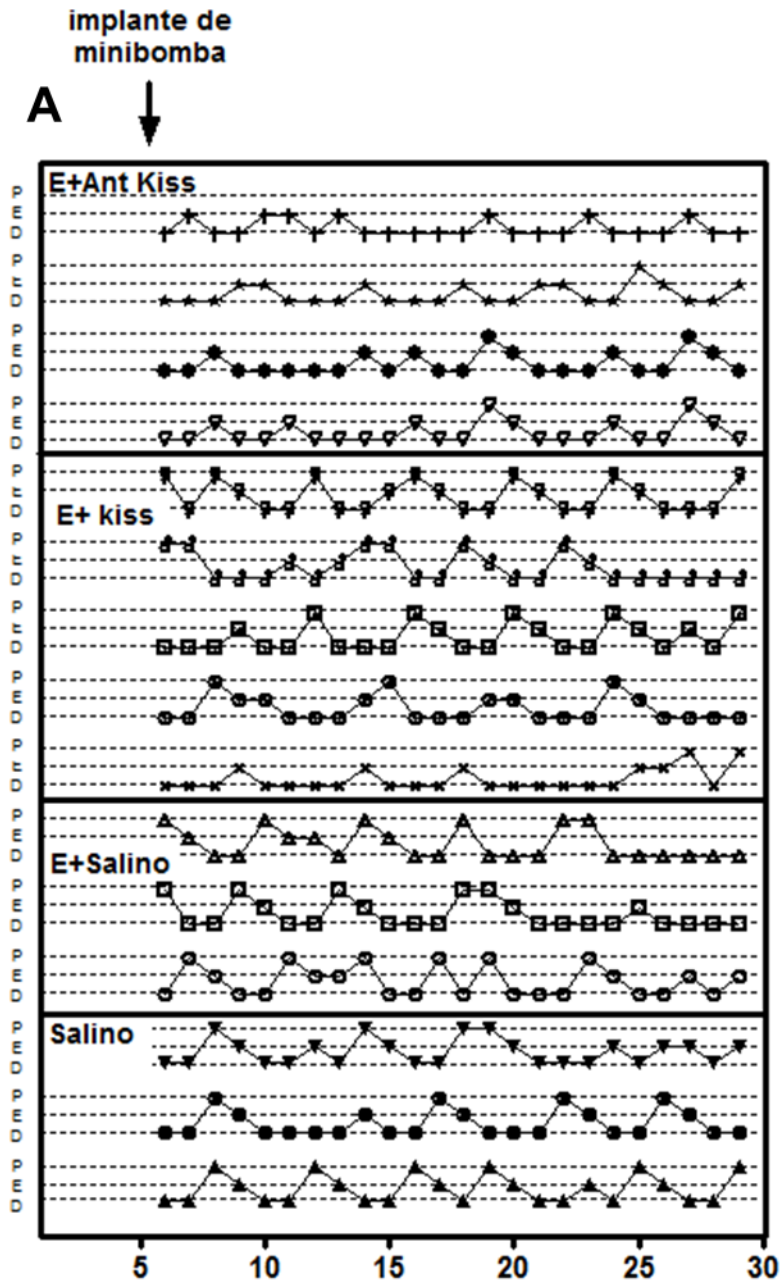


Figura 25: Grafico representativo de la ciclicidad estral en ratas sometidas a estrés por frío crónico por 4 semanas y administración conjunta de kisspeptina o p234. Efecto de la administración de kisspeptina en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas sobre la ciclicidad estral (escala de 0 a 30 días). A todas las ratas al momento de la instalación de la minibomba seccionó el ovario derecho separándolas en los siguientes grupos: salino (n=6), kisspeptina (kiss) (n=5), estrés más salino (E+salino) (n=6), estrés más kisspeptina (E+kiss), estrés más antagonista contra kisspeptina (E+ant kiss) (n=4).

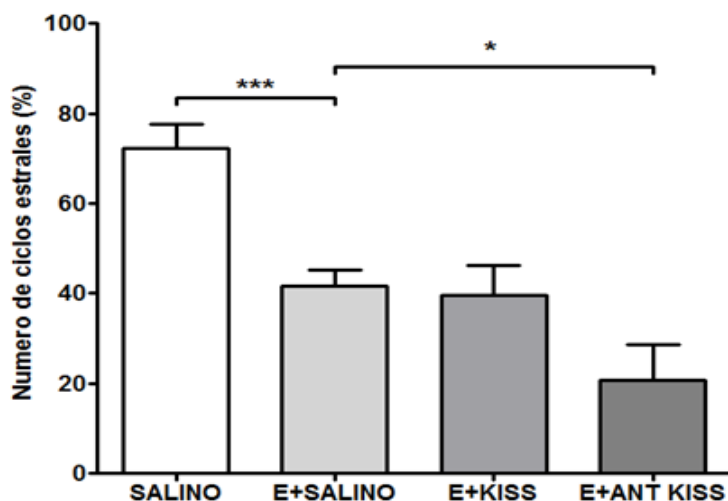


Figura 26: Ciclicidad estral (%) en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas. Efecto del estrés por frío crónico, sobre el efecto de la administración de kisspeptina o un antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en ratas por 4 semanas. A) Porcentaje del número de cíclicos estrales durante el periodo de tratamiento representada como el número de ciclos estrales normales con respecto a los ciclos estrales teóricos (considerando cada ciclo estral de 4 días. D, Diestro; E, estro; P, proestro. Un ciclo teórico corresponde a un P seguido por un E y 2 días en D. Grupos: salino (n=6), estrés mas salino (E+SALINO) (n=6), estrés más kisspeptina (E+kiss) (n=5), estrés más el antagonista contra kisspeptina (E+ANT KISS) (n=4). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. *** Corresponde a un $p < 0,001$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

