



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## **EFFECTO DE KISSPEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIA EN OVARIOS DE RATAS DURANTE EL PERIODO DE SUBFERTILIDAD**

CONSTANZA DEL ROSARIO VARGAS GARCÍA

### **MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO**

**Profesor Patrocinante:**

Dr. Alfonso Paredes Vargas.

Departamento de Bioquímica

y Biología Molecular.

Fac. Cs Químicas y Farmacéuticas.

**Director de Memoria:**

Dr. Alfonso Paredes Vargas.

Departamento de Bioquímica

y Biología Molecular.

Fac. Cs Químicas y Farmacéuticas.

SANTIAGO DE CHILE

NOVIEMBRE 2017

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, mis papas y mi hermano, por haberme dado la oportunidad de estudiar y por haberme acompañado en este último proceso hasta el final. Muchas gracias por su incondicional apoyo durante todos estos años y por haber sido partícipes de esta gran etapa, los amo mucho.

También quiero hacer un reconocimiento especial a mi pololo, compañero y mejor amigo, Abel, quien me acompañó y me aconsejó durante todo este tiempo, incluso en los periodos de máximo estrés. Gracias por ser un apoyo fundamental, por escucharme y siempre subirme el ánimo cuando más lo necesitaba, te amo infinitamente.

Agradecer también a mis amigos y compañeros de laboratorio por haberme ayudado en múltiples ocasiones con mis experimentos y en los seminarios. Lo que más destaco de este gran grupo es su buena onda. Gracias chiquillos por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

A mis ex compañeras de trabajo en Carey (Rachel, Xime y Gabi), gracias por haberme transmitido todos sus conocimientos en PI (jajaja) y por ser las mejores compañeras-amigas que uno podría tener en una pega. Ustedes fueron gran parte de este proceso y me iniciaron en el mundo laboral, las quiero un montón.

A mis amigos de la vida (Pancha, Esteban y Karen), mis amigos de la U (Coni, Javi, Maquita, Apu, Churri y Nini) y mis amigas de cheer, también les doy las gracias por aguantarme y hacerme reír por cualquier cosa.

Finalmente, quiero agradecer enormemente a mi Director de Memoria, el Dr. Alfonso Paredes. Gracias Profe por haberme enseñado todo lo que aprendí, por haberme acogido en su laboratorio a pesar de que yo me encontraba trabajando y por haber sido flexible con mis tiempos. Pero por sobre todo, gracias por su infinita paciencia y por cada una de las críticas constructivas que siempre me brindó. Extiendo también este agradecimiento a los miembros de mi comisión, el Dr. Hernán Lara y el Dr. Dante Miranda, a quienes también admiro mucho como docentes.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Abstract</b> .....	3
<b>3. Introducción</b> .....	5
3.1. Postergación de la maternidad.....	5
3.2. Desarrollo folicular (Foliculogénesis).....	6
3.3. Regulación del desarrollo folicular.....	8
3.4. Envejecimiento reproductivo.....	10
3.5. Factor Inhibidor de Leucemia.....	13
3.6. LIF a nivel reproductivo.....	15
3.6.1. Rol de LIF en el útero.....	15
3.6.2. Interacción LIF-KP en útero.....	16
3.6.3. Rol de LIF en el ovario.....	17
3.6.4. Participación de LIF en el proceso ovulatorio.....	18
<b>4. Hipótesis</b> .....	19
<b>5. Objetivo general</b> .....	19
<b>6. Objetivos específicos</b> .....	19
<b>7. Materiales y Métodos</b> .....	20
7.1. Animales.....	20
7.2. Incubación de ovarios de rata con KP.....	21
7.3. Determinación de los niveles de mRNA de LIF en ovario de rata mediante RT-qPCR.....	22
7.4. Determinación de los niveles de proteína de LIF en ovario de rata mediante WB.....	24
7.5. Análisis estadístico.....	25

<b>8. Resultados</b> .....	26
8.1. Objetivo 1: Niveles de mRNA y proteína de LIF en el ovario durante el envejecimiento reproductivo.....	26
8.2. Objetivo 2: Efecto <i>in vitro</i> de KP sobre la expresión de LIF en ovarios neonatos, fértiles y subfértiles.....	28
<b>9. Discusión</b> .....	32
9.1. Los niveles de mRNA de LIF se mantienen constantes durante el envejecimiento reproductivo.....	33
9.2. Los niveles de proteína LIF aumentan significativamente durante el período fértil.....	34
9.3. KP induce un aumento en los niveles de expresión de LIF en ovarios de ratas fértiles.....	36
<b>10. Conclusión</b> .....	43
<b>11. Anexo</b> .....	44
<b>12. Referencias</b> .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Decaimiento en la población folicular en relación a los eventos reproductivos durante la vida de la mujer.....	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del desarrollo folicular y su regulación en rata y humano.....	9
<b>Figura 3.</b> Representación de los índices de fertilidad en la rata entre los 4 y 12 meses de edad.....	10
<b>Figura 4.</b> Kisspeptina aumenta durante el envejecimiento reproductivo.....	12
<b>Figura 5.</b> Expresión de LIF en el ovario de rata durante el envejecimiento reproductivo.....	27
<b>Figura 6.</b> Kisspeptina no induce cambios en la expresión de LIF en ovario neonato de rata <i>in vitro</i> .....	29
<b>Figura 7.</b> Kisspeptina induce un aumento en los niveles de proteína LIF en ovario de rata fértil <i>in vitro</i> .....	30
<b>Figura 8.</b> Kisspeptina no induce cambios en la expresión de LIF en ovario de rata subfértil <i>in vitro</i> .....	31
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la probable regulación de KP sobre LIF durante el periodo de fertilidad.....	39
<b>Figura 10.</b> Fotos de membranas de WB completas correspondientes al objetivo 1.....	44
<b>Figura 11.</b> Fotos de membranas de WB completas correspondientes al grupo de neonatos del objetivo 2.....	45
<b>Figura 12.</b> Fotos de membranas de WB completas correspondientes al grupo fértil del objetivo 2.....	46
<b>Figura 13.</b> Fotos de membranas de WB completas correspondientes al grupo subfértil del objetivo 2.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de los partidores utilizados para amplificación por PCR en tiempo real para rata.....	23
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de qPCR por gen.....	23

## ABREVIACIONES

AMH	Hormona Anti-Mülleriana
BSA	Albúmina de suero bovino
CG	Células de la granulosa
CT	Células de la Teca
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FIGLA	Factor en la línea germinal alfa
FSHR	Receptor de la Hormona Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDF9	Factor de diferenciación 9
gp130	Subunidad común a todos los receptores de citoquinas tipo IL-6
hCG	Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana
HPG	Hipotálamo-Pituitaria-Gónadas
HRP	Peroxidasa de rábano
IL-6	Interleuquina-6
Kiss <sup>-/-</sup>	Gen homocigoto deficiente para kisspeptina
KL	Kit ligando
KP	Kisspeptina
KP-10	Kisspeptina-10
LH	Hormona Luteinizante

LHR	Receptor de la Hormona Luteinizante
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
LIF <sup>-/-</sup>	Gen homocigoto deficiente para LIF
LIFR	Receptor de LIF
MMP-9	Metaloproteinasa-9
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular
NE	Norepinefrina
NGF	Factor de crecimiento nervioso
P234	Antagonista de KP
PAGE	Electroforesis en gel de poli-acrilamida.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris-HCl	Hidrocloreuro de Tris (hidroximetil) aminometano
VIP	Péptido vasointestinal
WB	Western Blot
WT	Wild Type



## 1. RESUMEN

En la actualidad, la postergación de la maternidad, se ha vuelto una tendencia cada vez más preponderante en las mujeres. Esto debido al mayor acceso a la educación, oportunidades laborales y métodos para el control de la natalidad. Por consiguiente, cuando la mujer decide ser madre más allá de los 30 años de edad, ya se aproxima al periodo de subfertilidad, etapa en donde la reserva folicular ovárica disminuye considerablemente, al igual que las probabilidades de éxito de un embarazo. Por lo anterior, es que ha tomado gran importancia el estudio del funcionamiento ovárico durante el envejecimiento reproductivo y de los factores involucrados en dicho proceso.

