

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



EFFECTO DE KISSPEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR 2 Y 9 A NIVEL OVÁRICO EN RATAS EN EL PERIODO DE SUBFERTILIDAD

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

MACARENA ANDREA LAS HERAS PARRAGUEZ

Director de Tesis: Dr. Alfonso Humberto Paredes Vargas

Santiago-CHILE

Diciembre 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

MACARENA ANDREA LAS HERAS PARRAGUEZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día 1 de Diciembre de 2016.

Director de Tesis:

Dr. Alfonso Humberto Paredes Vargas

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela Padevilla

Dra. Lorena Del Pilar García Nannig

Dra. María Margarita Vega Blanco

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a quienes han estado conmigo en cada etapa de mi vida, me han formado y brindado todo su apoyo y amor: a mi mamá, mi hermanita, mi Mun y mi abuelito (que ya no está con nosotros). También a Ricardo, a mi papá, a mis tíos y primos y a la familia de mi pololo. Gracias a todos ustedes por quererme, soportarme y alentarme. Los quiero mucho.

Quiero agradecer además a Daniel y a mi hija Paulita, a quienes amo profundamente y me alegran la vida cada día. Gracias por su gran apoyo durante este largo proceso, por soportarme, por todo lo que me han enseñado y por lo que hemos construido juntos.

Agradezco también a mis amigos de la U: Carlitos, Fabi, Frenshi, Huguito, Iván, Mayo, Paulilla, Pablito, Ange y Cláu. Por todos los momentos y aventuras que hemos vivido juntos, por apoyarme, ayudarme, acompañarme y hacerme reír siempre.

A todos los que forman o formaron parte del Laboratorio de Neurobioquímica: Frenshi, Dani, Bea, Profe Mónica, Vale, Ruth, Pia, Ángela, Michelle y Raúl. Son un muy buen equipo y hacen que el trabajo sea más ameno y entretenido.

A mis profesores de la U, especialmente a mi Director de Tesis, el Dr. Alfonso Paredes. Muchísimas gracias por todo, en especial por permitirme formar parte de su laboratorio, por sus enseñanzas durante toda mi formación profesional, por su ayuda, su comprensión y su paciencia. También quiero agradecer al Dr. Hernán Lara que, al igual que el Dr. Paredes, ha sido muy importante en mi formación profesional.

Finalmente, quiero agradecer a mi comisión de tesis por su paciencia y sus comentarios constructivos.

Macarena Las Heras P.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Fernandois D, Na EK, Cuevas F, Las Heras M, Lara H, Paredes A. Kisspeptina aumenta en el ovario de rata durante el periodo de subfertilidad y participa en el desarrollo folicular. **XXV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo**. Valdivia, Chile. 3 al 6 de Septiembre de 2014.

Las Heras M, Lara H, Paredes A. Kisspeptina regula la expresión de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9 en ovarios de ratas en el periodo de subfertilidad. **XXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo**. Antofagasta, Chile. 4 al 7 de Septiembre de 2015.

BECAS Y FINANCIAMIENTO

BECAS

- MARZO 2013 – AGOSTO 2015: Beca otorgada por CONICYT para estudios de Magíster en Chile. Folio N° 22131990.
- SEPTIEMBRE 2015: Beca otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Asistencia a congresos nacionales.

FINANCIAMIENTO

- PROYECTO FONDECYT REGULAR N° 1120147.

Esta tesis se desarrolló en:

- Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. POSTERGACIÓN DE LA MATERNIDAD	1
1.2. ENVEJECIMIENTO REPRODUCTIVO	3
1.3. KISSPEPTINAS	4
1.4. KISSPEPTINA EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA.....	5
1.5. KISSPEPTINA INTRAOVÁRICA	6
1.6. METALOPROTEINASAS OVÁRICAS Y MATRIZ EXTRACELULAR	8
1.7. RELACIÓN ENTRE KISSPEPTINA Y METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	11
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS	13
3.1. OBJETIVO GENERAL	13
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3.2.1. Primer objetivo específico	14
3.2.2. Segundo objetivo específico	14
3.2.3. Tercer objetivo específico	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. ANIMALES	15
4.2. DETERMINACIÓN DE LA FASE DEL CICLO ESTRAL	17
4.3. DETERMINACIÓN DE LOS mRNAs DE <i>Kiss-1</i> , MMP-2 Y MMP-9 POR PCR EN TIEMPO REAL.....	18
4.4. EXTRACCIÓN DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR OVÁRICA	19

4.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	20
4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA	20
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
5. RESULTADOS	22
5.1. OBJETIVO 1: CARACTERIZAR EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MRNAS DE KISS-1, MMP-2 Y MMP-9 Y LOS CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD GELATINÁSICA EN OVARIOS DE RATAS SPRAGUE DAWLEY FÉRTILES Y SUBFÉRTILES EN LAS DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO ESTRAL (PROESTRO TEMPRANO, TARDÍO Y ESTRO).....	22
5.1.1. <i>Niveles de mRNA de Kiss-1, MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas Sprague Dawley fértiles</i>	<i>22</i>
5.1.2. <i>Niveles de mRNA de Kiss-1, MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas Sprague Dawley subfértiles</i>	<i>22</i>
5.1.3. <i>Niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 en ovarios de ratas Sprague Dawley fértiles durante el ciclo estral</i>	<i>25</i>
5.1.4. <i>Niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 en ovarios de ratas Sprague Dawley subfértiles durante el ciclo estral.....</i>	<i>26</i>
5.2. OBJETIVO 2: DETERMINAR EL EFECTO DE LA ADICIÓN DEL PÉPTIDO KP-10 SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DE MMP-2 Y MMP-9 EN OVARIOS DE RATAS SPRAGUE DAWLEY DE 6, 8 Y 10 MESES DE EDAD Y ESTUDIAR SI DICHO EFECTO SE REVIERTE EN PRESENCIA DE P234 (ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE KISSPEPTINA).....	29
5.2.1. <i>Niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas Sprague Dawley de 6, 8 y 10 meses de edad incubados in vitro en condiciones control</i>	<i>29</i>
5.2.2. <i>Niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas Sprague Dawley de 6, 8 y 10 meses de edad incubados in vitro en presencia del péptido KP-10 y de KP-10 + p234</i>	<i>30</i>
5.3. OBJETIVO 3: ESTUDIAR EL EFECTO DE UN AUMENTO DE KISSPEPTINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS GELATINASAS (MMP-2 Y MMP-9) EN EL OVARIO DE RATAS SPRAGUE	

DAWLEY DE 6, 8 Y 10 MESES DE EDAD Y DETERMINAR SI DICHO EFECTO SE REVIERTE EN PRESENCIA DE P234 (ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE KISSPEPTINA).....33

5.3.1. *Niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 en ovarios de ratas Sprague Dawley de 6, 8 y 10 meses incubados in vitro en presencia del péptido KP-10 y p234*

33

6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	45
8. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa global de fecundidad en Chile entre 1950 y 2014 (INE 2014).....	2
Figura 2. Disminución en el número de folículos en relación a los eventos reproductivos durante la vida de la mujer (Faddy et al., 1992).	3
Figura 3. Representación esquemática del gen <i>Kiss-1</i> y sus productos derivados(Pinilla et al., 2012).	5
Figura 4. Representación esquemática de la regulación del sistema MMP. (Curry & Osteen 2003).	10
Figura 5. Expresión del mRNA de <i>Kiss-1</i> , MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas <i>Sprague Dawley</i> de 3 a 6 meses de edad durante el ciclo estral.....	23
Figura 6. Expresión del mRNA de MMP-2, MMP-9 y <i>Kiss-1</i> en ovarios de animales en el inicio del periodo de subfertilidad en proestro y estro.	24
Figura 7. Gel representativo de zimografía.	25
Figura 8. Niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas <i>Sprague Dawley</i> fértiles de 3 a 6 meses de edad durante el ciclo estral.	26
Figura 9. Niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas <i>Sprague Dawley</i> de 8 meses de edad en proestro y estro.....	27
Figura 10. Niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas <i>Sprague Dawley</i> de 6, 8 y 10 meses de edad incubados <i>in vitro</i> en condiciones control.....	29
Figura 11. Expresión del mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de animales de 6, 8 y 10 meses de edad incubados <i>in vitro</i> en presencia del péptido KP-10 y de p234 (antagonista del receptor de kisspeptina).....	31
Figura 12. Niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas <i>Sprague Dawley</i> de 6, 8 y 10 meses de edad incubados <i>in vitro</i> en presencia del péptido KP-10 y de KP-10 + p234 (antagonista del receptor de kisspeptina).	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de animales a utilizar por condición experimental para el objetivo 1.....	16
Tabla 2. Número de animales a utilizar por condición experimental para los objetivos 2 y 3.....	16
Tabla 3. Secuencias de partidores a utilizar.....	19
Tabla 4. Condiciones de amplificación.....	19

ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero bovino.
dNTPs	Desoxinucleótidos fosfato.
CHO	Células de ovario de hámster chino.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas.
GPR54	Receptor de kisspeptina.
hCG	Gonadotrofina coriónica humana.
HEKs	Células embrionarias de riñón humano.
KISS	Kisspeptina.
KP-10	Péptido de kisspeptina de 13 aminoácidos.
LH	Hormona luteinizante.
MEC	Matriz extracelular.
MMP-2	Metaloproteinas-2.
MMP-9	Metaloproteinasa-9.
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular.
MT-MMPs	Metaloproteinasas de matriz tipo membrana.
p234	Antagonista del receptor de kisspeptina.
PAGE	Electroforesis en gel de poli-acrilamida.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas.
Tris-HCl	Hidrocloreuro de Tris (hidroximetil) aminometano.

RESUMEN

En la actualidad existen mayores posibilidades de desarrollo académico y profesional para las mujeres. Esto, sumado al fácil acceso a métodos para el control de la natalidad, ha llevado a que se postergue la maternidad a edades más tardías. Esta situación se ha convertido en un gran problema para los países por sus consecuencias a nivel económico, social y de salud pública. Por ello, es de suma importancia estudiar los mecanismos involucrados en el proceso de envejecimiento reproductivo.

La regulación de la función ovárica se conoce ampliamente desde el punto de vista neuroendocrino, sin embargo, poco se sabe de los mecanismos que la controlan a nivel local. Se cree que un grupo de péptidos, conocidos como kisspeptinas (KISS), cuyos niveles en el ovario varían conforme al progreso del ciclo estral, podrían estar regulando al sistema proteolítico de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) a nivel local, de manera similar a como se ha descrito en otros tejidos. De ser así, KISS podría regular cíclicamente el remodelamiento de la matriz extracelular ovárica controlando los niveles de expresión y/o actividad de las MMPs. Esto cobraría especial importancia en el periodo de subfertilidad, puesto que se ha descrito que los cambios morfológicos asociados al envejecimiento ovárico en la rata van acompañados de un aumento significativo en los niveles de KISS en el ovario. En base a esto, se postuló que **“el aumento de kisspeptina endógeno produce la disminución de la expresión del transcrito y/o actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular-2 y -9 en el ovario en el periodo de subfertilidad en ratas”**. El objetivo general del trabajo consistió en caracterizar el patrón de expresión de los mRNAs de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 y los niveles de actividad proteolítica en ovarios de ratas fértiles y subfértiles en diferentes etapas del ciclo estral, y estudiar el efecto de la adición del péptido KP-10 y del bloqueo de su receptor con el antagonista p234 sobre la expresión y actividad de estas MMPs. Para llevar a cabo este objetivo, se obtuvieron ovarios en distintas fases del ciclo estral y, a partir de ellos, se estudiaron los niveles de mRNA de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 mediante RT-qPCR, y los niveles de actividad gelatinásica mediante zimografía. Además, se realizaron incubaciones *in vitro* de ovarios de ratas de 6, 8 y 10 meses de edad en presencia del péptido KP-10 y de KP-10 + p234 y, a partir de éstos, se estudiaron los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 y los niveles de actividad gelatinásica.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los niveles de mRNA de las gelatinasas varían de forma opuesta en el ciclo estral, lo que coincide con el rol fisiológico que se ha descrito para cada una de ellas en procesos como ovulación y formación del cuerpo lúteo. Además, se encontró que los niveles del mRNA de MMP-2 disminuyen de forma significativa en el ovario en el periodo de subfertilidad, probablemente como resultado de la disminución en el número de folículos antrales y cuerpos lúteos que se ha descrito a los 10 meses de edad en la rata. Por último, se encontró que los resultados no avalan la hipótesis planteada puesto que el tratamiento de los ovarios con el péptido KP-10 o con KP-10 + p234 no tuvo efecto sobre la expresión de los mRNAs de MMP-2 y MMP-9 en el periodo fértil ni en el subfértil. En el caso de MMP-2, tampoco se observó efecto a nivel de actividad.

ABSTRACT

There are currently greater possibilities of academic and professional development for women. This, coupled with ease of access to birth control methods, has led women to postpone motherhood to later ages. This situation has become a major problem for countries due to its economic, social, and public health consequences. Therefore, it is important to study the mechanisms involved in the process of reproductive aging.

While the regulation of the ovarian function is widely known from the neuroendocrine point of view, little is known about the mechanisms that control it locally. It is believed that a group of peptides, known as kisspeptins (KISS), whose levels vary according to the progress of the estrous cycle, could be regulating the extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) proteolytic system locally, similarly to what has been described in other tissues. If so, KISS could be cyclically regulating the ovarian extracellular matrix remodeling by controlling the MMP expression levels and/or activity. This would be especially important in the subfertility period, since it has been described that the morphological changes associated with the ovarian aging in the rat are accompanied with a significative increase in the ovarian KISS levels. Based on this, it was postulated that **“the endogenous kisspeptin increase causes a decrease in the transcript expression and/or extracellular matrix metalloproteinases -2 and -9 activity in the ovary on the subfertility period in rats”**. The main objective was to characterize the *Kiss-1*, MMP-2 and MMP-9 expression pattern and the gelatinolytic activity levels in ovaries of fertile and subfertile rats at different stages of the estrous cycle, and to study the effect of an addition of KP-10 peptide and the blocking of its receptor with p234 antagonist over the expression and activity of these MMPs. To carry out this objective, ovaries were obtained in different stages of the estrous cycle and, from them, the *Kiss-1*, MMP-2 and MMP-9 mRNA's levels were studied by RT-qPCR, and the gelatinolytic activity levels by zymography. In addition, *in vitro* incubations of rat ovaries were performed with KP-10 peptide or with KP-10 peptide + p234 and, from these, the mRNA's levels of MMP-2 and MMP-9 and the gelatinolytic activity levels were studied.

