

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“PARTICIPACIÓN DE KISSPEPTINA EN EL RECLUTAMIENTO  
FOLICULAR DURANTE EL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO”**

**Presentada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctora en Farmacología**

**Por:**

**DANIELA DEL PILAR FERNANDOIS VICENCIO**

**Director de Tesis**

**Dr. Alfonso Paredes Vargas**

**SANTIAGO- CHILE  
2016**

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

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

**DANIELA DEL PILAR FERNANDOIS VICENCIO**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 18 de Noviembre del 2016.

**Director de Tesis:**

Dr. Alfonso Paredes V. \_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. María Antonieta Valenzuela P. \_\_\_\_\_

Dra. María Margarita Vega B. \_\_\_\_\_

Dr. Rafael Burgos A. \_\_\_\_\_

Dr. Ramón Sotomayor Z. \_\_\_\_\_

Dr. Luis Velásquez C. \_\_\_\_\_

---

“En la vida  
no hay cosas  
que temer  
sólo cosas  
que comprender”

---

*Marie Skłodowska-Curie*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer en primer lugar a toda mi familia, cuyo apoyo incondicional y fe en mí han hecho que logre terminar esta etapa en la forma en que ha sido. Ustedes saben el esfuerzo que ha requerido este proyectos, todos los altos y bajos que he tenido, pero también han sido testigos del cómo me ha ayudado a crecer. Agradecer a mi papá y mi mamá, sin ellos yo no sería yo, ustedes me han dado todos los valores que han guiado mi vida y carrera profesional hasta hoy. A mis amados hermanos Lily y Coke, a mi sobrina Camila y a mi prima Mony y especialmente a Sergio, mi compañero y mejor amigo, gracias por estar ahí cada vez que lo necesité, mil veces muchas gracias, nadie tiene más fe en mí que ustedes y eso ha sido una fuerza vital para ese ciclo. Especialmente a ti Chechito, tu paciencia Zen no tiene límites, te amo.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio, para aquellos que ya no están (Gonzalo y Jonathan), gracias por ser mis partners, por ayudarme a darle forma a mis resultados y por mantener la amistad, casi como si nos viéramos aún todos los días. Y a mis nuevos compañeros de laboratorios (Frenshi, Ángela, Cony's, Raúl, Bea, Andrés, Valentina) gracias por la amistad, por escuchar mis críticas y criticar también mi trabajo, sin eso, no se podría hacer ciencia, gracias por los buenos momentos y por hacer del laboratorio un lugar al que día a día dan ganas de ir. A mis amigas de la vida (Pao, Michelle, Naty y Andre) ustedes han estado presente en todo el proceso y saben mejor que nadie como ha sido todo, gracias por escucharme.

Finalmente agradecer al Dr. Alfonso Paredes y al Dr. Hernán Lara por recibirme y aguantarme tantos años, gracias por los consejos y particularmente a mi director de tesis por escucharme y apoyarme, por considerar mis ideas y darme la libertad de desarrollarlas, sin ése espacio y confianza este trabajo no sería el mismo.

Finalmente, han sido muchas las personas que me acompañaron durante estos 5 años, familia, amigos de la vida, compañeros, gracias a todos, el paso de cada uno por mi vida ha contribuido en algo para el cierre de esta etapa. Un abrazo a todos...Los Quiero!.

## **Financiamiento**

Este trabajo fue financiado por:

- Proyecto FONDECYT regular 1120147
- Beca de Doctorado Nacional CONICYT 21120254
- Proyecto Gastos Operacionales CONICYT 21120254 Etapa 1 y 2
- Programa de Pasantías y Cotutelas CONICYT año 2013
- Beca de extensión de tesis CONICYT año 2016

## Publicaciones científicas

### Internacionales:

- **Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation" Cruz G, Fernandois D, Paredes HA.** *Reproduction* 2016 (doi: 10.1530/JOE-16-0181). **IF: 3.184**
- **Kisspeptin level in aging ovary is regulated by the sympathetic nervous system. Fernandois D, Cruz G, Na E, Lara HE, Paredes AH.** *J Endocrinol.* 2016 (doi:10.1530/REP-16-0117). **IF: 4.498**
- **Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. Fernandois D, Na E, Cuevas F, Cruz G, Lara HE, Paredes AH.** *J Endocrinol.* 2016 Mar;228(3):161-70. doi: 10.1530/JOE-15-0429. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26698566. **IF: 4.498**
- **Beyond the brain-Peripheral kisspeptin signaling is essential for promoting endometrial gland development and function. León S, Fernandois D, Sull A, Sull J, Calder M, Hayashi K, Bhattacharya M, Power S, Vilos GA, Vilos AG, Tena-Sempere M, Babwah AV.** *Sci Rep.* 2016 Aug 19;6:30954. doi: 10.1038/srep30954. PMID:27541333. **IF: 5.228**

### Nacionales

- **Regulación neuronal de la función ovárica durante el envejecimiento reproductivo. Fernandois D, Garrido M, Lara HE, Paredes AH.** *Revista de Farmacología de Chile* 7(1): 47 (2014).

## **Premios y presentaciones a congresos**

### 1.- Septiembre 2016- Presentación oral SCHR D

La ausencia periférica del receptor de kisspeptina altera la expresión génica de factores moleculares asociados al desarrollo folicular y ovulación. 2016 XXVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Antofagasta, Chile.

### 2.- Premio Presentación modalidad poster (mayo 2015)-Congreso internacional

Kisspeptin is raised during the ageing and is under the control of the nervous sympathetic system. 2015 XVII European Congress of Endocrinology. Dublin, Ireland

### 3.- Premio Presentación modalidad poster (Agosto 2015)-Workshop internacional

Ovarian kisspeptin increases during reproductive aging and participates in the follicular development and ovulation. 2015 International Workshop in Neuroendocrinology. Mendoza, Argentina

### 4- Premio presentación modalidad oral (Septiembre 2015)- SCHR D

Kisspeptina participa en el desarrollo de folículos antrales y aumenta la ovulación durante el envejecimiento ovárico. 2015 XXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Antofagasta, Chile.

### 5.- Septiembre 2014- Presentación oral SCHR D

Kisspeptina produce un cambio favorable en la dinámica folicular durante el periodo del subfertilidad. (Kisspeptin produce a favorable change in the follicular dynamics during the period subfertility) 2014 XXV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. Valdivia, Chile

6.- Noviembre 2014- Presentación poster SOFARCHI

Kisspeptina bloquea el aumento del receptor de FSH inducido por una estimulación  $\beta$ -adrenérgica en el ovario de rata durante el periodo de subfertilidad. (Kisspeptin block the increase of the FSH receptor induced by a  $\beta$ -adrenergic stimulation in the rat ovary during the subfertility period). 2014 XXXVI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Hotel Termas de Chillán.



# Índice

Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas .....	5
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción .....	10
Fertilidad y fecundidad en la actualidad .....	10
Desarrollo folicular en la mujer y la rata .....	11
Desarrollo folicular en el envejecimiento .....	13
Ovulación y formación espontáneas de quistes en ratas durante el envejecimiento. ....	14
Participación del sistema nervioso simpático en la función ovárica.....	15
Kisspeptina a nivel hipotalámico .....	16
Evidencias de la función de Kiss en el ovario .....	17
Hipótesis .....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos .....	19
Materiales y Métodos.....	20
Animales .....	20
Ciclicidad estral. ....	21
Administración de propranolol .....	21
Sección quirúrgica bilateral del Nervio ovárico superior. ....	22
Incubación de ovarios completos <i>in vitro</i> .....	22
Cuantificación de la Hormona AMH y FSH en suero. ....	23
Análisis Morfológico del Ovario. ....	24
Determinación de los niveles de mRNA en ovario de rata.....	24
Determinación de los niveles de mRNA en ovario de ratón.....	25
Determinación del contenido ovárico de Kisspeptina, FSHR y Receptor de Kisspeptina.....	26
Tamaño muestral.....	27
Análisis Estadísticos .....	27
Resultados .....	28

<i>Objetivo 1:</i> .....	28
El péptido Kiss aumenta durante el envejecimiento ovárico, y se correlaciona con el aumento del tono adrenérgico. ....	28
El mRNA de Kiss1R aumenta durante el envejecimiento ovárico. ....	30
El bloqueo $\beta$ -adrenérgico o una denervación quirúrgica del ovario disminuye la expresión de Kiss ovárica. ....	32
Resumen del objetivo 1 .....	36
Objetivo 2 .....	37
El péptido Kiss afecta el desarrollo folicular, modulando los folículos secundarios a través del FSHR.....	37
La ausencia periférica de Kiss1R modifica los niveles de mRNA de marcadores del desarrollo folicular .....	41
Resumen del objetivo 2.....	49
Objetivo 3 .....	50
La administración de propranolol durante el periodo de subfertilidad mejora la transición de folículos primordiales a secundarios en el ovario de rata. ....	50
Resumen del objetivo 3.....	58
Discusión .....	59
Kiss aumenta durante el envejecimiento reproductivo, y sus niveles se correlacionan con la actividad noradrenérgica del ovario. ....	59
La expresión de Kiss está regulada por la NA en el ovario. ....	60
El Kiss1R ovárico aumenta durante el envejecimiento reproductivo. ....	62
Kiss favorece la ovulación. ....	62
Kiss regula el desarrollo folicular por medio de la modulación de la expresión del FSHR. ...	63
El bloqueo $\beta$ -adrenérgico crónico produce un aumento del FSHR.....	65
La disminución de la expresión de Kiss genera un aumento del reclutamiento folicular. ....	68
Conclusiones Finales .....	72
Anexo.....	73
Peso de los animales y ciclicidad estral durante el tratamiento con Propranolol por dos meses. ....	74
Bibliografía .....	77

## Índice de Figuras

Figura 1.- Kiss aumenta en el envejecimiento ovárico. ....	29
Figura 2.- El mRNA del receptor de Kiss aumenta durante el envejecimiento ovárico ..	31
Figura 3.- La expresión de Kiss disminuye con un bloqueo $\beta$ -adrenérgico.....	33
Figura 4.- La expresión de Kiss disminuye con una denervación quirúrgica (SONX)....	34
Figura 5.- Niveles de mRNA del receptor de Kiss (Kiss1R o GPR54). ....	35
Figura 6.- Efectos de Kiss e isoproterenol sobre el receptor FSH .....	39
Figura 7.- Efectos de Kiss e Isoproterenol sobre el receptor de FSH en los folículos preantrales .....	40
Figura 8.-Niveles de mRNA y proteína del receptor de FSH .....	43
Figura 9.-Niveles de mRNA de receptores involucrados en el desarrollo folicular en ratones transgénicos .....	44
Figura 10.-Niveles de mRNA de factores de desarrollo ovocitario y folicular en ratones transgénicos.....	45
Figura 11.-Imagen representativa de la ruta de síntesis de esteroides .....	46
Figura 12.-Niveles de mRNA y proteína de la enzima P450 <sub>scc</sub> .....	47
Figura 13- Niveles de mRNA de 17 $\beta$ HSD y Aromatasa. ....	48
Figura 14.- Expresión del receptor de FSH (FSHR). ....	52
Figura 15 Niveles de mRNA de GDF9 y su receptor BMPR2. ....	53
Figura 16.- Niveles de Hormona Anti-Mülleriana plasmática.....	54
Figura 17- Número de folículos preantrales en ovario de rata subfértil con bloqueo $\beta$ -adrenérgico.....	55

Figura 18- Número de folículos secundarios por tamaño en ovario de rata subfétil con bloqueo $\beta$ -adrenérgico.....	56
Figura 19.- Representación del posible mecanismo molecular por el cual la noradrenalina podría regular la expresión de Kiss en el ovario .....	61
Figura 20.- Representación del posible mecanismo molecular por el cual la Kiss podría antagonizar la expresión de FSHR mediada por noradrenalina en el ovario .....	67
Figura 21.- Estructura del gen FSHR y su localización cromosómica .....	71
Figura 22.- Peso de los animales.....	74
Figura 23.- Diagrama representativo de la ciclicidad estral de 5 animales para cada uno de los grupos tratados.....	75
Figura 24.- Ciclicidad estral durante el periodo de subfertilidad determinado por análisis de frotis vaginal.....	76

## Índice de Tablas

Tabla 1.- Secuencia de los partidores utilizados para amplificación por PCR en tiempo real para rata.....	25
Tabla 2.- Condiciones de qPCR por gen.....	25
Tabla 3.- Secuencia de los partidores utilizados para amplificación por PCR en tiempo real para ovario de ratón.....	26
Tabla 4.- FSH plasmática en ratas controles.....	57
Tabla 5.- FSH plasmática en ratas tratadas con propranolol.....	57
Tabla 4.- FSH plasmática en ratas con una denervación quirúrgica.....	57

## Abreviaturas

AMH	Hormonas Anti-Mülleriana
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
BMP15	Proteína morfométrica del hueso 15
BMPR2	Receptor de la proteína morfométrica del hueso 2
CG	Células de la granulosa
CREB	Elemento de respuesta de unión a AMPc
CT	Célula de la teca
CYP19A1	Citocromo P 19 A 1
ESR1	Receptor de estradiol 1 o alfa
ESR2	Receptor de estradiol 2 o beta
FSH	Hormona folículo estimulante
FSHR	Receptor de la hormona folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GDF9	Factor de diferenciación 9
GnRh	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GPR54	Receptor de proteína G 54
HSD17 $\beta$	Deshidrogenasa de hidroxisteroide 17 subtipo $\beta$
ISO	Isoproterenol
Kiss	Kisspeptina
Kiss1R	Receptor de kisspeptina
KO	Knock Out
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de hormona luteinizante
NA	Noradrenalina
NGF	Factor de crecimiento nervioso
P234	Péptido 234
P450scc	Enzima escisión de la cadena lateral del colesterol

PGR	Receptor de progesterona
PKA	Proteína quinasa A
SON	Nervio ovárico superior
SONX	Corte del nervio ovárico superior
Tg	Transgen
VIP	Péptido vasointestinal
WB	Western blot
WT	Silvestre.

## Resumen

En la actualidad las parejas deciden postergar la maternidad más allá de los 30 años de edad, acercándose a la ventana de subfertilidad de la mujer. Este cambio en la conducta de la población disminuye la probabilidad de éxito del embarazo y también la natalidad. El periodo de subfertilidad en la mujer se asocia a una pérdida acelerada de la reserva folicular junto con un aumento en el tono adrenérgico del ovario, efecto observado tanto en humanos como en ratas. Ante esto, el comprender los mecanismos que aceleran el reclutamiento folicular durante el periodo de subfertilidad permitirá desarrollar potenciales terapias que faciliten la fertilidad durante esta etapa de la vida. Por esto, el **objetivo de este trabajo es caracterizar el rol del kisspeptina como un factor clave del desarrollo folicular durante el periodo de subfertilidad en ratas y relacionarlo con el control simpático del ovario**. En este trabajo planteamos que “El aumento del tono simpático ovárico durante el periodo de subfertilidad incrementa la expresión de kisspeptina, lo que se relaciona con cambios en la dinámica de crecimiento folicular”. **Nuestros resultados muestran que:** **1)** Existe un aumento de la expresión de kisspeptina en el ovario de rata, que se correlaciona positivamente con un aumento del tono adrenérgico ovárico durante el envejecimiento, **2)** El bloqueo  $\beta$ -adrenérgico y la denervación del nervio ovárico superior previenen el aumento de kisspeptina durante el envejecimiento, lo que se relaciona a una disminución en los folículos primordiales y un aumento de folículos secundarios y antrales. Más aún, este aumento en el desarrollo folicular se relacionó con una mayor expresión del receptor de FSH y **3)** Kisspeptina antagoniza el efecto de isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) *in vitro*, antagonizando la expresión del FSHR inducida por isoproterenol. Además, un antagonista del receptor de kisspeptina (péptido P234) potencia el efecto de isoproterenol sobre la inducción de la expresión del FSHR. Estos resultados sugieren que kisspeptina es regulada por el tono adrenérgico del ovario y que el sistema simpático en conjunto con el kisspeptinérgico participa en la regulación de la expresión del FSHR, lo que puede explicar en parte los cambios en el reclutamiento folicular durante el periodo de subfertilidad.



## Abstract

In the present days, couples decide to delay childbearing beyond the 30-year-old, approaching to the window of subfertility in women. This change in the behavior of the population had decreased the successful of pregnancy and birth rate. On the other hand, subfertility period in women has been associated with an accelerated loss of follicular reserve along with an increased adrenergic tone of the ovary, effect observed both in humans and rats. Given this, understanding the mechanisms that accelerates follicular recruitment during the subfertility period will help us develop potential therapies to improve fertility during this stage of life. Therefore, the objective of this work is characterize the role of kisspeptin as a key factor in follicular development during subfertility period using a rat model, and relate kisspeptin expression with the sympathetic control of the ovary. In this thesis we claim that "The increase in ovarian sympathetic tone during the period of subfertility increases the expression of kisspeptin, which is associated with changes in follicular development". Our results show that: 1) There is an increased expression of Kisspeptin in rat ovary that directly correlates with an increased ovarian adrenergic tone during aging, 2) The pharmacological blockade of  $\beta$ -adrenergic receptors and denervation of superior ovarian nerve, prevents kisspeptin increase during aging, which is related with a decrease in primordial follicles and an increase in antral and secondary follicles. Furthermore, this increase in follicular development was associated with increased expression of FSH receptor, and 3) Kisspeptin antagonizes the effect of isoproterenol (a  $\beta$ -adrenergic agonist) *in vitro*, antagonizing the FSHR induced expression for isoproterenol. In summary, these results suggest that kisspeptin expression is regulated by the adrenergic tone of the ovary and that the sympathetic system together with the kisspeptinergic system are involved in the regulation of FSHR expression, which may partially explain the changes in follicular recruitment during the subfertility period.

## **Introducción**

### **Fertilidad y fecundidad en la actualidad**

En la actualidad, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, existe una postergación en la decisión de tener hijos. Los estudios demuestran que la tasa global de fecundidad ha disminuido constantemente en los últimos años (Larragaña 2003), postergando la natalidad hacia edades más tardías (DEIS 2011, 2012). Aunque la reducción de la fertilidad en la mujer es multifactorial, uno de los factores fundamentales corresponde a la disminución de la reserva folicular, proceso que acontece de forma espontánea y natural con el envejecimiento reproductivo (Alviggi, et al. 2009, Dorland, et al. 1998, te Velde, et al. 1998b). El establecimiento de la reserva folicular en la mujer (formación de folículos primordiales) es un proceso que ocurre durante la gestación. En este proceso, se establece la población de folículos que constituyen la reserva folicular, que corresponde a un número finito de folículos primordiales, que posteriormente serán reclutados durante la vida fértil. Durante cada ciclo menstrual, estos folículos pasarán de un estado quiescente a uno de desarrollo activo, lo que paulatinamente mermará la reserva folicular. Modelos matemáticos estiman que cuando la reserva alcanza 1000 folículos, comienza el proceso de la menopausia ante la imposibilidad de mantener el sustento ovárico para la comunicación hipotalámica (Faddy, et al. 1992). Adicionalmente, nuevos estudios evidencian en la población de países desarrollados y en vías de desarrollo que existe un adelantamiento en la edad de la menarquia, lo que se ha relacionado con un adelantamiento en la edad de la menopausia (Faddy, et al. 1992, Weghofer, et al. 2013). En la mujer, el periodo de fertilidad óptima se localiza entre los 18 y 32 años de edad, etapa en donde la tasa de pérdida folicular es constante. Pero posterior a los 35 años, y por razones aún desconocidas, se incrementa la pendiente en la tasa de pérdida folicular, aumentando a más del doble (Faddy, et al. 1992). Aunque otros estudios postulan que el aceleramiento no es bifásico sino continuo a lo largo de la vida en la mujer (Hansen, et al. 2008).

Independiente de cuál es el modelo correcto de tasa de pérdida folicular, a la edad de 35 años se establece el periodo de subfertilidad (te Velde, et al. 1998a, te Velde, et al. 1998b). La etapa de subfertilidad se caracteriza por una caída en el porcentaje de éxito de embarazos y de respuesta a la fertilización asistida, además de diversos cambios en los perfiles hormonales en la mujer. Finalmente, en un período de 13 años la reserva folicular disminuye abruptamente, marcando la entrada a la menopausia (Wu, et al. 2005). Para estudiar el envejecimiento reproductivo hemos utilizado como modelo experimental la rata, dado que en este animal el envejecimiento ovárico es similar al humano. Al respecto, la fertilidad de la rata Sprague-Dawley alcanza su máximo a los 6 meses de edad, mientras que el período de subfertilidad se comprende entre los 8 y 10 meses, determinado por el número de crías por camada (disminuye a menos del 50%) (Acuna, et al. 2009). El foco de nuestro trabajo ha sido caracterizar el periodo de subfertilidad en la rata y la influencia del sistema nervioso simpático del ovario sobre su funcionamiento. Particularmente, en este trabajo pretendemos demostrar la influencia del sistema nervioso simpático y de la proteína kisspeptina sobre la pérdida de folículos que ocurre durante el periodo de subfertilidad en la rata. Nuestros resultados pueden dar indicios de alternativas farmacológicas para modular la foliculogénesis durante este proceso y generar posibilidades que favorezcan la fertilidad sobre los 35 años de edad en la mujer.

### **Desarrollo folicular en la mujer y la rata**

El establecimiento de la cohorte folicular tanto en el humano como en la rata comienza en la etapa fetal con el proceso llamado ensamblaje folicular. Mientras que este proceso es exclusivamente gestacional en la mujer, en la rata el proceso se extiende hasta los primeros 4 días de la vida posnatal (Pepling 2012, Rajah, et al. 1992). Una vez que los folículos son ensamblados pasan a formar la cohorte de reserva, desde aquí los folículos serán reclutados y una vez ocurrida la pubertad comienzan a seleccionarse para crecer y ser ovulados. En la mujer, cada ciclo ovulatorio consta de 28 días (ciclo

menstrual) y en la rata consta de 4 días (ciclo estral). En cada ciclo se recluta grupo de folículos primordiales que se encuentran quiescentes y son transformados en folículos primarios (Hirshfield and Midgley 1978a, McGee and Hsueh 2000). Desde este momento las células de la granulosa (CG) son sensibles a factores de crecimiento y hormonas que actúan de forma autocrina y paracrina, permitiendo la proliferación y diferenciación de las CG. Cuando las CG de un determinado folículo han proliferado lo suficiente para que éste tenga 2 o más capas de grosor, el folículo se denomina folículo secundario. Durante este proceso, se forma una capa externa de células por sobre la membrana basal, llamadas células de la teca (CT). El folículo secundario temprano es insensible a gonadotrofinas ya que carece de receptores funcionales para estas hormonas, y obedece más bien a un conjunto heterogéneo de señales paracrinas y nerviosas como por ejemplo: la hormona anti-mülleriana (AMH) (Visser, et al. 2006, Weenen, et al. 2004), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) (Pepling 2006), el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Dissen, et al. 1996, Manni, et al. 2006, Salas, et al. 2006), Kit ligando/receptor (Pepling 2006), noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Mayerhofer, et al. 1997). Todos estos factores en conjunto contribuyen a la adquisición del receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR) en las CG. El FSHR es de vital relevancia en el desarrollo folicular posterior ya que la sensibilidad de éstos al control hipotalámico vía la señalización de FSH permite el reclutamiento y desarrollo de los folículos pequeños y la selección de los folículos preovulatorios (McGee and Hsueh 2000, Rajah, et al. 1992, Romero, et al. 2002). Una vez iniciado el proceso cíclico de reclutamiento folicular la capa de CG continúa proliferando y además da origen a la formación de un antro. Cuando esto ocurre, los folículos se denominan antrales y son dependientes de gonadotrofinas, ya que han adquirido tanto FSHR como el receptor de la hormona luteinizante (LHR) (Hirshfield and Midgley 1978b, Palermo 2007). Los folículos antrales desarrollados (maduros) se denominan preovulatorios, y durante esta fase, la presencia del pico de LH gatillará la ovulación. La rata al ser un animal poliovulatorio, cerca del 30% de los folículos preovulatorios ovularán exitosamente (McGee 2000), en cambio en la mujer sólo un

folículo antral será seleccionado y ovulará. Debido a esta diferencia, y dado que el ciclo estral de la rata dura 4 días, y un cuerpo lúteo en la rata dura en promedio 14 días (4 ciclos), el número de cuerpos lúteos presentes en el ovario de la rata da cuenta de la función reproductiva actual y pasada del animal (Hirshfield and Midgley 1978a, Lara, et al. 1993).