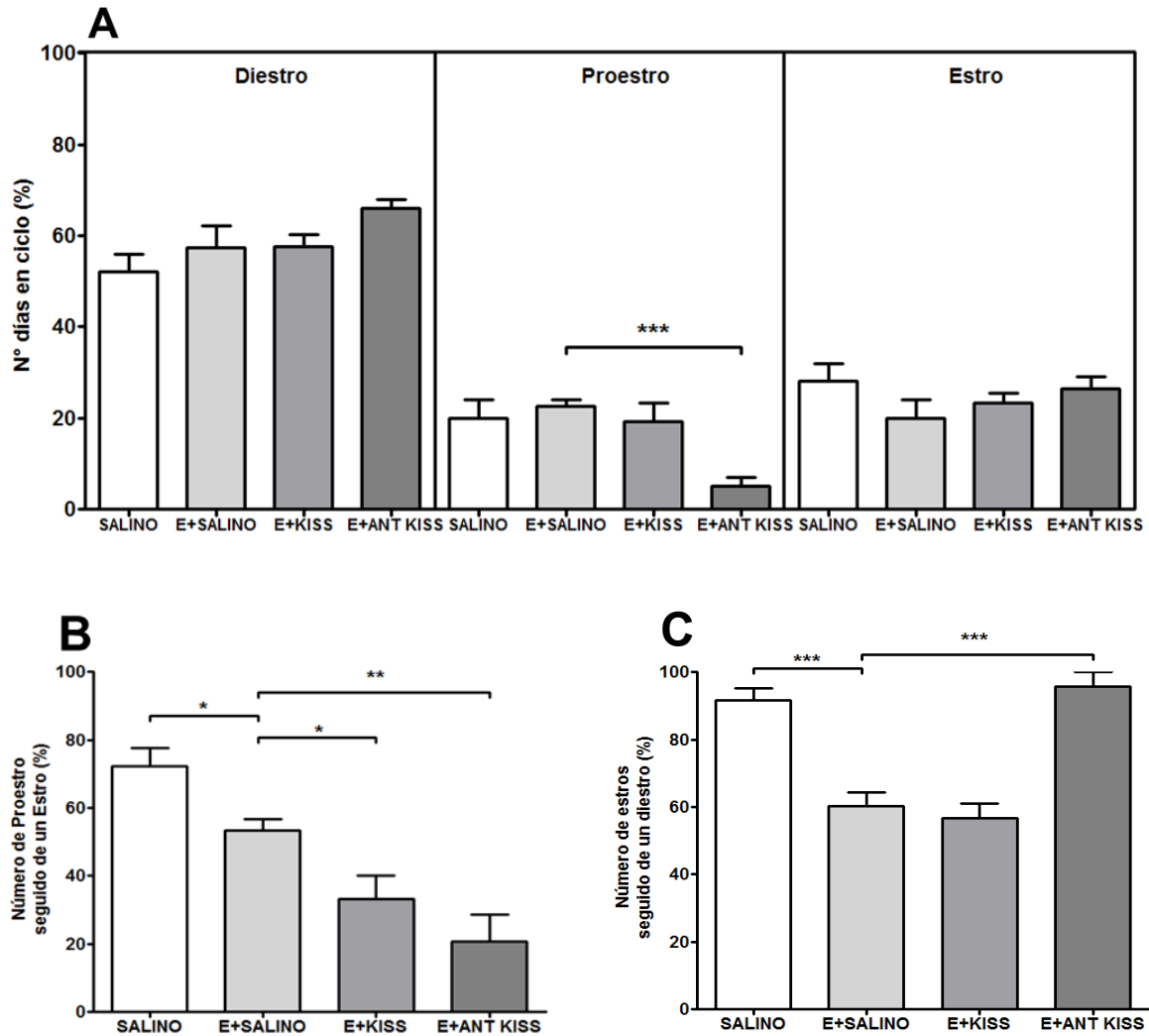


Figura 27: Cambios en la transición proestro-estro (P-E) y estro-diestro (E-D) en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas. Efecto de la administración de kisspeptina en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas. Con el fin de determinar como afectó la disminución en la ciclicidad estral sobre el numero de días que permanecen en cada etapa del ciclo estral, se muestra como porcentaje de días que permanecen en cada etapa (A). La transición proestro-estro (B), y la transición estro-proestro (C). Grupos: salino (n=6), estrés más salino (E+salino) (n=6), estrés más kisspeptina (E+kiss) (n=5), estrés más antagonista contra kisspeptina (E+ant kiss) (n=4). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$. ** corresponde a $p < 0,01$, *** corresponde a $p < 0,001$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

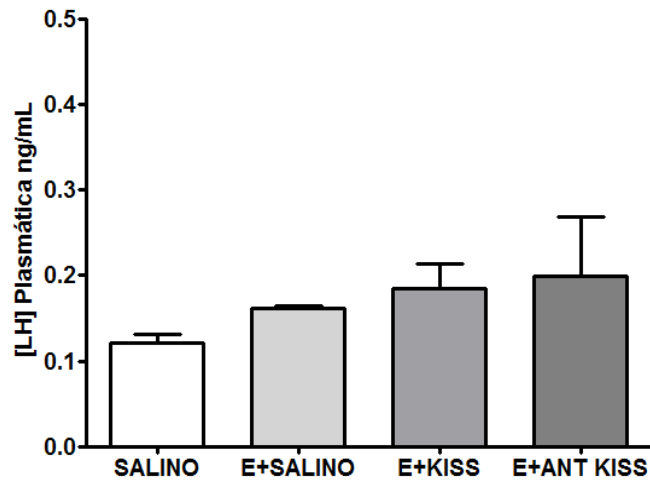


Figura 28: Variación en la concentración plasmática de LH en ratas adultas bajo administración de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas. Efecto de la administración de kisspeptina en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas sobre la concentración plasmática de LH. Grupos: salino (n=6), estrés más salino (E+salino) (n=6), estrés más kisspeptina (E+kiss) (n=5), estrés más antagonista contra kisspeptina (E+ant kiss) (n=4). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

6.4.4 La administración de kisspeptina mediante una bomba osmótica en el ovario mantiene su efecto aún en presencia del estrés por frío crónico aumentando el número de cuerpos lúteos y modificando los niveles de esteroides plasmáticos.

Para confirmar los resultados iniciales, en los cuales se encontró una disminución en la ciclicidad estral, se contaron los cuerpos lúteos por ovario. Encontrando que al contrario de lo esperado la administración de kisspeptina mantuvo el aumento en el número de cuerpos lúteos (figura 29A), en cambio la administración del antagonista contra kisspeptina no produjo efectos (figura 29A). Para confirmar estos resultados se midió la concentración plasmática de progesterona, encontrando que la administración de kisspeptina en conjunto con el estrés crónico aumentó la concentración de progesterona (figura 29B). Adicionalmente para determinar la capacidad de síntesis de las otras hormonas sexuales ováricas, se midió la concentración plasmática de testosterona (figura 30A) y estradiol (figura 30B). Los resultados muestran que la administración de kisspeptina aumentó significativamente la concentración de testosterona no así la de estradiol, en cambio no hubo efectos significativos al bloquear la acción de kisspeptina (p234).

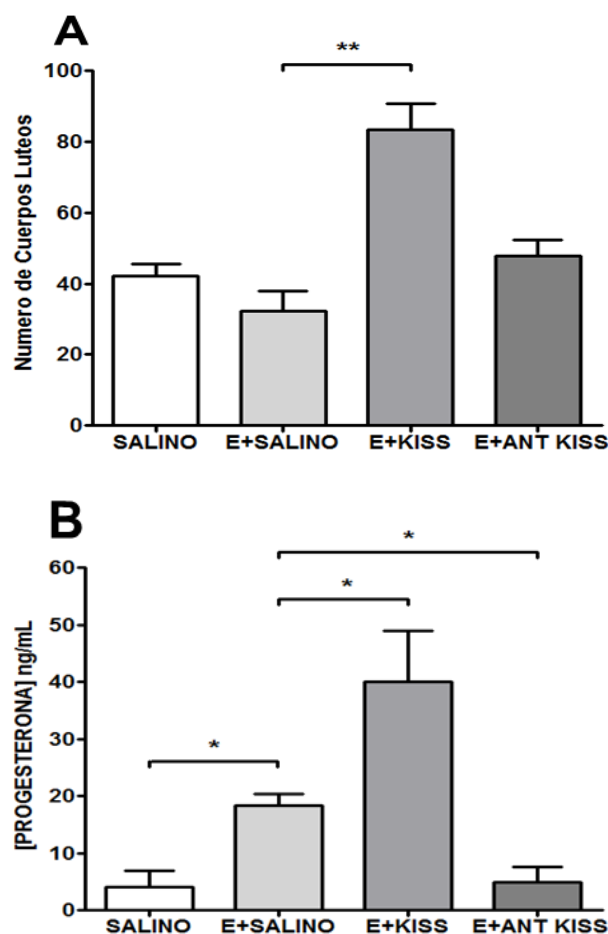


Figura 29: Variación en el número de cuerpos lúteos y la concentración de progesterona plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con el estrés crónico por frío por 4 semanas. Efecto de la administración de kisspeptina o de un antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas. A) Número de cuerpos lúteos por ovario y B) Concentración plasmática de progesterona. Grupos: salino (n=6), estrés más salino (E+salino) (n=6), estrés más kisspeptina (E+kiss) (n=5), estrés más antagonista contra kisspeptina (E+ant kiss) (n=4). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. * corresponde a $p < 0,05$, ** corresponde a $p < 0,01$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