The results obtained in this work showed that the gelatinases mRNA levels vary in an opposite way in the estrous cycle, which coincides with the physiological role that has been described for each of them in processes such as ovulation and formation of the corpus luteum. In addition, MMP-2 mRNA levels were found to decrease significantly in the ovary in the subfertile period, probably as a result of the decrease in the number of antral follicles and corpus luteum that has been described at 10 months old in the rat. Finally, it was found that the results do not support the postulated hypothesis since the treatment of the ovaries with the KP-10 peptide or with KP-10 + p234 had no effect on the MMP-2 and MMP-9 mRNA's expression levels in the fertile or subfertile period. In the case of MMP-2 there was no effect in the activity levels.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. POSTERGACIÓN DE LA MATERNIDAD

El aumento en el nivel educacional y en la participación laboral de las mujeres sumado a la mayor estabilidad económica e independencia social y al fácil acceso a métodos para el control de la natalidad, ha llevado a que se postergue la maternidad a edades más tardías (Larrañaga 2003), lo que ha provocado una caída en las tasas de fecundidad a cifras inferiores a la tasa de recambio poblacional que es de 2,1 hijos por mujer. Esto significa que los hijos nacidos por cada mujer no alcanzarían para renovar la población al momento del fallecimiento de sus progenitores (Donoso 2007). En Chile, el nivel de fecundidad a inicios de los años 60 mostraba un promedio levemente superior a 5 hijos por mujer. Desde alrededor del año 1962, la fecundidad comenzó a descender drásticamente hasta finales de la década de los 70, alcanzando un valor de 2,72 hijos por mujer. Luego de un periodo de cierta estabilidad, se observó un nuevo descenso a partir de 1990, llegando a un promedio de 2,08 hijos por mujer en 1999. Posteriormente, la caída continuó, alcanzando el 2014 un promedio de 1,85 hijos, cifra que está bajo el nivel de recambio poblacional (INE 2014) (ver Figura 1).

La caída de la fecundidad producto de la postergación de la maternidad, se explica porque después de los 30 años, ocurre una disminución de la fertilidad de la mujer. Esto sucede, en parte, como resultado de una disminución en la cohorte de folículos de reserva (Faddy et al., 1992), que se presenta de manera más acelerada en el periodo de subfertilidad, que se inicia a los 32 años y se extiende hasta alcanzar la menopausia (50,5 años), cuando quedan aproximadamente 1000 folículos en la reserva, los que no son suficientes para mantener el control hormonal hipotalámico y el funcionamiento del ovario (Wu et al., 2005) (ver Figura 2).

La postergación de la maternidad, se está convirtiendo en un gran

problema para nuestro país, puesto que trae consigo múltiples consecuencias a nivel social, económico y de salud pública (Donoso 2007). Además de tener repercusiones en la tasa de fecundidad, provoca un aumento en los embarazos de alto riesgo debido a enfermedades como hipertensión o diabetes en la madre, una mayor probabilidad de enfermedades genéticas (Faddy et al., 1992; Te Velde et al., 1998; te Velde & Pearson 2002) y menores posibilidades de éxito en los procedimientos de fertilización *in vitro* (Wu et al., 2005) Por ello, es de suma importancia estudiar y entender los mecanismos involucrados en el proceso de envejecimiento reproductivo, especialmente en relación a la pérdida de la función ovárica. Para esto, es posible utilizar modelos animales como la rata. En él se han descrito casi todos los procesos que regulan la función ovárica en el ser humano. Además, su corto ciclo de vida permite hacer un seguimiento experimental durante toda su vida reproductiva.

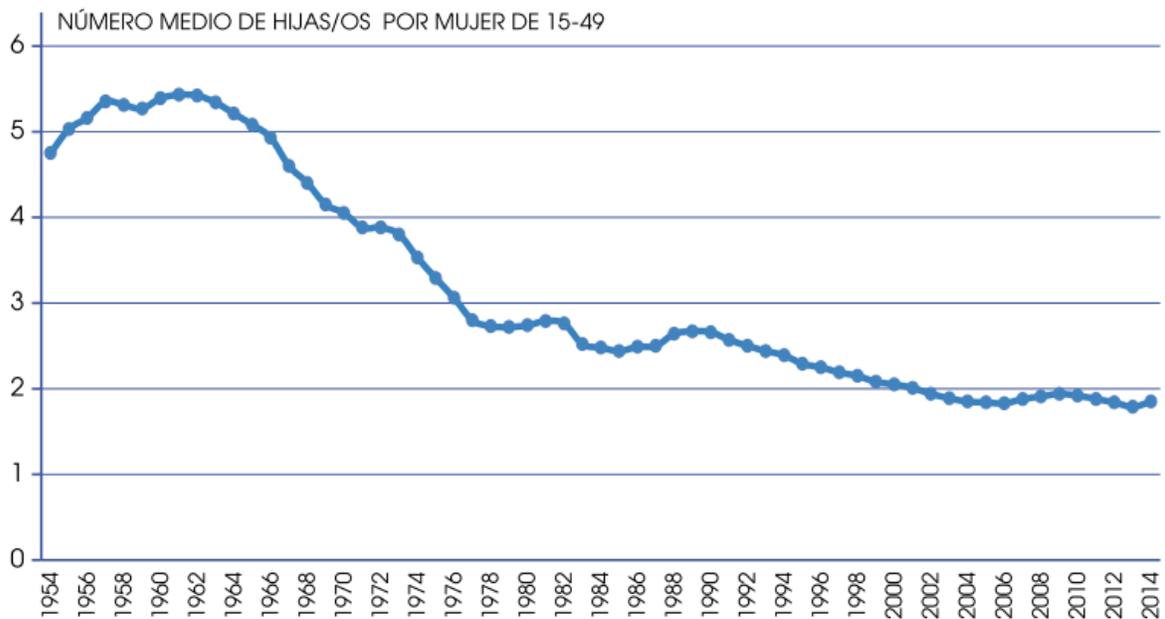


Figura 1. Tasa global de fecundidad en Chile entre 1950 y 2014 (INE 2014).

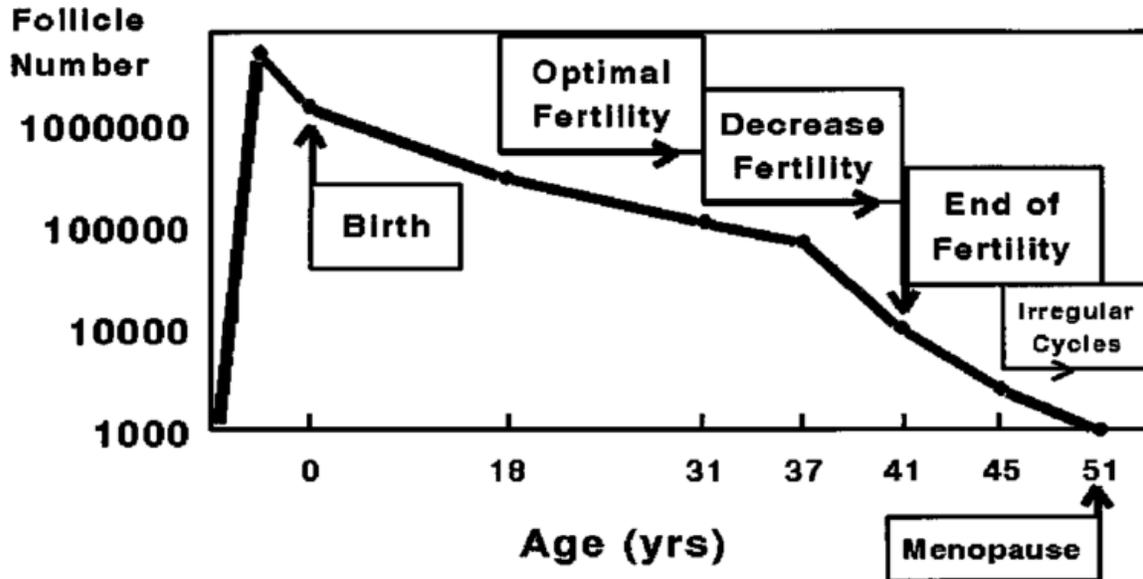


Figura 2. Disminución en el número de folículos en relación a los eventos reproductivos durante la vida de la mujer (Faddy et al., 1992).

1.2. ENVEJECIMIENTO REPRODUCTIVO

Según estudios realizados en nuestro laboratorio en ratas *Sprague Dawley* (Acuña et al., 2009), los cambios morfológicos asociados al envejecimiento ovárico comienzan a los 8 meses de edad (inicio de subfertilidad) y, a los 10 meses, se observan cambios que sugieren una caída en el proceso ovulatorio: disminución significativa de cuerpos lúteos, un continuo aumento de folículos luteinizados, disminución en el pool de folículos preovulatorios y un incremento en dos tipos de estructuras anómalas: folículos tipo III, que representan una etapa previa en la formación del quiste (Brawer et al., 1989; Lara et al., 2000) y quistes foliculares. Los folículos preantrales sanos disminuyen de manera importante entre los 6 y los 8 meses de edad. Los antrales, por su parte, muestran una disminución entre los 6 y los 14 meses de edad y presentan los niveles más altos de atresia folicular a los 10 meses de edad.

Recientemente, se encontró que dichos cambios morfológicos asociados al envejecimiento ovárico en ratas *Sprague Dawley* (Acuña et al., 2009), van acompañados de un incremento en los niveles del transcrito y del péptido de

kisspeptina a los 10 y 12 meses de edad (en relación a los 6 meses de edad). Este incremento podría estar involucrado en la disminución de la ovulación y en la formación y mantención de las estructuras quísticas en el envejecimiento reproductivo (Fernandois et al., 2016; Ricu et al., 2012).

1.3. KISSPEPTINAS

Las kisspeptinas (KISS) son una familia de péptidos estructuralmente relacionados, codificados por el gen *Kiss-1*, originalmente identificado como un gen supresor de la metástasis en melanoma y cáncer de mama (Kotani et al., 2001; J. H. Lee et al., 1996; Lee & Welch 1997). Sus extremos C-terminales comparten un motivo de arginina y fenilalanina modificado de manera post traduccional mediante una reacción de amidación, por lo que se conocen como péptidos RF-amidados. Inicialmente, éstos son sintetizados como un fragmento de 145 aminoácidos (Kotani et al., 2001; Chufán et al., 2009), cuyo procesamiento proteolítico y co-amidación genera a los péptidos bioactivos (Chufán et al., 2009). Estudios realizados en células de placenta humana y células embrionarias de riñón humano (HEKs) demostraron que los productos de dicha proteólisis, correspondientes a péptidos de 54, 14, 13 y 10 residuos (ver Figura 3), poseen una actividad similar, dado que comparten los últimos 10 aminoácidos en los que reside su actividad biológica y son ligandos naturales del receptor GPR54, caracterizado hasta ese entonces como un receptor huérfano (Kotani et al., 2001). Los mismos estudios, evaluaron unión a GPR54 en células de ovario de hámster chino (CHO) y demostraron que las kisspeptinas se unen con afinidad nanomolar, generando cascadas transduccionales que producen movilización de calcio intracelular y fosfatidilinositol, liberación de ácido araquidónico y fosforilación de las MAP quinasas ERK1/2 y p38.

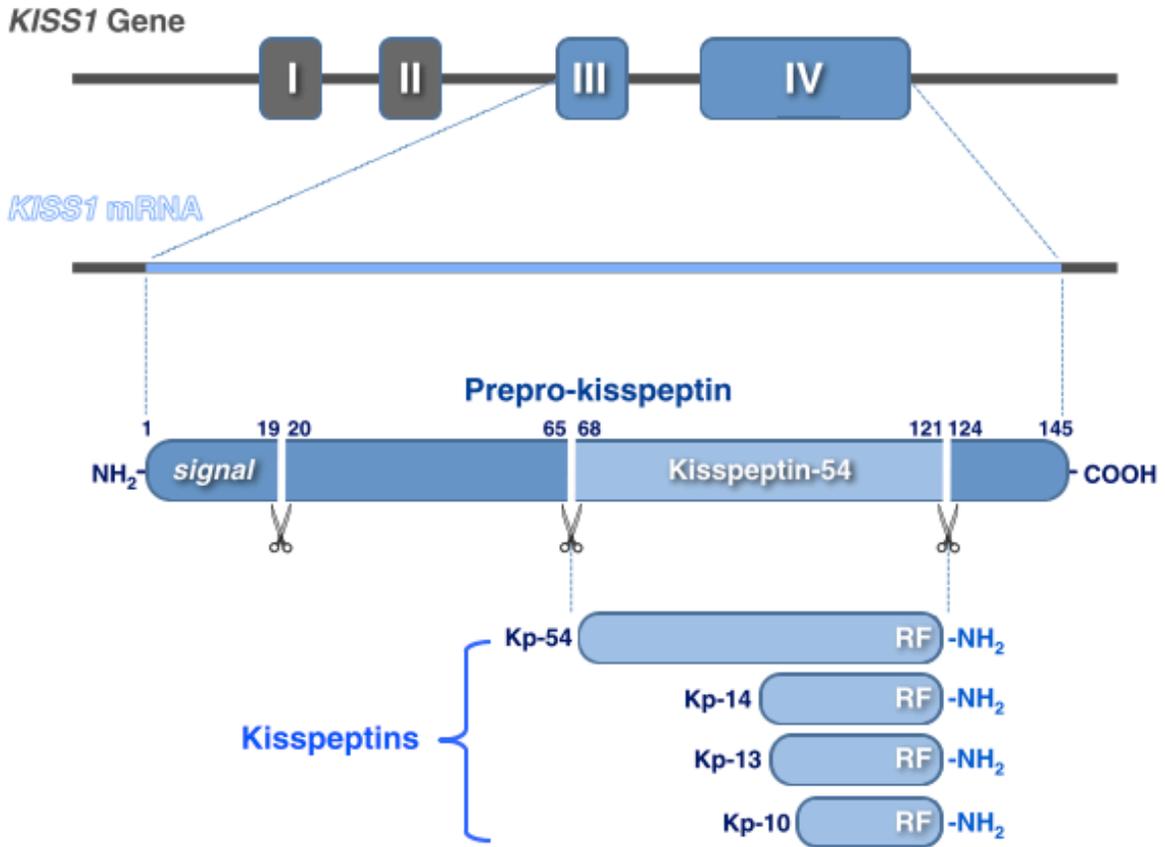


Figura 3. Representación esquemática del gen *Kiss-1* y sus productos derivados. Las diferentes kisspeptinas resultan del procesamiento proteolítico de un precursor común, prepro-kisspeptina, de 145 aminoácidos (Pinilla et al., 2012).

1.4. KISSEPTINA EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA

El rol de kisspeptina en la función reproductiva se descubrió a fines de 2003, tras hallar deleciones o mutaciones inactivantes en la secuencia del gen GPR54 que producían hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático en humanos, condición caracterizada por la ausencia de desarrollo puberal espontáneo, bajos esteroides sexuales y gonadotrofinas, que se puede revertir al administrar GnRH (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Además, se realizaron estudios en ratones deficientes tanto en GPR54 como en KISS y se observó que éstos no mostraban ninguno de los cambios fisiológicos asociados a maduración sexual: sus gónadas eran significativamente más pequeñas respecto a los controles y

presentaban un fenotipo que demostraba una falta de desarrollo sexual adulto y bajas concentraciones de gonadotrofinas circulantes (Seminara et al., 2003; Lapatto et al., 2007). Esto desencadenó una serie de estudios en modelos mamíferos que culminaron con el descubrimiento de neuronas kisspeptinérgicas en el sistema nervioso central (Brailoiu et al., 2005), fundamentalmente en el hipotálamo, donde son las responsables de modular la liberación de GnRH mediante la activación de GPR54. Todo esto, posicionó a KISS como un factor clave en el control neuroendocrino de la función reproductiva.