### **Desarrollo folicular en el envejecimiento**

Como se ha explicado previamente, el número de folículos primordiales en ratas y ratones declina mientras la edad avanza (Almeida, et al. 2012, Atkins, et al. 2014, Jones and Krohn 1961, Mandl and Shelton 1959). En ratones se ha postulado que la disminución de folículos primordiales ocurre a una tasa proporcional a la reserva folicular, no en un número constante (Jones and Krohn 1961). Además, el reclutamiento de folículos primordiales hacia la cohorte de folículos en crecimiento no depende de la actividad cíclica de las gonadotrofinas (dada la ausencia de FSHR), sino más bien de una maquinaria coordinada de factores paracrinos que controla de manera inhibitoria los folículos primordiales (Adhikari and Liu 2009). En la revisión publicada por McGee y col. se sugiere llamar “reclutamiento inicial” a esta transición de folículos primordiales a primarios, para diferenciarlo del reclutamiento cíclico controlado por la FSH (McGee and Hsueh 2000). Por otro lado, se observa que el número de folículos preantrales disminuye a más de la mitad a los 8 meses de edad en la rata, y que éste número es mantenido relativamente constante hasta los 14 meses de edad (Acuna, et al. 2009). Sin embargo, se ha demostrado que el número de folículos antrales de mayor tamaño y preovulatorios permanecen constantes (Jones and Krohn 1961, Lerner, et al. 1990). Este aumento en la proporción de folículos de mayor tamaño indica que los ovarios dentro de la etapa de subfertilidad poseen una utilización “más eficiente” de los folículos primordiales, es decir, un bajo reclutamiento inicial y un bajo crecimiento de folículos pequeños, pero una proporción mayor de folículos que logran la etapa de preovulatorios en el proestro (Jones and Krohn 1961, Peluso, et al. 1979). Esto indica que los folículos

preovulatorios toman una vía diferente a la ovulación. Nosotros hemos postulado que esta vía puede ser la formación de quistes, prequistes y folículos luteinizados (Acuna, et al. 2009). Estas estructuras alternativas que aparecen en el ovario de la rata durante el periodo de subfertilidad podrían producir hormonas y factores paracrinos que potencialmente afectan el desarrollo de otros folículos en crecimiento.

### **Ovulación y formación espontáneas de quistes en ratas durante el envejecimiento.**

En la rata, la capacidad ovulatoria y la fertilidad pueden ser evaluadas de diversas formas, por ejemplo: como el número de cuerpos lúteos presentes en el ovario, el número de ovocitos ovulados y también como el número de crías nacidas por camada a diferentes edades. Como hemos mencionado previamente, en la rata estos parámetros disminuyen desde los 8 meses de edad (Acuna, et al. 2009, Chavez-Genaro, et al. 2007, Jones and Krohn 1961). Al respecto, la disminución de cuerpos lúteos mientras la edad aumenta (Acuna, et al. 2009), sucede más rápidamente que la disminución de los folículos preovulatorios (Peluso, et al. 1979). Junto a este fenómeno, nosotros hemos demostrado que las ratas presentan un incremento de los quistes foliculares y los prequistes (folículos tipo III) desde los 10 meses de edad (Acuna, et al. 2009). Los folículos tipo III son estructuras con una morfología muy similar a folículos preovulatorios. Los folículos tipo III son estructuras de gran tamaño ( $>700 \mu\text{m}$ ), que contienen cuatro o cinco densas capas de CG que rodean un gran antro y un compartimiento tecal aparentemente normal pero que pueden ser encontrado en la etapa de estro, indicando que no ovularon luego del aumento de LH y se mantienen presentes en los ciclos posteriores (Lara, et al. 2000).

## **Participación del sistema nervioso simpático en la función ovárica**

Numerosas evidencias muestran que el ovario recibe inervación simpática que alcanza diferentes estructuras del órgano, tales como vasos sanguíneos, tejido conectivo y folículos en diversos estadios del desarrollo (Stefenson, et al. 1981). Durante el envejecimiento ovárico en ratas (Acuna, et al. 2009, Chavez-Genaro, et al. 2007) y en humanos (Heider, et al. 2001) se ha descrito un aumento de tono adrenérgico (Acuna, et al. 2009, Chavez-Genaro, et al. 2007, Heider, et al. 2001), es más, este aumento muestra una correlación con la aparición de estructuras quísticas y la disminución de cuerpos lúteos en el ovario (Acuna, et al. 2009, Finch 2014, Heider, et al. 2001). En ratas, este efecto es parcialmente prevenido con una administración diaria de propranolol (antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos) por dos meses (Fernandois, et al. 2012). En este protocolo, hemos observado la disminución de las estructuras quísticas, el aumento de los cuerpos lúteos, folículos antrales en el ovario de ratas de 10 y 12 meses de edad, pero además, se ha identificado una recuperación de los perfiles séricos de las hormonas esteroidales, así como de la ciclicidad estral (Fernandois, et al. 2012). Se ha descrito además, que la inervación simpática del ovario proviene de dos rutas diferentes, la primera es la vía el plexo nervioso del ovario, y la segunda por el nervio ovárico superior (SON), cuyos cuerpos celulares son proyectados desde el ganglio celiaco (GC) directamente hacia los folículos en crecimiento (Gerendai, et al. 1998). Dentro de las funciones caracterizadas para el sistema nervioso simpático sobre el ovario, se ha visto un efecto aditivo conjunto con las gonodatrofinas en la secreción de esteroides (Adashi and Hsueh 1981, Aguado, et al. 1982). Por otro lado, la cantidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el ovario cambia de forma inversa a la concentración de NA durante el ciclo estral en ratas. Además durante el envejecimiento entre los 6 y 12 meses de edad los receptores  $\beta$ -adrenérgicos disminuyen de forma inversa al aumento del contenido de NA ovárico (Fernandois, et al. 2012). Esto reafirma la idea que la inervación simpática juega un rol importante en la maduración de los folículos, secreción esteroideal y ovulación durante el envejecimiento reproductivo.

## **Kisspeptina a nivel hipotalámico**

Las kisspeptinas (Kiss) son una familia de péptidos originados por procesamiento proteolítico de una prepro-proteína de 145 aminoácidos, de los cuales 19 corresponden a un péptido señal, y 54 a la zona central que origina el primer precursor de Kiss (Tena-Sempere 2006). En humanos, se han descrito cuatro péptidos biológicamente activos, mientras que en ratas sólo se han detectado dos. La característica principal de todos estos péptidos es que comparten los últimos 10 aminoácidos de la región C-terminal, siendo éstos la región responsable de la unión al receptor Kiss1R (o GPR54) (Funes, et al. 2003, Kotani, et al. 2001, Messenger, et al. 2005, Muir, et al. 2001, West, et al. 1998). El neuropéptido kisspeptina es considerado el regulador maestro del eje gonadotrópico y es fundamental en el inicio de la pubertad en mamíferos (Pinilla, et al. 2012, Roa, et al. 2009). Ratones deficientes en el gen que codifica para el receptor de Kiss (GPR54<sup>-/-</sup> o KO), no alcanzan la pubertad y son infértiles, debido a la ausencia de secreción de gonadotropinas. Esto se traduce en un hipogonadismo hipogonadotrófico. Recientemente (Kirilov, et al. 2013), reportó que una reinscripción selectiva del gen Kiss1R mediante un transgén (Tg) en las neuronas GnRH permite el restablecimiento de la pulsatilidad hipotalámica y la recuperación del fenotipo ovárico y testicular en los ratones GPR54<sup>-/-</sup>-Tg. Finalmente la caracterización sexual de estos ratones, resultó en una recuperación de los niveles plasmáticos de FSH, LH y un restablecimiento de la pubertad. Además, los ovarios mostraron signos de crecimiento folicular y ovulación. Respecto a la ovulación, los ratones Tg de 12 meses mostraron una morfología ovárica similar a un fenotipo de envejecimiento adelantado, esto debido a que cerca de un 40% muestra ausencia de cuerpos lúteos a esta edad (Leon, et al. 2016), lo que es anómalo para el caso de los ratones, ya que ellos llegan a un envejecimiento más tardío que las ratas (Finch 2014).



## Evidencias de la función de Kiss en el ovario

Uno de los primeros trabajos que abordaron la relación directa entre la Kiss y el ovario fue realizado por Castellano et al. Estos investigadores mostraron la presencia de Kisspeptina y su receptor en el ovario en diferentes especies, incluyendo el humano (Castellano, et al. 2006a, Castellano, et al. 2006b, Gaytan, et al. 2009, Roa, et al. 2009). Además, se ha descrito que la expresión del gen *kiss1* ovárico varía durante el ciclo estral, con un marcado aumento en el proestro tardío (Castellano, et al. 2006a, Laoharatchathanin, et al. 2015), otorgándole a kisspeptina un posible rol local en respuesta al pico ovulatorio de LH, ya que el bloqueo del mismo por un antagonista de GnRH, previene el aumento de *kiss1* en el ovario (Castellano, et al. 2006a) y la estimulación con 10 UI de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) aumenta 40 veces la expresión de su mRNA (Laoharatchathanin, et al. 2015). En el caso de Kiss1R, Castellano et al, muestran que la expresión de éste receptor no cambia a lo largo del ciclo estral en la rata, y que la inmunoreactividad de Kiss1R se encuentra presente en las CT de folículos en crecimiento, cuerpo lúteo, y células epiteliales de humanos y monos (Castellano, et al. 2006a, Castellano, et al. 2006b, Gaytan, et al. 2009). Por su parte (Laoharatchathanin, et al. 2015), utilizando microdissección láser describen que Kiss es expresada en los folículos y que su aumento inducido por hCG ocurre principalmente en CG (Laoharatchathanin, et al. 2015). Por otro lado, se ha determinado que una incubación *in vitro* de ovarios completos en presencia de Isoproterenol (ISO) (un agonista  $\beta$ -adrenérgico), genera un aumento en la expresión de Kiss intraovárica (Ricu, et al. 2012). Es importante recordar que durante el periodo de senescencia reproductiva, se encuentra aumentada la actividad simpática del ovario de ratas subfértiles (10 meses de edad) comparado con ratas fértiles (6 meses de edad) (Acuna, et al. 2009), por lo que es posible que exista una correlación entre los niveles de Kiss intraovárica y el aumento del tono adrenérgico durante el periodo de subfertilidad.

En síntesis, esta tesis postula que el tono simpático aumentado espontáneamente en el ovario en el periodo de subfertilidad de la rata, incrementa los niveles de kisspeptina, y esta proteína podría tener un rol regulador del reclutamiento folicular durante el envejecimiento ovárico en la rata y posiblemente en el humano. Lo que lleva a postular la siguiente hipótesis.

## **Hipótesis**

“El aumento del tono simpático ovárico durante el periodo de subfertilidad incrementa la expresión de kisspeptina, aumentando el reclutamiento folicular”

## **Objetivo general**

Demostrar que kisspeptina participa en el reclutamiento folicular y que su participación está regulada por la inervación extrínseca del ovario por medio de la noradrenalina.

## **Objetivos específicos**

1. Determinar la participación del sistema nervioso simpático en la expresión de kisspeptina y su receptor durante el envejecimiento ovárico.
2. Determinar si la estimulación con kisspeptina genera cambios en el reclutamiento folicular en ovarios de ratas.
3. Determinar y analizar los cambios morfológicos de los folículos preantrales en el ovario de ratas sometidas a un bloqueo  $\beta$ -adrenérgico crónico.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley adquiridas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones regulares de luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y temperatura (23 a 25°C) con agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales fueron eutanasiados por decapitación utilizando una guillotina para animales menores. Todos los procedimientos experimentales desarrollados en este trabajo cuentan con la aprobación del comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas (CBE-2013-15).

Número total de animales: 116 animales

Objetivo específico N° 1: 20

Objetivo específico N° 2: 66

Objetivo específico N° 3: 30

Para el objetivo 1, se utilizaron 5 animales de cada edad. Las edades a utilizadas son: 6, 8, 10 y 12 meses de edad. Estos animales no recibieron ningún tipo de tratamiento y se les denominó grupo control.

Para el objetivo 2 se utilizaron 30 animales de 5 a 7 días y 36 animales de 8 meses. Los animales no recibieron ningún tipo de tratamiento. Los tejidos fueron extraídos en el momento de la eutanasia para protocolos de cultivo *in vitro* según ha sido realizado por (Mayerhofer, et al. 1997) y (Romero, et al. 2002).

Para el objetivo 3, se utilizaron 10 ratas de 6 meses, 10 animales de 8 meses y 10 animales de 10 meses de edad, para cada grupo. Cinco animales de cada edad fueron utilizados como control de vehículo, lo que consiste en una inyección diaria de suero fisiológico. Los otros 5 animales fueron sometidos a una inyección intraperitoneal diaria de propranolol en una dosis de 5 mg/kg de peso durante 8 semanas, hasta su eutanasia (Fernandois, et al. 2012). Los tejidos fueron utilizados inmediatamente para realizar cultivos de tejido completo *in vitro*, almacenados a -80°C para su posterior uso, o fijados en solución Bouin para realizar estudios histológicos.

Los ovarios para el experimento de cuantificación de mRNA de ratón silvestre y transgénico (que no expresan el receptor de kisspeptina) fueron otorgados por el Dr. Manuel Tena-Sempere del Instituto Maimónides de Investigaciones Biomédicas (IMIBIC) de la ciudad de Córdoba, España. Estos consisten en 5 ovarios de ratones silvestres (WT), 9 ovarios de ratas con ausencia del Kiss1R (KO) y ratas con una re inserción de Kiss1R en un transgén bajo el promotor de GnRH en un cromosoma bacteriano (Tg).

### **Ciclicidad estral.**

Para determinar las variaciones del ciclo reproductivo de las ratas, se registra la variación de su ciclo estral por observación microscópica del frotis vaginal. En un ciclo normal, la ovulación será considerada como un paso de Proestro a Estro seguido de un Diestro. El ciclo estral de cada animal se seguirá por al menos 15 días previo a la utilización de los tejidos. Este tiempo es suficiente para determinar un promedio de 4 ciclos en el animal.

### **Administración de propranolol**

Ratas de 6, 8 y 10 meses de edad fueron tratadas durante 2 meses con una dosis diaria de 5 mg/kg de DL-Propranolol HCl (1-isoprilamino-3-naftiloxi-2-propanol HCl;

Laboratorios Sigma N° P-0884), administrado por vía intraperitoneal en una solución de suero fisiológico. Como control, se utilizó una serie de animales bajo las mismas condiciones, pero con una inyección de suero fisiológico (1ml/Kg), que corresponde al vehículo de administración. La administración del fármaco durante dos meses, considera los días necesarios para observar el desarrollo completo de una 1 cohorte folicular en la rata (McGee and Hsueh 2000).

Luego del tratamiento y posterior eutanasia, los tejidos se guardaron a -80°C y los ovarios seleccionados para histología fueron fijados en solución Bouin.

### **Sección quirúrgica bilateral del Nervio ovárico superior.**

Ratas de 7, 9 y 11 meses de edad fueron sometidas a la cirugía. La cirugía se realizó de acuerdo a lo descrito previamente por la literatura (Barria, et al. 1993), donde mediante una incisión dorsal se buscan y exponen ambos ovarios para seccionar el SON con tijeras (SONX). Para los animales controles (Sham) se realiza el mismo procedimiento de exposición y manipulación del tejido, pero sin realizar el corte del nervio. Este procedimiento fue realizado por el Dr. Hernán Lara en el Laboratorio de Neurobioquímica, quien cuenta con amplia experiencia en este procedimiento quirúrgico. Luego de 16 días los animales fueron eutanasiados y los tejidos se guardaron a -80°C hasta su procesamiento

### **Incubación de ovarios completos *in vitro***

Se realizaron dos protocolos de incubación *in vitro* del ovario completo en medio DMEM-F12 suplementado según los protocolos de (Mayerhofer, et al. 1997) y (Romero, et al. 2002). Estos ovarios fueron estimulados farmacológicamente en las siguientes combinaciones experimentales:

- Control            Medio DMEM-F12, sin estímulo farmacológico
- Kiss                [100 ng/μL]
- Kiss + ISO        [100 ng/μL + 20μM]
- Kiss + P234      [100 ng/μL + 1μg/μL]
- ISO                [20 μM]
- ISO+P234        [20 μM + 1μg/μL]

La primera incubación tuvo una duración de 8 hrs. donde mediante un procedimiento de combinaciones farmacológicas de ISO, Kiss y su antagonista el péptido p234 en las concentraciones mencionadas anteriormente. Finalizado el tiempo de incubación se determinó la expresión del receptor de FSH.

El segundo protocolo consiste en una incubación *in vitro* durante 32 hrs (8 hrs de estimulación farmacológica + 24 hrs de estimulación con FSH), para determinar cambios en el reclutamiento folicular producto de las combinaciones farmacológicas utilizadas en la primera incubación. Finalizado el protocolo los ovarios fueron fijados en solución Bouin para determinar el efecto del tratamiento sobre el reclutamiento folicular mediante el recuento y medición de tamaño de los folículos secundarios.

### **Cuantificación de la Hormona AMH y FSH en suero.**

Los animales fueron eutanasiados por decapitación y durante este procedimiento se recolectó la sangre cervical en tubos de vidrio y se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos para cuantificar las hormonas AMH y FSH. Los sueros recolectados fueron almacenados a -60°C hasta su utilización. La determinación de las hormonas se realizó mediante un kit de ELISA específico para rata de la empresa Cusabio Biotech CO, Ltd. Para la AMH se utilizó el kit CSB-E11162r y para la FSH el kit CSB-E06869r. Para la AMH la sensibilidad corresponde a 0,375 ng/mL y no se informan reacciones cruzadas

con otros componentes. Para la FSH la sensibilidad corresponde a 0,07 mUI/mL y no se informan reacciones cruzadas con otros componentes.

### **Análisis Morfológico del Ovario.**

Los ovarios fueron inmersos en solución fijadora Bouin, seguido de una solidificación en parafina, para ser cortados en láminas de 6 µm de espesor. El tejido fue teñido con una solución de Hematoxilina-Eosina. Los folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales fueron medidos y contados según los criterios establecido por (Brawer, et al. 1986, Cruz, et al. 2012, Hirshfield and Midgley 1978a, Lara, et al. 1993). Se analizaron todas las secciones del ovario.

### **Determinación de los niveles de mRNA en ovario de rata**

Se realizó una extracción de RNA total de los ovarios utilizando el kit comercial E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, de la compañía Omega Bio-tek. Un µg de RNA total fue sometido a transcripción inversa utilizando la enzima SuperScript® II (Invitrogen™, ThermoScientific) en un volumen final de 20 uL. Para la cuantificación de los niveles de mRNA, se realizó un qPCR utilizando el fluoróforo SybrGreen™ (Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies) y con 200 ng de cDNA por reacción, se cuantificó el gen de interés (Tabla 1). El equipo IQ5 multicolor real time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories Inc) fue utilizado para la detección. Las curvas de calibración para cada gen se confeccionaron en base a una purificación del segmento amplificado. Las purificaciones se realizaron con el sistema Diffinity RapidTips® de la compañía Deffinity Genomics, y las condiciones de alineamiento para cada gen se resumen en la Tabla 2.



**Tabla 1.- Secuencia de los partidores utilizados para amplificación por PCR en tiempo real para rata.**

	Sentido 5' → 3'	Antisentido 5' → 3'	acceso Genebank
FSHR	CAT CAC TGT GTC CAA GGC CA	TGCGGAAGTTCTTGGTGAAAA	AF095642
Kiss	CCGGACCCCAGGAACTCG	CGTAGCGCAGGCCAAAGGAG	NM_181692
Kiss1R	TTCTACATCGCTAACCTGGCG	TCATGGCTGTCAAAGTGGCA	AF115516.1
GDF9	TCC TAAACCCAGCAGAAGTCACCT	AGCAGCGTTGTTTCAGAGTGTA	NM_021672.1
BMPR2	TTCCAGCTTGCTTTATCCACTCAT	ATT TTAGCCGGGGTTCTTTAGTTG	NM_080407.1

**Tabla 2.- Condiciones de qPCR por gen.**

	Tiempo de denaturación (s x °C)	Temperatura y tiempo de alineamiento (s x °C)	Tiempo de extensión (s x °C)
FSHR	95 x 20	60 x 20	72 x 30
Kiss	95 x 15	62,5 x 20	72 x 30
Kiss1R	95 x 15	57 x 20	72 x 30
GDF9	95 x 15	62 x 20	72 x 30
BMPR2	95 x 15	60 x 20	72 x 30

### **Determinación de los niveles de mRNA en ovario de ratón**

Se realizó una extracción de RNA total de los ovarios utilizando el método de TRIsure™ (Bioline, Meridian Life Science Company). Se realizó un RT-PCR seguido de un qPCR utilizando el fluoróforo iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc), se cuantificó el gen de interés (ver Tabla 3). Las curvas de calibración se confeccionaron en base a diluciones seriadas de una muestra de cDNA con contenido conocido. El equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc) fue utilizado para la detección.