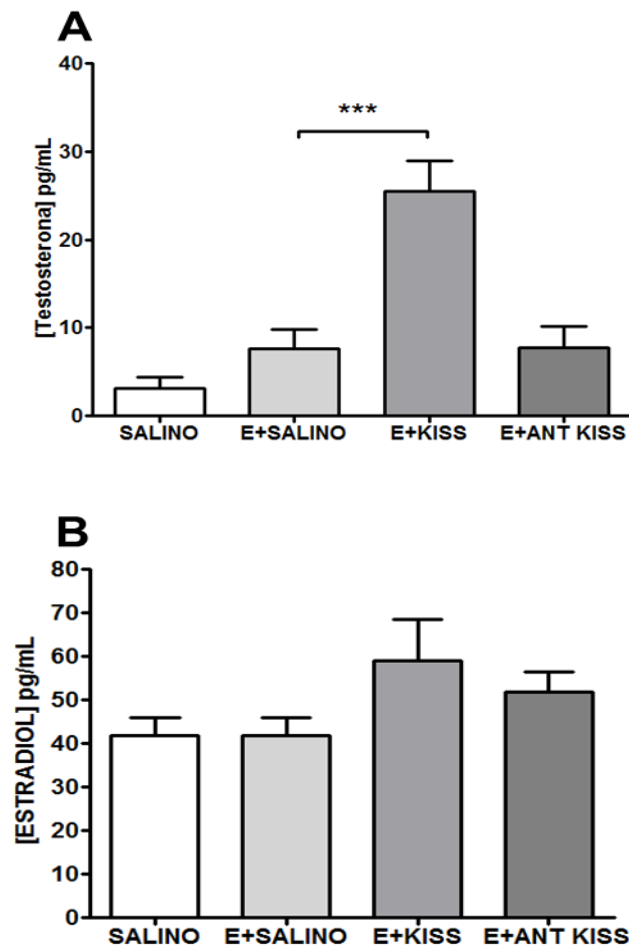


Figura 30: Variación en la concentración de testosterona y estradiol plasmática en ratas adultas bajo administración continua de kisspeptina o el antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en conjunto con la aplicación del estrés crónico por frío por 4 semanas. Efecto de la administración de kisspeptina o de un antagonista contra kisspeptina (p234) en el ovario en ratas sometidas a un estrés crónico intermitente por 4 semanas, sobre la concentración. Con el fin de determinar como afectó la disminución en la ciclicidad estral sobre la concentración plasmática de testosterona (A) y estradiol (B). Grupos: salino (n=6), estrés más salino (E+salino) (n=6), estrés más kisspeptina (E+kiss) (n=5), estrés más antagonista contra kisspeptina (E+ant kiss) (n=4). Cada barra corresponde al promedio \pm EEM. *** corresponde a $p < 0,001$. Cada gráfico fue analizado a través del test de student para datos pareados.

7 Discusión

En esta tesis se estudió: 1) la presencia y variación de kisspeptina y de su receptor GPR54 a través del desarrollo puberal principalmente en el eje ganglio celíaco, ovario (CGO), 2) cómo la activación del sistema simpático ovárico puede alterar la expresión de kisspeptina a lo largo de este eje, y finalmente 3) los efectos de kisspeptina sobre la ciclicidad estral y la ovulación. Los resultados obtenidos, nos permiten sugerir fuertemente que kisspeptina se localiza en neuronas del ganglio celiaco y tejido ovárico. Ambos participan en forma complementaria en los eventos que controlan la ciclicidad estral y el desarrollo folicular. Resultados previos de nuestro laboratorio han descrito que el estrés crónico por frío en ratas, genera alteraciones en la ciclicidad estral y el desarrollo folicular, asociados con la aparición de hipertrofia en las células de la teca a las 4 semanas de estrés (43) y un aumento en el número de quistes ováricos a las 8 semanas de estrés (49). Además se ha demostrado que estos efectos están mediados por la activación simpática (49). Estas características se han visto también en mujeres que presentan SOP. En relación a la kisspeptina, datos recientes han mostrado que kisspeptina está alterada en hipotálamo de ratas tratadas con DHT para generar quistes ováricos (50) y en plasma de mujeres con PCOS (51, 52). Por otro lado también se ha visto que kisspeptina estimula la liberación de gonadotropinas y testosterona (14, 15, 53), condición que está demostrada en pacientes con PCOS (54). Observaciones adicionales, sugieren que kisspeptina puede afectar al ovario por diferentes vías : 1) Activando a nivel hipotalámico la vía endocrina que lleva a la secreción de gonadotrofinas (55-57);

2) a través de un sistema de comunicación kisspeptinérgico con vías que llevan información a la periferia ya que existe expresión de kisspeptina en regiones del sistema nervioso central involucradas en el control autonómico como lo son el bulbo raquídeo y médula espinal, (58); 3) en hipotálamo existe coexpresión neuronal de kisspeptina y tirosina Hidroxilasa (TH) en neuronas que activan la liberación de GnRH (59), y 4) a través de una comunicación kisspeptinérgica aferente ya que se ha encontrado que la kisspeptina se expresa en vías neuronales periféricas somáticas (58, 60).

Si bien hasta ahora, se conoce ampliamente la participación de kisspeptina en el eje endocrino, la información disponible sobre su función en el ovario es muy pobre aún, como también lo es su interacción con el sistema simpático que llega hasta el ovario y que controla al ovario de forma complementaria a la vía endocrina.

7.1 Kisspeptina en el eje ganglio celiaco-ovario

Muchas evidencias de varios laboratorios incluyendo el nuestro, han demostrado la importancia del sistema nervioso simpático en la regulación de la función ovárica. Estas fibras postganglionares se originan en el ganglio celiaco y proyectan en la rata a través del nervio ovárico superior hasta llegar al ovario (61, 62). Evidencias de la literatura, muestran que la expresión del sistema kisspeptina/GPR54 a nivel de órganos periférico es variada; entre éstos, es interesante su descripción en ganglios autonómicos (60, 63). En relación a ello, en esta tesis mostramos por primera vez, la presencia de kisspeptina en ganglio celiaco, pero no así de su receptor. Quizás la expresión sea muy baja para

nuestros métodos de detección (RT-QPCR e inmunohistoquímica), aunque si bien no descartamos su presencia, nos estaría indicando que la vía kisspeptinérgica se iniciaría en este ganglio, por lo que el soma sería un lugar de síntesis del péptido, desde el cual se transportará a otros órganos incluyendo el ovario, desde el cual podría estar siendo liberado como neurotransmisor. Nuestros datos, también sugieren fuertemente que kisspeptina podría ser parte del sistema simpático, especialmente debido a la posible co-localización en somas neuronales que expresan kisspeptina y tirosina hidroxilasa. Esta observación abre la posibilidad de co-expresión en las mismas neuronas y por ende movilización por vía simpática hasta el ovario. Aunque si bien a nivel central se encontró colocalización de fibras que expresaban kisspeptina con fibras que expresaban tirosina hidroxilasa en el núcleo paraventricular del tercer ventrículo en ratones (59), ha sido difícil demostrar esto mismo en la rata (22), lo que sugiere ciertas diferencias entre especies. Sin embargo, el hecho de que kisspeptina se esté movilizando por fibras simpáticas, no nos descarta que además, se esté movilizando a otros órganos que reciben inervación simpática desde el ganglio celíaco (64). Esta suposición ha sido avalada por Ohtaki y cols., quienes describieron la presencia de kisspeptina en el ciego y el colón, regiones inervadas desde el ganglio celíaco (65).

Por otra parte, en el ovario encontramos que kisspeptina se expresa en ratas Sprague Dawley al igual como otras especies (28, 66, 67), en donde mostramos inmunoreactividad para kisspeptina en varios compartimentos ováricos, incluyendo las células lúteas del cuerpo lúteo (reactividad más baja), glándulas intersticial, y folículos en distinto estado de desarrollo, folículos primarios, secundarios, y en folículos antrales, adicionalmente al analizar la inmunoreactividad en el folículo

podemos ver que hay marca tanto en células de la teca como en células de la granulosa, datos confirmados al medir el mRNA en fracciones ricas en células de la granulosa y ovario residual que contiene a las células de la teca y tejido intersticial. Es importante notar, que el contenido de mRNA de kisspeptina en folículos antrales grandes va disminuyendo en comparación con las células de la teca y preferentemente siendo más intensa en las células de la granulosa murales, lo que podría tener alguna participación en la ovulación. Estos datos difieren un poco a lo presentado por Castellano y cols. (28), quienes trabajando en ratas Wistar describieron -- al igual que nosotros -- que la inmunoreactividad de kisspeptina en el ovario está distribuida ampliamente en cuerpo lúteo y glándula intersticial, pero la distribución en el folículo varia ya que ellos demuestran marca positiva en células de la teca pero una ausencia de inmunoreactividad en células de la granulosa, manteniéndose solo en las células de la teca. Para corroborar estos datos, repetimos estos análisis utilizando ratas Wistar e interesantemente encontramos una distribución similar a lo publicado por Castellano y cols. Lo que sugiere fuertemente que hay diferencias en la expresión de kisspeptina entre las ratas Sprague Dawley y Wistar. Como ha sido publicado anteriormente, en estas dos cepas de ratas también se han visto diferencias al analizar la presencia de neuronas simpáticas intraováricas (68).