En la regulación del desarrollo folicular, participan una pluralidad de factores destinados a controlar cada etapa. En la última década, ha tomado especial protagonismo una citoquina denominada Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), conocida ampliamente en el ámbito reproductivo por ser de vital importancia en el proceso de implantación uterina y, además, por participar en el desarrollo folicular ovárico, promoviendo la transición de folículos primordiales a primarios en rata y favoreciendo el proceso ovulatorio en primates. Sin embargo, se cree que sus acciones se encontrarían bajo la regulación de Kisspeptina (KP), un neuropéptido clave en el control del eje Hipotálamo-Pituitaria-Gónadas (HPG). De ser así, esto cobraría aún mayor importancia durante el periodo de subfertilidad, etapa en la que se ha demostrado que ocurre un aumento significativo en los niveles de expresión de KP en el ovario. Tomando en cuenta estos antecedentes, se postuló que “KP induce la expresión de LIF en ovario de rata durante el período de

subfertilidad". El objetivo general del presente trabajo consistió en determinar la expresión de LIF en ovarios de ratas Sprague Dawley en los periodos fértil y subfértil y estudiar los efectos de la adición de KP sobre la expresión de LIF durante ambos periodos. Los resultados muestran que: 1) los niveles de mRNA de LIF en el ovario no varían durante el envejecimiento reproductivo; 2) los niveles de proteína de LIF se encuentran aumentados durante el período fértil; y 3) la adición de KP produce un aumento en el contenido proteico intraovárico de LIF durante el periodo fértil, sugiriendo una posible regulación de KP sobre LIF en este estadio. Por consiguiente, los resultados obtenidos no avalan la hipótesis planteada puesto que el tratamiento de los ovarios con KP no tuvo efecto sobre la expresión de LIF durante el periodo subfértil. Sin embargo, los resultados sugieren que KP participa en la regulación de LIF en el periodo fértil.

## **2. ABSTRACT**

### **Effect of Kisspeptin on the expression of Leukaemia Inhibitory Factor in rat ovaries during the subfertility period.**

At present, the postponement of maternity has become an increasingly preponderant trend in women. This is due to the increased access to education, job opportunities and methods for birth control. Therefore, when women decide to become mothers beyond the age of 30, they are approaching the period of subfertility, a stage in which the ovarian follicular reserve decreases considerably, as well as the probabilities of a successful pregnancy. Due to the above, the study of ovarian function during reproductive aging and the factors involved in this process has taken great importance.

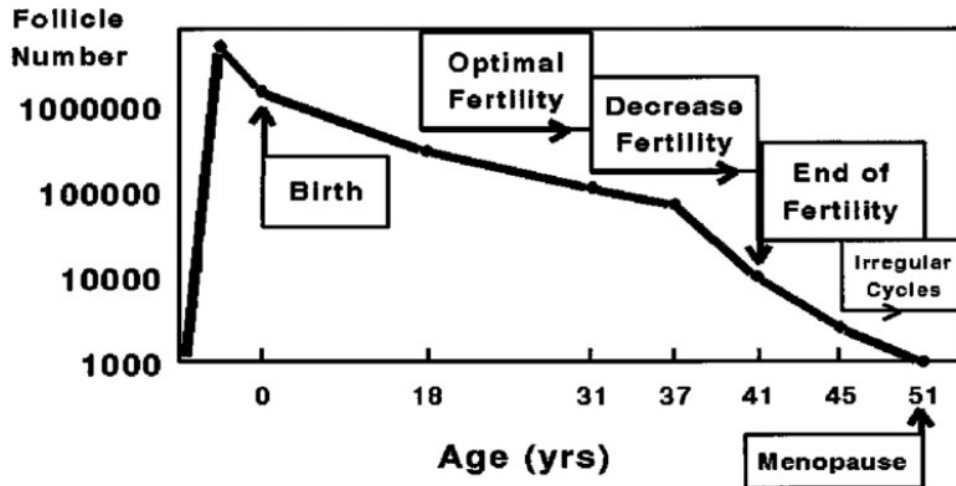
In the regulation of follicular development, a plurality of factors are involved in controlling each stage. In the last decade, the Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) has played a prominent role, a cytokine widely known in the reproductive field by its role in the uterine implantation process and, in addition, by its participation in ovarian follicular development, promoting the transition from primordial to primary follicles in rat and favoring the ovulatory process in primates. Nevertheless, it is thought that their actions would be under the regulation of Kisspeptin (KP), a key neuropeptide in the control of the Hypothalamus-Pituitary-Gonads (HPG) axis. If so, this would be even more important during the subfertility period, a stage in which it has been shown to occur a significant increase in KP expression levels in the ovary. Considering this background, it was postulated that, "KP induces LIF

expression in the rat ovary during the subfertility period". The main objective of the present work was to determine the expression of LIF in ovaries of fertile and subfertile Sprague Dawley rats and to study the effects of the addition of KP on the expression of LIF during both periods. Our results revealed that: 1) LIF mRNA levels in the ovary did not change during reproductive aging; 2) LIF protein levels were increased during the fertile period; and 3) the addition of KP in an *in vitro* system, produces an increase in the intraovarian protein content of LIF during the fertile period. These data suggest a possible regulation of LIF by KP during this stage of development. Therefore, we concluded that the results obtained do not support the hypothesis of a stimulatory role of KP on LIF expression, since the treatment of the ovaries with KP did not affect the expression of LIF during the subfertile period. Nevertheless, our results suggest that KP may participate in the regulation of LIF expression during the fertile period.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. Postergación de la maternidad**

En las últimas décadas, se ha registrado una tendencia a la postergación de la maternidad. El mayor acceso a la educación sumado a la posibilidad de optar a numerosas oportunidades laborales ha conducido a las mujeres a priorizar su desarrollo tanto en el campo educacional como profesional. Adicionalmente, el fácil acceso a métodos para el control de la natalidad ha contribuido a que la mujer postergue la maternidad a edades más tardías (Larrañaga et al., 2003). En efecto, cuando la mujer decide ser madre, ya se encuentra en el periodo de subfertilidad, que se inicia a partir de los 32 años de edad (Figura 1), periodo en el que la reserva folicular ovárica disminuye considerablemente (Faddy et al., 1992), y, por ende, también disminuyen las probabilidades de concebir un embarazo exitoso. Es por esto, que ha tomado gran relevancia la comprensión del funcionamiento del ovario en el contexto del envejecimiento reproductivo, además de entender cómo es que el ovario va perdiendo en forma progresiva su funcionalidad y cuáles serían los factores y mediadores involucrados en dicho proceso. Sin embargo, para poder comprender cuáles son los mecanismos y procesos que se van haciendo deficientes durante el envejecimiento reproductivo, es necesario primero entender cómo opera la dinámica folicular en el ovario y cómo se encuentra regulada durante el periodo de fertilidad. Para esto, es posible emplear modelos de estudio animales, como la rata. En ella 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. Decaimiento en la población folicular en relación a los eventos reproductivos durante la vida de la mujer.** Se observa que el período de óptima fertilidad abarca desde los 18 hasta los 31 años edad, mientras que a partir de los 37 años de edad ocurre una caída abrupta en el número de folículos, lo que se traduce en una importante disminución de la fertilidad (modificado de Faddy et al., 1992).