**Tabla 3.- Secuencia de los partidores utilizados para amplificación por PCR en tiempo real para ovario de ratón.**

	Sentido 5' → 3'	Antisentido 5' → 3'	acceso Genebank
GDF9	GTCACCTCTACAATACCGTCCG	CACCCGGTCCAGGTAAACA	NM_008110,2
BMPRII	GTGTTATGGTCTGTGGGAGAAAT	AAAGCGGTACGTTCCATTCTG	NM_007561
BMP15	AGATGAAGCAATGGCCCCAA	AGTGCTTGGTCCGGCATTTA	NM_009757,4
P450scc	CACAGACGCATCAAGCAGCAAAA	GCATTGATGAACCGCTGGGC	NM_019779
Hsd17b3	ATGGGCAGTGATTACCGGAGCA	TACAATCTTCACACAGCTTCCAGTGGTC	NM_008291
AMH	TCCTACATCTGGCTGAAGTGATATGGG	AGGTTCTGTGTGCCCCGCAG	NM_007445
Fshr	GGCCAGGTCAACATACCGCTTG	TGCCTGAAATAGACTTGTGCAAATTG	NM_013523
Lhr	CAGGAATTTGCCGAAGAAAGAACAAGAAATT	CAGAAGTCATAATCGTAATCCCAGC CA	NM_013582
esr1	TGTGTCCAGCTACAAACCAATG	CATCATGCCCACTTCGTAACA	NM_007956
esr2	ACACCTTGCTGTAAACAGAGA	GCAGAAGTGAGCATCCCTCTT	NM_207707,1
Pgr	GGGGTGGAGGTCGTACAAG	GCGAGTAGAATGACAGCTCCTT	NM_008829,2
cyp19a1	ACTACATCTCCCGATTCGGCA	GGGTCAACACATCCACGTAGC	NM_007810,3

### **Determinación del contenido ovárico de Kisspeptina, FSHR y Receptor de Kisspeptina.**

Kiss fue determinada mediante western blot (WB) bajo condiciones reductoras. En resumen, se realizó la detección de Kiss ovárica con una separación por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, se bloquearon con leche al 5% p/v en solución TBST 0,1% v/v durante 1 h y se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Kisspeptin (ab19028, Abcam, Inc.) en una dilución de 1:50 durante toda la noche. Los complejos de anticuerpos se detectaron usando anticuerpo de cabra anti-conejo IgG Fc (HRP) (ab97200, Abcam, Inc.) a una dilución 1:2.000. El FSHR y el receptor de Kiss (Kis1R) fueron determinados en un gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con leche al 5% p/v en solución TBST 0,1% v/v durante 1 h. Los anticuerpos

utilizados fueron: anticuerpo policlonal de conejo anti-FSHR (NBP1-46302, Novus Biologicals) en una dilución de 1:10.000 y el anticuerpo policlonal de conejo anti-Kiss1R (AKR-001, Alomone Labs) en una dilución de 1:5.000 por una hora a temperatura ambiente. Para la proteína constitutiva se utilizó una dilución 1:40.000 del anticuerpo policlonal de conejo anti-GAPDH (G9545, Sigma-Aldrich Co.) durante 1 h a temperatura ambiente. Los complejos de anticuerpos se detectaron usando anticuerpo de cabra anti-conejo IgG Fc (HRP) (ab97200, Abcam, Inc.) a 1:10.000. La quimioluminiscencia se obtuvo utilizando el kit EZ-ECL (Biological Industries). La quimioluminiscencia fue capturada utilizando el sistema Syngene G-Box (Sede Syngene).

### **Tamaño muestral**

El tamaño muestral fue determinado de acuerdo a la fórmula de Taucher:  $N=2x(Z\alpha/2 + Z\beta)^2 \times s^2/D^2$ , donde  $Z\alpha$  corresponde a la probabilidad de cometer un error tipo I (5%) y  $Z\beta$  a la probabilidad de cometer error tipo II (20%), con un nivel de significancia mínima de 0.05.

### **Análisis Estadísticos**

Los resultados son graficados como las veces de cambio sobre el control. El grupo control se consideró el grupo de 6 meses para los análisis por edad. Para los análisis entre propranolol y salino o para SONX y Sham, se considera como control en grupo salino y sham respectivamente. Considerando esto, el grupo control adquiere el valor de 1. Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales fueron analizadas utilizando el test de Student entre salino y propranolol o entre Sham y SONX. ANOVA de una vía o de Kruskal-Wallis según corresponda, para los análisis entre la condición edad, seguido por un post-test de Fisher o una comparación múltiple de Dunn según corresponda. Se consideraron diferencias significativas con un valor de  $p < 0,05$ . Los cálculos estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism para Windows v6.01.

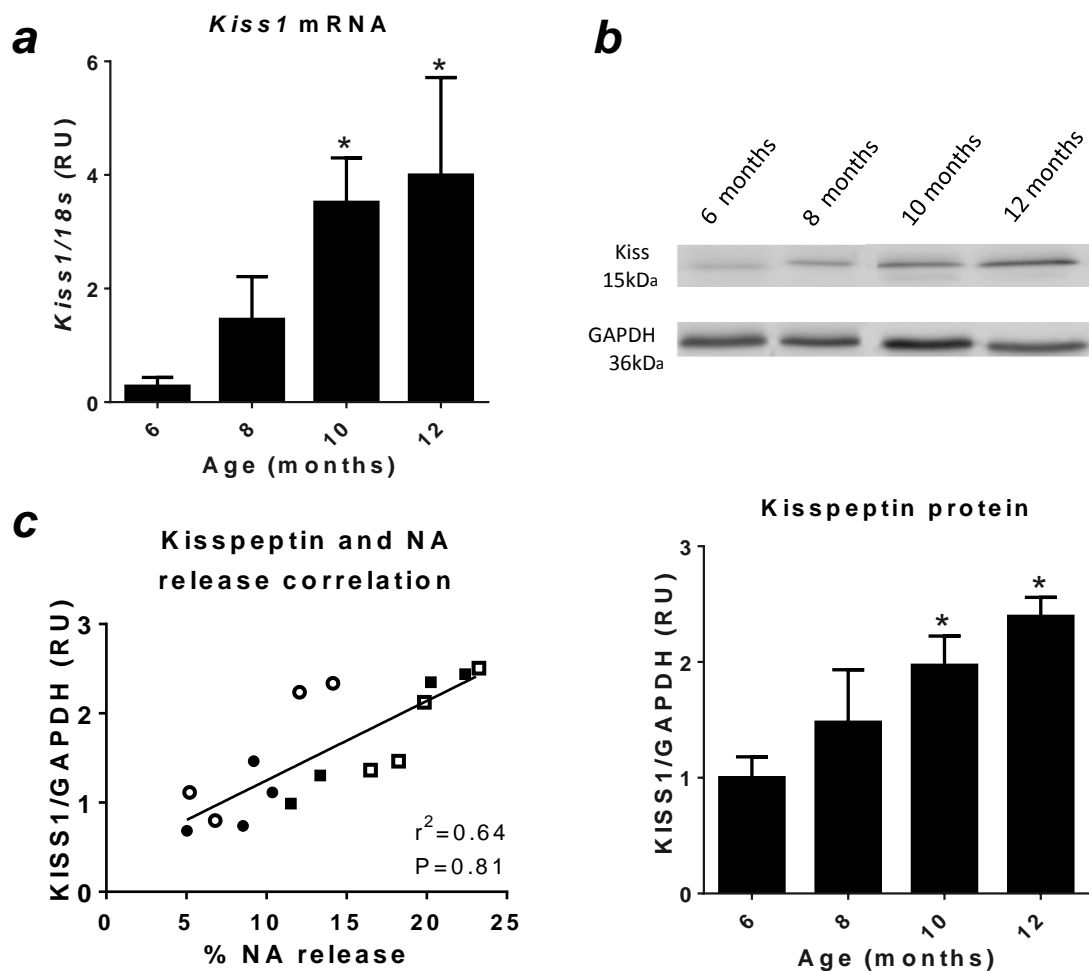
## Resultados

### **Objetivo 1:**

Determinar la participación del sistema nervioso simpático en la expresión de Kiss y su receptor durante el envejecimiento ovárico

### **El péptido Kiss aumenta durante el envejecimiento ovárico, y se correlaciona con el aumento del tono adrenérgico.**

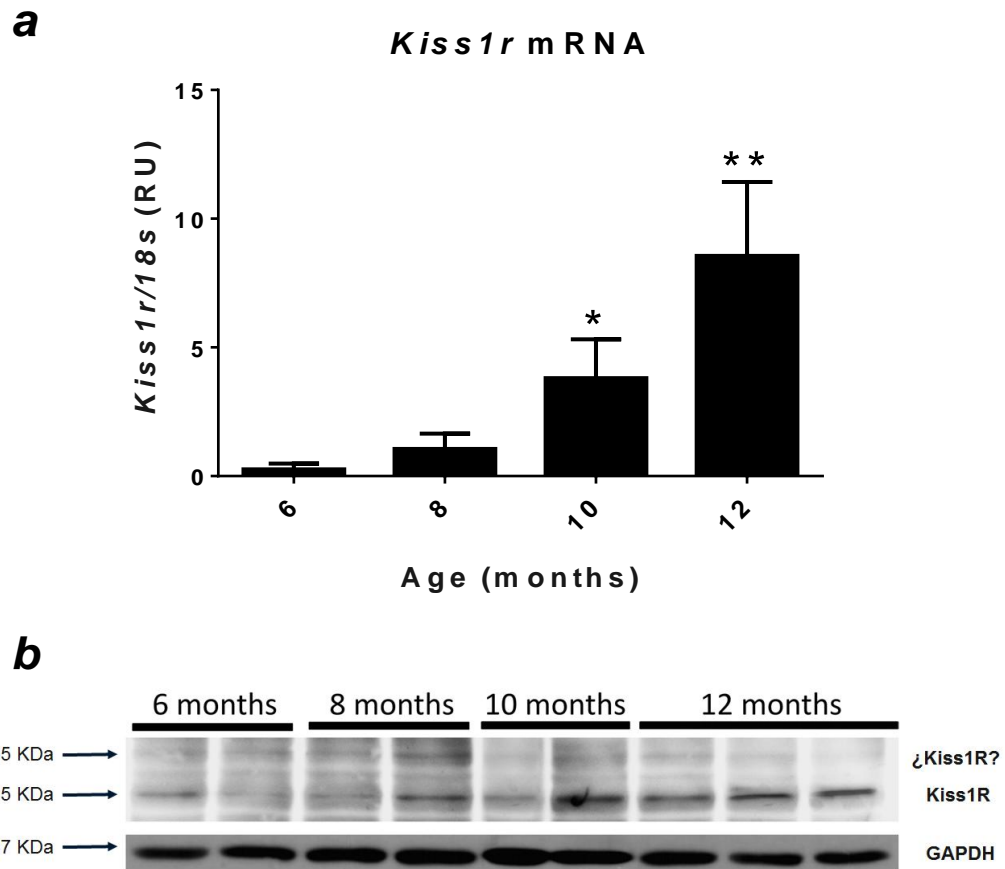
Experimentos previos han demostrado que un estímulo adrenérgico es capaz de aumentar la expresión de Kiss (Ricu, et al. 2012), por lo tanto, y considerando que el ovario presenta un aumento del tono adrenérgico espontáneo entre los 8 y 12 meses de edad (Acuna, et al. 2009), nosotros quisimos observar, si a estas edades se presenta un aumento de Kiss intraovárica. Al respecto, la Figura 1 muestra los cambios en la expresión de Kiss durante el envejecimiento en el ovario de rata. El panel A muestra un incremento en los niveles del mRNA de Kiss a los 10 y 12 meses de edad (periodo de subfertilidad), comparado con el periodo fértil (6 meses de edad). El panel B de la Figura 1 muestra que los niveles del péptido Kiss determinados por WB siguen el mismo patrón que los niveles de mRNA. Dado que la expresión de Kiss puede ser inducida por un estímulo adrenérgico (Ricu, et al. 2012), se realizó un análisis de correlación (panel C) entre el Kiss y la liberación de NA, como un reflejo de la funcionalidad y el tono adrenérgico en el ovario. El análisis mostró una alta correlación entre los niveles del péptido Kiss y la liberación de NA desde el ovario (el factor de correlación de Pearson=0,81), indicando una posible acción del tono adrenérgico sobre la expresión de Kiss. Por su parte, la Figura 2 muestra que el mRNA que codifica para el receptor de Kiss posee un aumento significativo a los 10 y 12 meses de edad comparado con los 6 meses de edad, siguiendo el mismo patrón de expresión que presenta Kiss.



**Figura 1. Kiss aumenta en el envejecimiento ovárico.** A) Los niveles del mRNA de Kiss ovárica de ratas Sprague-Dawley se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen 18S. N = 11 para 6 meses de edad, N = 8 por 8 meses de edad, N = 6 para 10 meses de edad y N = 8 para 12 meses de edad. B) Los niveles de proteína se cuantificaron por Western blot; cada muestra se evaluó 3 veces. Los valores de Kiss se normalizaron con la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J; N = 4 para cada condición. C) Correlación entre Kiss y el porcentaje de liberación de noradrenalina inducida por la despolarización eléctrica. Los resultados se expresan como el total de  $^3\text{H}$ -NA liberada por despolarización eléctrica respecto de la incorporación previa de NA. Se calculó la correlación entre los niveles de Kiss que se muestran en el panel B. Los círculos negros corresponden a las mediciones de 6 meses de edad, los círculos blancos a 8 meses, los cuadrados negros a 10 meses y los cuadrados blancos a 12 meses. Los resultados se representan como la media  $\pm$  SEM. Estadística: para el gráfico A, se obtuvo la significancia con la prueba de Kruskal-Wallis, seguido por una comparación múltiple de Dunn; para B, se obtuvo la significancia utilizando un ANOVA de una vía, seguido por una prueba de comparaciones múltiples.  $p < 0,05 = *$ . La correlación se determinó usando el ensayo de Pearson. Los asteriscos indican diferencias en comparación con los 6 meses de edad. Para A y B los datos se grafican como las veces de cambio sobre 6 meses como control.

### **El mRNA de Kiss1R aumenta durante el envejecimiento ovárico.**

Respecto al Kiss1R, los resultados muestran que el mRNA de Kiss1R también aumenta durante el envejecimiento ovárico, siendo el incremento significativo a los 10 y 12 meses de edad, comparado con los 6 meses de edad (Figura 2A). Respecto de la proteína, la cuantificación no se pudo llevar a cabo debido a que a pesar de utilizar 2 anticuerpos, de diferentes compañías, ninguno genera una marca que para nuestros estándares, nos entreguen la seguridad de la cuantificación. Esto se debe a que se observa una marca nítida a los 45 KDa (peso predicho de la proteína 43 KDa), pero además, una marca a los 55 KDa puede ser levemente observada. Esta segunda marca comercial (55 KDa) también fue observada con un segundo anticuerpo de otra marca, por lo que podría corresponder a una modificación postraducciona, por ejemplo a una glicosilación del receptor. A pesar de este inconveniente, la imagen de la Figura 2B muestra que, al menos visualmente, existiría un posible aumento de la proteína de Kiss1R.

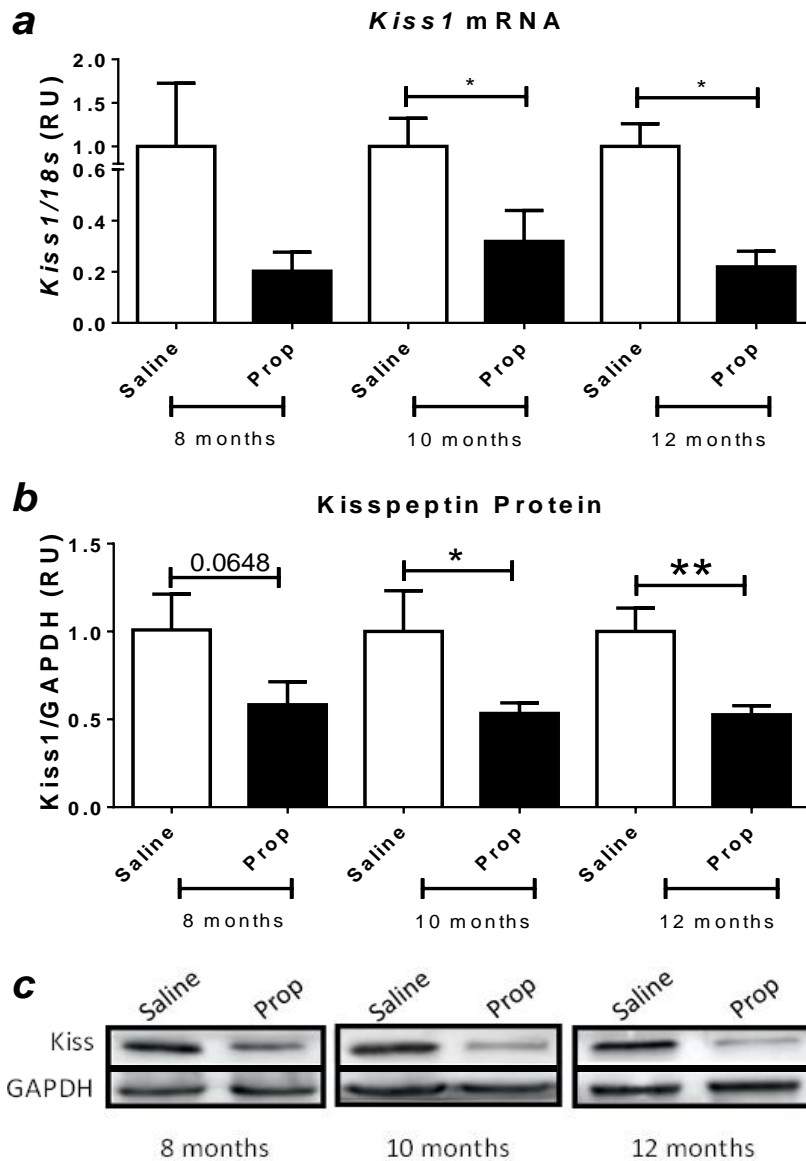


**Figura 2. El mRNA de Kiss1R aumenta durante el envejecimiento ovárico.** A) los niveles del mRNA del receptor de Kiss ovárica de ratas Sprague-Dawley se cuantificaron por RT-qPCR. Los niveles de mRNA se normalizaron con el gen 18S. N = 10 para 6 meses de edad, N = 5 por 8 meses de edad, N = 6 para 10 meses de edad y N = 6 para 12 meses de edad. B) Imagen representativa de un WB para el Kiss1R. Entre signos de interrogación se muestra la banda que posiblemente corresponda a Kiss1R con alguna modificación postraduccional. Para A la significancia se obtuvo con la prueba de Kruskal-Wallis, seguido por una comparación múltiple de Dunn.  $p < 0,05 = *$  y  $p < 0,01 = **$ . Los asteriscos indican diferencias en comparación con los 6 meses de edad. Los datos se grafican como las veces de cambio sobre 6 meses como control.

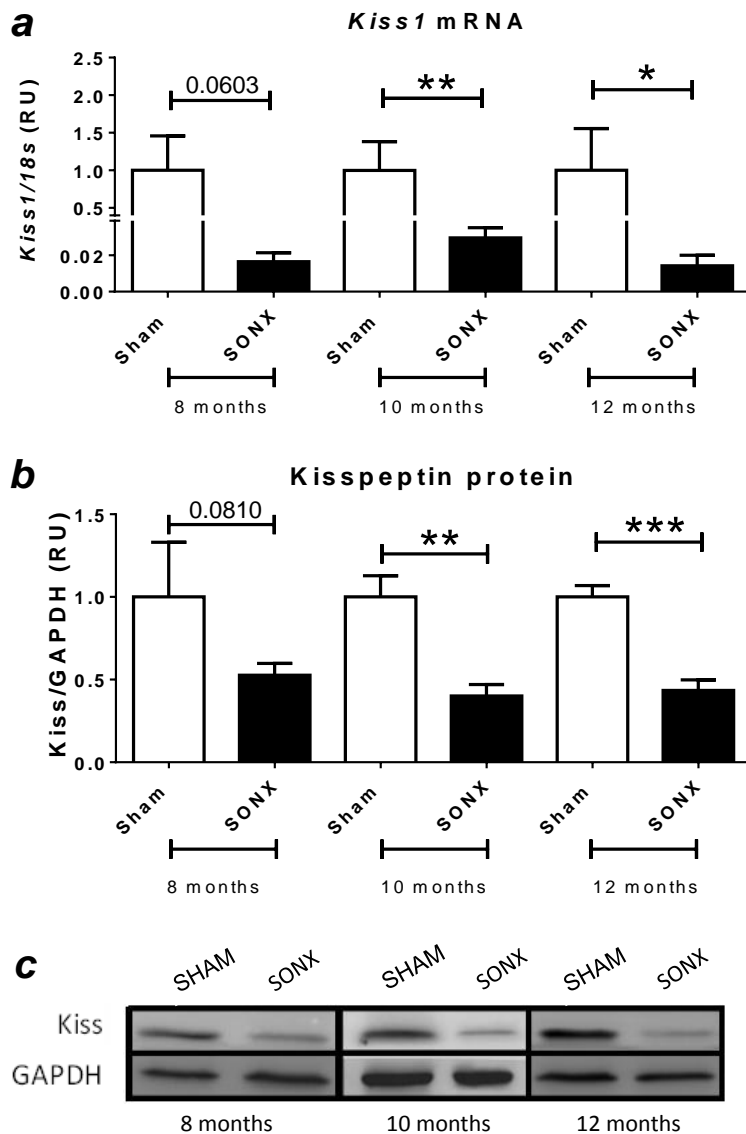
## **El bloqueo $\beta$ -adrenérgico o una denervación quirúrgica del ovario disminuye la expresión de Kiss ovárica.**

Para observar el efecto de bloqueo  $\beta$ -adrenérgico sobre la expresión ovárica de Kiss se utilizaron ratas de 6, 8 y 10 meses de edad, las que fueron tratadas con propranolol durante 2 meses, y tal como se observa en el anexo, no se apreciaron cambios del peso corporal durante el tratamiento, pero si una mejora en la ciclicidad estral, tal como se había reportado previamente (Fernandois, et al. 2016). Por otro lado, la Figura 3 muestra que la expresión de Kiss disminuye significativamente a los 10 y 12 meses de edad, respecto de su control. Dado que el propranolol se administró por vía intraperitoneal podría tener una acción central, así como periférica inespecífica, se realizó el experimento SONX para aportar selectividad y para demostrar el efecto local de la inervación simpática intraovárica sobre la expresión de Kiss. La Figura 4 muestra que las ratas de 10 y 12 meses de edad, sometidas a denervación quirúrgica, presentan una disminución significativa en la expresión de Kiss respecto de su control. En cuanto al Kiss1R, la Figura 5 muestra que los niveles del mRNA del receptor no varían con el bloqueo farmacológico del sistema adrenérgico, pero estos disminuyen significativamente con una denervación quirúrgica respecto de su control a los 8, 10 y 12 meses de edad.