7.2 Kisspeptina en el desarrollo

El descubrimiento de la expresión de kisspeptina en neuronas postganglionares formando parte de un sistema neuronal nos llevó a ver si la expresión de kisspeptina/GPR54 a lo largo del eje ganglio celíaco-ovario se activaría en

conjunto con la inervación simpática ovárica, la cual es funcional solo a partir del período peripuberal (21-25 días de edad) (69). El aumento en la expresión del mRNA para kisspeptina en el ovario desde la etapa infantil hasta la pubertad está de acuerdo a datos previamente publicados (28). Además, los resultados encontrados en el ganglio celiaco, los cuales muestran una relación similar con el ovario, sugieren un rol funcional del sistema kisspeptinérgico en el control de la función ovárica, particularmente debido a que el nervio ovárico superior se origina en el ganglio celíaco y cuyas células ganglionares van a inervar a la mayoría de las células secretoras del ovario. La relación inversa entre los niveles del mRNA y el péptido para kisspeptina en ambos órganos a medida que el animal va madurando podría representar modificaciones postraduccionales de la expresión de kisspeptina, las cuales ya se han demostrado en hipotálamo de ratas lactantes (70). Si esto es cierto, y aceptamos que hay una relación directa entre los niveles del mRNA y la concentración del péptido en los diferentes tejidos, un aumento del mRNA representa un aumento en la producción del péptido, entonces el aumento del péptido desde la etapa prepuberal el que disminuye en la etapa adulta, se debería a la alta actividad secretora del péptido asociada con la aparición de la pubertad. De hecho el aumento en los niveles plasmáticos de kisspeptina en la etapa prepuberal (mientras en el ovario se aprecia una baja concentración del péptido), podría ser el resultado de un aumento de la liberación de kisspeptina desde el órgano terminal (ya sea del ovario o de otros órganos que produzcan kisspeptina y cambien su actividad durante el período peripuberal) y de las células neuronales del ganglio celiaco. Por lo que si este proceso es cierto, se puede sugerir que el aumento en la actividad simpática que se ha descrito previamente

en el ovario de rata durante el periodo peripuberal (69), está estrechamente asociado con la actividad del sistema kisspeptinérgico en el ganglio celiaco, o incluso podría ser parte del mismo compartimento neuronal. El hecho de que hayamos encontrado en todos los tejidos estudiados, ganglio celiaco, ovario y plasma una disminución en los niveles de kisspeptina al llegar a la adultez, a diferencia de los que se aprecia en humanos, en los cuales no se aprecia tal disminución, podría deberse a características morfológicas distintas de los ovarios, mientras el ovario humano es monoovulatorio, el de la rata es multiovulatorio, representando los cuerpos lúteos más del 90% de su tamaño, cuya inmunoreacción para kisspeptina es baja.

7.3 Rol de kisspeptina en la pubertad y la ciclicidad estral

El rol de kisspeptina en el sistema reproductivo y la pubertad están hasta las fechas bien establecidas, pero su participación en el desarrollo folicular, y como hemos demostrado en esta tesis, la participación del sistema kisspeptinérgico aún no se conoce. Para poder cumplir con este objetivo se diseñó un protocolo en el que administramos un antagonista contra kisspeptina directamente en el ovario izquierdo. Dado que el ovario derecho no sería intervenido, no podíamos descartar que hubiera un efecto compensatorio sobre los efectos del fármaco que se pretendía administrar en el ovario izquierdo, para esto se procedió a realizar un protocolo de prueba sin hemiovariectomía, encontrando como esperábamos una compensación del ovario derecho dado que no se vieron efectos por la administración del fármaco. Todos los experimentos siguientes fueron realizados con animales hemiovariectomizados. El retraso en la apertura vaginal (un índice de

la pubertad en la rata) después de la administración directa en el ovario de un antagonista contra kisspeptina desde la etapa prepuberal hasta la adultez, claramente demuestra que el ovario depende de kisspeptina para iniciar sus ciclos reproductivos normales. Esto se apoya claramente en la determinación de la ciclicidad estral, en la cual apreciamos que al agregar el antagonista contra kisspeptina presentó severas irregularidades. Aunque estos efectos no pueden descartar que hayan sido producto de un efecto central del antagonista, nuestros resultados muestran que el antagonista no alcanza la suficiente concentración para alterar la liberación de LH. Datos previos publicados en la literatura, demostraron que la administración de 5 nmol del mismo antagonista (71) bloqueó la liberación de LH inducida por la administración de kisspeptina-10, sin afectar la liberación basal de LH, pero el hecho de que: 1) la administración central del antagonista fue capaz de inhibir el aumento preovulatorio de las gonadotropinas (71), 2) La administración de kisspeptina retrasa la aparición de la pubertad (nuestro estudio), y 3) Los resultados en este trabajo fueron obtenidos administrando continuamente en el ovario una infusión de 0,13 nmol/h (0,25 µL/h), concentración de antagonista que no inhibe el aumento preovulatorio de LH en ratas machos castrados cuando es administrada vía intracerebro ventricular (72), sugieren fuertemente que los cambios encontrados en la ciclicidad estral y en la pubertad, son resultado de una acción local del antagonista. De acuerdo a lo esperado – y como consecuencia de un proceso ovulatorio alterado -- los niveles de estradiol y progesterona plasmático disminuyeron significativamente, y si a estos resultados agregamos que al medir los niveles plasmáticos de kisspeptina en estas ratas también mostraron estar significativamente bajos, nos confirman la

importancia de kisspeptina para la función ovárica. Además los bajos niveles de kisspeptina en el ovario como resultado del pobre desarrollo folicular (vistos en los bajos niveles plasmáticos de estradiol), podría resultar en un aumento del eflujo de kisspeptina desde el ganglio celiaco, lo que explicaría la baja concentración encontrada, aunque esta posibilidad debe ser probada.

7.4 Efecto del estrés por frío sobre la expresión de kisspeptina en el eje ganglio celíaco-ovario

Considerando que nuestros resultados indicarían la existencia de una posible vía neuronal kisspeptinérgica la cual viajaría a través de la inervación simpática (figura 31). Usamos un protocolo de estrés por frío en el cual previamente mostramos que la activación simpática lleva a un aumento en la generación de quistes foliculares (43, 49). Este protocolo activa las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo (38, 39, 42) sin afectar el eje adrenal (73) en un mecanismo gatillado por la activación de neuronas glutamatérgicas que controlan la secreción de TRH. De hecho, puede ser bloqueado por la administración de MK-801 (bloqueador de los receptores NMDA, N-metil-D-aspartato) en la región magnocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (39), sugiriendo un origen central para la activación simpática del ovario. De esta forma, la aplicación de un protocolo de estrés agudo por frío (64 horas continuas), llevaría a un aumento en kisspeptina a lo largo del eje. Los resultados encontrados, en los cuales se muestra un aumento en el contenido del péptido para kisspeptina tanto en ganglio celiaco como en ovario, sugiere fuertemente que la activación hipotalámica de la vía simpática ovárica activa al sistema de kisspeptina. Es interesante señalar que

este aumento, se correlaciona con una disminución paralela en la expresión del mRNA. Es de conocimiento general que usualmente un aumento de mRNA se correlaciona con aumento en el péptido producido (74). En nuestro caso esta relación directa se visualizó claramente al incubar el ovario in-vitro en presencia de un agonista adrenérgico. Sin embargo, la respuesta es diferente cuando se realiza una estimulación adrenérgica en el individuo completo. Necesariamente éste es un mecanismo que involucra muchos más factores de regulación y abre la interesante posibilidad de la existencia de circuitos de regulación de feed-back similares a los que ocurren en el eje hipotálamo-hipófisis en el control de la síntesis de esteroides (75, 76). De ser así, este mecanismo de regulación debiera ser similar a lo descrito por True y cols., en que se ha demostrado que no siempre existe una relación directa entre el mRNA y el péptido (70). De ahí, que proponemos que el aumento en el contenido de kisspeptina regula la expresión de su propio mRNA y por ende el contenido del péptido.

Los cambios encontrados en el hipotálamo son difíciles de explicar principalmente por la complejidad de la inervación kisspeptinérgica a nivel del hipotálamo. A este nivel, se han visto dos zonas específicas en donde está concentrada la inervación de kisspeptina: el núcleo arcuato y paraventricular anteroventral, las cuales siempre responden de manera inversa a distintos factores tales como la edad, niveles hormonales, el ciclo estral, etc. Tomando en consideración el origen de la vía simpática activada por estrés y que inerva al ovario, la zona afectada debiera ser la zona del núcleo paraventricular. Sin embargo, ya que nosotros determinamos kisspeptina a nivel de la región ventro medial del hipotálamo, no

podemos diferenciar los núcleos que pueden ser afectados y que son activados por el estrés, aunque en general concuerdan con la disminución en el mRNA para kisspeptina previamente descritos al aplicar distintos tipos de estrés (77, 78). Claramente, estos son resultados preliminares que se podrán aclarar en protocolos dedicados a ello.