### 3.2. Desarrollo Folicular (Foliculogénesis)

La foliculogénesis corresponde al proceso de maduración que experimenta un folículo al interior del ovario, desde el momento en que deja la población de folículos de reserva, constituida por folículos primordiales, hasta crecer lo necesario para ovular o bien para involucionar en el proceso de atresia (Knobil and Neill, 2006). En el caso de la mujer, el establecimiento de la cohorte de folículos primordiales comienza y termina en la etapa fetal, mientras que en la rata, esta etapa se lleva a cabo durante los primeros 2 días post natal (Pepling et al., 2012; Rajah et al., 1992). Los folículos primordiales constituyen el primer estadio en el desarrollo folicular. Durante la embriogénesis, las células germinales proliferan y antes del nacimiento también lo hacen las células mesenquimales que darán

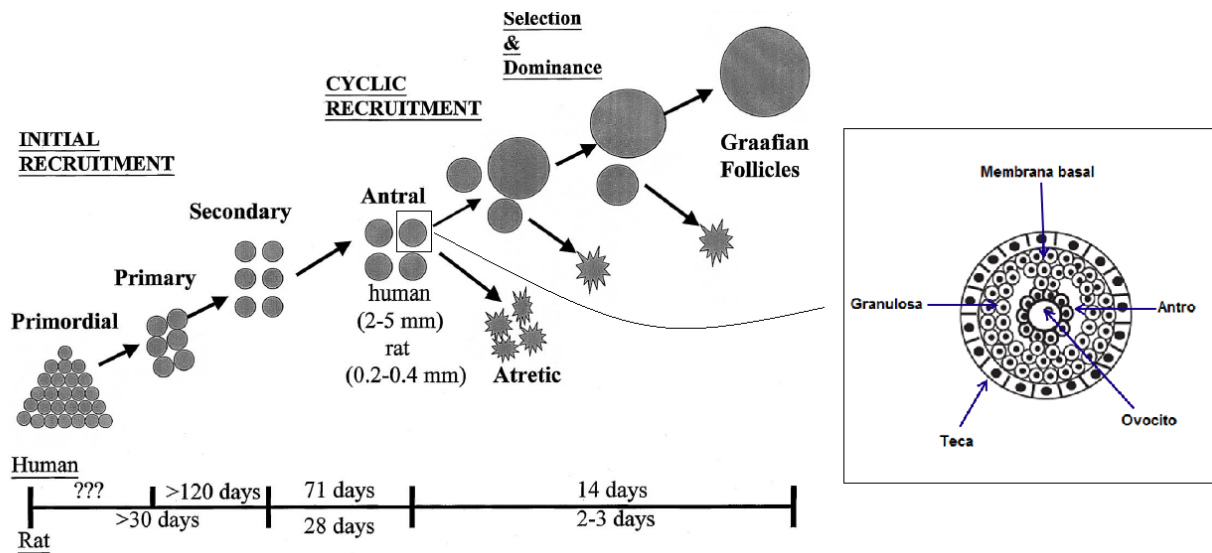
origen a las células de la granulosa (CG). Las CG comienzan a ensamblarse alrededor de las células germinales para pasar a constituir lo que se conoce como folículo primordial (Leung, Adashi, & Gougeon, 2003). Las CG siguen proliferando y comienzan a adoptar una forma cuboidal formando una capa de células que circunda el ovocito. El ovocito, a su vez, sigue aumentando en tamaño. A esta estructura se le denomina folículo primario. Al adquirir más de una capa de CG, el folículo se convierte en folículo secundario, caracterizado además, por la presencia de una capa adicional de células somáticas que rodean la membrana basal denominada células de la Teca (CT). Subsecuentemente las CG se separan entre sí, resultando en la formación de un antro folicular. La aparición de dicha cavidad convierte al folículo en un folículo antral (Knobil and Neill, 2006). Los folículos antrales que siguen creciendo hasta alcanzar su máximo tamaño y madurez se denominan folículos preovulatorios (McGee et al., 2000), los cuales finalmente ovularán en respuesta al pico de Hormona Luteinizante (LH). Producto de la ruptura folicular, se libera el ovocito y la estructura remanente forma el cuerpo lúteo, el cual secreta principalmente progesterona para la preparación uterina y la mantención del embarazo (Knobil and Neill, 2006). Una representación esquemática de todo el proceso anteriormente descrito se puede visualizar de mejor manera en la Figura 2. Es importante destacar que todo el proceso de ensamblaje y dinámica folicular se encuentra finamente regulado por el Sistema Neuroendocrino, el cual, a través de su actividad nerviosa y hormonal secreta una pluralidad de factores destinados a controlar cada etapa del desarrollo folicular (Leung, Adashi, & Gougeon, 2003).

### **3.3. Regulación del desarrollo folicular**

El desarrollo folicular es un proceso complejo cuyo inicio depende de un balance entre factores activadores e inhibidores, producidos localmente por los mismos folículos en desarrollo y/o los que se encuentran presentes en el microambiente ovárico. En general, las etapas más tempranas del desarrollo folicular se encuentran gobernadas por una serie de señales locales provenientes del ovario, mientras que las etapas más tardías responden a hormonas endocrinas secretadas por la pituitaria (Knobil and Neill, 2006). Sumado a lo anterior, una comunicación cruzada entre el ovocito, las CG y CT debe existir a lo largo de todo el desarrollo, lo cual también contribuye al correcto funcionamiento de este proceso (Matzuk et al., 2002). Previo a la formación del antro, los folículos son insensibles a la señalización de gonadotrofinas provenientes de la pituitaria y responden más bien a un conjunto de señales de factores de crecimiento, neurotrofinas y citoquinas, como por ejemplo: Factor en la línea germinal alfa (FIGLA), LIF, Hormona Anti-Mülleriana (AMH), Factor de diferenciación 9 (GDF9), Factor de crecimiento nervioso (NGF), Kit ligando (KL), Péptido vasointestinal (VIP), entre otras (Knobil and Neill, 2006; Pepling et al., 2006) (Ver Figura 2). Todos estos factores en conjunto contribuyen a la maduración temprana de los folículos y a la adquisición del receptor de la Hormona Folículo Estimulante (FSHR) en las CG (Mayerhofer et al., 1997; Salas et al., 2006). Una vez que los folículos alcanzan el estadio antral, adquieren el FSHR y el receptor de la Hormona Luteinizante (LHR), por lo tanto, ahora, los folículos antrales son dependientes de la señalización por gonadotrofinas (Hirshfield et al., 1978;