Aunque el sistema kisspeptina/GPR54 ejerce uno de sus roles más importantes en la función reproductiva a nivel central, también se ha demostrado su expresión a nivel periférico en órganos como placenta, oviducto, páncreas, testículos y ovarios (Sonigo & Binart 2012; Castellano et al., 2006), entre otros. En el ovario, el rol local de los péptidos de KISS, así como las vías de señalización involucradas son aún desconocidas y están siendo investigadas.

1.5. KISSPEPTINA INTRAOVÁRICA

Un grupo de investigadores (Castellano et al., 2006) estudió los perfiles de expresión de los genes *Kiss-1* y GPR54 en el ovario de rata adulta y observó que éstos dependen de la etapa del ciclo ovárico y del tipo celular en que se detecten. Este grupo encontró que ocurre un aumento en los niveles del transcrito de *Kiss-1* en respuesta al máximo de LH en el folículo preovulatorio y que los niveles de expresión del transcrito de GPR54 son bajos y constantes a lo largo de todo el ciclo. Además, estudió los patrones de localización de los péptidos de KISS y GPR54 mediante inmunohistoquímica y detectó una intensa inmunoreactividad de KISS en las células de la teca de folículos en crecimiento, que alcanzaba un máximo durante la fase periovulatoria y disminuía con la involución del cuerpo lúteo. Para GPR54, por su parte, se observó un patrón de inmunoreactividad

similar al de KISS, pero con menores niveles de intensidad (Castellano et al., 2006).

En nuestro laboratorio (Ricu 2012), se estudió el patrón de expresión de los péptidos de KISS mediante inmunohistoquímica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* y se confirmó lo descrito previamente por Castellano y cols. (Castellano et al., 2006), encontrándose marca positiva en cuerpo lúteo, glándula intersticial y células de la teca. Sin embargo, a diferencia de lo descrito por el grupo español, se detectó también presencia de KISS en las células de la granulosa. Además, se analizó el patrón de inmunoreactividad de KISS en distintas etapas del desarrollo folicular: en folículos primarios, se detectó marca tanto en células de la granulosa como en células de la teca, siendo más difusa en estas últimas; en folículos secundarios, también se observó marca en ambos tipos celulares, pero ésta fue más intensa en células de la teca; en folículos antrales, por su parte, se detectó una marca menos intensa en células de la granulosa y una intensa marca en las células de la teca; por último, en folículos preovulatorios, se observó una disminución en la intensidad de la marca tanto en células de la granulosa como en células de la teca, con excepción de la zona del ápice folicular, en que se apreció una intensa inmunotinción. Este patrón de localización de KISS en folículos preovulatorios (Ricu 2012) es muy similar al de los transcritos de MMP-2 y MMP-9 (gelatinasas), dos importantes metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) en el ovario (Curry et al., 2001), y coincide con el sitio en que se observa un aumento en la actividad de estas enzimas previo a la ovulación. Todos estos antecedentes sugieren que podría haber una relación entre KISS y las gelatinasas y que dichos actores podrían estar participando localmente en el control de la función ovárica.

1.6. METALOPROTEINASAS OVÁRICAS Y MATRIZ EXTRACELULAR

Se han descrito dos grandes sistemas proteolíticos que juegan un rol clave en el remodelamiento de la matriz extracelular (MEC) ovárica: el sistema activador de plasminógeno y el sistema de MMPs. Este último está conformado por un componente proteolítico, las enzimas, y un componente inhibitorio asociado que controla la actividad de estas enzimas en el espacio extracelular, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) (Curry & Osteen 2001).

Las MMPs son controladas de manera espacio-temporal y son fundamentales en los procesos de remodelamiento de la MEC ovárica a lo largo de todo el ciclo (Curry & Osteen 2001; Curry & Osteen 2003; Woodruff & Shea 2007). La MEC es importante para un correcto funcionamiento del ovario debido a que constituye un soporte estructural para los compartimentos subtisulares y además, participa en los procesos de desarrollo folicular, ovulación, formación y regresión del cuerpo lúteo y angiogénesis (Strickland & Richards 1992).

Actualmente, la familia de las MMPs comprende al menos 25 enzimas proteolíticas relacionadas (Birkedal-Hansen et al., 1993; Nagase & Woessner 1999; Murphy et al., 1999; Kleiner & Stetler-Stevenson 1993) clasificadas en cuatro grandes clases: colagenasas, gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelinas y metaloproteinasas de matriz tipo membrana (MT-MMPs). Todas ellas son sintetizadas como pre-proenzimas y sufren un procesamiento proteolítico inicial para alcanzar su localización final, convirtiéndose en proenzimas que se activan luego de una proteólisis adicional (Ny et al., 2002). Además, contienen un sitio de unión a zinc y pueden ser inhibidas por agentes quelantes e inhibidores en el ambiente extracelular (TIMPs) (Nagase et al., 1991).

La acción de las MMPs es rigurosamente controlada a nivel transcripcional, traduccional, de activación de la proenzima y de actividad enzimática por formación de complejos no covalentes con inhibidores tisulares (TIMPs) (Curry & Osteen 2003; Parsons et al., 1997). Los TIMPs son inhibidores

específicos de MMPs y se unen a ellas con una alta afinidad. Son producidos localmente y comparten similitudes en su conformación estructural. Estas similitudes incluyen puentes disulfuro internos, importantes para la estructura de la proteína, y un dominio N-terminal, crítico para la inhibición funcional de las MMPs (Gomez et al., 1997; Brew et al., 2000; Apte et al., 1995). Se han identificado cuatro tipos distintos de TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) en base a su peso molecular y acción biológica. Estos inhibidores difieren en su regulación, grado de glicosilación, localización post-secreción, especificidad enzimática y en su modo de acción (Gomez et al., 1997; Smith et al., 1999; Brew et al., 2000).

En el año 2001, un grupo de investigadores de la Universidad de Kentucky (Curry et al., 2001) realizó estudios en ovarios de ratas *Sprague Dawley* para evaluar los cambios en la localización celular de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y TIMPs durante el crecimiento y diferenciación folicular asociada a un estímulo ovulatorio y en el proceso de formación lútea temprana y observó, mediante hibridación *in situ*, que el mRNA de las gelatinasas estaba localizado en la teca de folículos en desarrollo y en el estroma. Luego del estímulo ovulatorio con hCG, el mRNA de MMP-2 se incrementó a medida que las células de la granulosa de folículos preovulatorios sufrieron luteinización durante la formación del cuerpo lúteo. El mRNA de MMP-9 permaneció principalmente en la teca durante este periodo. Además de los estudios de localización celular de los transcritos, se hicieron estudios de zimografía *in situ* para evaluar actividad gelatinásica. En éstos, se observó un patrón de actividad que se correlaciona con la localización de los mRNA de MMP-2 y MMP-9 alrededor de los folículos en desarrollo. En folículos preovulatorios, se encontró un gran aumento de actividad de estas enzimas al momento de la ovulación en la zona del ápice folicular, la cual requiere una mayor degradación de la MEC para un proceso ovulatorio efectivo. Ésta y otras evidencias similares demuestran un rol fundamental de estas enzimas en la ovulación (Curry & Osteen 2001; Curry & Osteen 2003; Deady et al., 2015).

Aún se desconocen los mecanismos y las señales responsables de la selección espacio-temporal de la actividad metaloproteásica durante la ruptura

folicular, así como también la(s) fuente(s) de los factores proteolíticos y anti-proteolíticos (Curry & Osteen 2001). Sin embargo, se cree que los péptidos de KISS, cuyos niveles varían según el progreso del ciclo ovárico, podrían estar regulando a este sistema proteolítico a nivel local, de manera similar a como se ha descrito en otros tejidos (Navenot et al., 2005; Yan et al., 2001; J. H. Lee et al., 1996; Lee & Welch 1997).

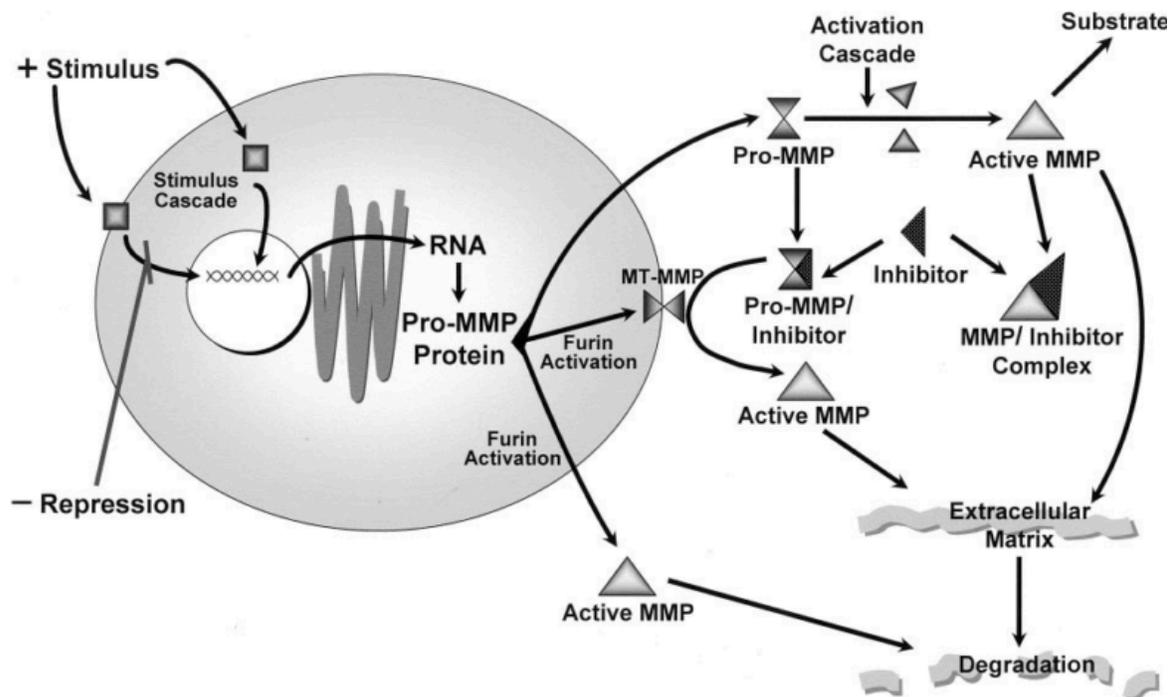


Figura 4. Representación esquemática de la regulación del sistema MMP. Se presenta un modelo general en el cual un estímulo activa un receptor y pone en marcha una cascada de señalización intracelular que lleva a la síntesis del mRNA de una MMP específica, el que será luego traducido. Ciertas MMPs, tales como las MT-MMPs, son activadas intracelularmente por una vía de procesamiento proteolítico y son insertas en la membrana o secretadas en una forma activa. Sin embargo, la mayoría de las MMPs son secretadas en una forma latente que requiere activación en el espacio extracelular por otras proteinasas (otras MMPs, serino proteasas u otras). Una vez que esto ocurre, la MMP está activa y puede actuar sobre la MEC. Alternativamente, la acción MMP puede ser inhibida por la unión a TIMPs (Curry & Osteen 2003).

1.7. RELACIÓN ENTRE KISSPEPTINA Y METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Estudios en líneas celulares de cáncer han demostrado que KISS es capaz de regular los niveles de las MMPs de una manera que depende fuertemente del tipo celular. En líneas celulares de cáncer renal, cáncer pancreático, fibrosarcoma (HT-1080) y melanoma (C8161 Y MelJuSo), se ha visto que KISS tiene un rol inhibitorio sobre la expresión de MMP-9 (Navenot et al., 2005; Yan et al., 2001; J. H. Lee et al., 1996), mientras que en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y Hs578T) se ha mostrado que un incremento en la expresión de *Kiss-1* y GPR54 se correlaciona con un mayor potencial metastásico y con un incremento en la actividad de MMP-9 (Zajac et al., 2011).

En el año 2001, Yan y cols. realizaron un estudio (Yan et al., 2001) para determinar si el gen *Kiss-1*, que se ha mostrado previamente que suprime la metástasis (J. H. Lee et al., 1996; Lee & Welch 1997), regula negativamente la expresión de MMP-9. Para ello, utilizaron líneas celulares de fibrosarcoma (HT-1080) que expresaban MMP-9, pero no *Kiss-1* y que fueron transfectadas con un constructo que expresaba *Kiss-1*. Como resultado, se observó que estas células presentaban menor invasividad *in vitro* y que sus niveles de proteína/actividad enzimática de MMP-9 eran sustancialmente más bajos debido a una disminución en los niveles del transcrito de esta gelatinasa provocada por una reducción en la unión de NF- κ B al promotor del gen que codifica para esta proteína, lo que se reflejó en niveles reducidos de p50/p65 en el núcleo y en niveles incrementados de I κ B α en el citosol de las células transfectadas.

Por otro lado, se sabe que existen similitudes entre las células invasivas del trofoblasto extraveloso y las neoplásicas, debido a que éstas utilizan los mismos mecanismos moleculares que las células cancerígenas para sus funciones invasivas y migratorias. En este contexto, se ha descrito que cuando se reduce la expresión de MMP-9 en células de trofoblasto *in vitro*, disminuye su capacidad invasiva (Luo et al., 2011). Junto con ello, se ha mostrado que KISS es

capaz de regular la invasividad en explantes y cultivos primarios de trofoblasto reduciendo la actividad proteolítica de MMP-2 (Bilban et al., 2004), y que KISS puede regular negativamente la transcripción de MMP-2 y MMP-9 en células HTR8SVneo (Roseweir et al., 2012). Además, recientemente, un grupo de investigadores demostró que KISS es capaz de regular negativamente la transcripción de las MMPs 1, 2, 3, 7, 9, 10 y 14 y positivamente la transcripción de TIMP-1 y TIMP-3, lo que indicaría que este péptido puede regular en forma dual la actividad de las MMPs (Francis et al., 2014).

Aunque se sabe que en el ovario los niveles de KISS y MMPs varían cíclicamente, no hay estudios que correlacionen el efecto de los péptidos de KISS sobre la expresión y actividad de estas enzimas en dicho órgano. Teniendo en cuenta la relación funcional entre KISS y MMPs descrita en otros tejidos, no se puede descartar un comportamiento similar a nivel de ovario. De ser así, KISS podría regular cíclicamente el remodelamiento de la MEC ovárica controlando el nivel de expresión y/o actividad de las MMPs.

2. HIPÓTESIS

En síntesis, es posible pensar que el aumento en los niveles de KISS que acompaña a los cambios morfológicos que ocurren en el ovario en el periodo de subfertilidad provoca alteraciones en la funcionalidad ovárica, las que podrían ser mediadas por cambios en los niveles de expresión y/o actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular-2 y -9.

En base a los antecedentes presentados, la hipótesis del presente trabajo fue:

“El aumento de kisspeptina endógeno produce la disminución de la expresión del transcrito y/o actividad de las metaloproteinasas-2 y -9 en ovario en el periodo de subfertilidad en ratas”.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el patrón de expresión del mRNA de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles y subfértiles en las diferentes etapas del ciclo estral y estudiar los efectos de la adición del péptido KP-10 y del bloqueo de su receptor sobre la expresión del mRNA y la actividad de estas enzimas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Primer objetivo específico.

“Caracterizar el patrón de expresión de los mRNAs de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 y los niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles y subfértiles en las diferentes etapas del ciclo estral (proestro temprano, proestro tardío y estro)”.