El que exista un efecto de estrés que se origina en hipotálamo, se apoya también en que no solo el péptido varió ante el estrés por frío, sino que también vimos cambios del mRNA para kisspeptina y su receptor a lo largo del eje ganglio celíaco ovario. Es importante señalar que en el ganglio celíaco se observó una relación directa entre el aumento de mRNA y el péptido para kisspeptina a diferencia de lo discutido previamente en el ovario. Es importante señalar que en este caso del ganglio se corresponde con una relación neuronal más directa que las interacciones que pueden ocurrir a nivel del ovario.

El concepto de regulación de la expresión del mRNA y del péptido que se planteó anteriormente, se reforzó más claramente en los experimentos de denervación. Al eliminar la información nerviosa simpática que comunica el ganglio celíaco con el ovario, se produjo un gran aumento en el péptido kisspeptina indicando que posiblemente una fracción del péptido ovárico puede viajar por vía neuronal retrograda hasta el ganglio celíaco en donde encontramos que se co-localiza con TH. Sin embargo, el aumento intraovárico es más que suficiente para gatillar la retroalimentación sobre la expresión del mRNA ya que alcanzó niveles más bajos que por efecto del estrés. El aumento en la concentración del péptido en el ganglio

celíaco representaría el componente del flujo anterógrado que está bloqueado por la denervación.

Una relación similar ocurre cuando estudiamos la respuesta del ovario al estrés cuando se ha eliminado la comunicación nerviosa con el ganglio celiaco (SONX). En este caso los cambios provocados por el estrés no debieran ser mediados por la vía neuronal simpática, una alternativa descartada se podría deber a un efecto agudo de estimulación hormonal mediada por el eje corticotropo (se ha demostrado que el estrés por frío no lo afecta) otra alternativa es una acción catecolaminérgica por estimulación neuronal de la suprarrenal por vía nerviosa originada en el ganglio celíaco. Estas proyecciones no se eliminaron por la desnervación de forma que podría estimular la glándula suprarrenal para desencadenar una respuesta. Se han publicado trabajos que demuestran que distintos tipos de estrés disminuyen la expresión del mRNA para kisspeptina y su receptor en hipotálamo (78), estrés que modifica la concentración de corticoides (79-81), de tal manera que si existiera esa posibilidad se podría explicar por qué disminuye el péptido a nivel de ganglio celíaco (lugar de síntesis de kisspeptina neuronal) y no se modifica el mRNA. A nivel ovárico el hecho de disminuir el péptido (ya sea por este efecto hormonal o por otro mecanismo, disminuye la inhibición sobre la expresión del mRNA. Un resumen de estas observaciones se muestra en el esquema de la figura 31.

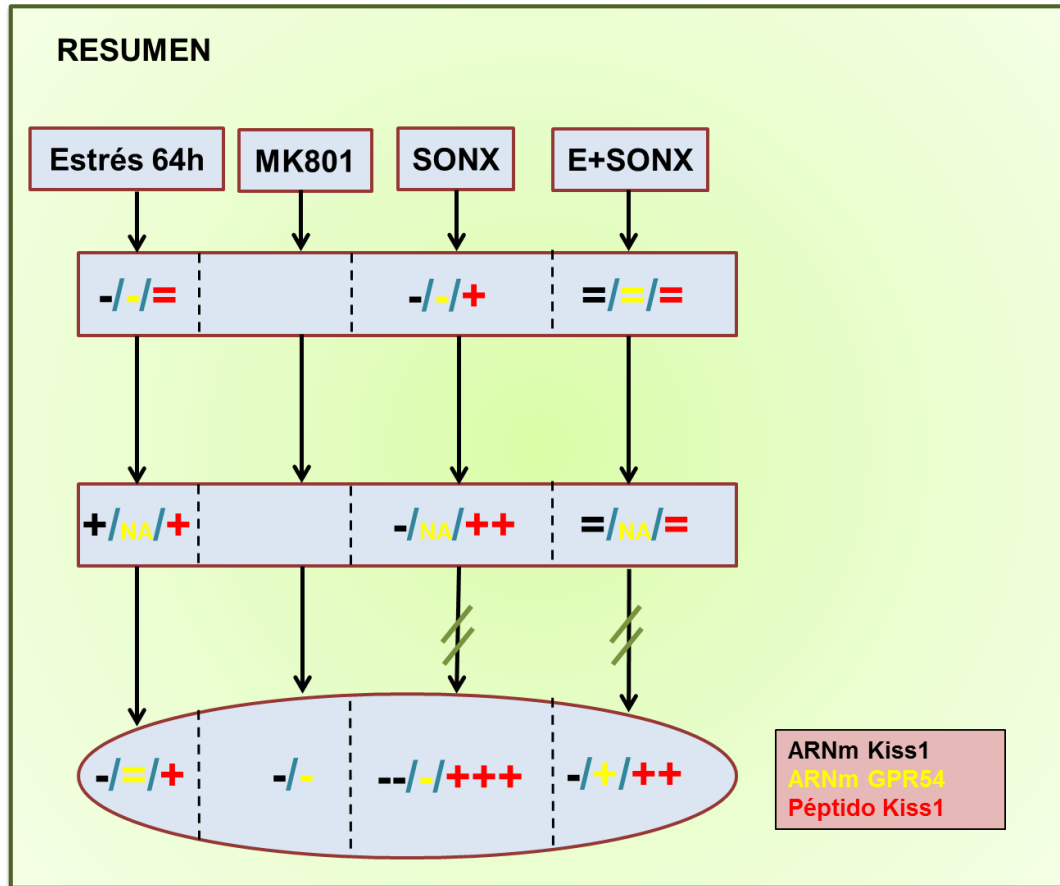


Figura 31: Esquema resumen de los resultados correspondientes a la expresión del mRNA para kisspeptina/GPR54 y del péptido para kisspeptina en los protocolos de estrés por frío agudo de 64 horas. La figura muestra el eje hipotálamo-ganglio celiaco-ovario (HGO), las flechas descendentes representan a la inervación simpática que desciende a través del ganglio celiaco.. Los signos +, - y =, se refieren a aumento, disminución o igual del mRNA o péptido de los grupos estrés 64h, MK801, SONX y E+SONX con respecto al control.

7.5 Efectos del estrés crónico por frío sobre la expresión de kisspeptina

La activación simpática aumenta la síntesis de kisspeptina a lo largo del eje GCO y este péptido es importante para la ciclicidad estral, por lo tanto una activación simpática mediada por el estrés (que altera el desarrollo folicular), debiera modificar la expresión de kisspeptina en el eje GCO. La disminución encontrada en el contenido ovárico de kisspeptina a las 4 semanas de estrés, podría ser el resultado de un aumento en la actividad nerviosa simpática demostrada a ese tiempo de estrés (43). Esto llevaría a un aumento en el eflujo de kisspeptina que al ser un péptido se debe reponer solo por síntesis proteica en los compartimentos foliculares (y que están disminuidos) en donde se localiza preferencialmente. (43), Otro resultado interesante fue el comportamiento de kisspeptina en el ganglio celíaco, ya que el gran aumento con una disminución en la expresión del mRNA indica que probablemente no se está movilizando, lo que además contribuiría a la disminución de la concentración de kisspeptina en el ovario. El hecho de que los niveles de kisspeptina plasmáticos están elevados, indica que el efecto sobre el ovario es más bien local y dependiente de las estructuras foliculares presentes las cuales no expresan niveles importantes del péptido tal como se encontró en la inmunodetección del péptido en cortes de ovario. Interesantemente, apreciamos que a las 8 semanas de estrés kisspeptina se mantuvo en el ovario y alta en el ganglio celíaco, y como lo vemos en la inmunohistoquímica hay una casi total desaparición de la marca para kisspeptina en folículos de todas las etapas de desarrollo, por lo que la kisspeptina sintetizada en el ovario podría ser importante

en el desarrollo folicular, aunque se necesitan más estudios para probarlo. Un resumen de estos resultados se presenta en la figura 32.