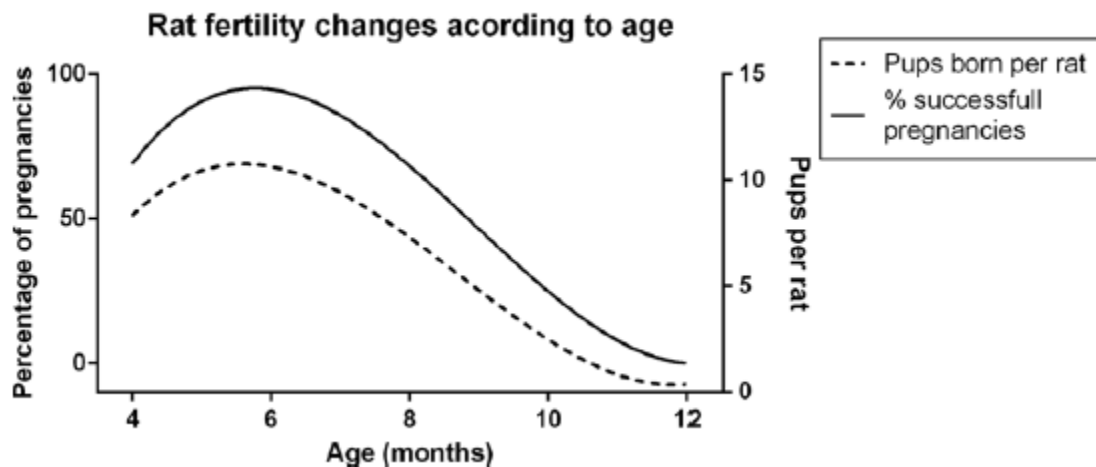


Palermo et al., 2007). Finalmente, el pico de LH gatillará la ovulación de aquellos folículos pre-ovulatorios que fueron seleccionados.



**Figura 2. Representación esquemática del desarrollo folicular y su regulación en rata y humano.** Se representan los diferentes tipos de folículos saludables en crecimiento hasta llegar a la ovulación. Adicionalmente, se señala la temporalidad en la que transcurre cada una de las etapas, tanto en rata como en humano. A la derecha, en el recuadro, se aprecia un folículo antral con los distintos tipos celulares que lo constituyen (modificada de McGee et al., 2000).

Este proceso ocurre cíclicamente, reclutando una cohorte de folículos que crecen y maduran durante el periodo fértil. Posteriormente, cuando quedan pocos folículos de reserva, se establece el periodo de subfertilidad, que para el caso de la rata se inicia a partir de los 8 meses de vida (ver Figura 3), periodo en el que la función ovárica comienza a disminuir progresivamente (inicio del envejecimiento reproductivo) (Cruz et al., 2017; McGee et al., 2000). Es preciso destacar, que en esta etapa, los mecanismos de regulación de la función ovárica no están completamente dilucidados y, por ende, requieren ser estudiados con más detalle.



**Figura 3. Representación de los índices de fertilidad en la rata entre los 4 y 12 meses de edad.** La figura muestra el número promedio de crías nacidas por rata y el porcentaje de éxito de preñez entre los 4 y 12 meses de edad. Se puede apreciar que entre los 4 y 6 meses de edad se establece un período de fertilidad óptima, mientras que a partir de los 8 meses de edad se establece el período de subfertilidad (Cruz et al., 2017).

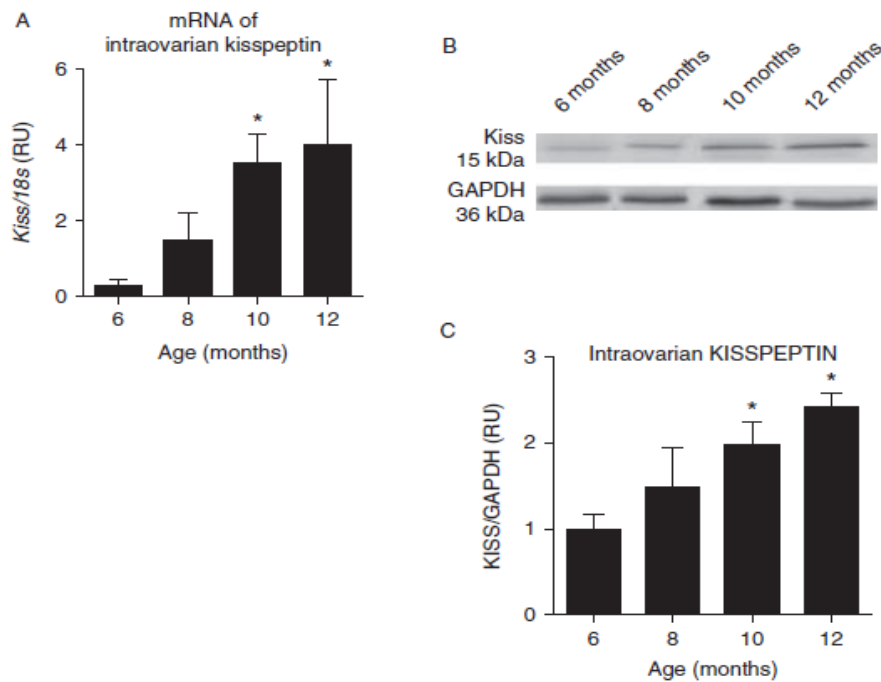
### 3.4. Envejecimiento reproductivo

Para estudiar el envejecimiento reproductivo, el modelo murino presenta varias ventajas (Cruz et al., 2017). En ratas Sprague Dawley, conforme avanza el envejecimiento ovárico se afecta la dinámica folicular. Signos claros de lo anterior, son la importante reducción en el número de folículos pre-antrales y antrales sanos a partir de los 6 meses de edad, reducción que se extiende hasta los 14 meses de edad, es decir, cuando ya se ha entrado al periodo de infertilidad (Acuña et al., 2009; Cruz et al., 2017). Adicionalmente, se ha observado que a partir de los 10 meses de edad (periodo de subfertilidad) ocurre una disminución gradual de los cuerpos lúteos, en contraste con la aparición y el aumento de folículos luteinizados, estructuras quísticas y pre-quísticas. Coincidentemente a partir de los

8 meses de edad, la liberación y el contenido de norepinefrina (NE) en el ovario aumenta significativamente (Acuña et al., 2009). Por lo tanto, el aumento en el tono simpático del ovario que ocurre durante el envejecimiento es un fenómeno causal de los cambios observados en la población folicular. En este sentido, se ha planteado que dicho aumento en el tono simpático del ovario es responsable de los cambios en la dinámica folicular (Cruz et al., 2017).

Por otro lado, se ha demostrado mediante experimentos *in vitro* que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica además conduce a un aumento en los niveles de KP intraovárica (Ricu et al., 2012; Fernandois et al., 2017), un neuropéptido clave en la regulación de la función reproductiva a través del eje HPG. A pesar del importante rol de KP a nivel central, donde regula la secreción de gonadotropinas (Gottsch et al., 2004; Pinilla et al., 2012), se ha visto que KP también cumple un rol relevante a nivel periférico. Por ejemplo, en el trabajo de Castellano et al., 2006, se demostró la presencia de KP y su receptor KISS1R en ovarios de rata, expresándose específicamente en CT, células intersticiales y células lúteas. Posteriormente, resultados de nuestro laboratorio confirmaron lo anterior, pero además, demostraron la presencia de KP en CG (Ricu M., 2013. Tesis de Doctorado). Además, se ha demostrado que la expresión de KP varía a lo largo del ciclo estral, mostrando un marcado aumento durante el proestro tardío, pico coincidente con el de la ovulación (Castellano et al., 2006). En nuestro laboratorio, por otro lado, se ha estudiado como varían los niveles de KP durante el envejecimiento ovárico para saber si existe una posible relación con las alteraciones que ocurren a nivel folicular durante esta etapa. En relación a esto

último, se ha comprobado que ovarios de ratas subfértiles e infértiles poseen niveles de KP superiores a los encontrados en ratas fértiles, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Figura 4A-C). En efecto, a partir de los 10 meses de edad el contenido intraovárico de KP aumenta significativamente (Fernandois et al., 2016).