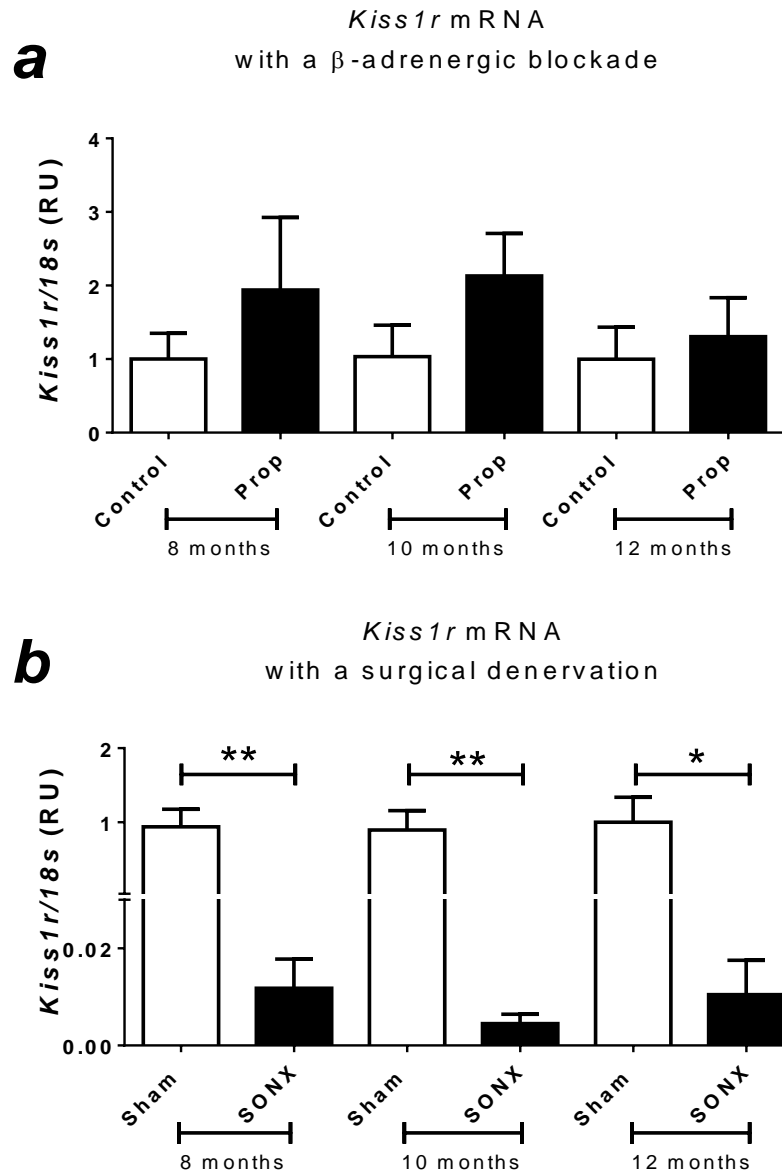




**Figura 3 La expresión de Kiss intraovárica disminuye con el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico.** A) Los niveles ováricos del mRNA de Kiss de ratas Sprague-Dawley se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen 18S. N = 6 para cada edad. B) Los niveles de proteína se cuantificaron por Western blot; cada muestra se evaluó 3 veces. C) Figura representativa de un WB de Kiss en cada condición. Los valores de Kiss se normalizaron con la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J; N = 5 para cada condición. La significancia se obtuvo con un t-test de Student entre control y propranolol.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ . Se grafica el promedio de las veces sobre el control  $\pm$  SEM. Los datos se grafican como las veces de cambio sobre su propio control.



**Figura 4 .- La expresión de Kiss intraovárica disminuye con SONX.** A) Los niveles ováricos del mRNA de Kiss de ratas Sprague-Dawley se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen 18S. N = 5 para cada edad. B) Los niveles de proteína se cuantificaron por WB; cada muestra se evaluó 3 veces y C) Figura representativa de un WB de Kiss en cada condición. Los valores de Kiss se normalizaron con la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J; N = 5 para cada condición. La significancia se obtuvo con un t-test de Student entre control y propranolol.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  y  $p < 0,001 = ***$ . Se grafica el promedio de las veces sobre el control  $\pm$  SEM. Los datos se grafican como las veces de cambio sobre su propio control.



**Figura 5.- Niveles de mRNA de Kiss1R.** Los niveles ováricos del mRNA del Kiss1R de ratas Sprague-Dawley se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen 18S. A) Representa la determinación en animales tratados con propranolol, N = 6 para cada edad y en B) Los animales SONX comparados con los Sham, N=5 para cada condición. La significancia se obtuvo con un t-test de Student entre control y propranolol.  $p < 0,05 = *$   $p < 0,01 = **$ . Se grafica el promedio de las veces sobre el control  $\pm$  SEM. Los datos se grafican como las veces de cambio sobre su propio control.

## **Resumen del objetivo 1**

- La expresión de Kiss ovárica aumenta durante el envejecimiento reproductivo.
- La expresión de Kiss ovárica se correlaciona positivamente con el tono adrenérgico. Efecto observado con la correlación de Pearson entre el porcentaje de liberación de NA y los niveles intraováricos de Kiss, sumado a la disminución en la expresión de Kiss bajo un bloqueo  $\beta$ -adrenérgico y SONX.
- Los niveles del mRNA de Kiss1R no varían con el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico. Sin embargo, SONX disminuye el mRNA de Kiss1R en el ovario.

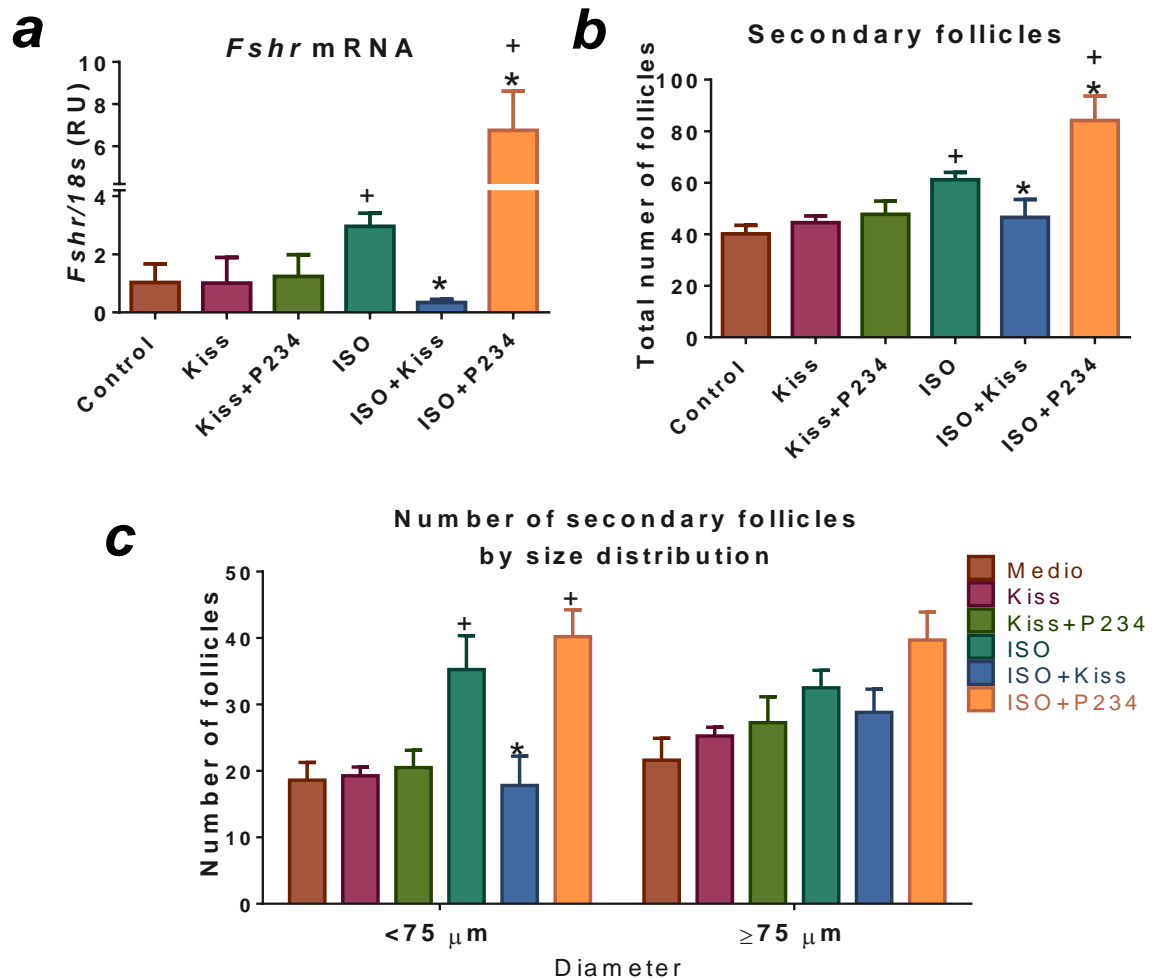
## **Objetivo 2**

Determinar si la estimulación farmacológica con Kiss genera cambios en el reclutamiento folicular de ovarios de ratas.

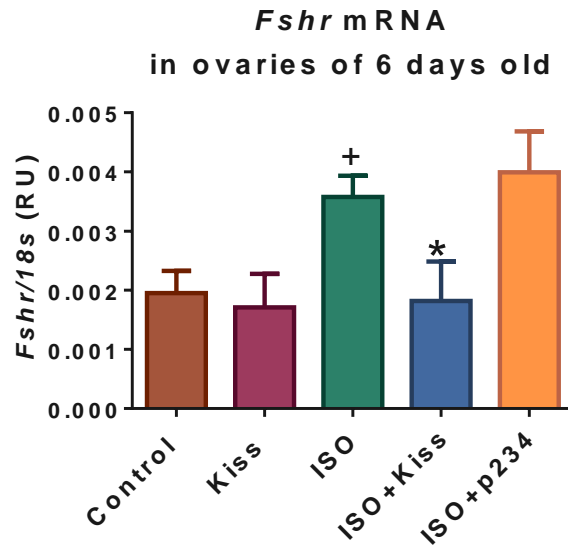
### **El péptido Kiss afecta el desarrollo folicular, modulando los folículos secundarios a través del FSHR.**

Debido a que el FSHR es un factor clave para el desarrollo y crecimiento folicular, se evaluaron los efectos de Kiss en la expresión de FSHR, inducida por un estímulo adrenérgico. Para este fin, se realizó un ensayo *in vitro* del ovario. Los ovarios fueron incubados en presencia de Kiss, P234, ISO (agonista  $\beta$ -adrenérgico capaz de inducir la expresión del FSHR) por 8 hrs. Luego se incubó con FSH por 24 hrs. para ver la funcionalidad del receptor, y se cuantificaron los folículos secundarios. La Figura 6A muestra que Kiss por sí sola no es capaz de inducir la expresión de FSHR. A pesar de esto, cuando Kiss se co-incubó con ISO, se produjo una disminución significativa en los niveles del mRNA de FSHR en comparación con los ovarios tratados con ISO. En contraste, cuando ISO se co-incuba con P234, este péptido produce una potenciación del efecto de ISO sobre el aumento del mRNA de FSHR. La Figura 6B muestra la cuantificación de los folículos secundarios luego de la estimulación de los ovarios con FSH en cada condición experimental. Los resultados muestran que FSH aumenta el número de folículos secundarios en el grupo incubado con ISO, en comparación con los controles. Además, se observó una disminución del número de folículos secundarios en el grupo ISO + Kiss y un aumento en el grupo ISO + P234. En resumen, la Figura 6 muestra que Kiss evita la inducción de la expresión del FSHR inducida por ISO, lo que se traduce en un menor recuento de folículos secundarios. Además, como se muestra en la Figura 6 C, la incubación con ISO e ISO + P234 genera un incremento en la cantidad de folículos secundarios de menor tamaño ( $<75 \mu\text{m}$ ), mientras que ISO + Kiss previene este aumento.

Por otro lado, dado que el ovario adulto presenta estructuras foliculares en diferentes estados de desarrollo, entre ellos folículos antrales y cuerpos lúteos, pensamos que el efecto de Kiss podría ser indirecto. Para descartar esta posibilidad se realizó una segunda incubación, esta vez con ovarios de 7 días, para evitar esta interferencia por folículos de mayor tamaño. La Figura 7 muestra que en la co-incubación de ISO con Kiss, Kiss evita el aumento de la expresión del FSHR producido por ISO en el ovario de ratas de 7 días, al igual que como ocurre en ratas de 8 meses de edad.



**Figura 6.- Efectos de Kiss e ISO sobre el FSHR.** A) los niveles del mRNA del FSHR se midieron con una incubación *ex vivo* en ovarios de 8 meses de edad; los ovarios se incubaron ya sea con Kiss 100 ng/ml, ISO 20 mM (ISO) y P234 1 mg/ml, o una combinación como se indica. Los niveles del mRNA de FSHR se normalizaron con el gen 18S, N = 6 para cada condición. Los datos se grafican como las veces de cambio sobre su propio control. B) Número de folículos secundarios por observación microscópica después de la estimulación farmacológica como en A y una subsecuente incubación de 24 horas con FSH. C) Cuantificación del número de folículos secundarios por tamaño. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. La significancia se obtuvo con un ANOVA de una vía seguido de por una prueba de comparación múltiple.  $p < 0,05 = *$  o +,  $p < 0,01 = **$  o ++. Los asteriscos (\*) representan diferencias en comparación con la condición de ISO, y el signo más (+) representa diferencias en comparación con el control.



**Figura 7.- Efectos de Kiss e ISO sobre el FSHR en los folículos preantrales.** A) Los niveles del mRNA de receptor de FSH se midieron en una incubación *ex vivo* de ovarios a los 5-7 días; los ovarios se incubaron ya sea con Kiss 100 ng/ml, ISO 20 mM y P234 1 mg/mL, o una combinación como se indica. Los niveles del mRNA de FSHR se normalizaron con el gen 18S, N = 6 para cada condición. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de n=6 ovarios para cada condición. La significancia se obtuvo mediante ANOVA de una vía seguido por un test de Fisher.  $p < 0,05 = *$  y +. Los asteriscos (\*) representan diferencias en comparación con la condición de ISO, y el signo (+) representa diferencias en comparación con el control.

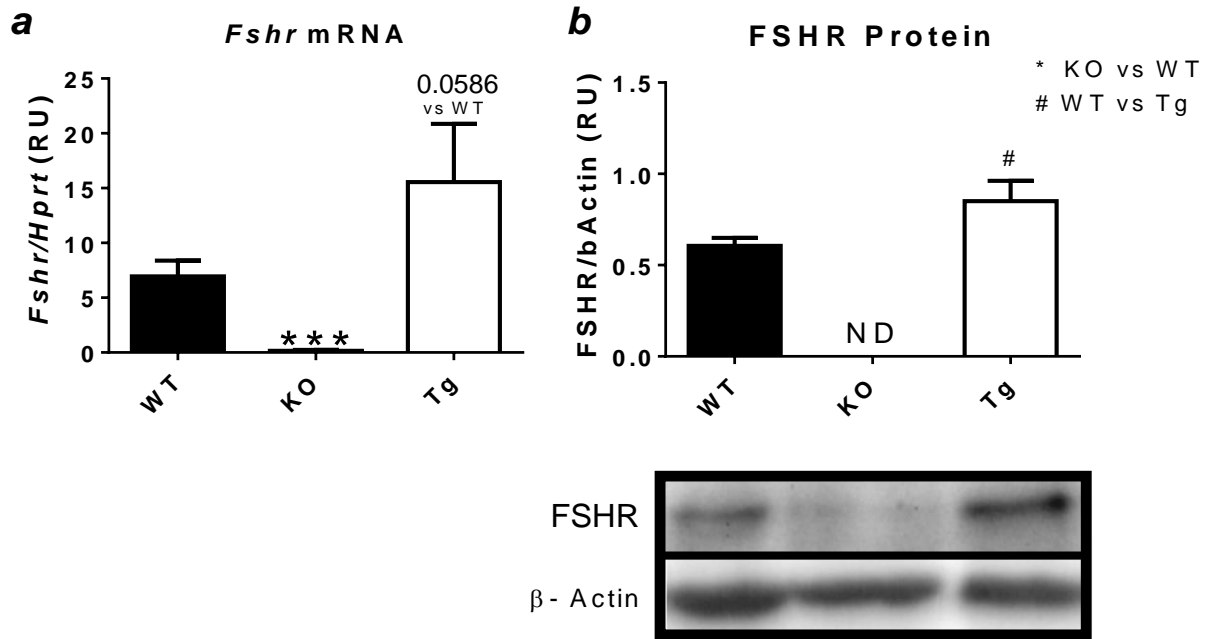


## **La ausencia periférica de Kiss1R modifica los niveles de mRNA de marcadores del desarrollo folicular**

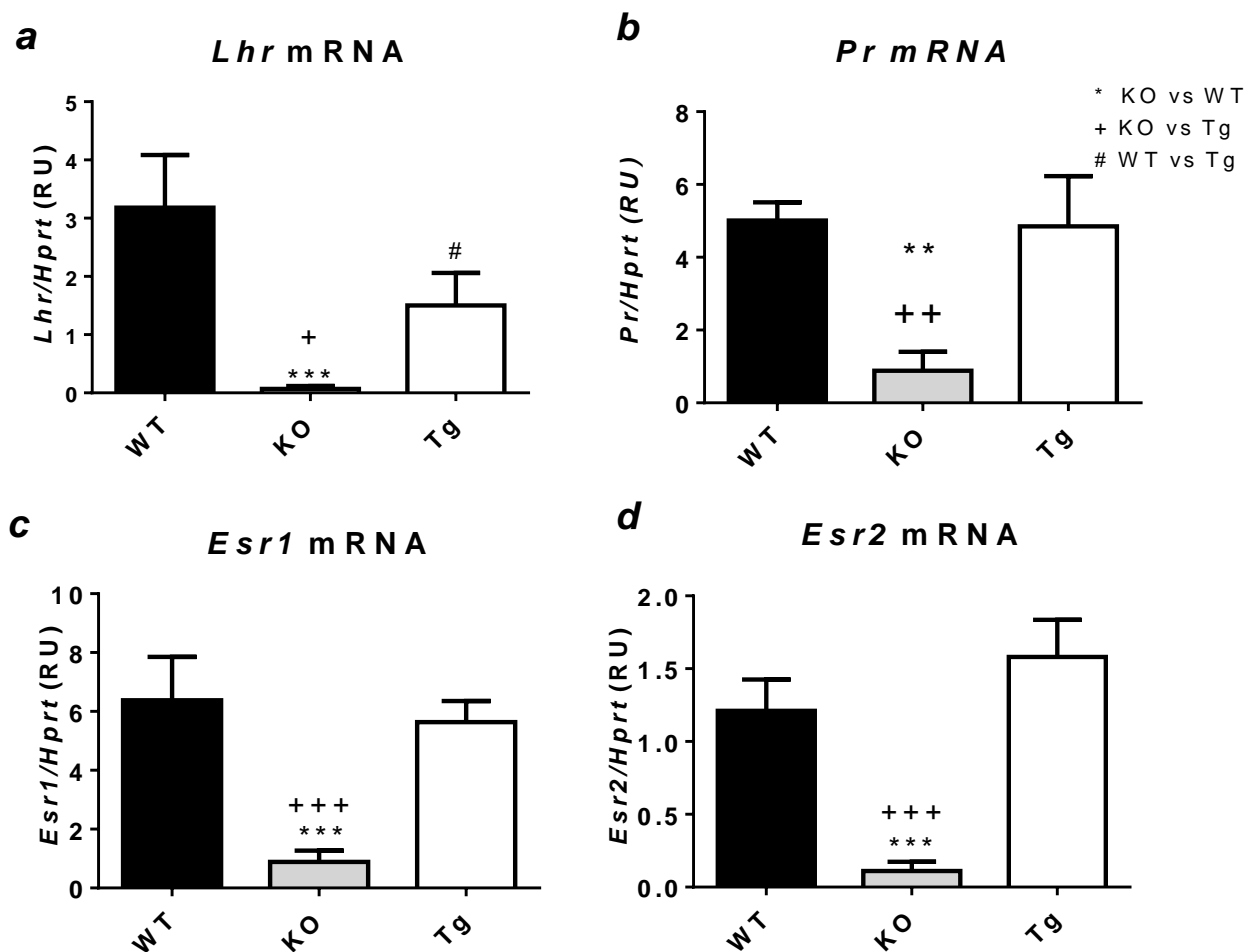
Se ha caracterizado que ratones KO para el Kiss1R (GPR54<sup>-/-</sup>) son infértiles, dado que la ausencia del receptor evita la señalización de Kiss a nivel central, bloqueando la secreción de las gonadotropinas necesarias para el correcto desarrollo ovárico. Dado esto, los ratones GPR54<sup>-/-</sup> no poseen desarrollo folicular y se observa atrofia ovárica. Utilizando un modelo de reincorporación selectiva del receptor de Kiss en las neuronas GnRH (Tg), se ha logrado desarrollar un ratón que posee una recuperación del eje gonadotrófico a nivel central, pero ausencia del receptor de Kiss a nivel periférico. Estos ratones recuperan la secreción pulsátil de gonadotropinas, la ovulación, la ciclicidad estral y finalmente la recuperación de la condición de hipogonadismo hipogonadotrófico. Para nuestros experimentos se obtuvieron ovarios de ratón de 4 meses de edad y se analizó por qPCR y western blot los niveles de diferentes genes involucrados en el desarrollo folicular ovárico. La Figura 8 muestra que existe un aumento de la expresión del FSHR en los ovarios del ratón Tg versus los WT. Por otro lado, se analizaron otros receptores importantes para la función ovárica, y se encuentra una disminución significativa del LHR en los ovarios de ratón Tg (Figura 9A), sin afectar los niveles del ESR1, ESR2 y receptor de progesterona (Figura 9 B, C y D respectivamente). Por otro lado, se observa un aumento del mRNA de algunos factores paracrinos involucrados en el reclutamiento folicular. La Figura 10B muestra un aumento significativo de BMP15 en los ratones Tg respecto del WT. Dado que BMP15 es un factor secretado por los ovocitos que han ingresado a desarrollo y que establece comunicación entre el ovocito y las CG, un aumento en este factor es un indicador indirecto del número de folículos reclutados. Por otro lado la Figura 10C muestra que los ratones Tg muestran un aumento de AMH respecto del WT, reforzando la idea de que existe un aumento del reclutamiento folicular en estos ovarios. No se observan cambios a niveles del mRNA de GDF9 ni de BMPR2, que es el receptor de GDF9 y BMP15 (Figura 9A y D respectivamente). Finalmente, como se indica en la Figura 11, se

seleccionaron 3 enzimas características de la vía de síntesis de esteroides, la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450scc), la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) encargada de la síntesis de testosterona y la aromatasa, encargada de la síntesis de estradiol. Los análisis muestran que los ratones Tg no poseen cambios en los niveles de mRNA de las enzimas 17 $\beta$ -HSD ni en la Aromatasa (Figura 13 A y B), pero se observa un aumento de la expresión (mRNA y proteína) de la enzima P450scc (Figura 12).