Para ello, a partir de los ovarios obtenidos en las distintas fases del ciclo estral, se estudiaron los niveles de mRNA de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 mediante RT-qPCR, y los niveles de actividad gelatinásica mediante zimografía.

3.2.2. Segundo objetivo específico.

“Determinar el efecto de la adición del péptido KP-10 sobre los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad y estudiar si dicho efecto se revierte en presencia de p234 (antagonista del receptor de kisspeptina)”.

En este objetivo, se realizaron incubaciones *in vitro* de los ovarios en presencia del péptido KP-10 y de un antagonista del receptor de kisspeptina y se estudiaron los niveles de transcrito de MMP-2 y MMP-9 mediante RT-qPCR.

3.2.3. Tercer objetivo específico.

“Estudiar el efecto de la adición del péptido KP-10 sobre la actividad de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad y determinar si dicho efecto se revierte en presencia de p234 (antagonista del receptor de kisspeptina)”.

Para ello, se realizaron incubaciones *in vitro* de los ovarios en presencia del péptido KP-10 y de un antagonista del receptor de kisspeptina y se estudiaron los niveles de actividad gelatinásica mediante zimografía.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES

Se utilizaron en total 60 ratas hembras *Sprague Dawley* de 3, 6, 8 y 10 meses de edad (ver detalle en número de animales utilizados por objetivo, tablas 1 y 2), obtenidas desde el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Éstas fueron mantenidas en jaulas individuales entre 21 y 23°C, bajo ciclos constantes de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con comida y agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos que se realizaron fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (código CBE-2013-15) y por el Comité de Bioética de Conicyt. Este trabajo se enmarcó en un objetivo del Proyecto FONDECYT 1120147.

Para la realización del primer objetivo, se utilizaron ratas fértiles (3 a 6 meses de edad) y subfértiles (8 meses de edad). Se determinó la etapa del ciclo estral en que se encontraban mediante la observación al microscopio del tipo y morfología celular presente en el frotis vaginal. Los animales fueron sacrificados en las etapas correspondientes del ciclo (ratas fértiles: proestro temprano, tardío y estro; ratas subfértiles: proestro y estro) y los ovarios, obtenidos por sección abdominal, fueron guardados a -80°C hasta que se realizaron los análisis de RT-qPCR.

Tabla 1. Número de animales a utilizar por condición experimental para el objetivo 1.

OBJETIVO 1			
Animales fértiles (3 a 6 meses de edad)		Animales subfértiles (8 meses de edad)	
Etapa del ciclo estral	Número de animales a utilizar	Etapa del ciclo estral	Número de animales a utilizar
Proestro temprano	5	Proestro	5
Proestro	5	Estro	5
Estro	5		
	15		10

Tabla 2. Número de animales a utilizar por condición experimental para los objetivos 2 y 3.

OBJETIVOS 2 Y 3		
Edades de los animales	Grupo experimental	Número de animales a utilizar
6 meses	Control	5
	KP-10	5
	KP-10 + p234	5
8 meses	Control	5
	KP-10	5
	KP-10 + p234	5
10 meses	Control	5
	KP	5
	KP-10 + p234	5
		45

Para la realización de los objetivos 2 y 3, se utilizaron ratas de 6, 8 y 10 meses de edad (ver tabla 2). Los animales fueron sacrificados por decapitación una vez que cumplieron la edad requerida y sus ovarios fueron incubados *in vitro* inmediatamente después de su obtención. Posteriormente, fueron guardados a -80°C hasta que fueron utilizados para los experimentos de RT-qPCR y zimografía. Por cada edad (6, 8 y 10 meses), se trabajó con tres grupos experimentales: El primer grupo fue el control, los ovarios de este grupo fueron incubados sólo en

amortiguador Krebs (NaCl 118,6 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, glucosa 4,5 mg/mL, ácido ascórbico 100 µg/mL, EDTA 11,2 µg/mL, NaHCO₃ 13 mg/mL, CaCl₂ 25 mM, BSA 0,1 mg/mL y agua). El segundo grupo fue Kiss, los ovarios de este grupo fueron incubados en amortiguador Krebs con KP-10 10 ng/µL (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA) y, el tercero fue Kiss-p234 y los ovarios fueron incubados con KP-10 10 ng/µL y p234 1 µg/µL (Phoenix 120 Pharmaceutical, Inc., Mountain View, CA, PA). Todas las incubaciones se realizaron con burbujeo constante de O₂ en placas de 24 pocillos a 37°C durante 3 hrs. Este amortiguador permitió mantener el pH y el balance osmótico en el medio de cultivo del órgano. Además, proporcionó a las células iones inorgánicos esenciales y agua.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA FASE DEL CICLO ESTRAL

El ciclo reproductivo de las ratas hembras es llamado ciclo estral. Éste dura 4 días y presenta 4 fases. Es posible determinar la fase del ciclo estral en que se encuentran los animales mediante la observación al microscopio del tipo y morfología celular presente en el frotis vaginal (Marcondes et al., 2002). Se pueden distinguir células epiteliales (redondas y nucleadas), células cornificadas (presentan bordes irregulares) y leucocitos (redondos y pequeños).

Las fases que se distinguen son (Marcondes et al., 2002): 1) Proestro: la vagina produce un engrosamiento epitelial. Se observan en los frotis células epiteliales, muy pocos leucocitos y escasas células cornificadas; 2) Estro: se observa un predominio de células cornificadas y muy pocas células epiteliales; 3) Metaestro o Diestro I: disminuyen las células cornificadas y se observa la presencia de leucocitos; 4) Diestro II: se observa abundancia de leucocitos y muy escasas células epiteliales.

4.3. DETERMINACIÓN DE LOS mRNAs DE *Kiss-1*, MMP-2 Y MMP-9 POR PCR EN TIEMPO REAL

Se extrajo RNA total de ovarios de ratas de diferentes edades, utilizando un Total RNA Kit I, E.Z.N.A.® (Omega-Biotek, Norcross, GA, USA) según las indicaciones del fabricante. A partir de 5 µg de RNA total, se realizó la reacción de transcripción inversa a 42°C por 60 min para obtener el cDNA. Para esta reacción, se utilizó la enzima SuperScript II 125 U (Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de dNTPs 1,6 mM, DTT 10 mM y partidores randomizados 176 nM (Invitrogen, Carlsbad, CA). El volumen final fue de 20 µL. Para detener la reacción, la enzima fue desnaturalada por calor incubando a 75 °C por 10 min.

Una vez obtenido el cDNA, se amplificaron 2 µL de muestra por PCR en tiempo real (diluida 1:10), en un termociclador IQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Santa Clara, CA, USA), utilizando partidores específicos para los genes de interés (tabla 3). Para cada reacción de PCR se utilizarán 0,5 µL de cada partidor (sentido y antisentido), 10 µL de Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) y 7 µL de agua nanopura. El volumen de reacción final fue de 20 µL. Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 4.

Las curvas estándar para cada gen fueron obtenidas por diluciones seriadas de una muestra de cDNA de concentración conocida. Para normalizar la cuantificación de los mRNA de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9, se midió la cantidad de mRNA de la subunidad ribosomal 18S. Los resultados se expresaron como la razón entre el gen de interés (*Kiss-1*, MMP-2 o MMP-9) y el gen constitutivo 18S.

Tabla 3. Secuencias de partidores a utilizar.

GEN	SECUENCIA	NÚMERO DE ACCESO GENBANK	TAMAÑO (PARES DE BASES)
18S	F 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3' R 3'-TGTGATGCCCTTAGATGTCC-5'	EU139318.1	493
MMP-2	F 5'-AGCTCCCGGAAAAGATTGAT-3' R 3'-TCCAGTTAAAGGCAGCGTCT-5'	NM_031054.2	180
MMP-9	F 5'-CGCAAGCCTCTAGAGACCAC-3' R 3'-TGGGGGATCCGTGTTTATTA-5'	NM_031055.1	159
<i>Kiss-1</i>	F 5'-CCGGACCCCAGGAACCTCGT-3' R 3'-CTCCTTTGGCCTGCGCTACG-5'	NM_181692.1	245

Tabla 4. Condiciones de amplificación.

18S y MMP-2	1 ciclo	40 ciclos			1 ciclo
	95°C por 10 min	95°C por 20 seg	60°C por 30 seg	72°C por 30 seg	72°C por 10 min
<i>Kiss-1</i>	1 ciclo	45 ciclos			1 ciclo
	95°C por 5 min	95°C por 15 seg	62.5°C por 20 seg	72°C por 30 seg	72°C por 7 min
MMP-9	1 ciclo	45 ciclos			1 ciclo
	95°C por 10 min	95°C por 20 seg	57°C por 30 seg	72°C por 30 seg	72°C por 10 min

4.4. EXTRACCIÓN DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR OVÁRICA

Se extrajeron los componentes de la matriz extracelular ovárica en base a la modificación del método descrito por Talhouk y colaboradores (Talhouk et al., 1992). Para ello, se homogenizaron los ovarios en tampón de extracción (Tris-HCl 500 mM; Tritón X-100 1% V/V; CaCl₂ 10 mM; NaCl 200 mM, pH7,5) en razón 1:5 (m/V) con homogeneizador cónico de vidrio en hielo. Luego, el homogenizado se sometió a ciclos de congelamiento/descongelamiento en nitrógeno líquido 3 veces, durante 5 min cada vez. A continuación se efectuó una centrifugación a 13000 x g por 30 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante (extracto de componentes de la MEC ovárica) y se guardó a -80°C hasta la cuantificación de proteínas.

4.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas totales en cada muestra se cuantificó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976). Brevemente, un volumen conocido de muestra se mezcló con 1 mL de reactivo de Bradford a temperatura ambiente, e inmediatamente se procedió a medir su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro. La curva de calibración se realizó en las mismas condiciones utilizando un rango entre 0 y 10 µg de estándar de albúmina de suero bovino (BSA, Winkler, Santiago, Chile).

4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA

Los extractos proteicos obtenidos fueron sometidos a electroforesis no denaturante en geles de poliacrilamida (PAGE) al 7,5% (m/V) co-polimerizada con gelatina (1 mg/mL), de 0,75 mm de espesor y 15 pocillos. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y se inició a un voltaje constante de 70 V. Cuando el frente de migración alcanzó la fase separadora del gel, el voltaje se aumentó hasta 100 V.

Luego de la electroforesis, se incubó el gel a temperatura ambiente con Tritón X-100 (2,5% V/V) por 30 min con agitación suave para remover el SDS y, a continuación, se incubó el gel por 24 hrs a 37 °C en tampón de ensayo de MMPs (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM, CaCl₂ 20 mM; pH 7,5). Finalmente, el gel fue teñido con azul de Coomassie toda la noche y luego desteñido con solución de ácido acético al 10% (V/V).

La actividad gelatinolítica se visualizó como bandas claras contra un fondo azul. Se utilizó plasma de rata como control positivo. A partir de éste y de la utilización de un estándar de peso molecular, se identificó a qué correspondía cada banda. Los resultados fueron normalizados respecto a un estándar interno, (la misma muestra se cargó en todos los geles). Los análisis densitométricos se

realizaron utilizando el software UN-SCAN-IT version 6.1 (Graph Digitizer Software – Silk Scientific).

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número mínimo de ratas de todos los experimentos se calculó de acuerdo a la variabilidad de los procedimientos experimentales y de acuerdo a la variación intrínseca entre los animales. La determinación del número mínimo de muestra se realizó según la ecuación $n=2(Z\alpha + Z\beta)^2 \times S^2/\delta^2$ basado en lo descrito por Zar J. 1984, n: sujeto necesario en cada una de las muestras; S: desviación estándar; δ : diferencia que se espera estimar como estadísticamente significativa; $Z\alpha$: probabilidad de cometer un error estadístico tipo I (5%); $Z\beta$: probabilidad de cometer un error estadísticamente significativo tipo II (20%). En cada uno de los objetivos de esta tesis el n mínimo calculado para cada grupo experimental fue de n=5.

Los resultados se expresaron como el promedio \pm error estándar (SEM). Para la determinación de diferencias significativas entre dos grupos experimentales independientes se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para comparaciones múltiples entre grupos independientes se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn. Se consideraron diferencias significativas los test con un valor de $p < 0,05$.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism, version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, 229 USA).

5. RESULTADOS

5.1. **OBJETIVO 1:** Caracterizar el patrón de expresión de los mRNAs de *Kiss-1*, *MMP-2* y *MMP-9* y los cambios en la actividad gelatinásica en ovarios de ratas Sprague Dawley fértiles y subfértiles en las diferentes etapas del ciclo estral (proestro temprano, tardío y estro).

5.1.1. Niveles de mRNA de *Kiss-1*, *MMP-2* y *MMP-9* en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles

Se determinaron los niveles de mRNA de *Kiss-1*, *MMP-2* y *MMP-9* en ovarios de ratas fértiles (3 y 6 meses de edad) en proestro temprano, tardío y estro, mediante RT-qPCR. Se encontró que los niveles de mRNA de *Kiss-1* y *MMP-9* fueron significativamente más altos en ovarios de ratas en proestro tardío ($p < 0,05$) comparados con ovarios de ratas en estro (Figura 5A y 5C). Por otra parte, los niveles de mRNA de *MMP-2* fueron significativamente más bajos en ovarios de ratas en proestro temprano y tardío ($p < 0,05$) comparados con los encontrados en ovarios de ratas en estro (Figura 5B).

5.1.2. Niveles de mRNA de *Kiss-1*, *MMP-2* y *MMP-9* en ovarios de ratas *Sprague Dawley* subfértiles

Se determinaron los niveles de mRNA de *Kiss-1*, *MMP-2* y *MMP-9* en ovarios de ratas subfértiles (8 meses de edad) en proestro y estro, mediante RT-qPCR. Se encontró que los niveles de mRNA de *Kiss-1* (Figura 6A) eran significativamente más altos en proestro que en estro ($p < 0,05$). Los niveles de los mRNAs de *MMP-2* (Figura 6B) y *MMP-9* (Figura 6C) no cambiaron significativamente entre proestro y estro. Sin embargo, sus niveles tendían a encontrarse más altos en proestro respecto al estro.