**Figura 4. Kisspeptina aumenta durante el envejecimiento reproductivo.** A) niveles de mRNA de KP intraovárica. Los niveles de mRNA se cuantificaron mediante RT-qPCR y se normalizaron con respecto al gen 18S. B) Figura representativa de un Western Blot (WB) de KP en ovarios de 6, 8, 10 y 12 meses de edad. C) niveles de proteína de KP intraovárica. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante WB y se normalizaron con respecto a la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J. Los resultados se expresan como la media de las razones  $\pm$  SEM. Para A) la significancia se obtuvo con el test Kruskal-Wallis, seguido de una comparación múltiple de Dunn. Para C) la significancia se obtuvo utilizando un ANOVA de una vía, seguido por una prueba de comparaciones múltiples.  $p < 0,05 = *$ . Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación a los 6 meses de edad (modificado de Fernandois et al., 2016).

Sumado a lo anterior, experimentos *in vivo*, han demostrado que la estimulación con KP a través de una minibomba osmótica conectada al ovario de la rata, resulta en el aumento del número de los cuerpos lúteos y folículos tipo III en ratas de 6 y 10 meses de edad, efecto que es revertido por la administración del antagonista de KP (P234). A su vez, KP disminuye el número y tamaño de los folículos antrales en las ratas de 6 y 10 meses de edad (Fernandois et al., 2016). A partir de estos resultados, se concluyó que KP es capaz de regular el desarrollo folicular y que ésta misma se encontraría bajo el control simpático, participando en conjunto con la NE en la regulación de la dinámica folicular durante el periodo fértil y subfértil. Sin embargo, es probable que KP también regule la expresión de otros intermediarios involucrados en el control de la dinámica folicular. Por ejemplo, se ha visto que KP es capaz de regular los niveles de expresión LIF en el útero (Calder et al., 2014), una citoquina ampliamente conocida por participar en el proceso de implantación del embrión en ratones (Stewart et al., 1994). No obstante, también se ha demostrado que LIF se expresa en ovarios de ratas y que estaría implicada en las etapas más tempranas del desarrollo folicular (Nilsson et al., 2002), por lo que resultaría interesante estudiar si en ovarios de ratas fértiles y subfértiles, también ocurre una regulación de LIF mediante la señalización kisspeptinérgica.

### **3.5. Factor Inhibidor de Leucemia**

LIF recibió su nombre, en primera instancia, por su habilidad para inducir la diferenciación terminal de la línea celular leucémica M1 a macrófagos, evitando de

esta manera su crecimiento continuo y descontrolado (Gearing et al., 1987; Moreau et al., 1988). LIF se ha identificado como una citoquina perteneciente a la familia de las citoquinas tipo Interleuquina-6 (IL-6) cuya señalización es a través de la vía JAK/STAT. La unión de LIF al receptor de LIF (LIFR) de baja afinidad promueve la heterodimerización de LIFR con la subunidad gp130 (subunidad común a todos los receptores de citoquinas tipo IL-6) (Baumann et al., 1994; Graf et al., 2011). La activación de este sistema LIF/LIFR es capaz de actuar a distintos niveles del organismo y estar involucrada en diversos procesos. La vía de señalización LIF/STAT3 finaliza con la translocación de los dímeros STAT3 al núcleo celular, donde se unen a regiones promotoras de sus genes diana con el fin de regular la transcripción de ciertos genes asociados a regeneración, supervivencia y diferenciación celular (Graf et al., 2011). Sin embargo, en las últimas décadas, se le ha atribuido un rol determinante en reproducción a lo largo de diversas especies.

A pesar de que se ha descrito la participación de LIF en ciertos estadios del desarrollo folicular y cómo se comportan sus niveles de expresión en distintas especies (Murphy et al., 2016; Nilsson et al., 2002), ***aún se desconoce cuál es el comportamiento de LIF dentro del contexto del envejecimiento ovárico, la variación en su expresión durante el periodo fértil y subfértil y si tiene alguna participación activa a nivel ovárico una vez que los sujetos entran al período de subfertilidad.***

### 3.6. LIF a nivel reproductivo

#### 3.6.1. Rol de LIF en el útero

A nivel reproductivo, LIF se ha caracterizado ampliamente por su participación en el proceso de implantación (Stewart et al., 1994; Dey et al., 2004; Bhatt et al., 1991; Sun et al., 2013; Pawar et al., 2013). Un aumento en los niveles de LIF se ha detectado en el útero en 2 momentos cruciales durante la preñez: el primero es en estro, coincidente con la ovulación (Shen et al., 1992) y el segundo, al 4to y 5to día de preñez (Bhatt et al., 1991). A través de técnicas de hibridación *in situ*, se ha demostrado que la expresión de LIF en hembras preñadas de ratón está confinada a las glándulas endometriales (Stewart et al., 1994). Al cabo del 5to día de preñez, una vez ocurridos los procesos de implantación y decidualización, las glándulas comienzan a degenerarse y con ello la secreción de LIF cesa (Bhatt et al., 1991). Lo anterior, condujo a plantear que el pico de LIF producido durante la preñez podría ser determinante al momento de la implantación. Esto quedó demostrado, posteriormente, en hembras de ratón homocigotas deficientes para LIF (LIF<sup>-/-</sup>), cuyos óvulos fertilizados por machos, ya sea, LIF<sup>-/-</sup> o Wild Type (WT) llegaron sin problemas a la etapa de blastocistos, pero que sin embargo, no pudieron llegar a la etapa de implantación (Stewart et al., 1994). No obstante, al transferir dichos embriones a una hembra WT seudopreñada, la preñez pudo llegar a término concluyendo que la falla en la implantación se debía a un defecto maternal, el cual era esencialmente atribuido a la carencia de LIF. A partir de dichos estudios, LIF se posicionó como un factor fundamental en el proceso de implantación (Stewart et al., 1994). Sin embargo, se ha constatado que la acción de LIF en este proceso

se encuentra sujeta a regulación por otros factores, entre ellos, KP como se detalla a continuación.

### **3.6.2. Interacción LIF-KP en útero**

Estudios recientes han confirmado que hembras de ratón deficientes en KP ( $Kiss1^{-/-}$ ) apareadas con machos WT muestran una incapacidad para alcanzar la preñez debido a un defecto en la implantación (Calder et al., 2014). Lo anterior hizo pensar que aquellas hembras  $Kiss1^{-/-}$  carecían de alguna señal determinante para el proceso de implantación. Al respecto, como se mencionó anteriormente, ya existían estudios que habían demostrado que LIF era un factor esencial para el proceso de implantación en ratones (Stewart et al., 1994; Dey et al., 2004; Bhatt et al., 1991; Sun et al., 2013; Pawar et al., 2013). En efecto, una terapia basada en la administración exógena de LIF recombinante fue capaz de rescatar parcialmente el proceso de implantación en las hembras  $Kiss1^{-/-}$ . A partir de dicho resultado, se hipotetizó que la expresión de LIF se encontraba reducida en aquellas hembras de ratón  $Kiss1^{-/-}$ , lo cual fue posteriormente evidenciado por la marcada reducción en los niveles de expresión de LIF a nivel del lumen glandular uterino de las hembras  $Kiss1^{-/-}$ , con respecto a las hembras de ratón WT (Calder et al., 2014). Este es el primer estudio que demostró que la señalización de KP uterina regula los niveles glandulares de LIF.