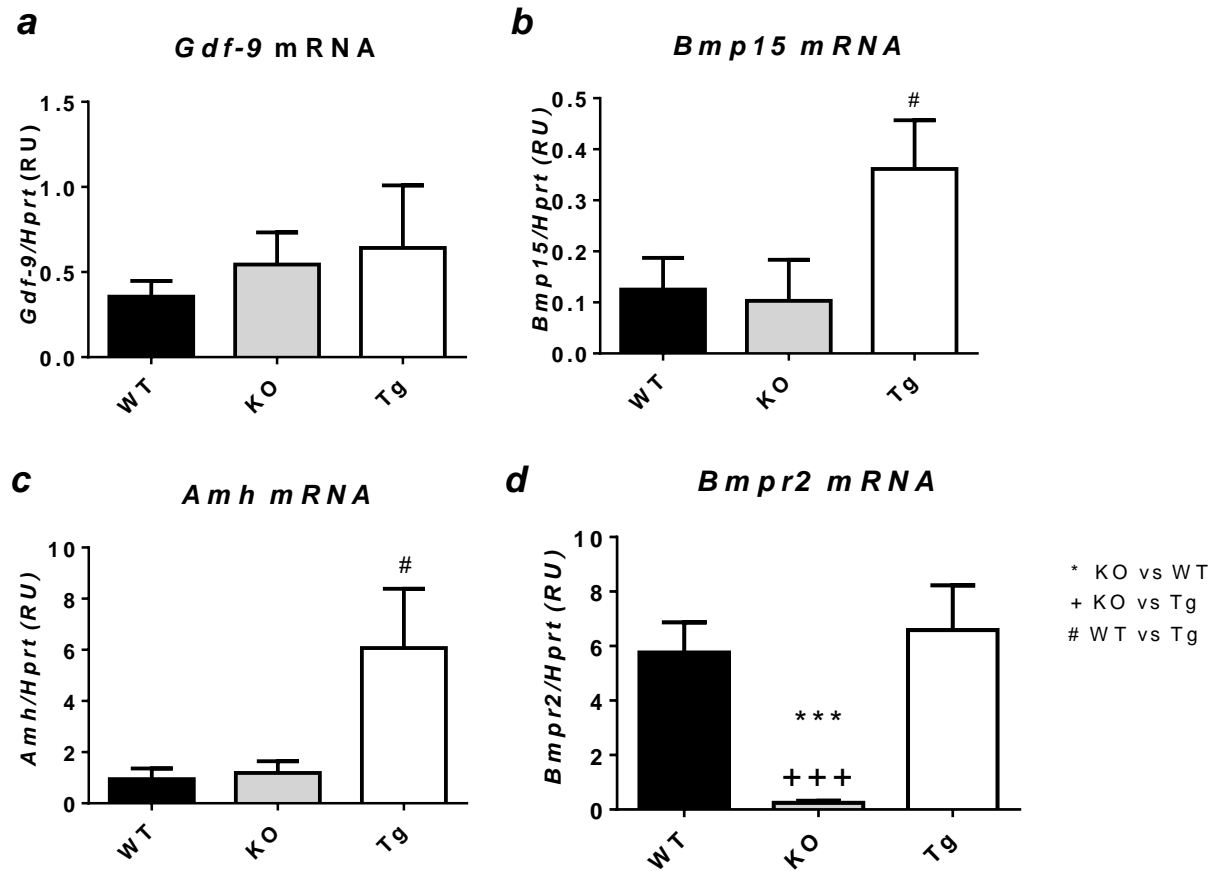
En resumen, como era esperable de la condición de hipogonadismo hipogonadotrófico, los marcadores de crecimiento y desarrollo folicular secretados por las CG y CT se encuentran significativamente disminuidos. Mientras que los factores propiamente ovocitarios como GDF9 y BMP15 se encuentran en general sin cambios (Figure 10A y B).



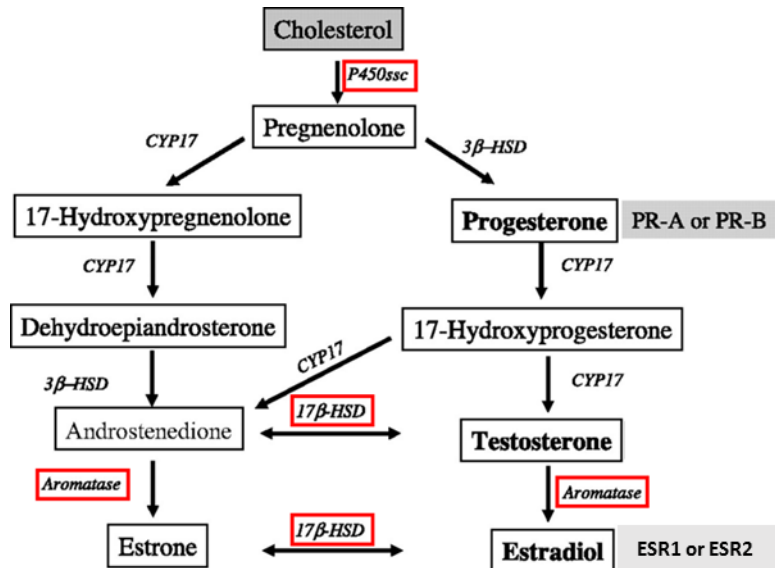
**Figura 8.-Niveles de mRNA y proteína del receptor de FSH.** A) Los niveles del mRNA de FSHR ovárica de ratones CBL57 se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen HPRT. N=5 para ratones wild type (WT), N=9 para ratones GPR54<sup>-/-</sup> (KO) y N=5 para ratones KO con reinscripción de Kiss1R en un transgen (Tg). B) Los niveles de la proteína del FSHR fueron cuantificados mediante western blot y normalizados contra  $\beta$ -actina como proteína constitutiva. N=5 para ratones wild type (WT), N=1 (pool de 9 ovarios) para ratones GPR54<sup>-/-</sup> (KO) y N=5 para ratones KO con reinscripción de Kiss1R en un transgen (Tg). Cada muestra fue analizada 3 veces. La significancia se obtuvo con un ANOVA de una vía seguido de un test de Fisher  $p < 0,001 = ***$ . \* indica diferencia entre KO y WT, # indica diferencias entre WT y Tg,  $p < 0,05 = \#$ . ND= marca no detectada.



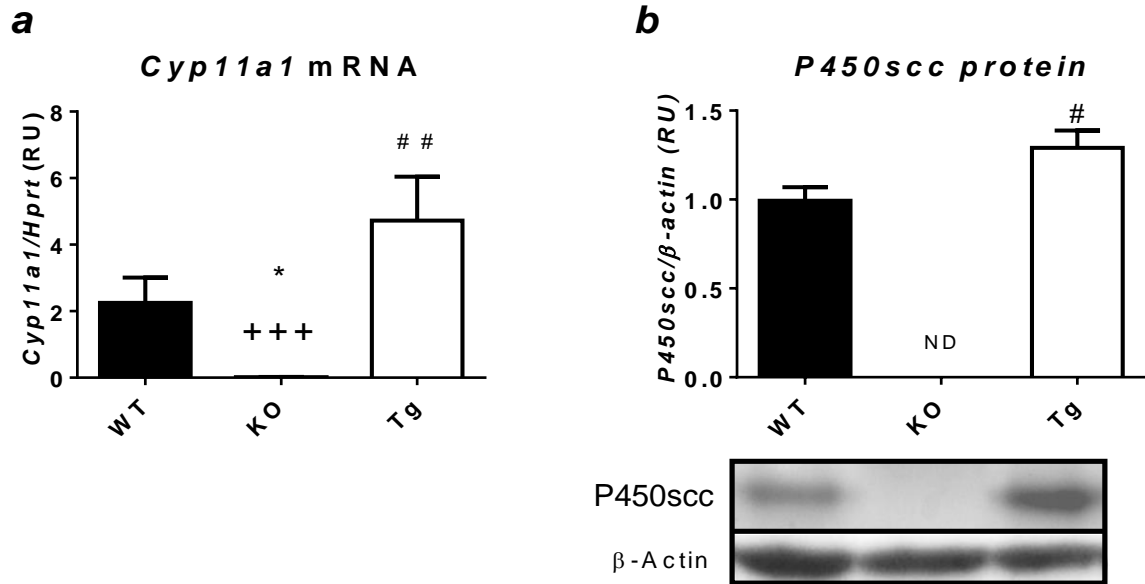
**Figura 9.-Niveles de mRNA de receptores involucrados en el desarrollo folicular en ratones transgénicos.** Los niveles del mRNA ovárico de ratones CBL57 se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen HPRT. N=5 para ratones WT, N=9 para ratones KO y N=5 para ratones Tg. La significancia se obtuvo con un ANOVA de una vía seguido de un test de Fisher.  $p < 0,05 = \#$ ;  $p < 0,01 = **$  ó  $++$  y  $p < 0,001 = ***$  ó  $+++$ . \* indica diferencia entre KO y WT, + indica diferencias entre KO y Tg y # indica diferencias entre WT y Tg.



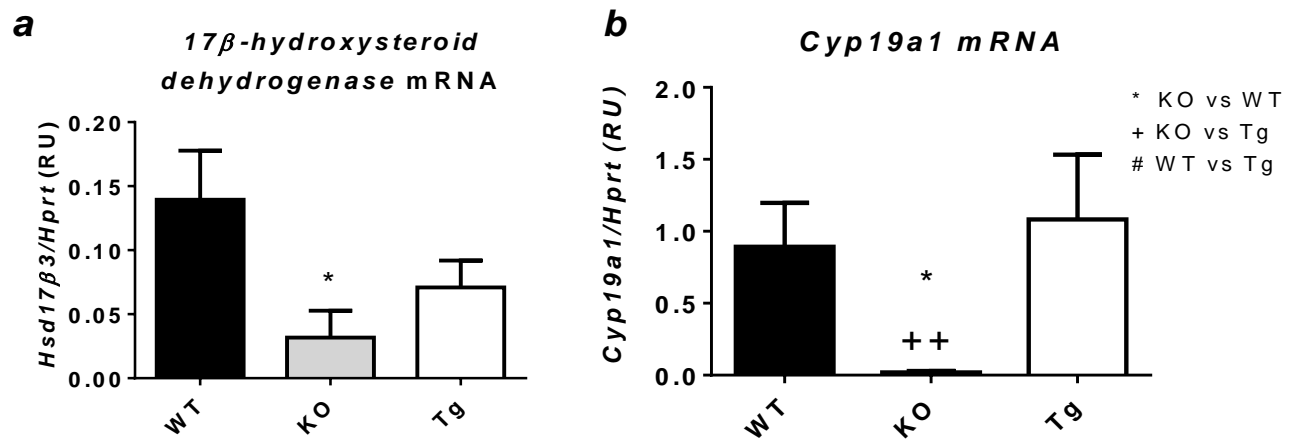
**Figura 10.-Niveles de mRNA de factores de desarrollo ovocitario y folicular en ratones transgénicos.** Los niveles del mRNA ovárico de ratones CBL57 se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen HPRT. N=5 para ratones WT, N=9 para ratones KO y N=5 para ratones Tg. La significancia se obtuvo con un ANOVA de una vía seguido de un test de Fisher.  $p < 0,05 = \#$  y  $p < 0,001 = ***$  ó  $+++$ . \* indica diferencia entre KO y WT, + indica diferencias entre KO y Tg y # indica diferencias entre WT y Tg.



**Figura 11.-Imagen representativa de la ruta de síntesis de esteroides.** En la imagen se muestran los metabolitos y enzimas participantes en cada paso. P450scc = enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol, CYP17= esteroide 17-  $\alpha$ -monooxigenasa, 3 $\beta$ -HSD= 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17 $\beta$ -HSD= 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y Aromatasa. PR= receptor de progesterona y ER= receptor de estradiol 1 y 2. Los recuadros rojos indican las enzimas analizadas en este trabajo.



**Figura 12.-Niveles de mRNA y proteína de la enzima P450scc.** A) Los niveles del mRNA de *Cyp11a1* ovárica de ratones CBL57 se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen *Hprt*. N=5 para ratones WT, N=9 para ratones KO y N=5 para ratones Tg. B) Los niveles de la proteína de la enzima *P450scc* fueron cuantificados mediante WB y normalizados contra β-actina como proteína constitutiva. N=5 para ratones wild type (WT), N=1 (pool de 9 ovarios) para ratones *GPR54*<sup>-/-</sup> (KO) y N=5 para ratones KO con re inserción de *Kiss1R* en un transgen (Tg). Cada muestra fue analizada 3 veces. La significancia se obtuvo con un ANOVA de una vía seguido de un test de Fisher.  $p < 0,05 = * \text{ ó } \#$ ;  $p < 0,01 = \#\#$  y  $p < 0,001 = +++$ . \* indica diferencia entre KO y WT, + indica diferencias entre KO y Tg y # indica diferencias entre WT y Tg. ND= marca no detectada.



**Figura 13- Niveles de mRNA de Hidroesteroide deshidrogenasa  $\beta 3$  y Aromatasa.** Los niveles del mRNA ovárico de ratones CBL57 se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen HPRT. N=5 para ratones wild type (WT), N=9 para ratones GPR54<sup>-/-</sup> (KO) y N=5 para ratones KO con reinscripción de Kiss1R en un transgen (Tg). La significancia se obtuvo con un ANOVA de una vía seguido de un test de Fisher.  $p < 0,05 = *$  y  $p < 0,01 = ++$ . \* indica diferencia entre KO y WT, + indica diferencias entre KO y Tg.



## **Resumen del objetivo 2**

- Kiss previene la inducción de la expresión del FSHR realizada por la estimulación adrenérgica en el ovario de ratas reproductivamente senescentes.
- Kiss está involucrada en el desarrollo folicular, particularmente en el reclutamiento inicial de los folículos.
- La ausencia periférica del Kiss1R, información entregada por el ratón transgénico Tg, genera un aumento del FSHR y una disminución del mRNA del LHR, así como un perfil global de transcritos que indican un aumento del reclutamiento folicular.

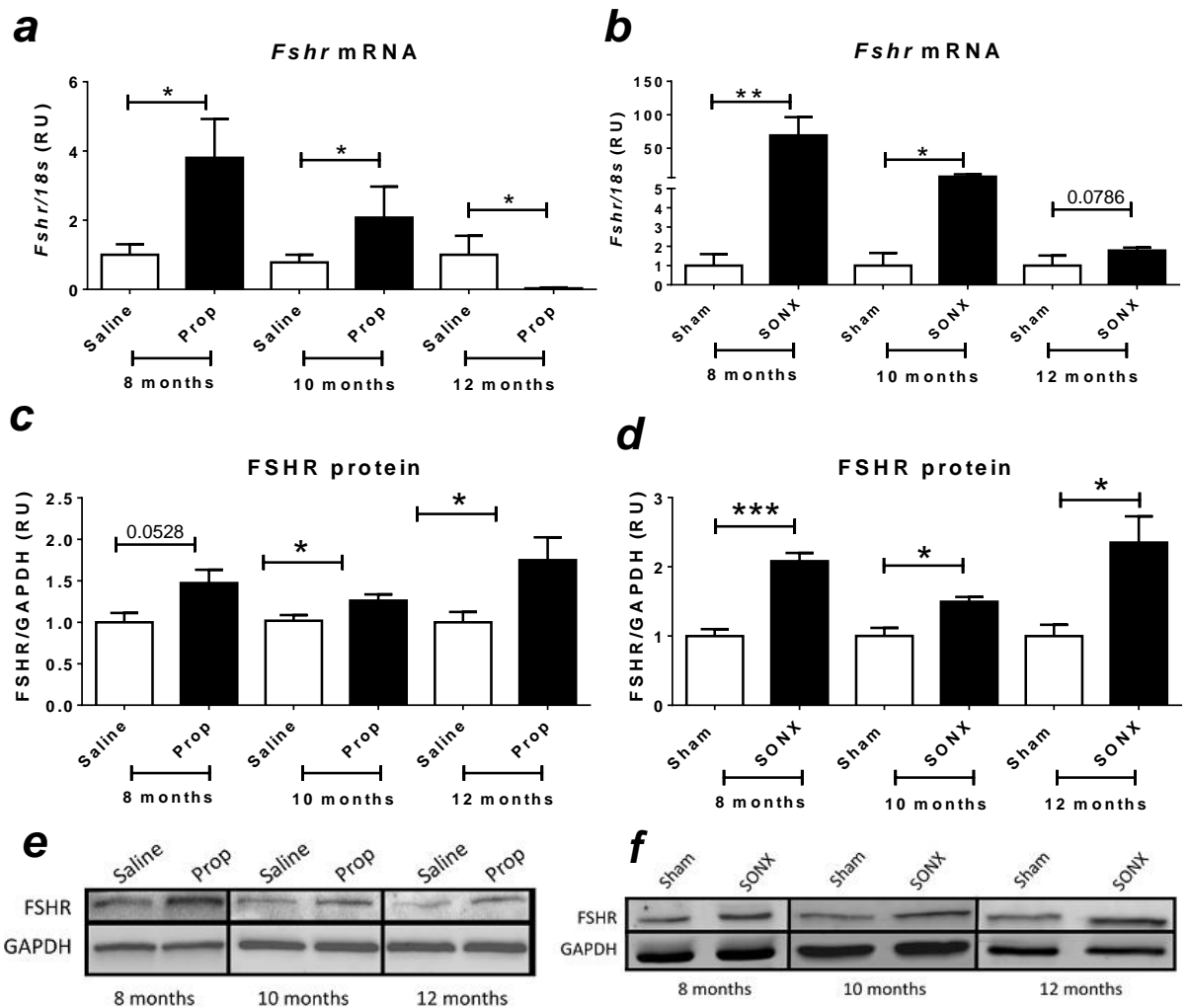
### **Objetivo 3**

Determinar y analizar los cambios morfológicos de los folículos preantrales en el ovario de ratas sometidas a un bloqueo  $\beta$ -adrenérgico crónico.

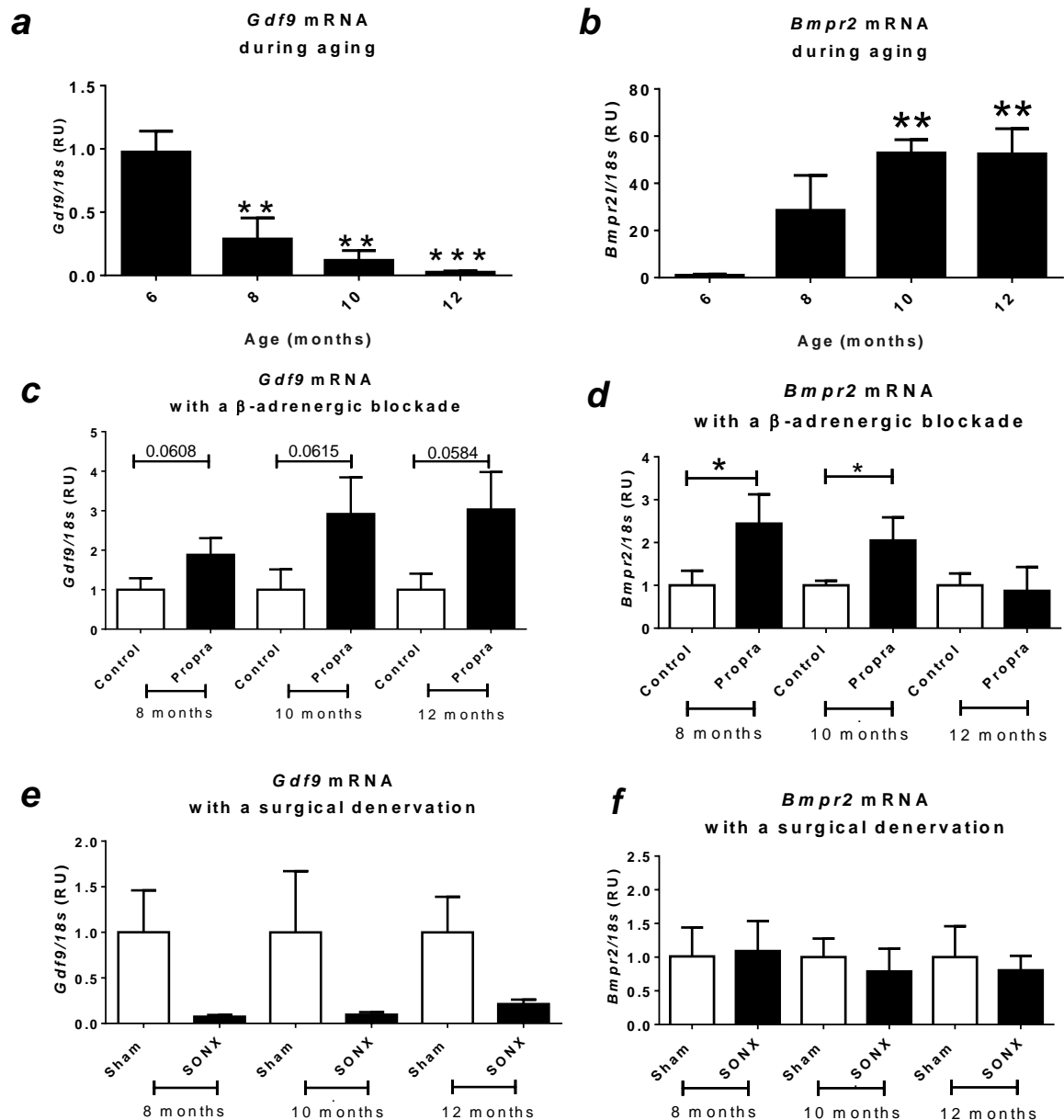
### **La administración de propranolol durante el periodo de subfertilidad mejora la transición de folículos primordiales a secundarios en el ovario de rata.**

Debido a que un aumento del FSHR favorece el desarrollo folicular temprano, se midieron los niveles del mRNA de FSHR, así como marcadores de crecimiento folicular en ovarios tratados con propranolol o con SONX, cuando la expresión de Kiss está disminuida. En la Figura 14 se observa que a los 8 y 10 meses de edad los niveles del mRNA del FSHR en el ovario aumentan con el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico (Figura 14 A y C), al igual que con una denervación quirúrgica (Figura 14 B y D). A los 12 meses de edad ocurre un fenómeno diferente, debido a que como se observa en la Figura 13A, la administración de propranolol genera una disminución del mRNA del FSHR, pero un aumento de la proteína (Figura 14C). Por otro lado, se midió el mRNA de GDF9, un factor de crecimiento secretado principalmente por el ovocito. El GDF9 es fundamental para la proliferación de las células de granulosa, particularmente aquellas que rodean al ovocito. La Figura 15A muestra que los niveles de mRNA de GDF9 disminuyen a los 8, 10 y 12 meses de edad comparados con los 6 meses, mientras que su receptor presenta una relación inversa, presentando un aumento a significativo a los 10 y 12 meses de edad (Figura 15B). La Figura 14E muestra que la denervación quirúrgica no genera cambios en los niveles de GDF9 ni de su receptor (Figura 15F) a ninguna de las edades analizadas. Por su parte, el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico muestra una tendencia al aumento del mRNA de GDF9 a los 8, 10 y 12 meses de edad (Figura 15C), mientras que el receptor posee un aumento significativo sólo a los 8 y 10 meses de edad (Figura 15D). En la misma línea, los resultados de AMH plasmática muestran que sólo el tratamiento con propranolol genera un incremento de la hormona a nivel plasmático (Figura 16B). Los resultados de GDF9, BMPR2, AMH y FSHR permiten pensar que el bloqueo  $\beta$ -

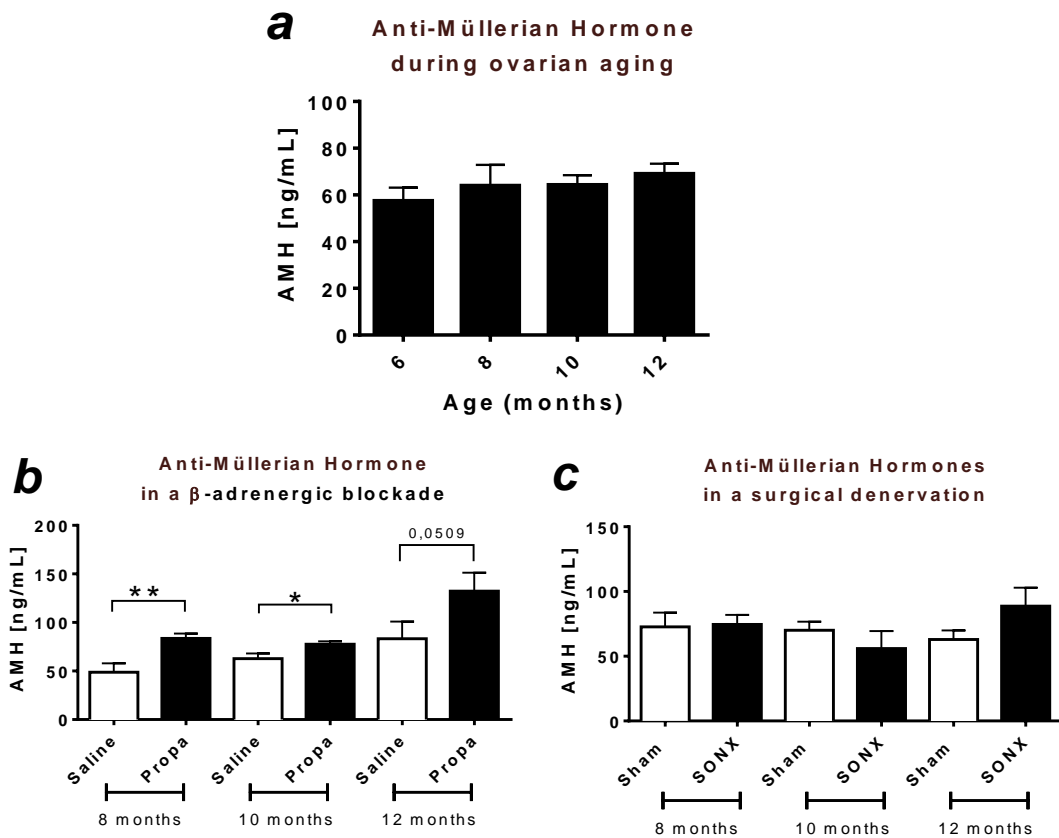
adrenérgico genera un aumento del reclutamiento folicular, por lo que para determinar cambios a nivel folicular, se contabilizaron los folículos preantrales de la serie con bloqueo  $\beta$ -adrenérgico. La Figura 17 muestra que esta aproximación experimental disminuye el porcentaje y número de folículos primordiales en el ovario, mientras que el porcentaje y número de folículos secundarios tiende a aumentar en las ratas de 8, 10 y 12 meses de edad. Si se analiza la distribución por tamaño de los folículos secundarios, se encuentra que el aumento de folículos secundarios es significativo en el grupo menor a 110  $\mu\text{m}$  (Figura 18) a los 8, 10 y 12 meses de edad. Todo esto sin generar cambios en los folículos primarios (Figura 17B y E). Por otro lado, estos cambios foliculares no afectaron la secreción hipotalámica de FSH para el grupo propranolol. Sólo observándose un aumento en el grupo SONX de 12 meses de edad (Tabla 4).