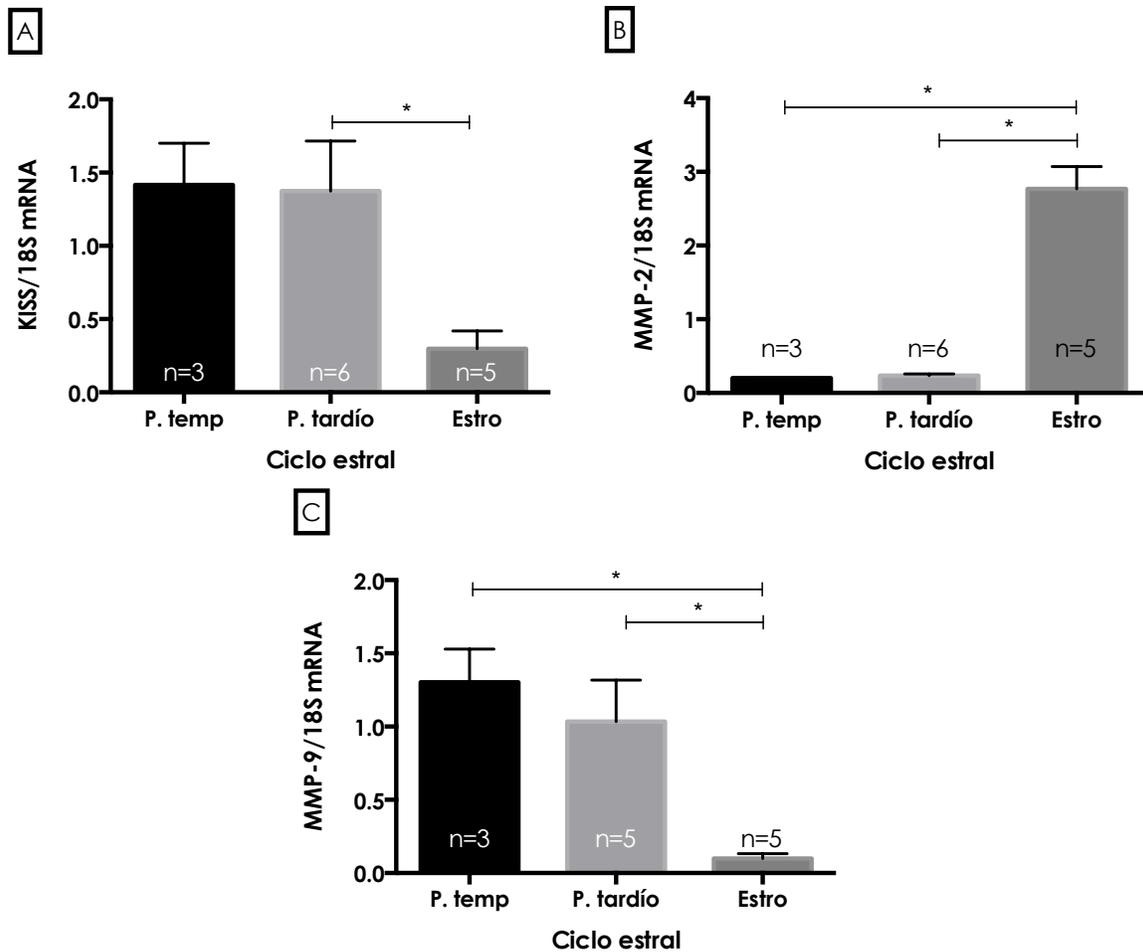


Figura 5. Expresión del mRNA de *Kiss-1*, *MMP-2* y *MMP-9* en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 3 a 6 meses de edad durante el ciclo estral. A) mRNA de *Kiss-1*, B) mRNA de *MMP-2*, C) mRNA de *MMP-9*. La etapa del ciclo estral en que se encontraban los animales se determinó mediante observación al microscopio del tipo y morfología celular presente en el frotis vaginal. Los datos graficados están normalizados respecto al gen constitutivo 18S y corresponden al promedio \pm SEM. El n se muestra en el gráfico. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn. * = $p < 0,05$.

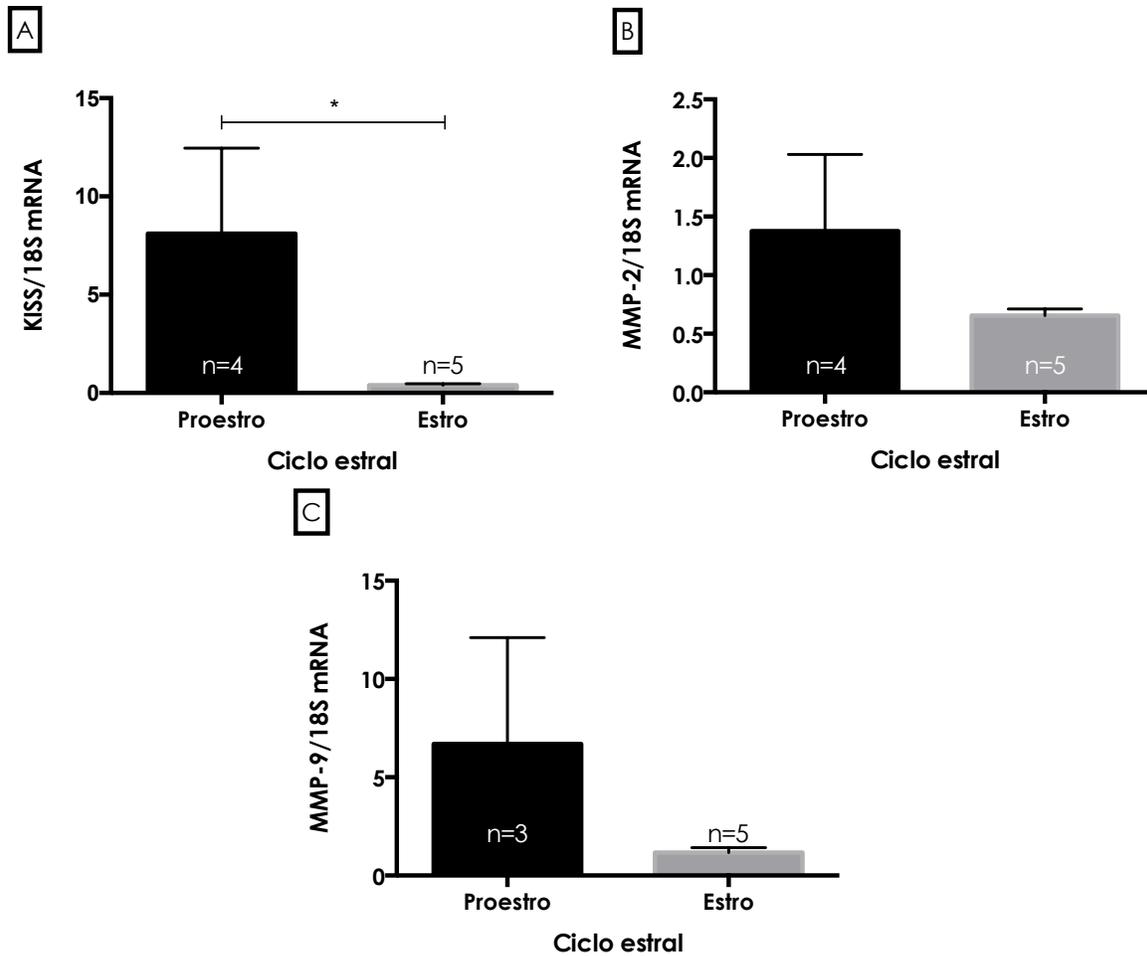


Figura 6. Expresión del mRNA de MMP-2, MMP-9 y *Kiss-1* en ovarios de animales en el inicio del periodo de subfertilidad en proestro y estro. A) mRNA de MMP-2, B) mRNA de MMP-9, C) mRNA de *Kiss-1*. La etapa del ciclo estral en que se encontraban los animales se determinó mediante observación al microscopio del tipo y morfología celular presente en el frotis vaginal. Los datos graficados están normalizados respecto al gen constitutivo 18S y corresponden al promedio \pm SEM. El n para cada condición experimental se muestra en el gráfico. Los análisis fueron realizados utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney. * = $p < 0,05$.

5.1.3. Niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles durante el ciclo estral

Se estudiaron, mediante zimografía (ver Figura 7), los niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles (3 y 6 meses de edad) en proestro temprano, tardío y estro. Como se observa en la Figura 8A, no se encontraron cambios significativos en los niveles de pro-MMP2 en las etapas del ciclo estral estudiadas. Sin embargo, los cambios encontrados en la forma activa de MMP-2 (Figura 8B) sí fueron significativos entre proestro temprano y estro ($p < 0,01$). Los niveles de pro-MMP-9 y de MMP-9 activa no fueron detectables en las condiciones experimentales utilizadas.

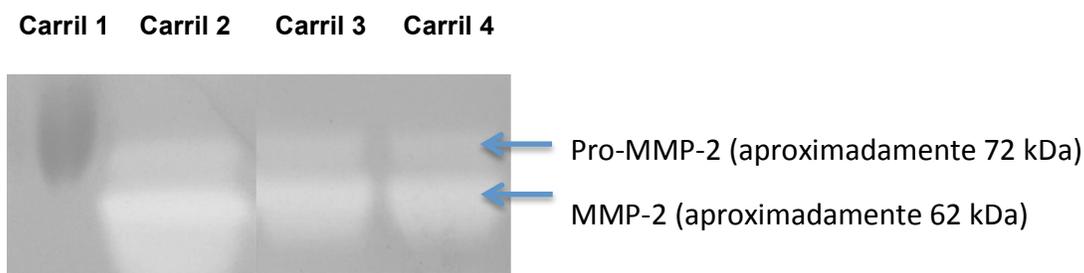


Figura 7. Gel representativo de zimografía. Carril 1: Estándar de peso molecular (se muestra banda de 70 kDa). Carril 2: Plasma de rata. Carriles 3 y 4: Homogenizados de ovarios en proestro temprano.

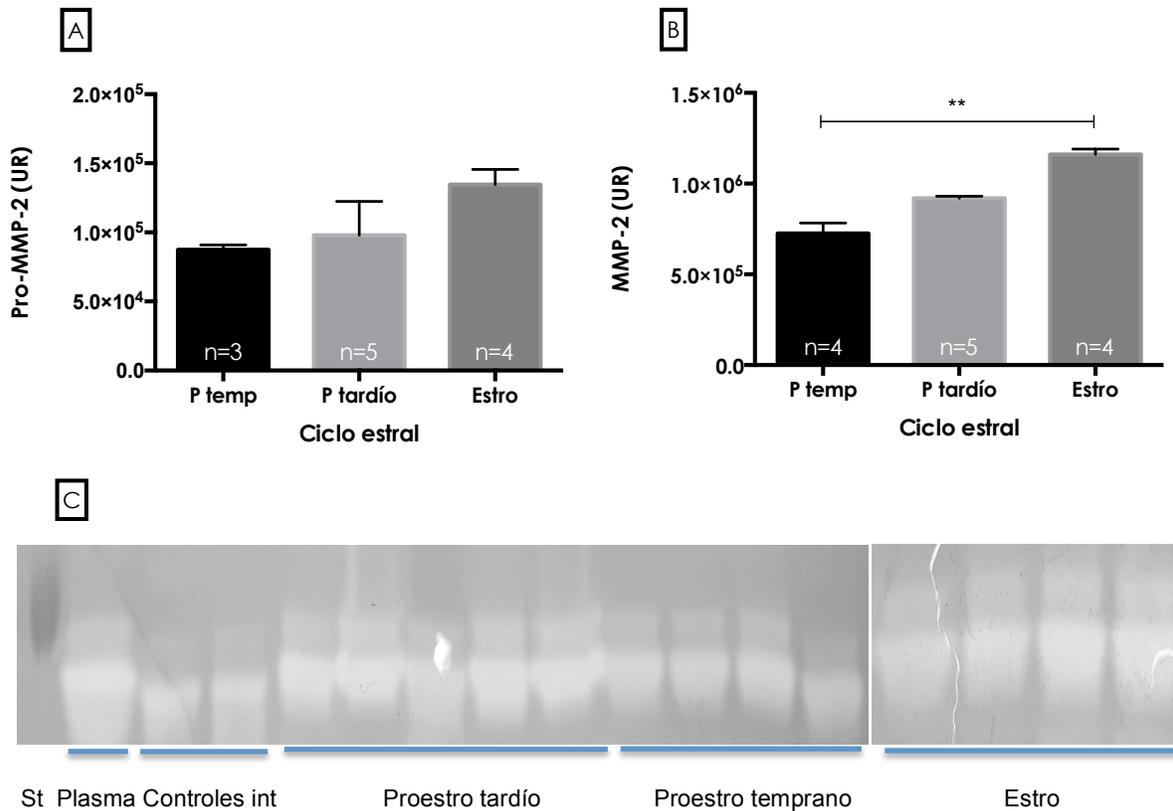


Figura 8. Niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles de 3 a 6 meses de edad durante el ciclo estral. A) pro-MMP2, B) MMP-2 activa. La etapa del ciclo estral en que se encontraban los animales se determinó mediante observación al microscopio del tipo y morfología celular presente en el frotis vaginal. Los datos graficados están normalizados respecto a un estándar interno y corresponden al promedio \pm SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn. ** = $p < 0,01$.

5.1.4. Niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* subfértiles durante el ciclo estral

Se estudiaron, mediante zimografía, los niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* subfértiles (8 meses de edad) en proestro y estro. En la Figura 9A, es posible observar que no se encontraron cambios significativos en los niveles de pro-MMP2 entre proestro y estro. Sin embargo, se encontró que los niveles de la forma activa de MMP-2 (Figura 9B) fueron

significativamente más altos en estro ($p < 0,001$). Los niveles de pro-MMP-9 y de MMP-9 activa no fueron detectables en las condiciones experimentales utilizadas.

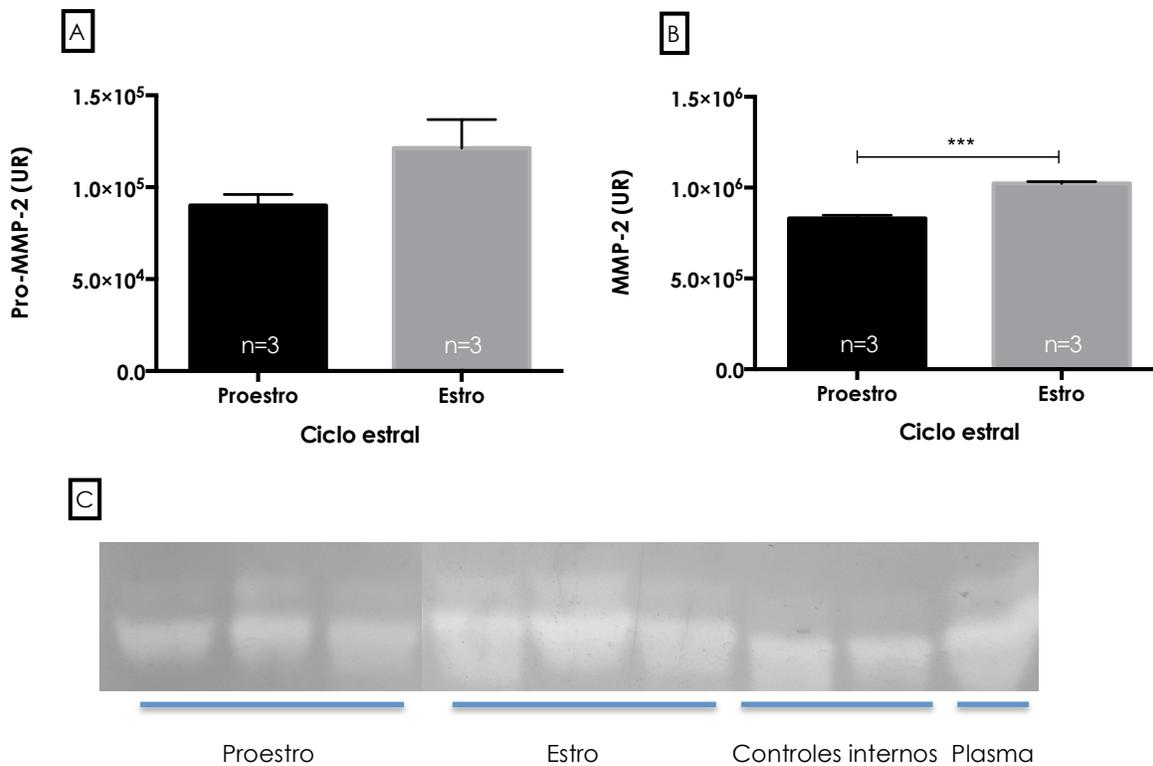


Figura 9. Niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 8 meses de edad en proestro y estro. A) pro-MMP2, B) MMP-2 activa. La etapa del ciclo estral en que se encontraban los animales se determinó mediante observación al microscopio del tipo y morfología celular presente en el frotis vaginal. Los datos graficados están normalizados respecto a un estándar interno y corresponden al promedio \pm SEM. Para la determinación de diferencias significativas se realizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. * = $p < 0,001$.**

En resumen, en los resultados del objetivo 1 se encontró que en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles, los niveles de mRNA de *Kiss-1* y MMP-9 fueron significativamente altos en proestro temprano y tardío y disminuían en estro. Los niveles de mRNA de MMP-2, en cambio, fueron significativamente bajos en proestro temprano y tardío y se incrementaban en estro.