Por consiguiente, resulta de interés estudiar si la regulación de KP a LIF en el útero podría ocurrir también a otro nivel, por ejemplo, en ovario, y si dicha



regulación podría influir sobre el desarrollo folicular en el contexto del envejecimiento.

### **3.6.3. Rol de LIF en el ovario**

Las primeras investigaciones orientadas a estudiar el rol de LIF en el desarrollo folicular, establecieron que LIF cumplía una labor fundamental en las etapas tempranas de este proceso, particularmente, al promover la transición de los folículos primordiales a primarios. Ovarios de ratas neonatas cultivados en presencia de LIF mostraron un aumento en la proporción de folículos en desarrollo en comparación con aquellos ovarios cultivados en un medio carente de LIF (Nilsson et al., 2002).

Adicionalmente, por medio de inmunocitoquímica, se ha logrado constatar la presencia de LIF en ovarios neonatos de rata, específicamente, en células de la granulosa de folículos primordiales y primarios. A su vez, se ha confirmado una marcada presencia en células de la granulosa y ovocitos de folículos pre-antrales y antrales de ovarios de 25 días de edad (Nilsson et al., 2002).

Por lo tanto, LIF estaría siendo producido tanto por las células de la granulosa como por el ovocito de ciertos folículos. Adicionalmente, se encontraría presente en el ovario actuando como un agente de señalización paracrina durante el desarrollo folicular temprano, ya que induciría la transición del folículo primordial a primario. No obstante, se ha evidenciado la participación de LIF en etapas más

tardías del desarrollo folicular, en particular, durante el proceso ovulatorio en Macaco Rhesus (Murphy et al., 2016).

#### **3.6.4. Participación de LIF en el proceso ovulatorio**

Al evaluar una base de datos transcriptómica se demostró que los niveles del mRNA para LIF y sus efectores río abajo se encontraban incrementados en los folículos periovulatorios de hembras de Macaco Rhesus, luego de que éstas recibieran un estímulo ovulatorio con Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) (Murphy et al., 2016). Tanto los niveles de mRNA como de proteína de LIF en el folículo se encuentran bajo el límite de detección previo a la administración de hCG, situación que se revierte a las 12 horas post-administración, donde se aprecia un aumento significativo de LIF. El aparente rol crítico de LIF en el proceso ovulatorio, se confirmó mediante un experimento *in vivo* en donde se inyectó de manera intrafolicular un antagonista de LIF al mismo tiempo que los animales recibieron la inyección de hCG. Posteriormente, una evaluación laparoscópica 72 horas post-administración del antagonista y hCG reveló que el bloqueo de la acción de LIF impidió la ovulación, evidenciado por la carencia del estigma clásico en el ovario post-ruptura folicular (Murphy et al., 2016). De esta manera, LIF demostró ser un factor esencial e indispensable para el proceso ovulatorio en primates.

En síntesis, se ha reportado recientemente que la expresión de LIF está siendo controlada por la expresión de KP, lo cual ha sido evidenciado, por ejemplo, en útero de ratón. De esta manera, KP podría estar regulando de forma similar los niveles de expresión de LIF en otros tejidos, como el ovario, lo que tomaría mayor relevancia durante el período subfértil, es decir, cuando ocurre un aumento significativo en los niveles de expresión de KP. En vista de lo anterior, se propuso la siguiente hipótesis:

#### **4. HIPÓTESIS**

***“Kisspeptina induce la expresión de LIF en ovario de rata durante el período de subfertilidad”***

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de LIF en ovarios de ratas Sprague Dawley fértiles y subfértiles y estudiar los efectos de la adición de Kisspeptina sobre la expresión de LIF.

#### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Medir los niveles basales de la expresión de LIF en ovarios de ratas neonatas y adultas (fértiles y subfértiles).
2. Determinar *in vitro* si Kisspeptina es capaz de ejercer una regulación sobre la expresión de LIF en ratas neonatas y adultas (fértiles y subfértiles).

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Animales

Se utilizaron 48 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones regulares de luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y temperatura (22 a 23°C) con agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales fueron eutanasiados al final de cada procedimiento mediante decapitación, utilizando una guillotina para animales menores. El objetivo de este método es proporcionar una rápida forma de pérdida de la conciencia que no provoque estrés, con el fin de evitar la contaminación química de los tejidos a utilizar (Leary et al., 2013). Todos los procedimientos experimentales desarrollados en este trabajo contaron con la aprobación del protocolo de uso y cuidados de animales de experimentación, código CBE-2016-01, por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

En el presente estudio los 48 animales fueron distribuidos de la siguiente forma:

- 1) Para el objetivo 1, se utilizaron 3 grupos experimentales: 12 ratas de neonatos de 5 días de edad, 6 ratas fértiles de 4 meses de edad y 6 ratas subfértiles de 10 meses de edad. Estos animales no recibieron ningún tipo de tratamiento. De cada rata se extrajeron ambos ovarios. Éstos fueron almacenados a -80°C hasta el momento de ser usados para la posterior

determinación de mRNA y proteínas mediante RT-qPCR y Western Blot (WB), respectivamente.

- 2) Para el objetivo 2, se utilizaron 3 grupos experimentales: 12 ratas de neonatos de 5 días de edad, 6 ratas fértiles de 4 meses de edad y 6 ratas subfértiles de 10 meses de edad. Los animales no recibieron ningún tipo de tratamiento. Los ovarios fueron extraídos en el momento de la eutanasia para protocolos de cultivo *in vitro*, los cuales fueron posteriormente utilizados para determinación de mRNA y proteínas mediante RT-qPCR y WB, respectivamente.

## **7.2. Incubación de ovarios de rata con KP**

Se extrajeron ovarios de ratas neonatas, de 4 y 10 meses de edad, los que fueron preincubados en 1 mL de buffer Krebs-albúmina (compuesto por NaCl 118,6 mM, KCl 4,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, Glucosa 4,5 mg/mL, Ácido ascórbico 100 µg/mL, EDTA 11,2 µg/mL, NaHCO<sub>3</sub> 13 mg/mL, CaCl<sub>2</sub> 25 mM, BSA 0,1 mg/mL y agua, burbujeado por 10 minutos antes de añadir el CaCl<sub>2</sub>) a 37°C por 5 minutos en placas Nunc™ (Nunc Cat.#142475, ThermoScientific, Carlsbad, CA, USA). A continuación, los ovarios se transfieren a otra placa Nunc™ donde cada pocillo contiene 2 mL de buffer Krebs-albúmina más 200 ng/µL de Kisspeptina-10 (KP-10) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA), para incubar el tejido por 3 y 8 horas, con el fin de evaluar cambios a nivel de mRNA y proteínas, respectivamente (Fernandois et al., 2016). Dos condiciones

experimentales fueron ensayadas (6 ovarios por condición): Control (buffer Krebs-albúmina) y KP (buffer Krebs-albúmina + 200 ng/ $\mu$ L de KP-10). Al final de cada periodo de incubación, se almacenaron los ovarios y los sobrenadantes a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de RNA o proteínas (Fernandois et al., 2016) y para determinar futura secreción de progesterona mediante RIA (Xiao et al., 2011), respectivamente.