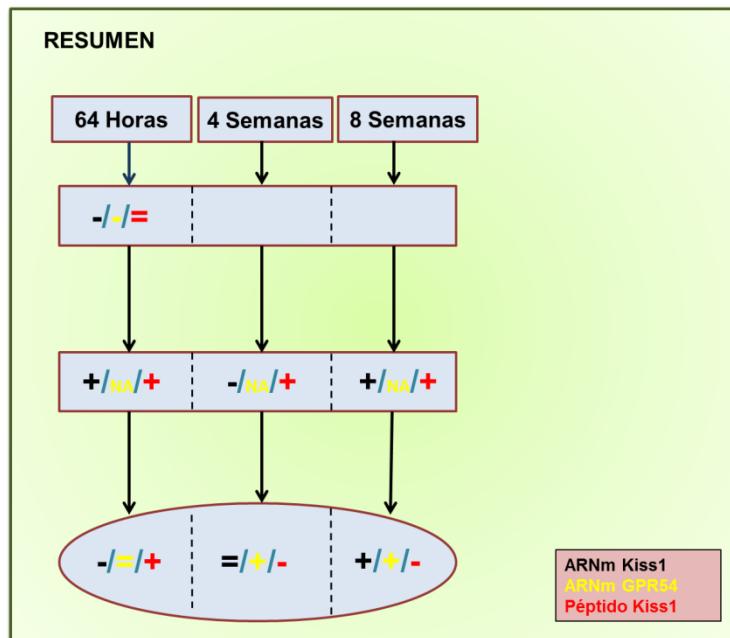


Figura 32: Esquema resumen de los resultados correspondientes a la expresión del mRNA para kisspeptina/GPR54 y del péptido para kisspeptina en los protocolos de estrés por frío agudo y crónico de 4 y 8 semanas. La figura muestra el eje hipotálamo-ganglio celíaco-ovario (HGO), las flechas descendentes representan a la inervación simpática que desciende a través del ganglio celíaco. Los signos +, - y =, se refieren a aumento, disminución o igual del mRNA o el péptido con respecto al control.

7.6 Efecto de la administración local de kisspeptina sobre el ovario en ratas sometidas a estrés crónico por 4 semanas

Los primeros estudios acerca de la función de kisspeptina, estuvieron relacionados a su actividad antimetastásica, como supresor de tumores en múltiples órganos (82), función que también le permite controlar otros procesos como lo es la invasión trofoblástica durante la implantación del embrión. Un mecanismo importante sería a través del control de proteasas como la metaloproteinasa-9, la cual participa en el proceso ovulatorio (83). Este control se realizaría tanto de forma dependiente como independiente de la unión a su receptor, por una parte uniéndose a NFκB inhibiendo la transcripción de la MMP, y por otra parte tiene la capacidad de unirse a la MMP inhibiendo su acción, proceso que se revierte al aumentar las MMP, donde se ha visto que estas degradan a kisspeptina dando término a su acción y así dejando libre el mecanismo de MMP para degradar la pared folicular. De esta forma, kisspeptina podría estar frenando la ovulación para que esta ocurra cuando el folículo se ha desarrollado completamente (8). Si esta hipótesis es correcta y kisspeptina está participando en el desarrollo folicular o en la ovulación, ya sea directa o indirectamente actuando sobre las MMP, significa que existen otros mecanismos por los cuales Kiss puede regular la función ovárica. Si se tiene presente que el proceso ovulatorio se produce en ratones y humanos con mutación para el receptor de kisspeptina mientras se le administre una dosis de gonadotrofinas (9, 84), indica que la unión de kisspeptina a su receptor no es un proceso clave para que ocurra la ovulación en ratas adultas. Hay que considerar sin embargo, que en esta tesis solo se midió el número de

cuerpos lúteos como índice de ovulación, por lo que aún no se conoce si el proceso se desarrolla de manera regular y si la participación de kisspeptina es por vía independiente de su receptor. En apoyo a esto, en esta tesis encontramos que kisspeptina es necesaria para el inicio de la pubertad y para una correcta función ovárica, por lo que era importante poder dilucidar cuál es el efecto de kisspeptina en el ovario de ratas adultas. En nuestros experimentos al administrar kisspeptina-10 en ratas hemiovariectomizadas, vimos una disminución en la ciclicidad estral, y específicamente hay una disminución en las transiciones P-E y E-D, por lo que hay una disminución en la ovulación. De acuerdo a estos hallazgos, el aumento de kisspeptina en el medio, podría estar manteniendo el proceso ovulatorio detenido por más tiempo, la cual podría estar controlando a través de la señalización de su receptor sobre la síntesis de las MMP. Hay que destacar también que kisspeptina tiene los mismo efectos que el estrés por frío y estos no se potencian al aplicarlos en conjunto, lo que nos insinuaría que los efectos del estrés por frío irían tanto a través de la acción simpática sobre la expresión de la kisspeptina ovárica intrínseca, y/o extrínseca (neuronal). Esta suposición también se apoya en que al igual que el estrés por frío crónico, la administración de kisspeptina también eleva la concentración plasmática de testosterona, función que ha sido descrito anteriormente en cultivo de células de la granulosa de pollos, en los cuales se demostró un aumento en la síntesis de las hormonas esteroideogénicas (85), sin variar la concentración de estradiol plasmático. Ahora si el exceso de kisspeptina, disminuyó la ovulación, el bloqueo de la acción de kisspeptina con el antagonista p234, en condiciones basales, no debiera generar mayores efectos, lo que iría en concordancia con lo descrito anteriormente en ratas knockout para el receptor

GPR54 (9). Nuestros resultados mostraron que no habían efectos sobre la ciclicidad estral, sin embargo cuando el receptor estuvo bloqueado con p234, y se aplicó un estrés por frío crónico, el cual está descrito que altera el desarrollo folicular, los efectos del estrés se vieron exacerbados, con una disminución en los ciclos estrales con respecto al del estrés crónico. Esto nos permite sugerir que en ratas adultas ciclando normalmente, la kisspeptina no juega un rol vital en la ovulación, pero si es importante ante eventos estresantes que perturban el desarrollo folicular, ejerciendo un rol protector en la ovulación.

En concordancia con los resultados obtenidos, una disminución en la ciclicidad estral, y por lo tanto de la ovulación, debería ir en conjunto con una disminución en el número de cuerpos lúteos. El hecho de que nuestros resultados mostraron que tanto en condiciones basales (kisspeptina) como en presencia del estrés crónico por frío, hubo un aumento en el número de cuerpos lúteos y en la concentración plasmática de progesterona, esto se debería a que la luteólisis en la rata está determinada en parte (importante) por la acción de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (86, 87) y a la caída en la concentración plasmática de progesterona. Debido a que kisspeptina podría tener una función estimuladora de la esteroidogénesis (85), La administración de kisspeptina en nuestro protocolo en ratas adultas podría estar dando cuenta del aumento de la secreción de progesterona, lo que llevaría a un bloqueo de los mecanismos regulatorios que llevan a la luteólisis, esto se podría apoyar también en datos de la literatura en los cuales, en ratas embarazadas y pseudoembarazadas, se mantienen altos los niveles de progesterona y llevando a la conservación del cuerpo lúteo (87, 88). Como derivación de este estudio, los resultados podrían extenderse a la función de

kisspeptina durante el embarazo, dado que la progesterona juega un rol importante para la mantención de la placenta mientras esta no se ha desarrollado completamente y la concentración plasmática de progesterona se conserva alta durante la preñez. Coincidentemente es en esta etapa en la cual los niveles de kisspeptina plasmática secretados por el trofoblasto llegan a sus puntos más altos (2, 66, 89, 90), lo que se había atribuido a una función local, controlando la invasión del trofoblasto en la pared uterina. Por lo tanto kisspeptina podría también contribuir a mantener y apoyar, a través de la progesterona, la función placentaria, aunque esta hipótesis debe ser probada.

8 Conclusiones

Finalmente podemos concluir:

- 1) Kisspeptina se sintetiza y colocaliza con neuronas TH positivas en ganglio celíaco.
- 2) Kisspeptina se expresa tanto en células de la granulosa y de la teca en ovarios de rata.
- 3) Kisspeptina se expresa desde folículos primarios hasta preovulatorios, pero disminuye en los folículos quísticos.
- 4) La activación β -adrenérgica activa la expresión de la kisspeptina ovárica.
- 5) El sistema kisspeptinérgico periférico (eje GCO) es alterado ante un estrés agudo o crónico
- 6) Kisspeptina es importante para el inicio de la pubertad y el comienzo de la actividad reproductiva medida por la ciclicidad estral.
- 7) El sistema kisspeptinérgico periférico estaría jugando un rol importante en el control del desarrollo folicular y la ciclicidad estral en ratas adultas.
- 8) Kisspeptina posee un efecto esteroideogénico, aumentando la concentración plasmática de testosterona y progesterona.
- 9) Kisspeptina aumenta el número de cuerpos lúteos, posiblemente inhibiendo la luteólisis.