En cuanto a los niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas fértiles, no se encontraron cambios significativos en los niveles de pro-MMP-2 en las etapas del ciclo estral estudiadas. Sin embargo, en la forma activa de MMP-2 se encontraron aumentos significativos entre proestro temprano y tardío, entre proestro temprano y estro y entre proestro tardío y estro. Los niveles de pro-MMP-9 y de MMP-9 activa no fueron detectables.

En ovarios de ratas *Sprague Dawley* subfértiles se encontró que los niveles de mRNA de *Kiss-1* fueron significativamente más altos en proestro respecto al estro. Los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9, por su parte, no cambiaron significativamente. Sin embargo, tendían a encontrarse aumentados en proestro respecto al estro.

En cuanto a los niveles de actividad gelatinásica en los ovarios de ratas subfértiles, no se encontraron cambios significativos en los niveles de pro-MMP2 entre proestro y estro. Sin embargo, los niveles de la forma activa de MMP-2 fueron significativamente más altos en estro que en proestro. Los niveles de pro-MMP-9 y de MMP-9 activa no fueron detectables en las condiciones experimentales estudiadas.

5.2. OBJETIVO 2: Determinar el efecto de la adición del péptido KP-10 sobre los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad y estudiar si dicho efecto se revierte en presencia de p234 (antagonista del receptor de kisspeptina).

5.2.1. Niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en condiciones control

Como se muestra en la Figura 10, se compararon los niveles de mRNA de MMP-2 (Figura 10A) y MMP-9 (Figura 10B) en los ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en condiciones control. Se encontró una disminución significativa ($p < 0,05$) en los niveles del mRNA de MMP-2 entre los 6 y 10 meses de edad y entre los 8 y 10 meses de edad. Por su parte, en los niveles de mRNA de MMP-9 no se observaron diferencias significativas entre los grupos comparados. Sin embargo, se encontró que éstos tendían a encontrarse aumentados a los 10 meses respecto a los 6 y 8 meses de edad.

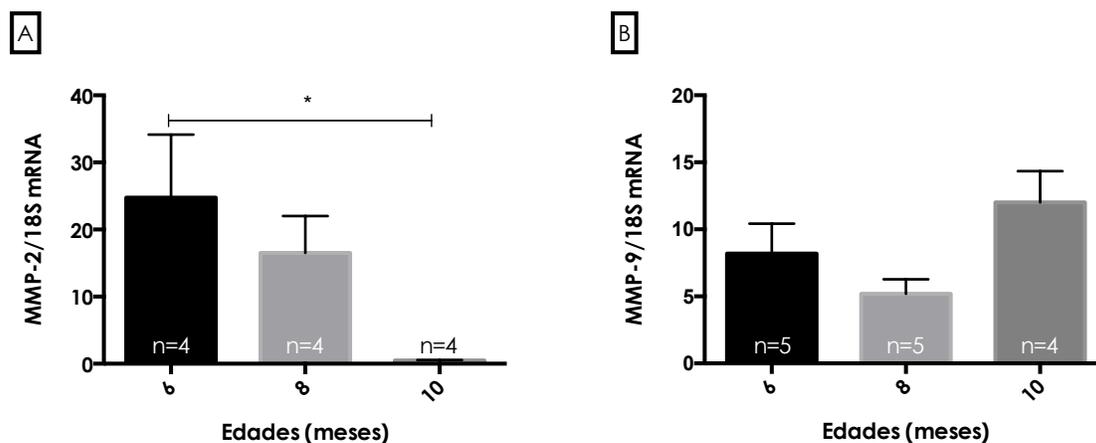


Figura 10. Niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en condiciones control. A) mRNA de MMP-2, B) mRNA de MMP-9. Los datos graficados están normalizados respecto al gen constitutivo 18S y corresponden al promedio \pm SEM. Las diferencias significativas se determinaron utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn. * $p < 0,05$.

5.2.2. Niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en presencia del péptido KP-10 y de KP-10 + p234

Se realizaron incubaciones *in vitro* de los ovarios en presencia del péptido KP-10 y de un antagonista del receptor de kisspeptina, p234 (100 veces más concentrado que KP-10). Este antagonista tiene mayor afinidad por el receptor GPR54 y comparte los mismos 10 aminoácidos de unión al receptor que tienen los péptidos de kisspeptina, pero difiere en su secuencia. A partir de esos ovarios incubados, se estudiaron los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 mediante RT-qPCR. Como se observa en la Figura 11, los niveles de mRNA de MMP-2 (Figura 11A) y MMP-9 (Figura 11B) no cambiaron significativamente en ovarios de ratas fértiles de 6 meses de edad incubados *in vitro* en presencia de KP-10 y de p234 respecto a los controles incubados sólo en amortiguador Krebs. Sin embargo, en ovarios de ratas de 8 meses de edad (inicio subfertilidad) se observó un aumento significativo en la expresión del mRNA de MMP-2 en presencia de KP-10 ($p < 0,05$) respecto al control (Figura 11C). Los niveles de mRNA de MMP-9 en ovarios de ratas de 8 meses, por su parte, no cambiaron significativamente en presencia de KP-10 y de KP-10 más p234 respecto al control (Figura 11D). En cuanto a los niveles de los mRNAs de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas de 10 meses de edad (subfertilidad), tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a los controles (Figura 11E y F).

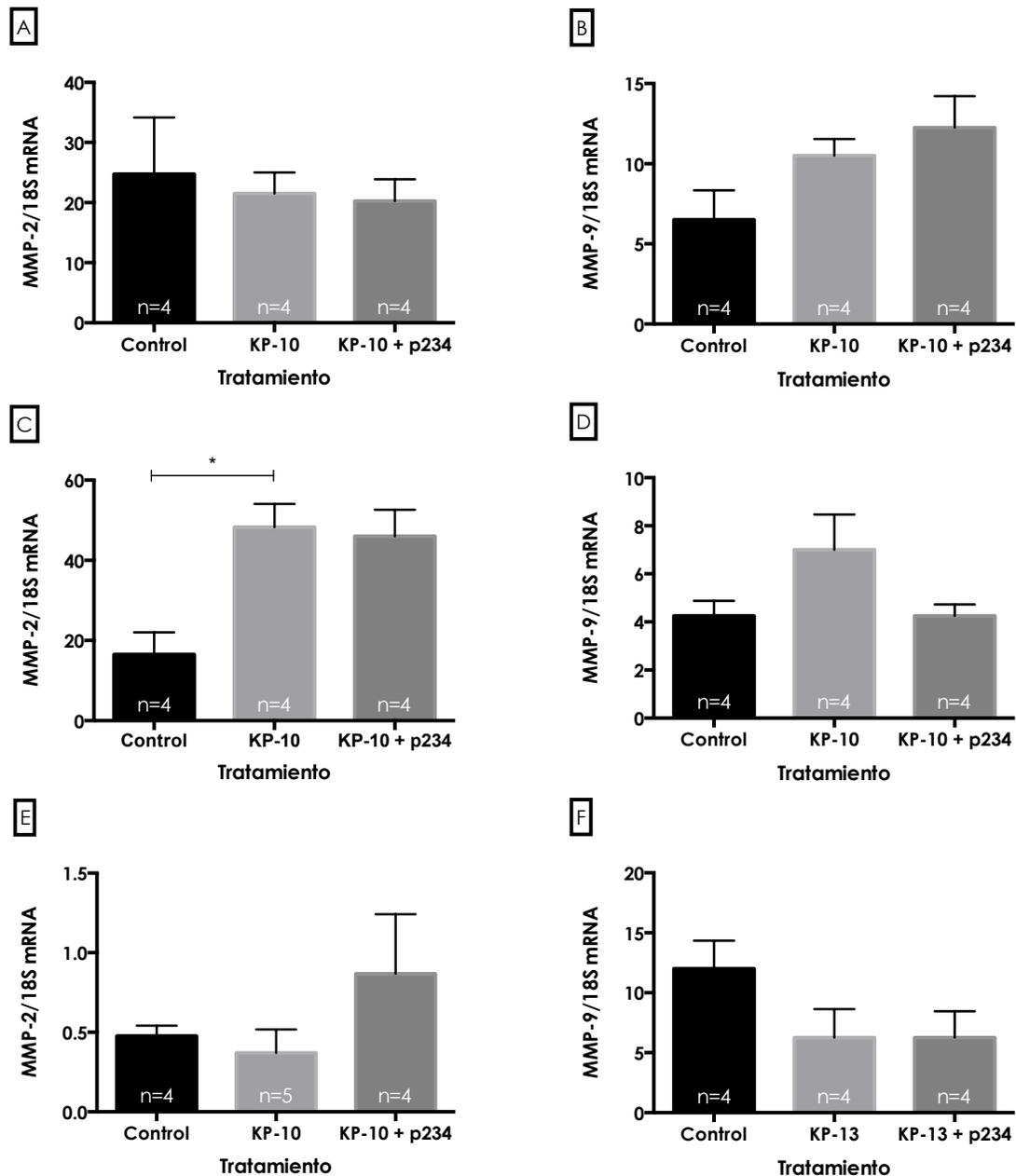


Figura 11. Expresión del mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de animales de 6, 8 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en presencia del péptido KP-10 y de p234 (antagonista del receptor de kisspeptina). El grupo control fue incubado sólo en amortiguador Krebs. **A) mRNA de MMP-2 en animales de 6 meses de edad, **B)** mRNA de MMP-9 en animales de 6 meses de edad, **C)** mRNA de MMP-2 en animales de 8 meses de edad, **D)** mRNA de MMP-9 en animales de 8 meses de edad, **E)** mRNA de MMP-2 en animales de 10 meses de edad, **F)** mRNA de MMP-9 en animales de 10 meses de edad. Los datos graficados están normalizados respecto al gen constitutivo 18S y corresponden al promedio \pm SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn. * = $p < 0,05$.**

En resumen, los resultados del objetivo 2 muestran que al comparar los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en los ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en condiciones control, se encontró una disminución significativa en los niveles del mRNA de MMP-2 entre los 6 y 10 meses de edad y entre los 8 y 10 meses de edad. En los niveles de mRNA de MMP-9, en cambio, no se observaron diferencias significativas entre los grupos comparados.

A partir de las incubaciones *in vitro* de los ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad en presencia de KP-10 y de un antagonista del receptor de kisspeptina (p234), no se encontraron cambios significativos en los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas de 6 meses de edad (fértiles). Sin embargo, en ovarios de ratas de 8 meses de edad (inicio subfertilidad) se observó un aumento significativo en la expresión del mRNA de MMP-2 en presencia de KP-10 y de KP-10 más p234 respecto al control. Por su parte, los niveles de mRNA de MMP-9 en ovarios de ratas de 8 meses, no cambiaron significativamente en presencia de KP-10 y de KP-10 más p234 respecto al control. En cuanto a los niveles de estos mRNAs en ovarios de ratas de 10 meses de edad (subfértiles), tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

5.3. OBJETIVO 3: Estudiar el efecto de la adición del péptido KP-10 sobre la actividad de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en el ovario de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad y determinar si dicho efecto se revierte en presencia del péptido KP-10 + p234 (antagonista del receptor de kisspeptina).

5.3.1. Niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses incubados *in vitro* en presencia del péptido KP-10 y p234

Se realizaron incubaciones *in vitro* de los ovarios en presencia de KP-10 y de un antagonista del receptor de kisspeptina (p234) y se estudiaron los niveles de pro-MMP-2 y MMP-2 activa mediante zimografía. Como se observa en la Figura 12, no se encontraron cambios significativos en los niveles de pro-MMP2 ni en los de MMP-2 activa con ninguno de los tratamientos realizados a los ovarios de las tres edades estudiadas. Los niveles de pro-MMP-9 y de MMP-9 activa no fueron detectables en las condiciones experimentales utilizadas.

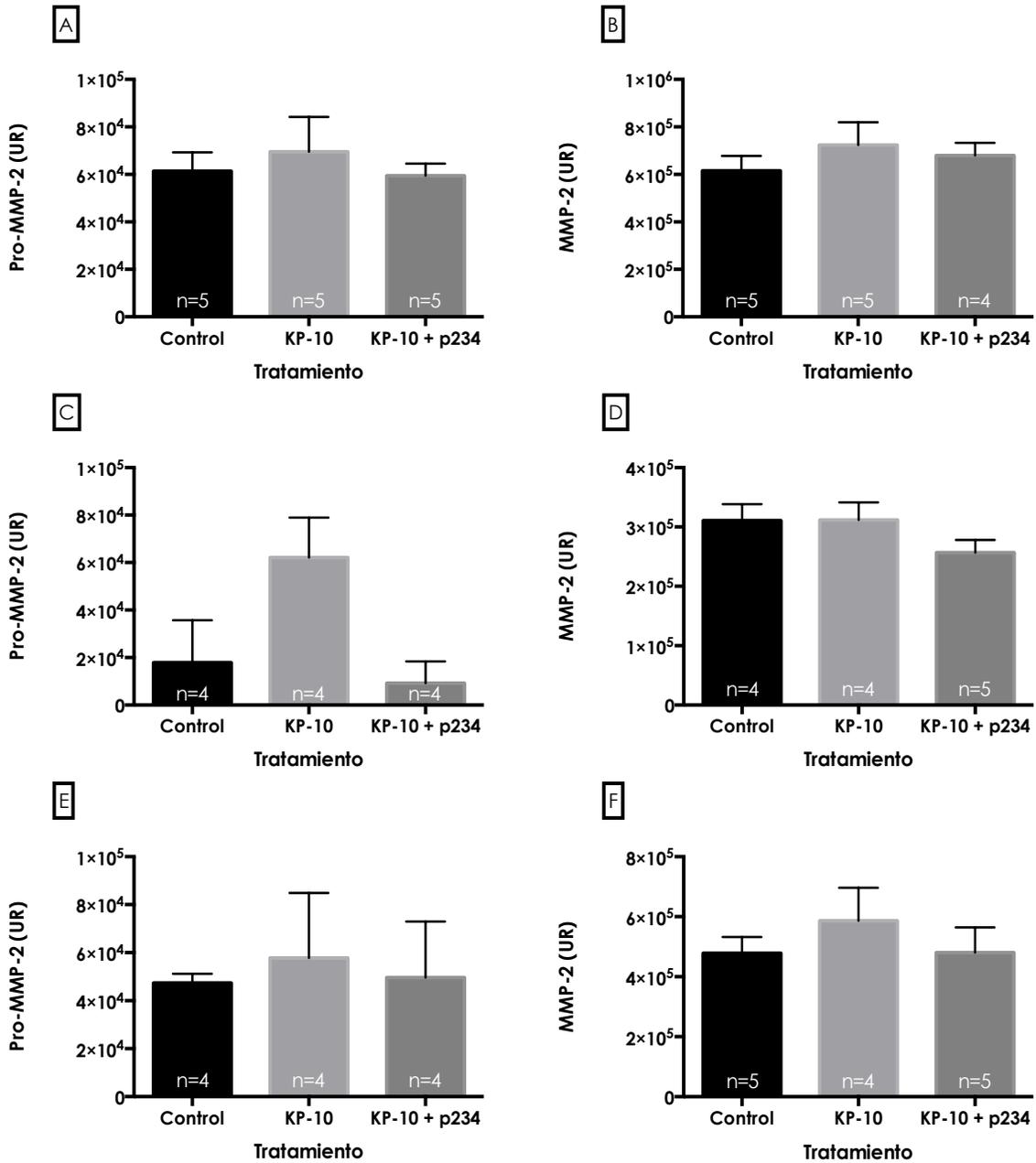


Figura 12. Niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en presencia del péptido KP-10 y de KP-10 + p234 (antagonista del receptor de kisspeptina). A y B) Niveles de Pro-MMP-2 y de MMP-2 activa en ovarios incubados de ratas de 6 meses, C y D) Niveles de Pro-MMP-2 y de MMP-2 activa en ovarios incubados de ratas de 8 meses, E y F) Niveles de Pro-MMP-2 y de MMP-2 activa en ovarios incubados de ratas de 10 meses. Los datos graficados están normalizados respecto a un estándar interno y corresponden al promedio \pm SEM. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunn.