### **7.3. Determinación de los niveles de mRNA de LIF en ovario de rata mediante RT-qPCR**

Se realizó una extracción de RNA total de los ovarios de acuerdo a lo descrito anteriormente por el método de Chomczynski et al., 1987. La concentración de RNA total y su pureza (razón 260/280) fueron medidas en NanoDrop 2000, ThermoScientific. Para evaluar la integridad del RNA total se realizó una electroforesis en gel de agarosa. 5  $\mu$ g de RNA total fueron sometidos a transcripción inversa utilizando la enzima SuperScript® II (Invitrogen™, ThermoScientific, Carlsbad, CA, USA) en un volumen final de reacción de 20 $\mu$ L (Fernandois et al., 2016). Para la cuantificación de los niveles de mRNA, se realizó un qPCR, utilizando el fluoróforo SybrGreen™ (Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies, Inc., Santa clara, CA, USA) y con 33,3 ng de cDNA por reacción, se cuantificó el gen de interés (*Lif*) y el gen constitutivo (*Gapdh*). Los partidores para *Lif* se obtuvieron a partir de Hu et al., 2015 y los de *Gapdh* a partir de Chen et al., 2014 (véase Tabla 1). Para la detección de la fluorescencia se utilizó el equipo IQ5 multicolor real time PCR detection system

(Bio-Rad Laboratories Inc., Santa Clara, CA, USA). Para la confección de la curva de calibración, se utilizó ovario de rata neonata (Nilsson et al., 2002). En el caso de *Lif*, ésta fue realizada con diluciones seriadas de cDNA entre 1/10 hasta 1/1000 mientras que para *Gapdh* se utilizaron diluciones desde 1/10 hasta 1/100.000. Las condiciones de alineamiento para cada gen se resumen en la Tabla 2.

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

	Sentido 5'→3'	Antisentido 5'→3'	No. Acceso Genebank
<b>LIF</b>	TCA ACT GGC TCA ACT CAA CG	AAA GGT GGG AAA TCC GTC AT	NM_002309.4
<b>GADPH</b>	GAT GCC CCC ATG TTT GTG AT	GGT CAT GAG CCC TTC CAC AAT	NM_001289746.1

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

	Ciclo 1	Ciclo 2 (40 repeticiones)	Ciclo 3
<b>LIF</b>	95°C por 5 min	95°C por 15 seg 60°C por 15 seg 72°C por 15 seg 74°C por 6 seg (detección Fluorescencia)	72°C por 7 min
	Ciclo 1	Ciclo 2 (40 repeticiones)	Ciclo 3
<b>GADPH</b>	95°C por 5 min	95°C por 30 seg 55°C por 30 seg 72°C por 30 seg 74°C por 6 seg (detección Fluorescencia)	72°C por 7 min

#### **7.4. Determinación de los niveles de proteína de LIF en ovario de rata mediante WB**

Las muestras de ovario fueron homogeneizadas en homogeneizador de vidrio en Buffer de Lisis (compuesto por Tris-HCl 50mM pH=8,0; EDTA 50mM; SDS 1%; NaCl 50mM; PMSF 0,5mM; DTT 1mM e Inhibidor de Proteasas en pastillas). La concentración total de proteínas fue determinada mediante el Ensayo de Bradford (Bradford et al., 1976), utilizando una curva de calibración en base a albúmina de suero bovino (BSA) (Winkler, Santiago, Chile). LIF fue determinado mediante WB bajo condiciones reductoras (Fernandois et al., 2016). Cabe destacar, que en este trabajo fueron estandarizadas las condiciones experimentales para la determinación de LIF mediante WB. En resumen, se realizó la detección de LIF ovárico con una separación por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,45  $\mu$ m), se bloquearon con leche descremada al 5% p/v en solución TBST 0,1% v/v durante 1 h con agitación suave y se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-LIF (Boster Biological Technology Ltd., Pleasanton, CA, USA) en una dilución 1:200 durante toda la noche. Los complejos de anticuerpo se detectaron usando anticuerpo de cabra anti-conejo IgG Fc (HRP) (ab97200, Abcam, Inc., Cambridge, Reino Unido) a una dilución 1:10.000. Para la proteína constitutiva se utilizó una dilución 1:40.000 del anticuerpo policlonal de conejo anti-GAPDH (G9545, Sigma-Aldrich Co., San Luis, Misuri, USA) durante 1 h a temperatura ambiente. Los complejos de anticuerpo se detectaron usando la misma dilución del anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG Fc (HRP) usado para detectar LIF. La



quimioluminiscencia se obtuvo utilizando el kit EZ-ECL (Biological Industries, KBH, Israel). La quimioluminiscencia fue capturada utilizando el sistema Syngene G-Box (Syngene Headquarters, Frederick, MD, USA).

## **7.5. Análisis estadístico**

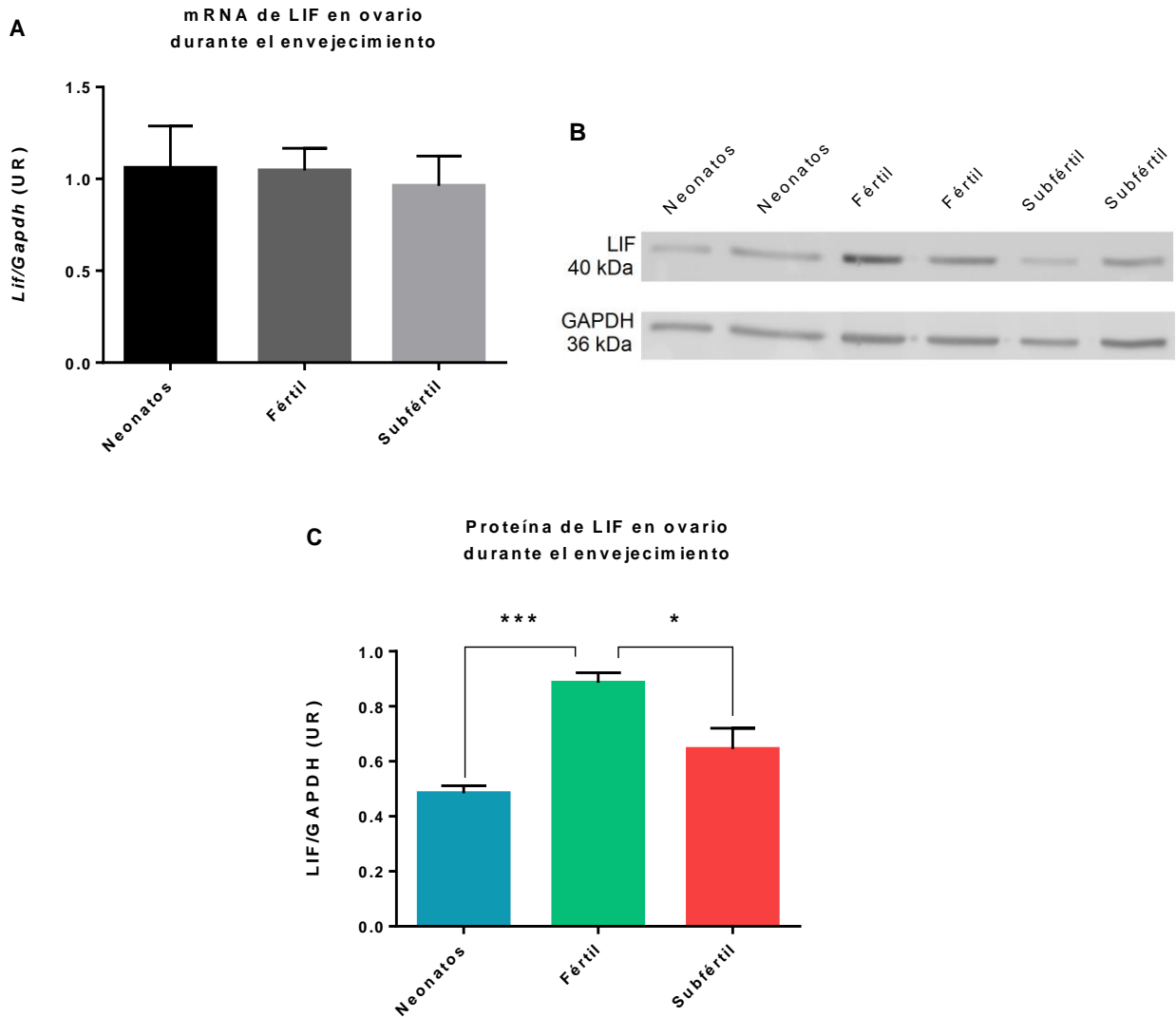
El número mínimo de ratas de todos los experimentos se calculó de acuerdo a la variabilidad de los procedimientos experimentales y de acuerdo a la variación intrínseca entre los animales. La determinación del número mínimo de muestra se realizó según la ecuación  $n=2(Z\alpha + Z\beta)^2 \times S^2/\delta^2$  basado en lo descrito por Zar J. 1984, n: sujeto necesario en cada una de las muestras; S: desviación estándar;  $\delta$ : 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=6. 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 t-test de Student. Para comparar más de 2 grupos experimentales, la significancia se obtuvo utilizando un ANOVA de una vía, seguido por una prueba de comparaciones múltiples. 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, USA).