8.1 General

Los resultados presentados en esta tesis han mostrado que kisspeptina es sintetizada en ganglio celíaco y ovario, siendo parte de una vía neuronal que podría contribuir en la regulación de la función ovárica. Por otra parte, la kisspeptina intraovárica estaría jugando un rol protector en la ovulación, teniendo una función esteroidogénica importante que podría participar tanto en la función reproductiva como en el embarazo.

8.2 Proyección

Esta tesis abre interesantes perspectivas en el estudio de las funciones de kisspeptina en el ovario durante las distintas etapas del ciclo estral, en el embarazo y en el envejecimiento reproductivo.

9 Modelo Propuesto

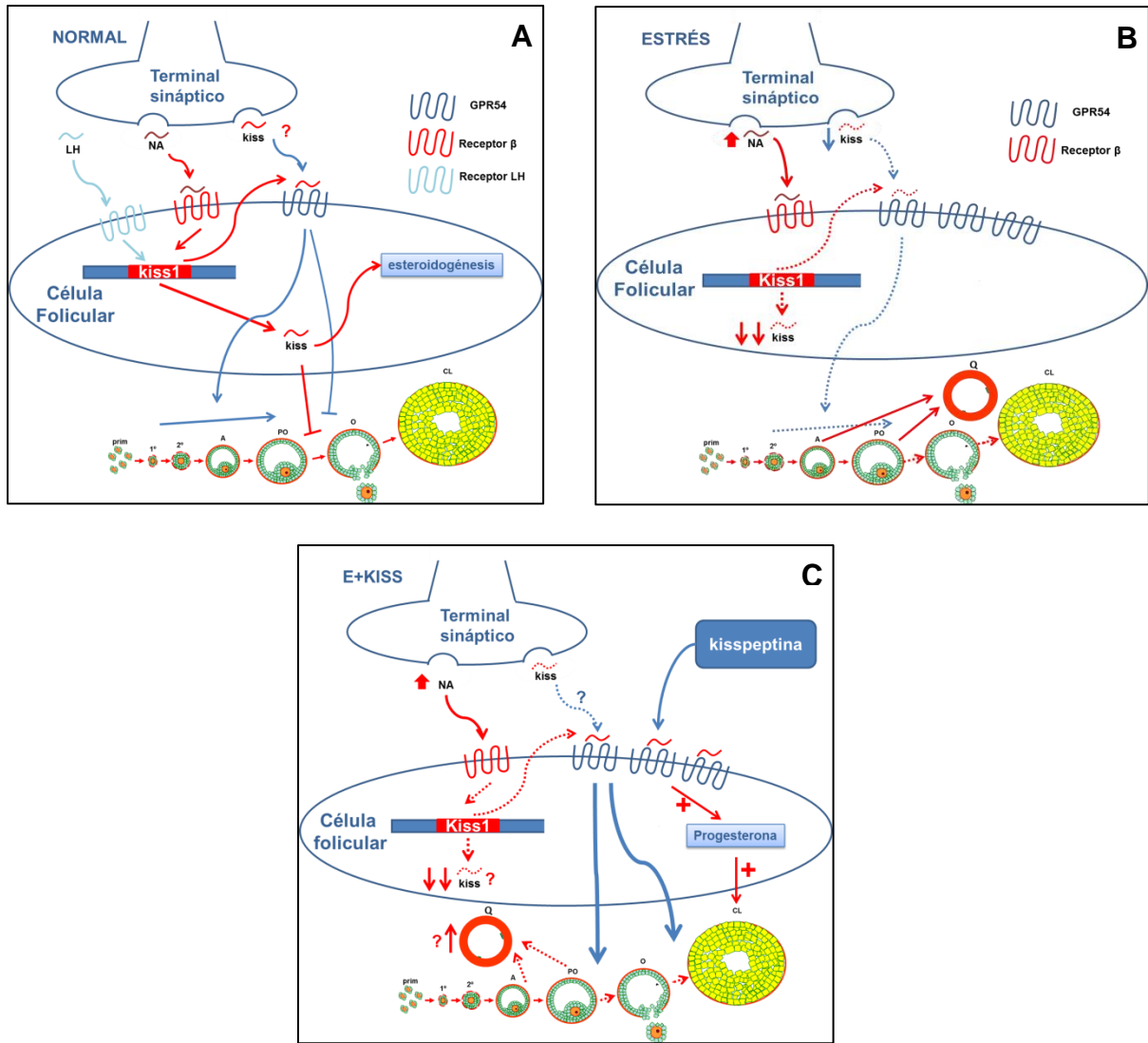


Figura 33: Esquemas resumen del modelo propuesto. A) Estado normal, kisspeptina es producida por el ovario y por el terminal nervioso. Kisspeptina a través de la unión a su receptor estaría por una parte potenciando el desarrollo folicular, por otra controlando la ovulación, y por otra parte también teniendo un efecto esteroidogénico. B) Estrés por frío crónico, La hiperactividad simpática generaría una disminución en kisspeptina en el ovario, ya sea por una menor síntesis como una menor movilización desde el ganglio celíaco y además llevaría a un aumento de la síntesis del receptor para kisspeptina, esto participar junto a los otros factores conocidos en el descontrol del desarrollo folicular y la producción de quistes foliculares. C) Administración de kisspeptina en el ovario en conjunto con el estrés por frío crónico. Kisspeptina estaría actuando sobre folículos sensibilizados (mayor número de receptores) con lo que potenciaría su efecto sobre la población de folículos en crecimiento, permitiendo un aumento en la esteroidogénesis, aumentando la progesterona plasmática, lo que incidiría en la inhibición de la luteólisis. En signo de interrogación se marcan la concentración de kisspeptina ovárica y el número de quistes foliculares los cuales aún no son determinados, así como sus efectos sobre el desarrollo folicular.

10 Referencias

1. **Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M** 2001 The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636
2. **Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R, Sharabi A, Hiden U, Graier W, Knofler M, Andreae F, Wagner O, Quaranta V, Desoye G** 2004 Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* 117:1319-1328
3. **Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR** 1996 KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731-1737
4. **Lee JH, Welch DR** 1997 Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 57:2384-2387
5. **Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N** 2004 Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:1379-1383
6. **Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C** 2003 Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* 162:609-617
7. **Navenot JM, Wang Z, Chopin M, Fujii N, Peiper SC** 2005 Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. *Cancer Res* 65:10450-10456
8. **Yan C, Wang H, Boyd DD** 2001 KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha - induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Biol Chem* 276:1164-1172
9. **Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH** 2003 The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627
10. **de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E** 2003 Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10972-10976
11. **Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL** 2003 The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1357-1363
12. **Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GE, Seminara SB** 2007 Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* 148:4927-4936
13. **d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH** 2007 Hypogonadotropic

- hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10714-10719
14. **Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA** 2004 A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073-4077
 15. **Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M** 2004 Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565-4574
 16. **Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM** 2005 Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2129-2134
 17. **Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR** 2004 Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16:850-858
 18. **Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE** 2005 Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349-11356
 19. **Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, Brailoiu E, Dun NJ** 2005 KiSS-1 expression and metastatin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol* 481:314-329
 20. **Clarkson J, Herbison AE** 2006 Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147:5817-5825
 21. **Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE** 2009 Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21:673-682
 22. **Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M** 2007 Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148:1774-1783
 23. **Bakker J, Pierman S, Gonzalez-Martinez D** 2010 Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm Behav* 57:390-395
 24. **Novaira HJ, Ng Y, Wolfe A, Radovick S** 2009 Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 311:126-134
 25. **Semaan SJ, Murray EK, Poling MC, Dhamija S, Forger NG, Kauffman AS** 2010 BAX-dependent and BAX-independent regulation of Kiss1 neuron development in mice. *Endocrinology* 151:5807-5817
 26. **Herbison AE** 1997 Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev Reprod* 2:1-6
 27. **Vikman J, Ahren B** 2009 Inhibitory effect of kisspeptins on insulin secretion from isolated mouse islets. *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4:197-201
 28. **Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE, Pellicer A, Pinilla L, Gaytan F, Tena-Sempere M** 2006 Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 147:4852-4862
 29. **Curry TE, Jr., Osteen KG** 2001 Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 64:1285-1296