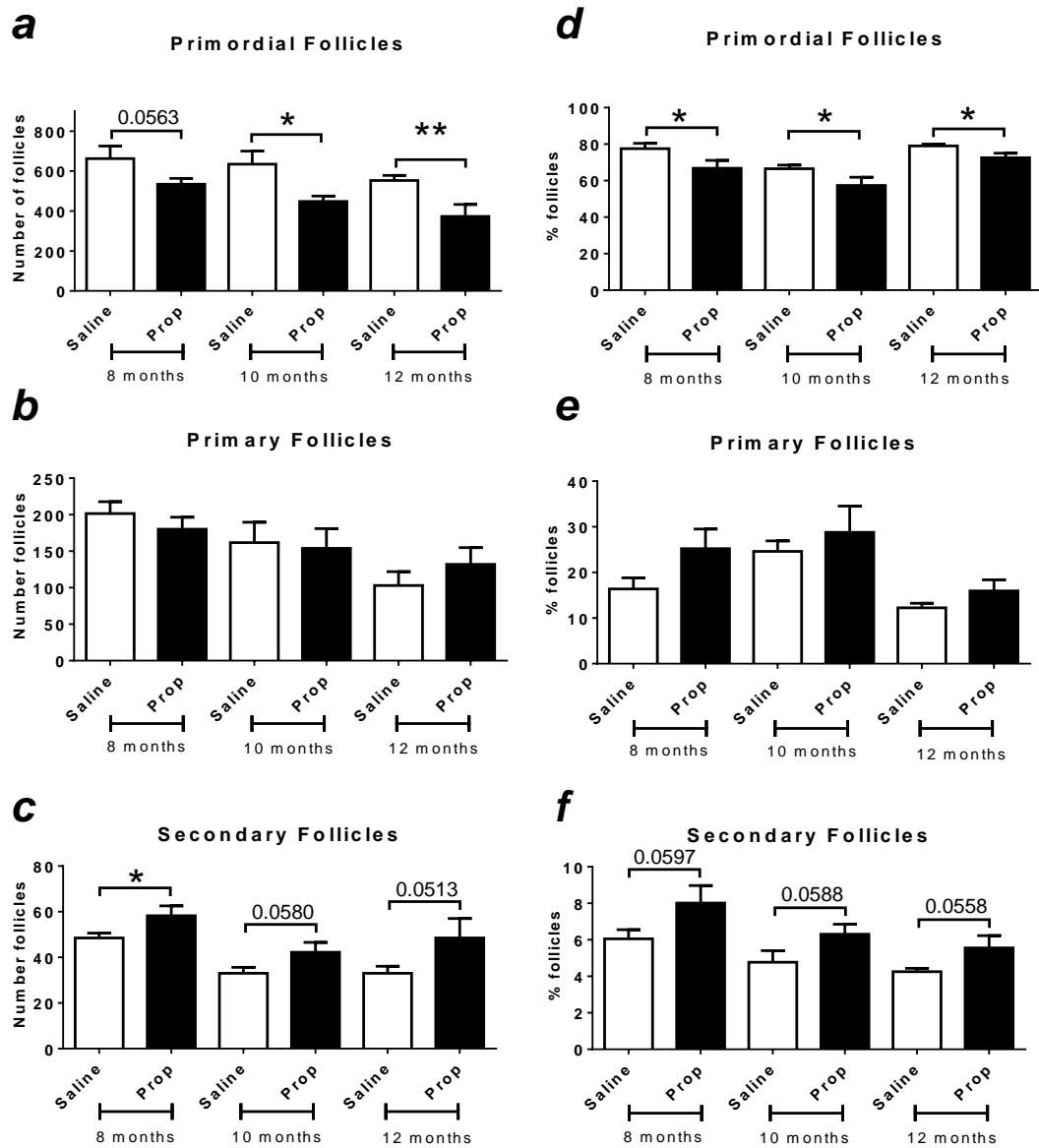
**Figura 14.- Expresión del FSHR.** Los niveles ováricos del mRNA del receptor de FSH de ratas Sprague-Dawley se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen 18S. En A) ratas tratadas con propranolol (Prop) para cada edad, N = 6 y en B) ovarios de ratas con una denervación ovárica (SONX), N=5 para cada condición. Los niveles de proteína se cuantificaron por Western blot; cada muestra se evaluó mínimo 2 veces. Los valores de FSHR se normalizaron con la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J. C) cuantificación de los píxeles para ovarios tratados con propranolol y D) Ovarios para la serie SONX, N=5 para cada condición. En E) gel representativo de FSHR en la serie con propranolol y en F) gel representativo para la serie SONX. La significancia se obtuvo con un t-test de Student entre control y propranolol o entre Sham y SONX.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  y  $p < 0,001 = ***$ . Los datos se grafican como las veces de cambio sobre su propio control.



**Figura 15 Niveles de mRNA de GDF9 y su receptor BMPR2.** Los niveles ováricos del mRNA del factor de crecimiento 9 (GDF9) o el receptor morfométrico de hueso 2 (BMPR2) de ratas Sprague-Dawley se cuantificaron por RT-qPCR y fueron normalizados con el gen 18S. En A y D N = 11 para 6 meses de edad, N = 8 por 8 meses de edad, N = 6 para 10 meses de edad y N = 8 para 12 meses de edad B y E N = 6 para cada edad, C y F) N=5 para cada condición. Para A y D la significancia utilizando un ANOVA de una vía, seguido de un test de Fisher; para B, C E y F la significancia se obtuvo con un t-test de Student entre control y propranolol o entre Sham y SONX.  $p < 0,05 = *$   $p < 0,01 = **$  y  $p < 0.001 = ***$ .

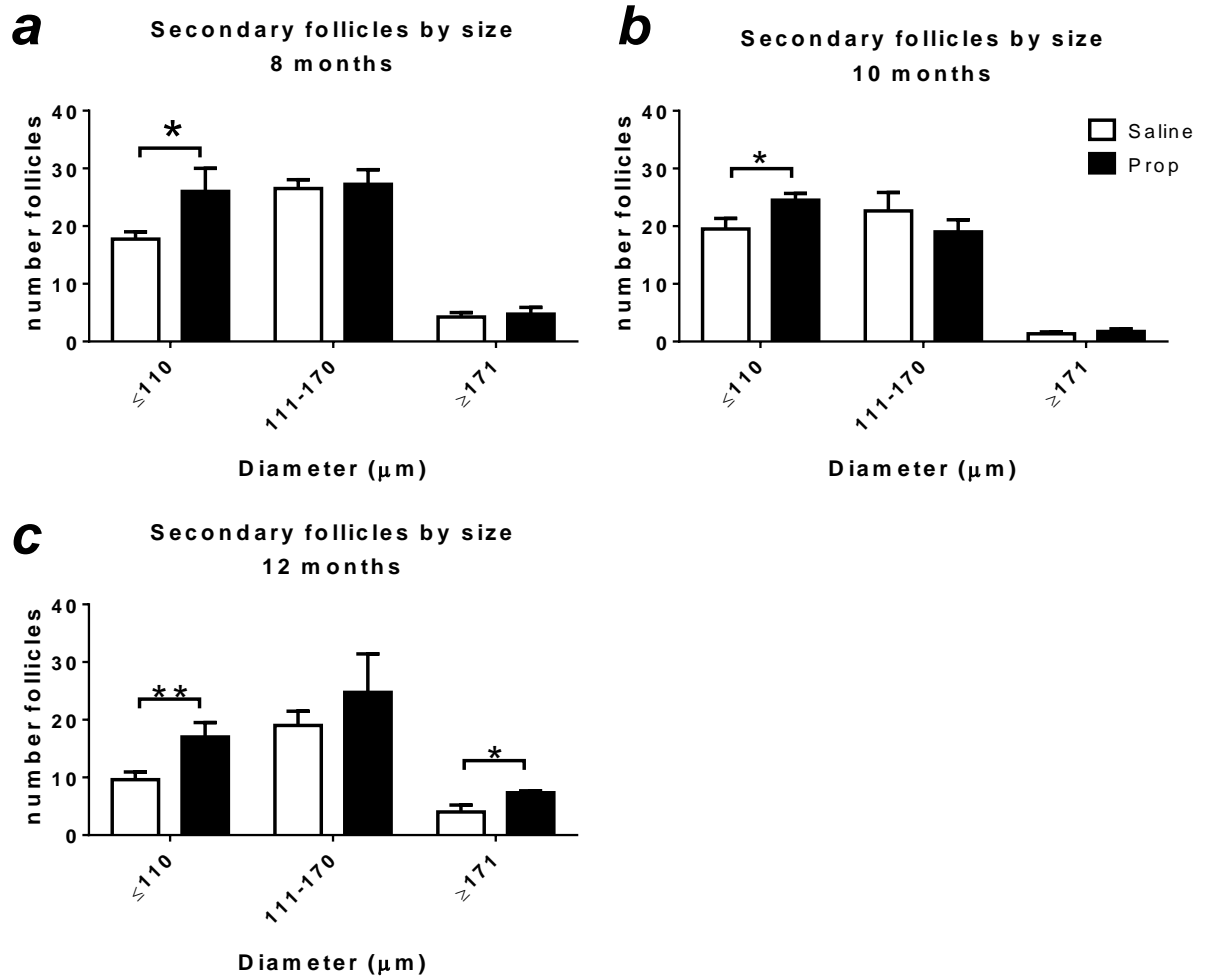


**Figura 16.- Niveles de Hormona Anti-Mülleriana plasmática.** En A) Niveles plasmáticos de AMH durante el envejecimiento reproductivo en ratas controles (N= 6 para cada edad). B) Niveles plasmáticos de AMH en ratas tratadas con propranolol (N= 5 para cada condición). C) Niveles plasmáticos de AMH en ratas sometidas a SONX (N=5 para cada condición). Los resultados se grafica como el promedio  $\pm$  SEM. Para A la diferencia estadística se obtuvo con un ANOVA de una vía, seguido de un test de Fisher. Para B y C la diferencia se obtuvo con un t-test de Student entre Salino y propranolol para cada edad  $p < 0,05 = *$  y  $p < 0,01 = **$ .



**Figura 17- Número de folículos preantrales en ovario de rata subfétil con bloqueo  $\beta$ -adrenérgico.**

A) Número de folículos primordiales, B) número de folículos primarios, C) número de folículos secundarios, D) porcentaje de folículos primordiales, E) porcentaje de folículos primarios y F) porcentaje de folículos secundarios. El porcentaje de folículos se calcula como el número de folículos dividido por la suma de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales para cada ovario x 100. Los resultados se grafican como el promedio  $\pm$  SEM. El número de ovarios es de N=4 para cada grupo. La significancia se obtuvo con un t-test de Student de dos colas en la condición Salino versus propranolol;  $p < 0,05 = *$  y  $p < 0,01 = **$ .



**Figura 18- Número de folículos secundarios por tamaño en ovario de rata subfértil con bloqueo  $\beta$ -adrenérgico** A) Número de folículos secundarios por tamaño a los 8 meses, B) número de folículos secundarios a los 10 meses y número de folículos secundarios a los 12 meses. El número de experimentos es de N=4 para cada grupo. La significancia se obtuvo con un t-test de Student de dos colas en la condición Salino versus propranolol;  $p < 0,05 = *$  y  $p < 0,01 = **$ .



**Tabla 4.- FSH plasmática en ratas controles.**

<b>Age of animals</b>	<b>FSH (mUI/mL)</b>
6 months	33,30 ± 9,29
8 months	28,19 ± 3,61
10 months	33,18 ± 4,73
12 months	20.69 ± 4,75

**Tabla 5.- FSH plasmática en ratas tratadas con propranolol.**

<b>Age of animals</b>	<b>FSH (mUI/mL)</b>		
	<b>Saline</b>	<b>Propranolol</b>	<b>P value</b>
8 months	28,19 ± 5,68	39,88 ± 13,93	0,134
10 months	22,28 ± 2,37	57,98 ± 17,95	0,088
12 months	22,05 ± 5,88	48,23 ± 13,31	0,145

**Tabla 6.- FSH plasmática en ratas con una denervación quirúrgica.**

<b>Age of animals</b>	<b>FSH (mUI/mL)</b>		
	<b>Sham</b>	<b>SONX</b>	<b>P value</b>
8 months	28,19 ± 3,61	39,88 ± 13,44	0,213
10 months	17,21 ± 7,31	26,13 ± 8,09	0,221
12 months	20,69 ± 4,75	35,10 ± 2,38	0,035

### **Resumen del objetivo 3**

- El bloqueo  $\beta$ -adrenérgico con propranolol y SONX generan un aumento de la expresión del FSHR
- El bloqueo  $\beta$ -adrenérgico con propranolol produce una disminución de los folículos primordiales, un aumento de los folículos secundarios y un aumento de la AMH durante el periodo de subfertilidad.
- El aumento del reclutamiento folicular y la expresión de FSHR podría estar mediado por la disminución de Kiss intraovárica producida por el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico con propranolol.

## Discusión

El péptido Kiss es un elemento clave en la regulación de la pulsatilidad de las neuronas GnRH hipotalámicas y además es fundamental en la adquisición de la pubertad (Pinilla, et al. 2012). A pesar de que diversos estudios han descrito la presencia de Kiss en tejidos periféricos, tales como placenta, endometrio, hígado y ovario, pocos se han centrado en una caracterización funcional del péptido sobre estos órganos. En este sentido, este trabajo y los que se han llevado en colaboración en nuestro laboratorio, entregan información novedosa y relevante sobre el control de la expresión de Kiss en el ovario. Además, con un énfasis en el periodo de subfertilidad de la rata, presentamos nuevas evidencias sobre la función de Kiss en el ovario, particularmente en lo que respecta a la regulación de la ovulación y foliculogénesis.

### **Kiss aumenta durante el envejecimiento reproductivo, y sus niveles se correlacionan con la actividad noradrenérgica del ovario.**

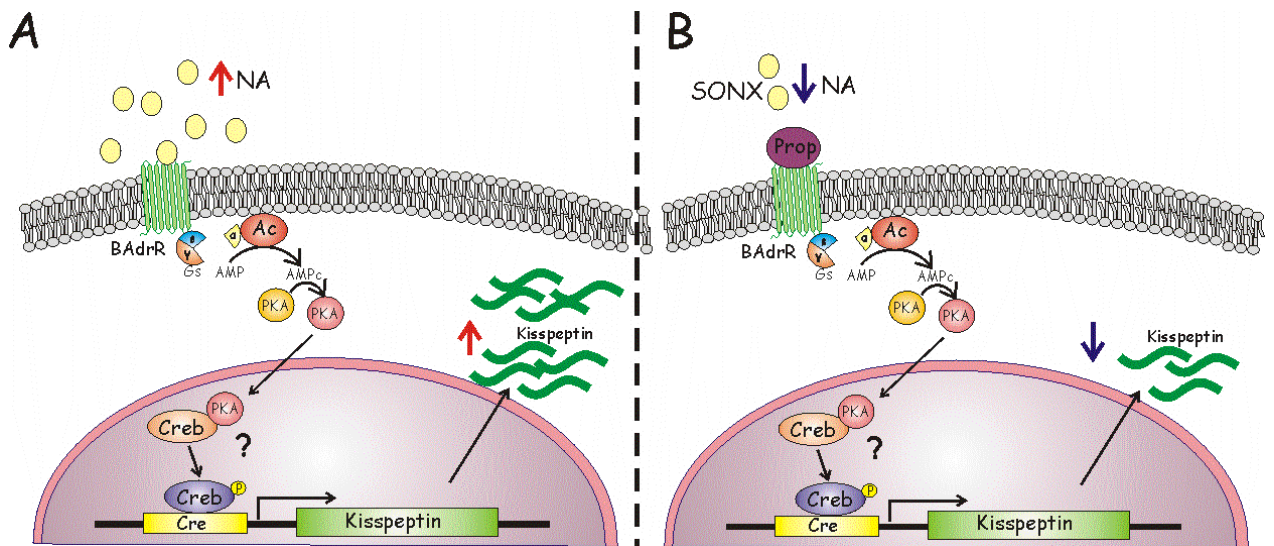
Algunos trabajos de nuestro laboratorio, y de otros investigadores han descrito un aumento en el contenido y liberación de noradrenalina durante el envejecimiento ovárico de la rata (Acuna, et al. 2009, Chavez-Genaro, et al. 2007). Por otro lado, hemos descrito que la expresión de Kiss aumenta en ovarios estimulados *in vitro* con ISO (Ricu, et al. 2012). Por tanto, considerando que durante el envejecimiento reproductivo aumenta de forma espontánea la actividad nerviosa sobre el ovario, quisimos evaluar si los niveles basales de Kiss aumentarían durante el envejecimiento. Como se observa en la Figura 1, la expresión de Kiss intraovárica aumenta durante el envejecimiento y este efecto se correlaciona fuertemente con un aumento de la liberación de NA del tejido. Además, el aumento significativo de la expresión de Kiss ocurre a los 10 y 12 meses de edad, coincidiendo con el aumento significativo de la actividad noradrenérgica en ovarios de ratas durante el periodo de subfertilidad (Acuna, et al. 2009).

### **La expresión de Kiss está regulada por la NA en el ovario.**

Considerando que durante el envejecimiento ovárico existe un aumento espontáneo de Kiss, y que éste se correlaciona positiva y fuertemente con la actividad simpática durante el periodo de subfertilidad, se realizaron dos experimentos para modular la actividad adrenérgica sobre el ovario en el periodo subfétil de las ratas (8, 10 y 12 meses de edad). En el primer experimento se realizó un bloqueo  $\beta$ -adrenérgico crónico en ratas de las edades mencionadas utilizando propranolol. Como esperábamos, los resultados mostraron una disminución de los niveles de Kiss, los cuales son significativos a los 10 y 12 meses de edad, edades que nuevamente coinciden con el aumento significativo en la actividad nerviosa del ovario (Acuna, et al. 2009). Dado que la administración de propranolol se realizó intraperitonealmente, el efecto periférico y/o central sobre otros órganos no puede ser evitado, se realizó un segundo experimento en el que utilizamos una denervación quirúrgica del nervio ovárico superior. El nervio ovárico superior es la fuente de innervación ovárica que se relaciona más directamente con el desarrollo folicular, y su resección disminuye notablemente el contenido y liberación de NA en el ovario de ratas senescentes (memoria para optar al título de Bioquímico de Fabian Jofré, datos no publicados). La Figura 4 muestra que la denervación del SON disminuye los niveles de Kiss en el ovario y al igual que con propranolol, el efecto fue más pronunciado a los 10 y 12 meses de edad. Considerando estos estudios *in vivo*, podemos concluir que el sistema nervioso simpático participa activamente regulando los niveles de Kiss ovárica durante el periodo fértil y subfétil de la rata, y que este efecto se produce vía receptores  $\beta$ -adrenérgicos ya que ISO aumenta la expresión de Kiss y propranolol los disminuye.

Clásicamente la actividad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se encuentra asociada a la activación de una proteína Gs, la que resulta en un aumento de AMPc intracelular y consecuentemente a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). La PKA, una vez activa, es capaz de traslocar al núcleo en donde puede activar diversos

factores de transcripción, uno de ellos es CREB (Montminy 1997). Esta vía es importante ya que la zona río arriba del promotor de Kiss posee la secuencia CRE (TGACG/CGTCA), la cual es altamente conservada entre rata, ratón y humanos (Altarejos, et al. 2008). Particularmente dos estudios utilizando genes reporteros y estudios *in vivo* (inmunoprecipitación de cromatina) muestran que en hipotálamo e hígado, CREB estimula directamente la expresión de Kiss (Altarejos, et al. 2008, Song, et al. 2014). Considerando esta evidencia indirecta creemos que dicha vía de activación transcripcional podría ser un mecanismo viable que explique el control noradrenérgico de los niveles de Kiss en el ovario, pero estudios futuros se requieren para comprobar si esta hipótesis es correcta en el ovario. Un esquema representativo se muestra en la Figura 19.



**Figura 19- Representación del posible mecanismo molecular por el cual la noradrenalina podría regular la expresión de Kiss en el ovario.** A) La imagen muestra que el aumento de noradrenalina (NA) que se evidencia en ovarios subfértiles actúa sobre el receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ AdrR) activando la vía de señalización de AMPc/PKA/CREB, lo que aumenta la expresión de Kiss. B) La imagen representa la disminución de NA provocada por SONX o bien el bloqueo del receptor generado por propranolol, lo que provoca una disminución de la expresión de Kiss.

### **El Kiss1R ovárico aumenta durante el envejecimiento reproductivo.**

En este trabajo encontramos que el mRNA del Kiss1R se encuentra aumentado en el ovario de ratas a los 10 y 12 meses de edad (Figura 2A). Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura para ovarios de ratones y CG del cúmulo en humanos (Merhi, et al. 2016). Adicionalmente logramos determinar que el Kiss1R disminuye con SONX (Figura 5B) pero no con el bloqueo farmacológico (Figura 5A). Dado que el SONX es una técnica que corta el SON, no sólo hemos disminuido los niveles de NA en el ovario, sino que también otros factores, como el VIP (Advis, et al. 1989). Es posible que este factor (u otro) esté implicado en el control de la expresión del Kiss1R intraovárico.