6. DISCUSIÓN

El descubrimiento de neuronas kisspeptinérgicas en el sistema nervioso central (Brailoiu et al., 2005), fundamentalmente en el hipotálamo, responsables de modular la liberación de GnRH mediante la activación del receptor GPR54, posicionó a KISS como un factor clave en el control neuroendocrino de la función reproductiva. Sin embargo, también se ha demostrado su expresión a nivel periférico en órganos como los ovarios (Sonigo & Binart 2012; Castellano et al., 2006), donde su rol local aún está siendo investigado (Ricu et al., 2012; Fernandois et al., 2016).

En este contexto, se ha planteado recientemente la posibilidad de que los péptidos de KISS, cuyos niveles varían según el progreso del ciclo ovárico, estén regulando al sistema proteolítico de las MMPs a nivel local, de manera similar a como se ha descrito en otros tejidos (Navenot et al., 2005; Yan et al., 2001; J. Lee et al., 1996; Lee & Welch 1997; Bilban et al., 2004; Luo et al., 2011; Roseweir et al., 2012; Francis et al., 2014). De ser así, KISS podría regular cíclicamente el remodelamiento de la MEC ovárica controlando los niveles de expresión y/o actividad de las MMPs, lo que sería especialmente importante en el periodo de subfertilidad, cuando existe un aumento significativo en los niveles de KISS en el ovario. En base a esto, se propuso caracterizar el patrón de expresión de los mRNAs de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 y, además, los cambios en la actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles y subfértiles en las diferentes etapas del ciclo estral. A partir de los resultados obtenidos, se encontró que los niveles de mRNA de *Kiss-1* y MMP-9 fueron significativamente más altos en proestro tardío en relación al estro, lo que coincide con lo reportado por el grupo español de Castellano y cols (Castellano et al., 2006), quienes caracterizaron, mediante RT-PCR semicuantitativo, los perfiles de expresión del mRNA de *Kiss-1* en las diferentes fases del ciclo estral en ovarios de ratas *Wistar* adultas. Sin embargo, a diferencia de lo descrito por dichos investigadores, se encontró que, en ratas fértiles, los niveles de expresión del transcrito de *Kiss-1* fueron altos también en proestro temprano (aunque no de forma significativa con

respecto al estro), lo que podría explicarse porque los sacrificios de dichos animales no se efectuaron a la misma hora. El grupo de Castellano sacrificó a los animales en proestro temprano antes de las 9 de la mañana, mientras que en nuestro laboratorio éstos fueron sacrificados entre las 10:30 a.m. y 12:30 p.m. Sin embargo, esto podría no ser suficiente para explicar esta diferencia, por lo que habría sido conveniente aumentar el n de la muestra en esta etapa del ciclo (el n fue de 3) para realizar un análisis más robusto (esto aplicaría para el análisis del mRNA de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 en esta etapa del ciclo, puesto que a partir de un mismo extracto ovárico se midieron los niveles de expresión de los tres genes). El grupo español sugirió en el mismo estudio mencionado, a partir de sus resultados, que KISS podría tener un rol en el control directo de la ovulación. Sin embargo, como es posible ver tanto en su estudio como en el nuestro, KISS no sólo se expresa en el periodo periovulatorio; lo hace también en otras etapas del ciclo estral, lo que sugiere que podría estar involucrada en otras funciones, como el desarrollo folicular (Fernandois et al., 2016), además de la ovulación.

En relación a los niveles de mRNA de MMP-2 durante el ciclo estral, se encontró que éstos fueron significativamente más altos en estro que en proestro temprano y tardío. Los elevados niveles encontrados en la fase estro coinciden con lo descrito por un grupo de investigadores suecos (Liu et al., 1999) que examinó el patrón de regulación fisiológico y la distribución celular de los mRNAs que codifican para algunas MMPs en el cuerpo lúteo de ratas *Sprague Dawley* pseudopreñadas mediante análisis de northern blot e hibridación *in situ*. Ellos encontraron que el mRNA de MMP-2 se expresaba principalmente durante el proceso de formación del cuerpo lúteo, lo que coincide con el máximo que encontramos en estro, y sugiere que esta enzima puede estar asociada con la extensa neovascularización y el remodelamiento tisular que toma lugar durante la formación del cuerpo lúteo. Este grupo, mostró además que el mRNA de MT1-MMP, una MMP capaz de activar *in vitro* a pro-MMP-2 (Jo et al., 2004), también se expresaba durante este proceso de formación lútea, por lo que podría estar involucrada en la activación de esta gelatinasa.

Se habría esperado, sin embargo, que también se encontraran más elevados los niveles del transcrito de MMP-2 en proestro tardío, puesto que también se ha descrito un rol para esta enzima en ruptura folicular (Curry et al., 1992; Gottsch et al., 2000; Curry et al., 2001; Curry & Osteen 2003). Volveremos a referirnos a este punto más adelante cuando se hable respecto de las zimografías.

Otro antecedente que apoya la idea de que MMP-2 juega un importante rol en la formación del cuerpo lúteo, tiene que ver con el reciente descubrimiento de un grupo de investigadores estadounidenses que mostró que la ovulación en *Drosophilla* es similar a la ovulación en mamíferos tanto a nivel celular como molecular y que MMP-2 es requerida para la ovulación y formación del cuerpo lúteo (Deady et al., 2015).

Respecto a los niveles del mRNA de MMP-9 se encontró que fueron significativamente más altos en proestro temprano y tardío respecto al estro, mostrando un patrón de expresión similar al mRNA de *Kiss-1* durante el ciclo estral. Los elevados niveles de expresión del mRNA de MMP-9 en proestro tardío coinciden con resultados de estudios que han descrito que previo a la ovulación ocurre un incremento en los niveles de mRNAs de ciertas MMPs ováricas, entre las que se encuentran las colagenasas (MMP-1 y MMP-13), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y MMP-19, con un patrón temporal consistente con la degradación de la pared folicular en la rata (Reich et al., 1985; Reich et al., 1991; Curry et al., 1992), ratón (Hägglund et al., 1999), oveja (Murdoch et al., 1986; Gottsch et al., 2000) y primates no humanos (Chaffin & Stouffer 1999). Estos cambios en el mRNA coinciden con un incremento en la actividad de dichas enzimas proteolíticas (Curry et al., 1992; Gottsch et al., 2000; Curry et al., 2001; Curry & Osteen 2003), las que juegan un papel fundamental, puesto que participan en la degradación del tejido conectivo apical del folículo, facilitando la liberación del ovocito (Knobil & Neill 2014).

Como se mencionó antes, según estudios realizados en nuestro laboratorio, los cambios morfológicos asociados al envejecimiento ovárico en ratas *Sprague Dawley* van acompañados de un incremento en los niveles del transcrito

y del péptido de KISS a los 10 y 12 meses de edad (en relación a los 6 meses de edad) (Fernandois et al., 2016). Como se cree que este incremento podría estar provocando alteraciones en la funcionalidad ovárica mediadas por cambios en los niveles de expresión y/o actividad de las gelatinasas a nivel local, de manera similar a como se ha descrito en diversos tipos de cáncer y en células de trofoblasto (Navenot et al., 2005; Yan et al., 2001; J. H. Lee et al., 1996; Lee & Welch 1997; Bilban et al., 2004; Roseweir et al., 2012; Francis et al., 2014), se evaluó el patrón de expresión de *Kiss-1*, MMP-2 y MMP-9 en ratas en el inicio del periodo de subfertilidad. Pese a que lo ideal habría sido comparar los niveles de expresión de dichos genes en ovarios de ratas fértiles de entre 3 y 6 meses de edad con los de ratas de 10 meses de edad, (debido a que, como se mencionó más arriba, a esa edad el aumento en los niveles de kisspeptina endógena son significativos); en este estudio, se utilizaron ovarios de ratas de 8 meses (inicio del periodo de subfertilidad), puesto que los animales a dicha edad se pueden encontrar todavía ciclando con mayor facilidad. Los estudios realizados con los ovarios obtenidos a partir de los animales de 8 meses de edad en proestro y estro mostraron que los niveles de mRNA de *Kiss-1* fueron significativamente más altos en proestro que en estro, lo que coincide con lo que encontramos en animales fértiles. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles del mRNA de MMP-2 y MMP-9 entre proestro y estro, no obstante ambos transcritos tendían a encontrarse aumentados en proestro respecto al estro.

Además, se estudiaron, mediante zimografía en gel, los cambios en la actividad gelatinásica en ovarios de ratas *Sprague Dawley* fértiles (3 y 6 meses de edad) y subfértiles (8 meses de edad). Las zimografías indicaron que la actividad gelatinolítica presente en los extractos ováricos se debía a MMP-2. Se observaron dos principales regiones de actividad: una banda de aproximadamente 72 kDa, correspondiente a pro-MMP-2, que es posible visualizar gracias a que sufre un cambio conformacional en presencia de SDS que deja expuesto su sitio activo, y otra de aproximadamente 62 kDa, correspondiente a la forma activa de MMP-2. Desafortunadamente, los niveles de pro-MMP-9 y de MMP-9 activa no fueron detectables en las condiciones experimentales utilizadas pese a que se hicieron

variaciones en el protocolo con el objeto de hacer posible la visualización de las bandas correspondientes a pro-MMP-9 y a MMP-9 activa. Dichas variaciones consistieron en probar con distintas cantidades de muestra a cargar (desde 20 a 150 mg) y con distintos tiempos de incubación del gel en el medio de actividad gelatinásica (desde 24 a 72 hrs). Sin embargo, algo que no se probó y que podría haber dado resultado es variar la cantidad de gelatina (sustrato) con la que se polimerizaba el gel. Esto podrá ser tomado en cuenta en futuros estudios de zimografía con homogenizados de tejidos.

La dificultad para visualizar la actividad proteolítica de MMP-9 podría deberse también a que, según se ha descrito en la literatura, al trabajar con tejidos intactos como el ovario, los procedimientos de homogenización pueden presentar artificialmente las MMPs a sustratos e inhibidores que no se encuentran en el ambiente celular inmediato, lo que puede resultar en una pérdida o disminución de la actividad enzimática (Curry et al., 1992; Curry & Osteen 2003).

En cuanto a los niveles de pro-MMP2 en las etapas del ciclo estral estudiadas en ratas fértiles, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, los cambios encontrados en la forma activa de MMP-2 sí fueron significativos entre proestro temprano y estro. La tendencia con la que ocurren estos cambios en los niveles de actividad gelatinolítica entre el proestro tardío y el estro coincide con la de los cambios reportados en los niveles del mRNA de MMP-2 entre dichas etapas del ciclo. Sin embargo, se observa una diferencia menos marcada en los cambios en los niveles de actividad de MMP-2 entre proestro tardío y estro que en los niveles del mRNA de MMP-2 entre estas dos fases. Los cambios en los niveles de actividad de MMP-2 entre las etapas del ciclo estral estudiadas parecen entonces asemejarse más al aumento periovulatorio descrito en la literatura y apoyar de esta forma el rol propuesto para MMP-2 en el proceso ovulatorio y de formación del cuerpo lúteo.

También se estudiaron los cambios en los niveles de actividad gelatinásica en ratas subfértiles. No se encontraron cambios significativos en los niveles de pro-MMP-2 entre proestro y estro. Sin embargo, los niveles de la forma activa de

MMP-2 fueron significativamente más altos en estro, lo que coincide con lo encontrado en ratas fértiles, pero no con lo encontrado en los análisis de los niveles del mRNA de MMP-2 entre estas fases del ciclo. Esto podría explicarse tomando en cuenta que la acción de las MMPs es rigurosamente controlada a nivel transcripcional, traduccional, de activación de la proenzima y de actividad enzimática por formación de complejos no covalentes con TIMPs, los inhibidores tisulares de MMPs (Parsons et al., 1997; Curry & Osteen 2003). Por ello, no necesariamente los cambios en los niveles del mRNA o de la proteína MMP-2 se verán reflejados en las variaciones en los niveles de actividad de dicha enzima. De manera similar a lo que se comentaba en el caso de las ratas fértiles, pese a que la diferencia en los niveles de actividad de MMP-2 entre proestro y estro es significativa, es menos marcada que la reportada para los niveles del mRNA de MMP-2 entre estas dos etapas y, al igual que en el caso de las ratas fértiles, las variaciones observadas se condicen con lo descrito en la literatura.

Para evaluar si el incremento en los niveles intraováricos de kisspeptina que ocurre con la edad (Fernandois et al., 2016) está alterando el nivel de expresión y/o actividad de las gelatinasas de manera local (Navenot et al., 2005; Yan et al., 2001; J. H. Lee et al., 1996; Lee & Welch 1997; Bilban et al., 2004; Roseweir et al., 2012; Francis et al., 2014), se realizaron incubaciones *in vitro* de ovarios de ratas *Sprague Dawley* de 6, 8 y 10 meses de edad en presencia del péptido KP-10 y del péptido KP-10 + p234 (antagonista del receptor de kisspeptina). Recordemos que este antagonista tiene mayor afinidad por el receptor GPR54 y comparte los mismos 10 aminoácidos de unión al receptor que tienen los péptidos de kisspeptina, pero difiere en su secuencia .

A partir de los ovarios incubados *in vitro*, se realizaron estudios de RT-qPCR y se encontró que al comparar los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 entre los ovarios de 6, 8 y 10 meses de edad incubados en condiciones control, hubo una reducción significativa en los niveles del mRNA de MMP-2 en los ovarios de ratas de 10 meses respecto de los de 6 meses de edad (animales subfértiles). Es probable que este efecto tenga que ver con la disminución que se ha descrito a

esta edad en el número de folículos antrales y cuerpos lúteos (Acuña et al., 2009), las estructuras que expresan mayores niveles de MMP-2. En relación a los niveles del mRNA de MMP-9 no se encontraron cambios significativos con la edad de la rata.