30. **Young KA, Stouffer RL** 2004 Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 70:244-252
31. **Takino T, Koshikawa N, Miyamori H, Tanaka M, Sasaki T, Okada Y, Seiki M, Sato H** 2003 Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastatin by matrix metalloproteinases. *Oncogene* 22:4617-4626
32. **Burden HW, Lawrence IE, Jr., Louis TM** 1985 The adrenergic innervation of the guinea pig ovary during prenatal and postnatal periods. *Acta Anat (Basel)* 122:193-196
33. **Kawakami M, Kubo K, Uemura T, Nagase M, Hayashi R** 1981 Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. *Endocrinology* 109:136-145
34. **Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B** 1998 Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* 68:244-256
35. **Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa ESAA, Ramirez VD** 2002 Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* 59:495-502
36. **Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE** 1993 Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 133:2696-2703
37. **Goldstein DS, Kopin IJ** 2008 Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis. *Endocr Regul* 42:111-119
38. **Fiedler J, Jara P, Luza S, Dorfman M, Grouselle D, Rage F, Lara HE, Arancibia S** 2006 Cold stress induces metabolic activation of thyrotrophin-releasing hormone-synthesising neurones in the magnocellular division of the hypothalamic paraventricular nucleus and concomitantly changes ovarian sympathetic activity parameters. *J Neuroendocrinol* 18:367-376
39. **Jara P, Rage F, Dorfman M, Grouselle D, Barra R, Arancibia S, Lara HE** 2010 Cold-induced glutamate release in vivo from the magnocellular region of the paraventricular nucleus is involved in ovarian sympathetic activation. *J Neuroendocrinol* 22:979-986
40. **Erickson GF, Hsueh AJ** 1978 Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 102:1275-1282
41. **Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR** 1993 Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133:2690-2695
42. **Luza SM, Arancibia S, Venegas M, Lara HE** 2003 Thyrotropin-releasing hormone as a mediator of the central autonomic pathway controlling ovarian function. *Neuroendocrinology* 77:273-281
43. **Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE** 2003 Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biology of reproduction* 68:2038-2043
44. **Paxinos G WC** 1997 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Academic Press
45. **Dissen GA, Parrott JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR** 2000 Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology* 141:4736-4750
46. **Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR** 2000 An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141:1059-1072

47. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
48. **Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P** 2000 Tissue hypoxigenation activates the adrenomedullin system in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R513-519
49. **Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci JA** 2008 Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology* 149:2907-2916
50. **Brown RE, Wilkinson DA, Imran SA, Caraty A, Wilkinson M** 2012 Hypothalamic kiss1 mRNA and kisspeptin immunoreactivity are reduced in a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Brain Res* 1467:1-9
51. **Panidis D, Rousso D, Koliakos G, Kourtis A, Katsikis I, Farmakiotis D, Votsi E, Diamanti-Kandarakis E** 2006 Plasma metastin levels are negatively correlated with insulin resistance and free androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 85:1778-1783
52. **Chen X, Mo Y, Li L, Chen Y, Li Y, Yang D** 2010 Increased plasma metastin levels in adolescent women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 149:72-76
53. **Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T** 2004 Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320:383-388
54. **Liou TH, Yang JH, Hsieh CH, Lee CY, Hsu CS, Hsu MI** 2009 Clinical and biochemical presentations of polycystic ovary syndrome among obese and nonobese women. *Fertil Steril* 92:1960-1965
55. **Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L, Tena-Sempere M** 2009 Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* 30:57-66
56. **Navarro VM, Tena-Sempere M** 2011 Kisspeptins and the neuroendocrine control of reproduction. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:267-275
57. **Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA** 2009 Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 30:713-743
58. **Dun SL, Brailoiu GC, Parsons A, Yang J, Zeng Q, Chen X, Chang JK, Dun NJ** 2003 Metastin-like immunoreactivity in the rat medulla oblongata and spinal cord. *Neurosci Lett* 335:197-201
59. **Clarkson J, Herbison AE** 2011 Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 23:293-301
60. **Mi WL, Mao-Ying QL, Liu Q, Wang XW, Li X, Wang YQ, Wu GC** 2009 The distribution of kisspeptin and its receptor GPR54 in rat dorsal root ganglion and up-regulation of its expression after CFA injection. *Brain Res Bull* 78:254-260
61. **Baljet B, Drukker J** 1979 The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta Anat (Basel)* 104:243-267
62. **Lawrence IE, Jr., Burden HW** 1980 The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196:51-59
63. **Porzionato A, Fenu G, Rucinski M, Macchi V, Montella A, Malendowicz LK, De Caro R** 2011 KISS1 and KISS1R expression in the human and rat carotid body and superior cervical ganglion. *Eur J Histochem* 55:e14
64. **Trudrung P, Furness JB, Pompolo S, Messenger JP** 1994 Locations and chemistries of sympathetic nerve cells that project to the gastrointestinal tract and spleen. *Arch Histol Cytol* 57:139-150

65. **Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M** 2001 Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617
66. **Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Hattori M, Nishimura A, Ohtaki T, Shintani Y** 2004 Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta* 1678:102-110
67. **Gaytan F, Gaytan M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, Garrido N, Sanchez-Criado JE, Millar RP, Pellicer A, Fraser HM, Tena-Sempere M** 2009 KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296:E520-531
68. **D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR** 2000 Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 300:47-56
69. **Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda SR, Lara HE** 2008 Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology* 149:50-56
70. **True C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS** 2011 Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol* 23:52-64
71. **Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M** 2010 Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151:722-730
72. **Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP** 2009 Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 29:3920-3929
73. **Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS** 1998 Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275:R1247-1255
74. **Lewin's** 2009 *Genes X*. 10 edition ed: Jones & Bartlett
75. **Docke F, Dorner G** 1965 The mechanism of the induction of ovulation by oestrogens. *J Endocrinol* 33:491-499
76. **Christian CA, Moenter SM** 2010 The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 31:544-577
77. **Li XF, Knox AM, O'Byrne KT** 2010 Corticotrophin-releasing factor and stress-induced inhibition of the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator in the female. *Brain Res* 1364:153-163
78. **Kinsey-Jones JS, Li XF, Knox AM, Wilkinson ES, Zhu XL, Chaudhary AA, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT** 2009 Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 21:20-29
79. **Cagampang FR, Cates PS, Sandhu S, Strutton PH, McGarvey C, Coen CW, O'Byrne KT** 1997 Hypoglycaemia-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats: role of oestradiol, endogenous opioids and the adrenal medulla. *J Neuroendocrinol* 9:867-872

80. **Rivier C, Vale W** 1989 In the rat, interleukin-1 alpha acts at the level of the brain and the gonads to interfere with gonadotropin and sex steroid secretion. *Endocrinology* 124:2105-2109
81. **Ruisseau PD, Tache Y, Brazeau P, Collu R** 1978 Pattern of adenohipophyseal hormone changes induced by various stressors in female and male rats. *Neuroendocrinology* 27:257-271
82. **Cho SG, Li D, Tan K, Siwko SK, Liu M** 2012 KiSS1 and its G-protein-coupled receptor GPR54 in cancer development and metastasis. *Cancer metastasis reviews*
83. **Curry TE, Jr., Song L, Wheeler SE** 2001 Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation, and early luteal formation in the rat. *Biol Reprod* 65:855-865
84. **Pallais JC, Bo-Abbas Y, Pitteloud N, Crowley WF, Jr., Seminara SB** 2006 Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, GPR54. *Mol Cell Endocrinol* 254-255:70-77
85. **Xiao Y, Ni Y, Huang Y, Wu J, Grossmann R, Zhao R** 2011 Effects of kisspeptin-10 on progesterone secretion in cultured chicken ovarian granulosa cells from preovulatory (F1-F3) follicles. *Peptides* 32:2091-2097
86. **Pharriss BB, Wyngarden LJ** 1969 The effect of prostaglandin F 2alpha on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 130:92-94
87. **McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC** 1999 Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79:263-323
88. **Pepe GJ, Rothchild I** 1974 A comparative study of serum progesterone levels in pregnancy and in various types of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 95:275-279
89. **Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, Fujino M** 2003 Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:914-919
90. **Hidden U, Bilban M, Knofler M, Desoye G** 2007 Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Rev Endocr Metab Disord* 8:31-39