### **Kiss favorece la ovulación.**

Considerando que Kiss aumenta durante el envejecimiento, nosotros quisimos determinar si Kiss participa en el cambio del perfil de desarrollo folicular que ocurre durante este periodo y/o afectando la ovulación como otros grupos lo han sugerido (Bhattacharya and Babwah 2015, Gaytan, et al. 2009, Pineda, et al. 2010, Pinilla, et al. 2012). Para poder probar esto, realizamos una administración local y directa de Kiss o de un antagonista farmacológico del receptor Kiss1R (P234) sobre el ovario mediante la infusión de una mini bomba osmótica por 28 días. A las dosis utilizadas (0,125nmol/hr) se ha observado un efecto local de Kiss, sin alterar los niveles plasmáticos del péptido. Por otra parte, la ausencia de cambios en los niveles de gonadotrofinas descarta un efecto de la administración ovárica de Kiss o el antagonista P234 sobre la liberación de GnRH en el hipotálamo.

Los resultados de este experimento mostraron que Kiss produce un aumento del número total de cuerpos lúteos en ovarios de 6 y 10 meses de edad (fértil y subfértil). Pero por otro lado, la infusión de P234 produjo una disminución del número

total de cuerpos lúteos. Dado que los ovarios son observados al cabo de un mes de la administración de los fármacos, una población heterogénea de cuerpos lúteos puede ser observada, es decir, cuerpos lúteos de ovulaciones formados recientemente y de ciclos estrales anteriores (Sato, et al. 2014). Considerando esto, se decidió realizar una cuantificación de los cuerpos lúteos según su tamaño, considerando que muy probablemente aquellos cuerpos lúteos de un diámetro mayor a 700  $\mu\text{m}$  provienen de ovulaciones más recientes (Greenwald and Rothchild 1968). En (Fernandois, et al. 2016) mostramos que la administración directa de Kiss en el ovario produjo un aumento del número de cuerpos lúteos totales, y aquellos de tamaños mayores a 850  $\mu\text{m}$ , mientras que los ovarios sometidos a una administración de P234, esta población de cuerpos lúteos fue casi inexistente (Fernandois, et al. 2016). Esto concuerda con el hecho de que los ratones Tg presentan una disminución de los niveles de mRNA para el LHR con respecto del ratón WT (Figura 9A), una tendencia a la disminución del número de cuerpos lúteos (Leon, et al. 2016). Más aún, sólo un 40% de los ratones Tg presentan cuerpos lúteos (Leon, et al. 2016), y ratones Kiss1R<sup>+/-</sup> presentan una prematura disminución en la tasa de ovulación (Gaytan, et al. 2014). Tomando estos datos en conjunto, Kiss posiblemente afecta positivamente la expresión del LHR, preparando de mejor forma a los folículos antrales en crecimiento para el alza de LH durante el proestro y favorecer así la ovulación.

### **Kiss regula el desarrollo folicular por medio de la modulación de la expresión del FSHR.**

Durante el envejecimiento reproductivo la distribución de folículos en desarrollo cambia considerablemente, ya que el número de folículos preantrales disminuye a más de la mitad alrededor de los 8 meses de edad respecto de edades más fértiles, y éste número se mantiene relativamente constante hasta los 24 meses de edad, lo que indica un menor reclutamiento de folículos primordiales (Acuna, et al. 2009). Por otro lado, durante el periodo de subfertilidad, el número de folículos antrales que alcanza la etapa

de folículo preovulatorio ( $>400 \mu\text{m}$ ) permanecen constantes a pesar de una disminución en los folículos de menor tamaño (Jones and Krohn 1961, Lerner, et al. 1990). Esto parece implicar que durante el periodo de subfertilidad el ovario presenta un desarrollo folicular inicial enlentecido, pero que logra llegar a la etapa de preovulación de una forma más eficiente. Dado que la regulación del desarrollo folicular inicial es independiente de gonadotrofinas, una variedad de factores se han asociado a su control. En (Fernandois, et al. 2016) publicamos que Kiss produce una disminución del número y tamaño de los folículos antrales en ovarios de ratas de 6 y 10 meses de edad. Consistentemente, el efecto completamente opuesto se observó cuando los ovarios fueron infundidos con el antagonista farmacológico del Kiss1R. En conclusión, este experimento mostró que Kiss podría ser responsable del menor reclutamiento y desarrollo de los folículos antrales observado en ratas senescentes, y que tal resultado es producto de un efecto local en el ovario, ya que la dosis utilizada de Kiss es menor a la necesaria para inducir efectos hipotalámicos desde la periferia (Pineda, et al. 2010).

Considerando que el crecimiento de los folículos es regulado principalmente por la hormona FSH, investigamos si Kiss participa a nivel local en la expresión del FSHR. Para esto realizamos una incubación *in vitro* de ovarios, los cuales fueron estimulados en diferentes combinaciones farmacológicas. Sorpresivamente Kiss no generó cambios sobre los niveles del mRNA del FSHR, pero cuando se co-incubó Kiss + ISO, Kiss fue capaz de evitar el aumento de los niveles de mRNA de FSHR inducidos por ISO. Más aún, cuando los ovarios fueron co-incubados con ISO+P234, la inducción de la expresión del mRNA del FSHR fue potenciada (Figura 6A). Considerando que los niveles del transcrito no siempre se correlacionan con la expresión de una proteína funcional, estos ovarios fueron expuestos a niveles fisiológicos de FSH. Consistentemente, la represión de la expresión del FSHR producido por Kiss en ovarios tratados con ISO, significó una disminución del número de folículos secundarios. Además, un aumento del número de folículos secundarios respecto del grupo ISO se observó en ovarios incubados con ISO+ P234, tal como se esperaba (Figura 6B). Al



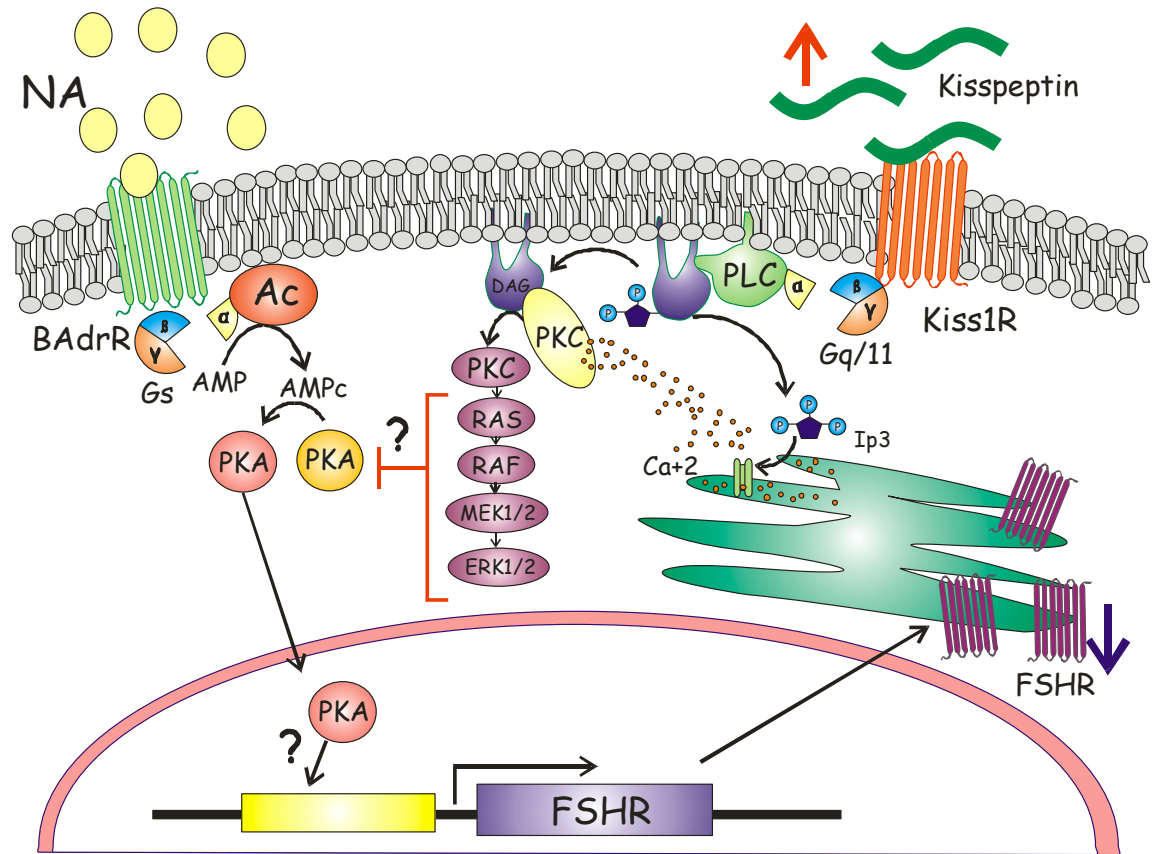
agrupar los folículos según su tamaño, se observa que Kiss evita el aumento de los folículos secundarios menores a 75  $\mu\text{m}$ , es decir, aquellos folículos que acaban de finalizar la transición desde folículo primario a folículo secundario y que han adquirido recientemente el FSHR. Como se mostró en la Figura 6C, este efecto nos hace pensar que Kiss podría estar actuando como antagonista funcional del receptor  $\beta$ -adrenérgico respecto de su acción sobre la expresión del FSHR.

Para complementar este estudio, utilizamos los animales transgénicos Tg. El ratón Tg posee una secreción de gonadotropinas normal y funcional, pero presenta una ausencia del Kiss1R en el resto de las células del ovario (Kirilov, et al. 2013, Leon, et al. 2016), por tanto creemos que este ratón debiera tener un perfil de desarrollo folicular similar al observado para el bloqueo farmacológico del Kiss1R en el ovario. La Figura 8 muestra que los ratones Tg presentan un aumento del mRNA y proteína del FSHR, lo que es consecuente con los resultados de que P234 genera un aumento del FSHR y del número y tamaño de los folículos antrales (Fernandois, et al. 2016). También es interesante notar que ratones Kiss1R  $^{+/-}$  poseen una falla ovárica prematura debido a una depleción temprana de folículos (Gaytan, et al. 2014), lo que reafirma que Kiss es esencial para suprimir el desarrollo folicular temprano. Con todas estas evidencias podemos concluir, que Kiss probablemente está participando como regulador negativo en la expresión del FSHR y por ende del desarrollo folicular.

### **El bloqueo $\beta$ -adrenérgico crónico produce un aumento del FSHR.**

Dado que los ovarios tratados con propranolol o con SONX producen una disminución endógena de Kiss, evaluamos si la disminución de Kiss afecta la expresión del FSHR, así como ocurre en la incubación *in vitro*. Como se puede observar en la Figura 14, propranolol y SONX produjeron un aumento significativo en la expresión del FSHR. Si bien en la Figura 14A el grupo propranolol a los 12 meses se observa una disminución de mRNA, la proteína se encuentra aumentada. Este cambio de perfil en la expresión, podría deberse a un cambio de la tasa o velocidad traduccional de las células

de granulosa a esta edad, dado que es el único grupo en donde se detectó un aumento de la FSH plasmática (Tabla 4), pero otros experimentos son necesarios para comprobar esta hipótesis. A pesar de esto, el aumento en la expresión del FSHR, se tradujo en un aumento funcional del número de folículos secundarios y antrales en los ovarios tratados con propranolol (efecto discutido en la siguiente sección). Por otro lado, considerando que el sistema nervioso, vía NA y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se han relacionado con la adquisición del FSHR y un aumento del desarrollo folicular en general (Mayerhofer, et al. 1997). Los resultados presentados en este trabajo parecieran ser contradictorios con la literatura, ya que un bloqueo crónico farmacológico con propranolol (un antagonista  $\beta$ -adrenérgico) produce un aumento de la expresión del FSHR y del reclutamiento folicular. Esta aparente discordancia podría ser explicada por medio de los cambios producidos por este modelo en la expresión disminuida de Kiss. Es decir, ambos experimentos disminuyen la señalización del receptor  $\beta$ -adrenérgico, pero no la eliminan por completo, por lo cual menores niveles de Kiss, podrían resultar en una señalización potenciada de NA en relación a su función sobre la expresión del FSHR. Un ejemplo representativo de un posible mecanismo molecular se ejemplifica en la Figura 20.



**Figura 20- Representación del posible mecanismo molecular por el cual la Kiss podría antagonizar la expresión de FSHR mediada por noradrenalina en el ovario.** La imagen muestra la cascada de señalización probable por la que noradrenalina (NA) vía receptor β-adrenérgico (βAdrR) produce un aumento de la expresión de FSHR. A su vez se esquematiza la cascada de señalización del Kiss1R, la cual podría interferir en la señalización del βAdrR y generar una disminución de la expresión del FSHR. FSHR: receptor de hormona folículos estimulante, PKC: proteína quinasa C, PLC: fosfolipasa C, PKA: Proteína quinasa A. AC: adenilato ciclasa. El signo de interrogación indica mecanismos desconocidad. Arriba indica un posible punto de interacción entre la vía de señalización de NA y Kiss, y abajo la interacción de PKA y la expresión del FSHR.

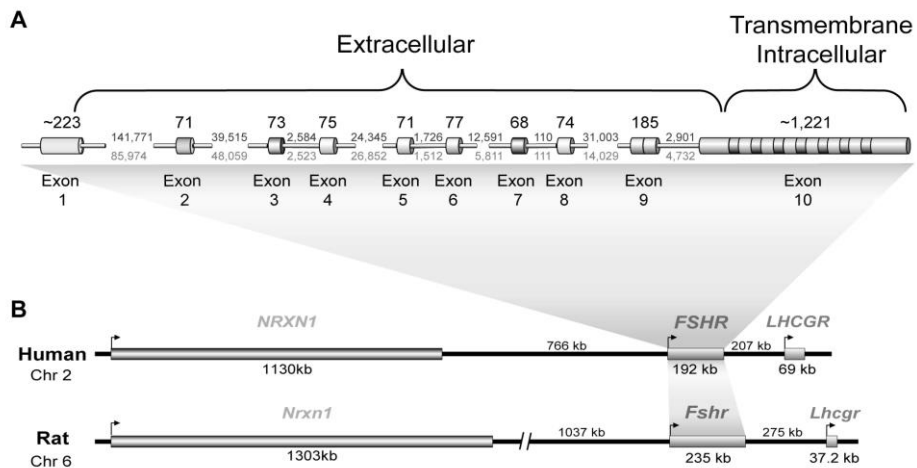
## **La disminución de la expresión de Kiss genera un aumento del reclutamiento folicular.**

Como se observa en la Figura 17, el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico crónico generó cambios en el desarrollo folicular, mostrando una disminución significativa del número de folículos primordiales, el aumento del número de folículos secundarios a los 8 meses y la tendencia a los 10 y 12 meses. Además, se observó el aumento significativo en folículos secundarios menores a 110  $\mu\text{m}$  en todas las edades analizadas (Figura 18). Este cambio en los folículos secundario indica que la tasa de transición desde folículos primarios a secundarios está incrementado. Algunas evidencias complementarias a esta activación lo muestran los niveles aumentados del mRNA de GDF9 y la AMH plasmática. El GDF9 es un factor que pertenece a la familia de los factores de crecimiento TGF- $\beta$ , que tiene como característica principal que su expresión es primordialmente producida por ovocitos en desarrollo y facilita la proliferación de las CG (expansión del cúmulo) (Knight and Glister 2006, Persani, et al. 2014). Es decir, el aumento del mRNA de este factor es un indicio indirecto de que un mayor número de ovocitos han salido desde su estadio de folículo primordial y por ende de más folículos en crecimiento. Más aún, el receptor BMP2, que señala para GDF9 y BMP15 (Persani, et al. 2014), también presenta niveles de mRNA aumentados, lo que probablemente se deba a que existe una mayor proporción de CG en crecimiento. Por otro lado, si bien la AMH, generalmente se ha asociado a una función inhibitoria sobre el crecimiento folicular y como marcador de la reserva folicular (Visser, et al. 2006), cada vez más estudios han estado poniendo en juicio su acción directa sobre estos procesos (Jamil, et al. 2016, Monniaux, et al. 2014). En nuestro caso, un aumento de la AMH plasmática se relaciona con un aumento del número de folículos en desarrollo, ya que la AMH es secretada y producida por folículos de tamaño pequeño, principalmente secundarios y antrales pequeños menores a 200  $\mu\text{m}$  en ratas (Baarends, et al. 1995), es decir, dado que el bloqueo  $\beta$ -adrenérgico (y la disminución de Kiss) genera un aumento de los folículos secundarios y antrales, éstos podrían dar cuenta del aumento de AMH plasmática encontrados en este trabajo. En conjunto, los cambios de GDF9, AMH y

BMPR2 demuestran que el aumento del FSHR encontrado en estos ovarios es funcional y la probable causa principal del crecimiento folicular. Más aún la FSH plasmática no cambia en las ratas tratadas con propranolol (Tabla 4), por lo que el efecto parece ser local y no hipotalámico. Así mismo, en el modelo de ratones Tg los ovarios presentan un aumento en los niveles del mRNA de AMH y el factor BMP15 (Figura 10), lo que reafirma la idea de un desarrollo folicular aumentado ante la falta del Kiss1R. Esto apoya la hipótesis de que Kiss participa como un controlador de la velocidad de crecimiento folicular vía una acción directa sobre la expresión del FSHR. Lamentablemente, aún a la fecha no existen consensos claros respecto del mecanismo específico sobre la regulación transcripcional del FSHR (Hermann and Heckert 2007) y aunque la estructura genómica básica del FSHR se conoce desde hace más de una década, sólo recientemente se ha logrado determinar con exactitud el tamaño real del gen y de su entorno genómico circundante. La secuencia codificante del FSHR posee un entorno de más de 235 Kb en la rata (Hermann and Heckert 2007, Simoni, et al. 1997). Este entorno genómico está desprovisto de otros genes de codificación y su vecino más cercano es el LHCGR (Receptor de hormona Luteinizante/Receptor de Gonadotropina Coriónica) a 275 kb de distancia río abajo (Nobrega, et al. 2003, Ovcharenko, et al. 2005) y entre 892 y 1037 Kb del gen NRXN1 (Neurexina 1) río arriba. Por otro lado, la región promotora del FSHR posee sólo un sitio E-box canónico como lugar de unión a factores transcripcionales (como se muestra en la Figura 21). Utilizando mutaciones sitioespecíficas e inmunoprecipitación de cromatina, se determinó que la E-box del FSHR (5'-CACGTG-3') une a los factores transcripcionales básicos hélice-vuelta-hélice: factor estimulador río arriba 1 y 2 (USF1 y USF2), y que ambos son importantes para la transcripción activa del FSHR (Heckert, et al. 1998). A pesar de esto, la actividad del promotor del FSHR no es completamente explicada por la unión de USF1 y USF2, sino que probablemente interacciones con sitios de regulación lejanas al sitio de inicio de la traducción completan la activación transcripcional de este gen (Hermann and Heckert 2007). En resumen; la cercanía génica del FSHR y el LHR, más la regulación en trans sobre el promotor de FSHR podría explicar que Kiss produzca una disminución del

FSHR pero un posible aumento del LHR, ya que si una conformación/plegamiento tridimensional del DNA con reguladores lejanos es necesaria, este cambio podría estar afectando la expresión, tanto del FSHR como del LHR.

En resumen, en este trabajo hemos descrito que la expresión de Kiss aumenta durante el envejecimiento ovárico y que dicho efecto está mecanísticamente relacionado con un aumento de la actividad noradrenérgica aumentada, vía receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Adicionalmente Kiss se relaciona con una acción dual sobre el LHR y el FSHR. Respecto del LHR, Kiss aparentemente aumenta su expresión, como lo sugiere el aumento de la ovulación, la disminución del LHR en los ovarios de ratones Tg y la falla ovulatoria temprana descrita en la bibliografía de los ratones tg y Kiss1R<sup>+/-</sup>. Por el contrario, Kiss disminuye la expresión del FSHR como lo puede explicar el aumento del reclutamiento folicular observado en los ovarios tratados crónicamente con un antagonista  $\beta$ -adrenérgico. Este efecto fisiológico sobre el desarrollo folicular se explica mediante el aumento de la expresión del FSHR detectada en los mismos ovarios, lo cual podría obedecer a un efecto de antagonismo funcional entre el sistema Kiss/Kiss1R (proteína Gq) y el sistema NA/ $\beta$ -ADR (proteína Gs).



**Figura 21- Estructura del gen FSHR y su localización cromosómica.** A) La estructura exón-intrón del FSHR corresponde a la estructura de dominio de la proteína. Los exones 1 a 9 corresponden al dominio extracelular de unión al ligando, mientras que el exón 10 codifica para los dominios intracelulares y transmembrana. Cada uno de los exones 2 a 8 poseen repeticiones ricas en leucina. El tamaño de cada exón en pares de bases se muestra arriba del diagrama y los tamaños conocidos de los intrones para rata (arriba) y humano (abajo) se ubican entre cada exón. B) Además de la estructura del gen, el entorno cromosómico circundante FSHR se conserva entre especies. El tamaño del FSHR y los genes vecinos en humanos y ratas se muestra por encima de cada gen y se indican las distancias intergénicas. Adaptado de Hermann 2007 (Hermann and Heckert 2007).

## **Conclusiones Finales**

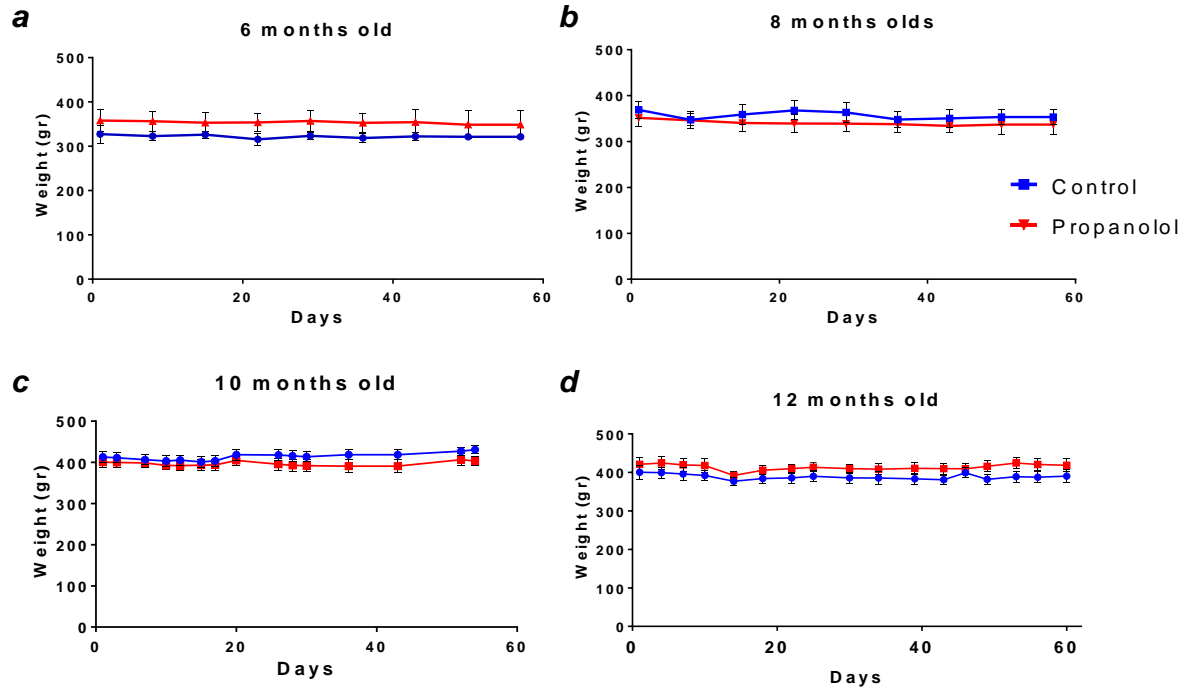
- 1) La expresión de Kiss aumenta espontáneamente en el ovario durante el envejecimiento reproductivo.
- 2) La Expresión de Kiss es probablemente controlada por el sistema simpático vía su acción sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de los folículos en desarrollo.
- 3) La acción de Kiss en el ovario pareciera ejercer un control dual y modulador sobre la expresión de los receptores de gonadotrofinas (FSHR y LHR) de los folículos en desarrollo, contribuyendo así a la regulación del desarrollo folicular y la ovulación durante el periodo subfertilidad.