Los niveles del mRNA de MMP-2 y MMP-9 no cambiaron significativamente en ovarios de ratas fértiles de 6 y 10 meses de edad incubados *in vitro* en presencia del péptido KP-10 y de KP-10 + p234 respecto a los controles. Pese a que en ovarios de ratas de 8 meses de edad, se observó un aumento significativo respecto al grupo control en la expresión del mRNA de MMP-2 en presencia del péptido KP-10 que se comentará más adelante, cuando se hable respecto de los resultados de las zimografías. Los niveles de mRNA de MMP-9 en ovarios de ratas de 8 meses, por su parte, no cambiaron significativamente con ninguno de los tratamientos. En resumen, los resultados obtenidos a partir de los análisis de RT-qPCR mostraron que las incubaciones *in vitro* en presencia del péptido KP-10 o de KP-10 + p234, no afectaron los niveles de expresión del mRNA de MMP-9 en ninguna de las edades estudiadas.

Se estudiaron además los niveles de actividad gelatinásica en ovarios de ratas de 6, 8 y 10 meses de edad incubados en presencia de KP-10 y de KP-10 + p234 y no se encontraron cambios significativos en los niveles de pro-MMP-2 ni en los de MMP-2 activa en las condiciones estudiadas, por lo que el incremento significativo en los niveles del transcrito de MMP-2 que se observó en los ovarios de ratas de 8 meses incubados en presencia de KP-10, no tendría mayor relevancia, ya que no conduce a cambios en la actividad proteolítica. Pese a que se observa que los niveles de pro-MMP-2 en ovarios de ratas de 8 y 10 meses de edad tienden a encontrarse más elevados en presencia de KP-10 respecto a los controles y al grupo KP-10 + p234, no tendría mayor relevancia, puesto que son variaciones en la forma inactiva de MMP-2.

Con los resultados obtenidos a partir de los estudios de RT-qPCR, se realizó un análisis de correlación de Pearson, entre los niveles de mRNA de *Kiss-1* y los de MMP-2 y MMP-9 en ovarios de ratas fértiles y subfértiles en las distintas

fases del ciclo estral estudiadas. Dichos análisis mostraron, tanto en ratas fértiles como en subfértiles, una correlación negativa entre los niveles del mRNA de *Kiss-1* y los de MMP-2 (el factor de correlación de Pearson fue de 0,5379 en ratas fértiles y de 0,3605 en ratas subfértiles). Entre los niveles del mRNA de *Kiss-1* y los de MMP-9, por su parte, se encontró una correlación positiva (el factor de correlación de Pearson fue de 0,9267 en ratas fértiles y de 0,7141 en ratas subfértiles). La correlación negativa que resultó entre los niveles de mRNA de *KISS-1* y MMP-2 se puede notar al observar que, en general, en las fases del ciclo en que los niveles de expresión del mRNA de *Kiss-1* fueron altos, los del mRNA de MMP-2 fueron bajos, mientras que cuando los niveles del mRNA de *Kiss-1* fueron bajos, los del mRNA de MMP-2 fueron altos. Por otro lado, es posible notar la alta correlación positiva entre los niveles de mRNA de *Kiss-1* y MMP-9, al observar que mostraron un patrón de variación casi idéntico: en las fases del ciclo en que los niveles de mRNA de *Kiss-1* se encontraron elevados, también lo hicieron los de MMP-9 y, cuando los niveles del mRNA de *Kiss-1* fueron bajos, los de MMP-9 también presentaron una disminución. Los análisis de correlación, junto a los análisis de los resultados obtenidos a partir de los objetivos 2 y 3 permitirían entonces descartar un efecto causal entre el aumento de KISS y el aumento del mRNA de MMP-9 y el aumento de KISS y la disminución del mRNA de MMP-2, lo que sugiere que podría haber uno o más factores que afecten la expresión de los mRNAs de *Kiss-1* y MMP-9, por ejemplo, en forma conjunta, como el máximo de LH preovulatorio o el aumento en los niveles de citoquinas, progesterona o prostaglandinas que se produce como consecuencia del incremento en LH. La variación en los niveles del mRNA de MMP-9 no es consecuencia de un efecto de kisspeptina.

En resumen:

- En ratas *Sprague Dawley* fértiles, el patrón de expresión de los mRNAs de *Kiss-1* y MMP-9 fue muy similar en las etapas del ciclo estral estudiadas: los niveles de mRNA de *Kiss-1* y MMP-9 se encontraban elevados en ovarios de ratas en proestro temprano y tardío y presentaban una caída en los ovarios de ratas en estro. Como se ha sugerido previamente, este incremento en los niveles del mRNA de *Kiss-1* en proestro tardío podría estar relacionado con un potencial rol de este péptido en el control directo de la ovulación. Sin embargo, el mRNA de *Kiss-1* también se expresa en las otras fases del ciclo estudiadas, lo que sugiere que kisspeptina podría estar involucrada en otras funciones como el desarrollo folicular, además de la ovulación. En cuanto a los elevados niveles de expresión del mRNA de MMP-9 en proestro tardío, éstos se condicen con lo descrito en la literatura y apoyan el rol que se ha sugerido para esta gelatinasa en la ruptura folicular en la zona del ápice al momento de la ovulación.
- En animales fértiles, los niveles del mRNA de MMP-2 fueron significativamente más bajos en ovarios de ratas en proestro temprano y tardío en relación a los encontrados en ovarios de ratas en estro. Esto coincidió con los cambios encontrados, mediante estudios de zimografía, en la forma activa de MMP-2, sin embargo, parece haber una diferencia menos marcada en los cambios en los niveles de actividad de MMP-2 que en los cambios en los niveles del mRNA, por lo que los cambios en la actividad de esta gelatinasa se asemejan más a lo descrito en la literatura y apoyan el rol propuesto para MMP-2 en el proceso ovulatorio y en la formación del cuerpo lúteo.
- En animales subfértiles, el patrón de expresión de los mRNAs de *Kiss-1* y MMP-9 fue también muy similar en las etapas del ciclo estral estudiadas y los niveles de expresión encontrados, pese a que no variaban de forma significativa, seguían la misma tendencia que la de los animales fértiles

(parecían encontrarse más elevados en proestro que en estro). Los niveles del mRNA de MMP-2 tampoco cambiaron significativamente entre proestro y estro. Sin embargo, los niveles de la forma activa de MMP-2 sí cambiaron de forma significativa entre estas dos etapas, siendo más altos en estro, lo que coincide con lo encontrado en ratas fértiles.

- Los resultados no avalan la hipótesis planteada puesto que el tratamiento de los ovarios con el péptido KP-10 o con KP-10 + p234 no tuvo efecto sobre la expresión de los mRNAs de MMP-2 y MMP-9 en el periodo fértil ni en el subfértil. En el caso de MMP-2, tampoco se observó efecto a nivel de actividad.

7. CONCLUSIONES

- Los niveles del mRNA de MMP-2 se encuentran significativamente disminuidos en proestro y aumentados en estro, mientras que los de MMP-9 se encuentran significativamente aumentados en proestro y disminuidos en estro. Esto muestra que las gelatinasas varían en el ciclo estral de forma opuesta.
- En el periodo de subfertilidad, los niveles del mRNA de MMP-2 disminuyen significativamente, lo que se correlaciona con la disminución en el número de folículos antrales y cuerpos lúteos descrito en envejecimiento reproductivo.
- KP-10 no tiene efecto sobre la expresión de MMP-2 y MMP-9 a nivel de mRNA en el periodo fértil ni subfértil. En el caso de MMP-2, tampoco hubo efecto a nivel de actividad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, E. et al., 2009. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol.*, 64(7).
- Apte, S.S., Olsen, B.R. & Murphy, G., 1995. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem*, 270, pp.14313–14318.
- Bilban, M. et al., 2004. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci*, 117(Pt 8), pp.1319–1328.
- Birkedal-Hansen, H. et al., 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 4, pp.197–250.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, pp.248–254.
- Brailoiu, G.C. et al., 2005. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol*, 481, pp.314–329.
- Brawer, J., Richard, M. & Farookhi, R., 1989. Pattern of human chorionic gonadotropin binding in the polycystic ovary. *Am J of Obstet Gynecol*, 161(2), pp.474–480.
- Brew, K., Dinakarbandian, D. & Nagase, H., 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1477, pp.267–283.
- Castellano, J.M. et al., 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*, 147(10), pp.4852–4862.

- Chaffin, C. & Stouffer, R., 1999. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor messenger ribonucleic acids in Macaque periovulatory granulosa cells: time course and steroid regulation. *Biol Reprod.*, 61(1), pp.14–21.
- Chufán, E.E. et al., 2009. Amidation of Bioactive Peptides: The Structure of the Lyase Domain of the Amidating Enzyme. *Structure*, 17, pp.965–973.
- Curry, E. et al., 1992. Gelatinase Proteoglycanase Activity during the Periovulatory Period in the Rat. *Biol Reprod*, 46, pp.256–264.
- Curry, T.E. & Osteen, K.G., 2001. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod*, 64(5), pp.1285–1296.
- Curry, T.E. & Osteen, K.G., 2003. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev*, 24(4), pp.428–465.
- Curry, T.E., Song, L. & Wheeler, S.E., 2001. Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation, and early luteal formation in the rat. *Biol Reprod*, 65(3), pp.855–865.
- Deady, L.D. et al., 2015. Matrix Metalloproteinase 2 Is Required for Ovulation and Corpus Luteum Formation in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 11(2), pp.1–15.
- Donoso, E., 2007. Descenso de la natalidad en Chile: un problema país. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 72(73–75).
- Faddy, M.J. et al., 1992. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*, 7, pp.1342–1346.
- Fernandois, D. et al., 2016. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *J Endocrinol.*, 228(3), pp.161–170.

- Francis, V.A. et al., 2014. Kisspeptin regulation of genes involved in cell invasion and angiogenesis in first trimester human trophoblast cells. *PLoS ONE*, 9(6), pp.1–10.
- Gomez, D.E. et al., 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74, pp.111–122.
- Gottsch, M., Van Kirk, E. & Murdoch, W., 2000. Tumour necrosis factor alpha up-regulates matrix metalloproteinase-2 activity in periovulatory ovine follicles: metamorphic and endocrine implications. *Reprod Fertil Dev.*, 12(1–2), pp.75–80.
- Hägglund, A. et al., 1999. Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology*, 140(9), pp.4351–4358.
- INE, 2014. *Estadísticas Vitales Anuario 2014*, Santiago.
- Jo, M. et al., 2004. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP)-associated MMP-2 activation increases in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod*, 70(4), pp.1024–32.
- Kleiner, D.E. & Stetler-Stevenson, W.G., 1993. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*, 5, pp.891–897.
- Knobil, E. & Neill, J., 2014. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* Fourth. T. M. Plant & A. J. Zeleznik, eds., New York.
- Kotani, M. et al., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, 276(37), pp.34631–34636.
- Lapatto, R. et al., 2007. Kiss1^{-/-} Mice Exhibit More Variable Hypogonadism than Gpr54^{-/-} Mice. *Endocrinology*, 148(10), pp.4927–4936.

- Lara, H.E. et al., 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, pp.1059–1072.
- Larrañaga, O., 2003. Participación laboral de la mujer en Chile: 1958-2003. Available at: <http://economiaynegocios.uahurtado.cl/pdf/seminarios/larranaga.pdf>
- Lee, J. et al., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*, 88(23), pp.1731–1737.
- Lee, J.H. & Welch, D.R., 1997. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer res*, 57, pp.2384–2387.
- Liu, K. et al., 1999. Distinct expression of gelatinase A [matrix metalloproteinase (MMP)-2], collagenase-3 (MMP-13), membrane type MMP 1 (MMP-14), and tissue inhibitor of MMPs type 1 mediated by physiological signals during formation and regression of the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 140(11), pp.5330–5338.
- Luo, J., Qiao, F. & Yin, X., 2011. Impact of silencing MMP9 gene on the biological behaviors of trophoblasts. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 31(2), pp.241–245.
- Marcondes, F.K., Bianchi, F.J. & Tanno, A.P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.*, 62, pp.609–614.
- Murdoch, W. et al., 1986. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol Reprod.*, 35(5), pp.1187–94.
- Murphy, G. et al., 1999. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci*, 878, pp.25–39.

- Nagase, H. et al., 1991. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem. Soc. Trans.*, 19(715–718).
- Nagase, H. & Woessner, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 274, pp.21491–21494.
- Navenot, J.-M. et al., 2005. Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: a potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. *Cancer res*, 65(22), pp.10450–10456.
- Ny, T., Wahlberg, P. & Brändström, I.J.M., 2002. Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. *Mol Cell Endocrinol*, 187(1–2), pp.29–38.
- Parsons, S.L. et al., 1997. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg*, 84, p.160–166.
- Pinilla, L. et al., 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, 92(3), pp.1235–1316.
- Reich, R. et al., 1991. Preovulatory changes in ovarian expression of collagenases and tissue metalloproteinase inhibitor messenger ribonucleic acid: role of eicosanoids. *Endocrinology*, 129(4), pp.1869–75.
- Reich, R., Tsafiriri, A. & Mechanic, G., 1985. The involvement of collagenolysis in ovulation in the rat. *Endocrinology*, 116(2), pp.522–527.
- Ricu, M., 2012. *Participación de kisspeptina en la función ovárica. Regulación por el sistema nervioso simpático y cambios por estrés por frío en la rata.*
- Ricu, M. a et al., 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(10), pp.4966–4977.

- Roseweir, A.K., Katz, A.A. & Millar, R.P., 2012. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. *Placenta*, 33(5), pp.408–415.
- de Roux, N. et al., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), pp.10972–10976.
- Seminara, S.B. et al., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, 349(17), pp.1614–1627.
- Smith, M. et al., 1999. Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J Reprod Fertil Suppl*, 54, pp.367–381.
- Sonigo, C. & Binart, N., 2012. Overview of the impact of kisspeptin on reproductive function. *Ann Endocrinol (Paris)*, 73, pp.448–458.
- Strickland, S. & Richards, W.G., 1992. Invasion of the trophoblasts. *Cell*, 71, pp.355–357.
- Talhouk, R.S., Bissell, M.J. & Werb, Z., 1992. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol*, 118(5), pp.1271–1282.
- Te Velde, E.R. et al., 1998. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol*. pp. 67–73.
- te Velde, E.R. & Pearson, P.L., 2002. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod*, 8(2), pp.141–154.
- Woodruff, T.K. & Shea, L.D., 2007. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. *Reprod Sci*, 14(8), pp.6–10.

- Wu, J.M. et al., 2005. Experimental Biology and Medicine Ovarian Aging and Menopause: *Exp Biol Med*, 230, pp.818–828.
- Yan, C., Wang, H. & Boyd, D.D., 2001. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Cell Biol*, 276(2), pp.1164–72.
- Zajac, M. et al., 2011. GPR54 (KISS1R) transactivates EGFR to promote breast cancer cell invasiveness. *PloS one*, 6(6), p.e21599.