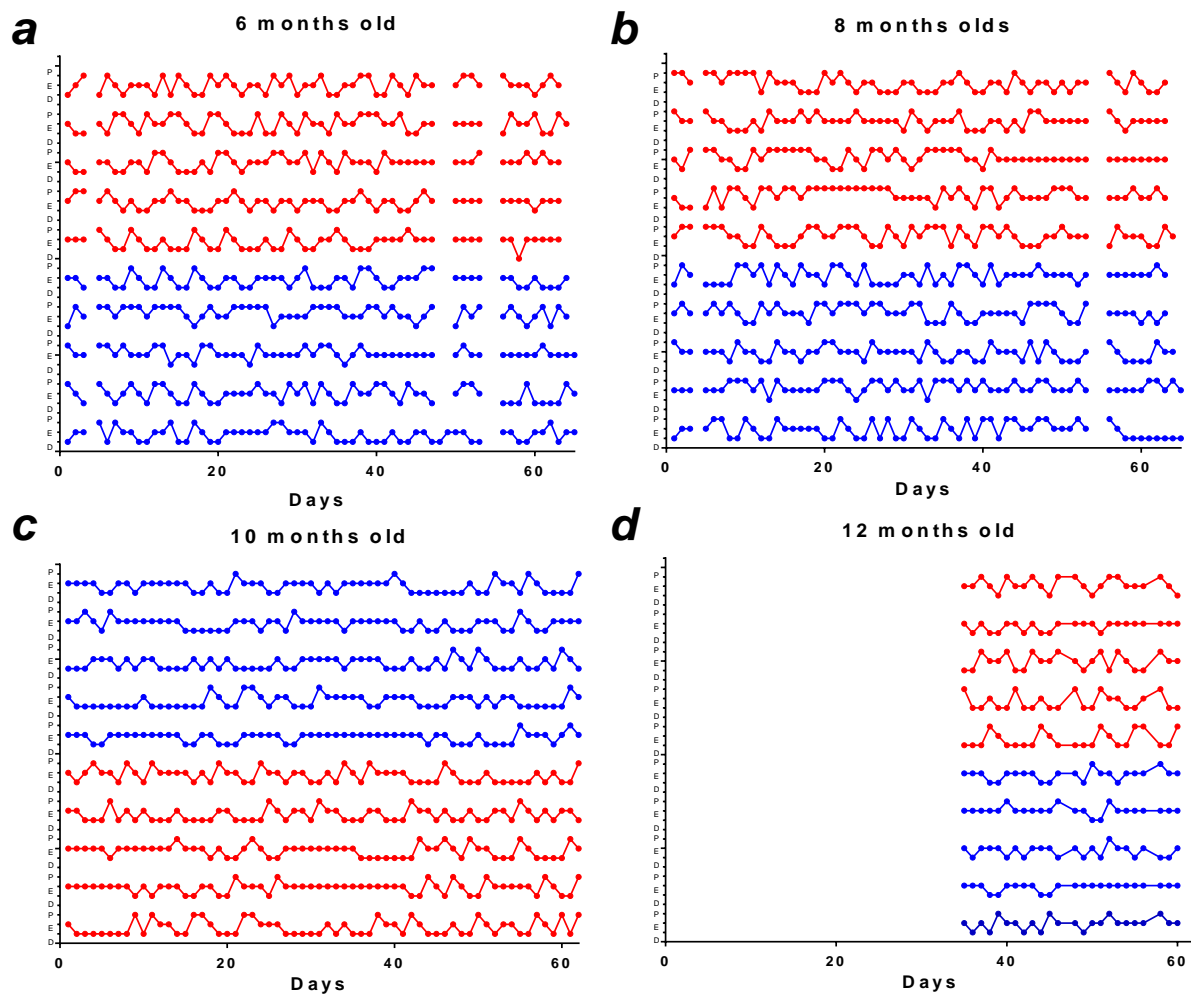
# Anexo

## Peso de los animales y ciclicidad estral durante el tratamiento con Propranolol por dos meses.

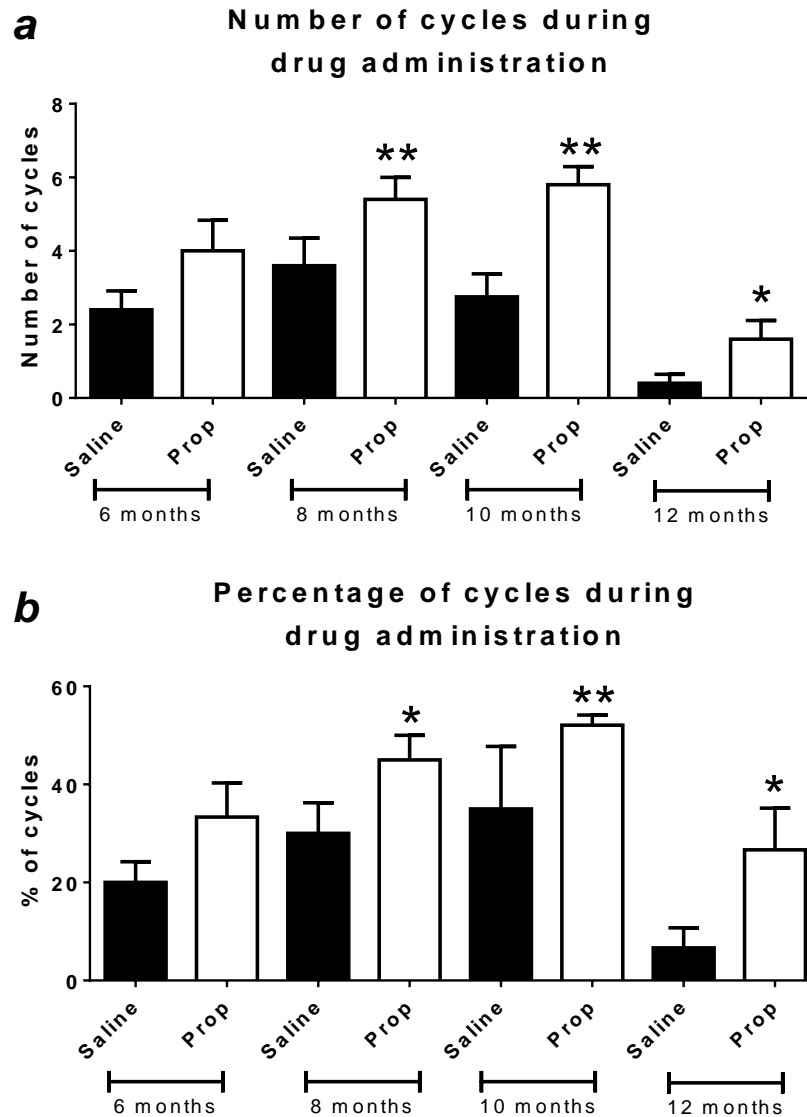
Como se observa en la Figura 22, no existen cambios en el peso de los animales atribuidos a la inyección con suero fisiológico (vehículo) o propranolol a ninguna de las edades estudiadas. Respecto de la ciclicidad estral, el tratamiento con propranolol genera un aumento del número de ciclos estrales respecto del control a los 8, 10 y 12 meses de edad (Figura 23 y 24). Este efecto fue reportado previamente por nuestro grupo (Fernandois, et al. 2012).



**Figura 22-** Peso de los animales. Se grafica el peso de los animales en  $gr \pm SD$ . Líneas azules corresponden a ratas controles con inyección intraperitoneal diaria de suero fisiológico como vehículo. Líneas rojas corresponden a ratas con inyección intraperitoneal diaria de propranolol 5mg/kg peso.



**Figura 23-** Diagrama representativo de la ciclicidad estral de cinco animales para cada uno de los grupos tratados. Se grafica como P = proestro, E = estro y D = metaestro y diestro. La ciclicidad se obtuvo mediante frotis vaginal diario con observación al microscopio. Un ciclo estral normal se considera como el paso de P a E, seguido necesariamente por un D. Líneas azules indican condición control o vehículo. Líneas rojas indican condición propranolol. Serie 12 meses sólo fue ciclada durante los últimos 20 días de administración del fármaco.



**Figura 24- Ciclicidad estral durante el periodo de subfertilidad determinados por análisis de frofisis vaginal.** A) Números de ciclos promedio de los animales por grupo experimental y B) el porcentaje de ovulación, considerando como el 100% un ciclo que ocurre cada 5 días, por los 60 días de tratamiento (aproximadamente 16 ciclos) a excepción de los 12 meses que se consideran (6 ciclos como el 100%). Los datos se grafican como el promedio  $\pm$  SEM. El número de experimentos para cada grupo experimental se muestra dentro de cada barra. La significancia se obtuvo con un *t*-test de Student de dos colas.  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$  y  $p < 0,001 = ***$ .

## Bibliografía

- Acuna, E, R Fornes, D Fernandois, MP Garrido, M Greiner, HE Lara, and AH Paredes** 2009 Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol* **7** 64.
- Adashi, EY, and AJ Hsueh** 1981 Stimulation of beta 2-adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* **108** 2170-2178.
- Adhikari, D, and K Liu** 2009 Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* **30** 438-464.
- Advis, JP, CE Ahmed, and SR Ojeda** 1989 Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. *Brain Res Bull* **22** 605-610.
- Aguado, LI, SL Petrovic, and SR Ojeda** 1982 Ovarian beta-adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* **110** 1124-1132.
- Almeida, DV, RR Santos, SR Scalercio, DL Leao, A Haritova, IC Oskam, and SF Domingues** 2012 Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Anim Reprod Sci* **134** 210-215.
- Altarejos, JY, N Goebel, MD Conkright, H Inoue, J Xie, CM Arias, PE Sawchenko, and M Montminy** 2008 The Creb1 coactivator Crtc1 is required for energy balance and fertility. *Nat Med* **14** 1112-1117.
- Alvigi, C, P Humaidan, CM Howles, D Tredway, and SG Hillier** 2009 Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol* **7** 101.
- Atkins, HM, CJ Willson, M Silverstein, M Jorgensen, E Floyd, JR Kaplan, and SE Appt** 2014 Characterization of ovarian aging and reproductive senescence in vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaues*). *Comp Med* **64** 55-62.
- Baarends, WM, JT Uilenbroek, P Kramer, JW Hoogerbrugge, EC van Leeuwen, AP Themmen, and JA Grootegoed** 1995 Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* **136** 4951-4962.
- Barria, A, V Leyton, SR Ojeda, and HE Lara** 1993 Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* **133** 2696-2703.
- Bhattacharya, M, and AV Babwah** 2015 Kisspeptin: beyond the brain. *Endocrinology* **156** 1218-1227.
- Brawer, JR, M Munoz, and R Farookhi** 1986 Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* **35** 647-655.
- Castellano, JM, M Gaytan, J Roa, E Vigo, VM Navarro, C Bellido, C Dieguez, E Aguilar, JE Sanchez-Criado, A Pellicer, L Pinilla, F Gaytan, and M Tena-Sempere** 2006a Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* **147** 4852-4862.
- Castellano, JM, VM Navarro, R Fernandez-Fernandez, JP Castano, MM Malagon, E Aguilar, C Dieguez, P Magni, L Pinilla, and M Tena-Sempere** 2006b Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* **257-258** 75-83.
- Cruz, G, R Barra, D Gonzalez, R Sotomayor-Zarate, and HE Lara** 2012 Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril* **98** 1283-1290.

- Chavez-Genaro, R, P Lombide, R Dominguez, P Rosas, and F Vazquez-Cuevas** 2007 Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and follicular population. *Reprod Fertil Dev* **19** 954-960.
- DEIS** 2011 Estadísticas de Natalidad y Mortalidad Chile, Año 2009. *In* DdEeId Salud–MINSAL (ed.).
- DEIS** 2012 Estadísticas de Natalidad y Mortalidad Chile, Año 2010. *In* DdEeId Salud–MINSAL (ed.).
- Dissen, GA, DF Hill, ME Costa, CW Les Dees, HE Lara, and SR Ojeda** 1996 A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* **137** 198-209.
- Dorland, M, RJ van Kooij, and ER te Velde** 1998 General ageing and ovarian ageing. *Maturitas* **30** 113-118.
- Faddy, MJ, RG Gosden, A Gougeon, SJ Richardson, and JF Nelson** 1992 Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* **7** 1342-1346.
- Fernandois, D, HE Lara, and AH Paredes** 2012 Blocking of beta-adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats. *Horm Metab Res* **44** 682-687.
- Fernandois, D, E Na, F Cuevas, G Cruz, HE Lara, and AH Paredes** 2016 Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *J Endocrinol* **228** 161-170.
- Finch, CE** 2014 The menopause and aging, a comparative perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol* **142** 132-141.
- Funes, S, JA Hedrick, G Vassileva, L Markowitz, S Abbondanzo, A Golovko, S Yang, FJ Monsma, and EL Gustafson** 2003 The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* **312** 1357-1363.
- Gaytan, F, D Garcia-Galiano, MD Dorfman, M Manfredi-Lozano, JM Castellano, GA Dissen, SR Ojeda, and M Tena-Sempere** 2014 Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion. *Endocrinology* **155** 3088-3097.
- Gaytan, F, M Gaytan, JM Castellano, M Romero, J Roa, B Aparicio, N Garrido, JE Sanchez-Criado, RP Millar, A Pellicer, HM Fraser, and M Tena-Sempere** 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. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296** E520-531.
- Gerendai, I, IE Toth, Z Boldogkoi, I Medveczky, and B Halasz** 1998 Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* **68** 244-256.
- Greenwald, GS, and I Rothchild** 1968 Formation and maintenance of corpora lutea in laboratory animals. *J Anim Sci* **27 Suppl 1** 139-162.
- Hansen, KR, NS Knowlton, AC Thyer, JS Charleston, MR Soules, and NA Klein** 2008 A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod* **23** 699-708.
- Heckert, LL, MA Daggett, and J Chen** 1998 Multiple promoter elements contribute to activity of the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene in testicular Sertoli cells. *Mol Endocrinol* **12** 1499-1512.
- Heider, U, I Pedal, and K Spanel-Borowski** 2001 Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril* **75** 1141-1147.
- Hermann, BP, and LL Heckert** 2007 Transcriptional regulation of the FSH receptor: new perspectives. *Mol Cell Endocrinol* **260-262** 100-108.
- Hirshfield, AN, and AR Midgley, Jr.** 1978a Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* **19** 597-605.
- Hirshfield, AN, and AR Midgley, Jr.** 1978b The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biol Reprod* **19** 606-611.
- Jamil, Z, SS Fatima, K Ahmed, and R Malik** 2016 Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers. *Dis Markers* **2016** 5246217.

- Jones, EC, and PL Krohn** 1961 The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *J Endocrinol* **21** 469-495.
- Kirilov, M, J Clarkson, X Liu, J Roa, P Campos, R Porteous, G Schutz, and AE Herbison** 2013 Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nat Commun* **4** 2492.
- Knight, PG, and C Glister** 2006 TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* **132** 191-206.
- Kotani, M, M Detheux, A Vandenbogaerde, D Communi, JM Vanderwinden, E Le Poul, S Brezillon, R Tyldesley, N Suarez-Huerta, F Vandeput, C Blanpain, SN Schiffmann, G Vassart, and M Parmentier** 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.
- Laoharatchathanin, T, R Terashima, T Yonezawa, S Kurusu, and M Kawaminami** 2015 Augmentation of Metastin/Kisspeptin mRNA Expression by the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Granulosa Cells of Rats: Implications for Luteinization. *Biol Reprod* **93** 15.
- Lara, HE, GA Dissen, V Leyton, A Paredes, H Fuenzalida, JL Fiedler, and SR Ojeda** 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.
- Lara, HE, JL Ferruz, S Luza, DA Bustamante, Y Borges, and SR Ojeda** 1993 Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* **133** 2690-2695.
- Larragaña, O** 2003 Participación Laboral de la Mujer en Chile, 1958-2003. *Depto. Economía U.Ch., [2004]*.
- Leon, S, A Barroso, MJ Vazquez, D Garcia-Galiano, M Manfredi-Lozano, F Ruiz-Pino, V Heras, A Romero-Ruiz, J Roa, G Schutz, M Kirilov, F Gaytan, L Pinilla, and M Tena-Sempere** 2016 Direct Actions of Kisspeptins on GnRH Neurons Permit Attainment of Fertility but are Insufficient to Fully Preserve Gonadotropic Axis Activity. *Sci Rep* **6** 19206.
- Lerner, SP, S Meredith, WV Thyne, and RL Butcher** 1990 Age-related alterations in follicular development and hormonal profiles in rats with 4-day estrous cycles. *Biol Reprod* **42** 633-638.
- Mandl, AM, and M Shelton** 1959 A quantitative study of oocytes in young and old nulliparous laboratory rats. *J Endocrinol* **18** 444-450.
- Manni, L, A Holmang, S Cajander, T Lundeberg, L Aloe, and E Stener-Victorin** 2006 Effect of anti-NGF on ovarian expression of alpha1- and beta2-adrenoceptors, TrkA, p75NTR, and tyrosine hydroxylase in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290** R826-835.
- Mayerhofer, A, GA Dissen, ME Costa, and SR Ojeda** 1997 A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* **138** 3320-3329.
- McGee, EA** 2000 The regulation of apoptosis in preantral ovarian follicles. *Biol Signals Recept* **9** 81-86.
- McGee, EA, and AJ Hsueh** 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* **21** 200-214.
- Merhi, Z, K Thornton, E Bonney, MJ Cipolla, MJ Charron, and E Buyuk** 2016 Ovarian kisspeptin expression is related to age and to monocyte chemoattractant protein-1. *J Assist Reprod Genet* **33** 535-543.
- Messenger, S, EE Chatzidaki, D Ma, AG Hendrick, D Zahn, J Dixon, RR Thresher, I Malinge, D Lomet, MB Carlton, WH Colledge, A Caraty, and SA Aparicio** 2005 Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** 1761-1766.
- Monniaux, D, F Clement, R Dalbies-Tran, A Estienne, S Fabre, C Mansanet, and P Monget** 2014 The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod* **90** 85.
- Montminy, M** 1997 Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* **66** 807-822.
- Muir, AI, L Chamberlain, NA Elshourbagy, D Michalovich, DJ Moore, A Calamari, PG Szekeres, HM Sarau, JK Chambers, P Murdock, K Steplewski, U Shabon, JE Miller, SE Middleton,**

- JG Darker, CG Larminie, S Wilson, DJ Bergsma, P Emson, R Faull, KL Philpott, and DC Harrison** 2001 AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* **276** 28969-28975.
- Nobrega, MA, I Ovcharenko, V Afzal, and EM Rubin** 2003 Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science* **302** 413.
- Ovcharenko, I, GG Loots, MA Nobrega, RC Hardison, W Miller, and L Stubbs** 2005 Evolution and functional classification of vertebrate gene deserts. *Genome Res* **15** 137-145.
- Palermo, R** 2007 Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* **15** 326-337.
- Peluso, JJ, RW Steger, H Huang, and J Meites** 1979 Pattern of follicular growth and steroidogenesis in the ovary of aging cycling rats. *Exp Aging Res* **5** 319-333.
- Pepling, ME** 2006 From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* **44** 622-632.
- Pepling, ME** 2012 Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction* **143** 139-149.
- Persani, L, R Rossetti, E Di Pasquale, C Cacciatore, and S Fabre** 2014 The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update* **20** 869-883.
- Pineda, R, D Garcia-Galiano, A Roseweir, M Romero, MA Sanchez-Garrido, F Ruiz-Pino, K Morgan, L Pinilla, RP Millar, and M Tena-Sempere** 2010 Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* **151** 722-730.
- Pinilla, L, E Aguilar, C Dieguez, RP Millar, and M Tena-Sempere** 2012 Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* **92** 1235-1316.
- Rajah, R, EM Glaser, and AN Hirshfield** 1992 The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* **194** 177-192.
- Ricu, MA, VD Ramirez, AH Paredes, and HE Lara** 2012 Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology* **153** 4966-4977.
- Roa, J, JM Castellano, VM Navarro, DJ Handelsman, L Pinilla, and M Tena-Sempere** 2009 Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* **30** 57-66.
- Romero, C, A Paredes, GA Dissen, and SR Ojeda** 2002 Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* **143** 1485-1494.
- Salas, C, M Julio-Pieper, M Valladares, R Pommer, M Vega, C Mastronardi, B Kerr, SR Ojeda, HE Lara, and C Romero** 2006 Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **91** 2396-2403.
- Sato, J, S Hashimoto, T Doi, N Yamada, and M Tsuchitani** 2014 Histological characteristics of the regression of corpora lutea in wistar hannover rats: the comparisons with sprague-dawley rats. *J Toxicol Pathol* **27** 107-113.
- Simoni, M, J Gromoll, and E Nieschlag** 1997 The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* **18** 739-773.
- Song, WJ, P Mondal, A Wolfe, LC Alonso, R Stamateris, BW Ong, OC Lim, KS Yang, S Radovick, HJ Novaira, EA Farber, CR Farber, SD Turner, and MA Hussain** 2014 Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion. *Cell Metab* **19** 667-681.
- Stefenson, A, C Owman, NO Sjoberg, B Sporrang, and B Walles** 1981 Comparative study of the autonomic innervation of the mammalian ovary, with particular regard to the follicular system. *Cell Tissue Res* **215** 47-62.
- te Velde, ER, M Dorland, and FJ Broekmans** 1998a Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas* **30** 119-125.



- te Velde, ER, AL van Baar, and RJ van Kooij** 1998b Concerns about assisted reproduction. *Lancet* **351** 1524-1525.
- Tena-Sempere, M** 2006 GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update* **12** 631-639.
- Visser, JA, FH de Jong, JS Laven, and AP Themmen** 2006 Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* **131** 1-9.
- Weenen, C, JS Laven, AR Von Bergh, M Cranfield, NP Groome, JA Visser, P Kramer, BC Fauser, and AP Themmen** 2004 Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* **10** 77-83.
- Weghofer, A, A Kim, DH Barad, and N Gleicher** 2013 Age at menarche: a predictor of diminished ovarian function? *Fertil Steril* **100** 1039-1043.
- West, A, PJ Vojta, DR Welch, and BE Weissman** 1998 Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* **54** 145-148.
- Wu, JM, MB Zelinski, DK Ingram, and MA Ottinger** 2005 Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. *Exp Biol Med (Maywood)* **230** 818-828.