## **8. RESULTADOS**

**Objetivo 1: Medir los niveles basales de la expresión de LIF en ovarios de ratas neonatas y adultas (fértil y subfértil).**

### **8.1. Niveles de mRNA y proteína de LIF en el ovario durante el envejecimiento reproductivo.**

La mayoría de los estudios en la última década se han enfocado en estudiar el rol de LIF en el proceso de implantación y unos pocos se han enfocado en el papel de LIF durante el desarrollo folicular. Por otro lado, ninguno de estos estudios ha sido orientado a investigar el comportamiento de LIF en el contexto del envejecimiento ovárico. Por lo tanto, con el objetivo de evaluar el contenido de los niveles basales de la expresión de LIF durante el envejecimiento reproductivo, se realizó la cuantificación de los niveles de mRNA mediante RT-qPCR y los niveles de proteína mediante WB en ovarios neonatos, fértiles y subfértil de rata Sprague-Dawley, sin ningún tipo de tratamiento. En la Figura 5A, se aprecia que al evaluar los niveles de mRNA de LIF en ovario no se observan cambios significativos entre ninguno de los grupos etarios, por lo que el contenido del mRNA de LIF es constante entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, al evaluar los niveles de proteína, se observa un incremento significativo en la expresión de LIF durante el período fértil en comparación con los neonatos y el grupo subfértil (Figura 5B-C).

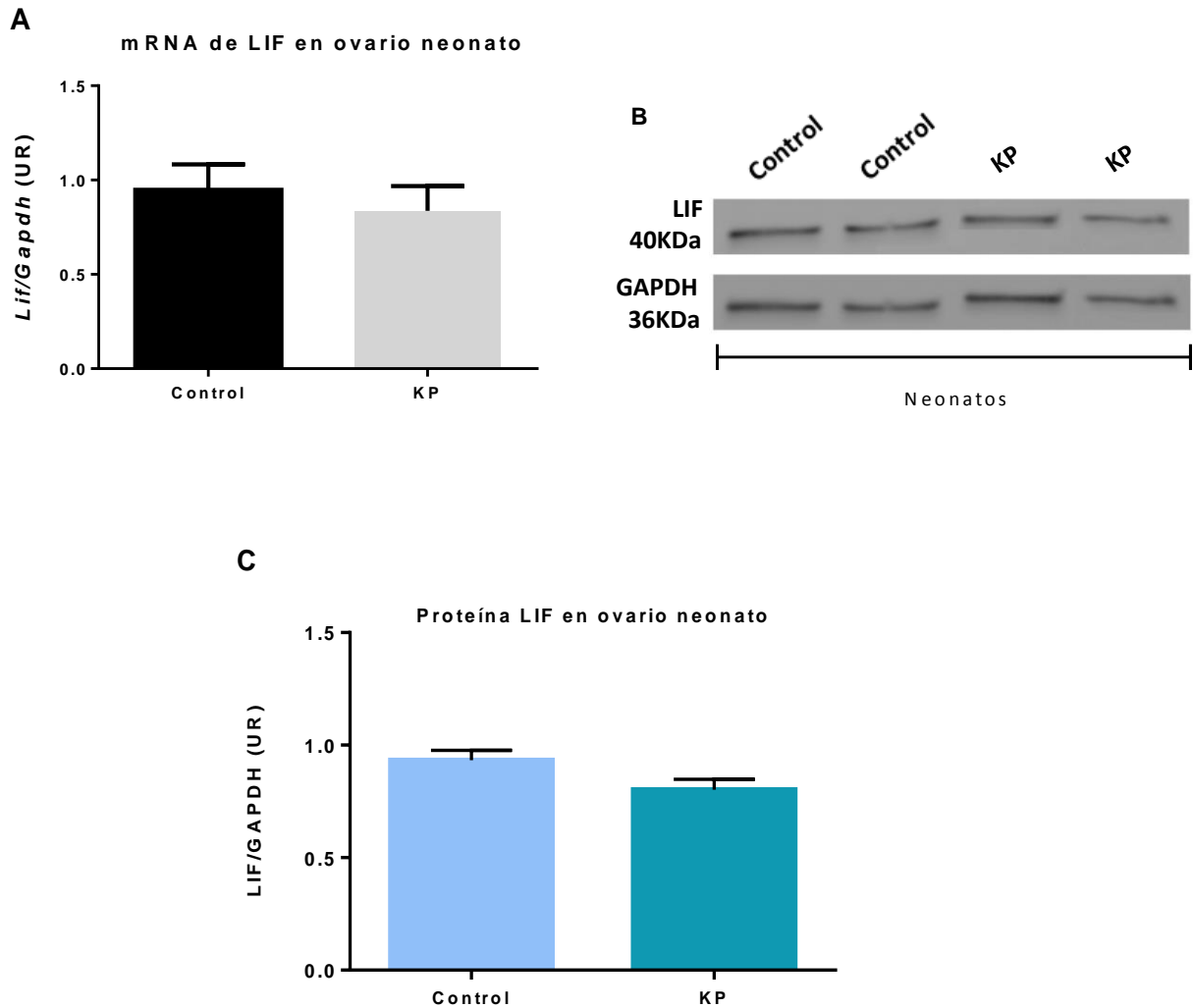


**Figura 5. Expresión de LIF en el ovario de rata durante el envejecimiento reproductivo.** A) mRNA de LIF en ovario durante el envejecimiento reproductivo. Los niveles de mRNA se cuantificaron mediante RT-qPCR. Los niveles de mRNA de LIF se normalizaron con respecto al gen GAPDH. Las razones LIF/GAPDH se expresan en unidades relativas (UR). N = 4 para neonatos; N = 5 para grupo fértil y N = 6 para grupo subfértil. B) Figura representativa de un WB de LIF en cada grupo etario. C) Proteína de LIF en ovario durante el envejecimiento reproductivo. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante WB. Los valores de LIF se normalizaron con respecto a la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J. Las razones LIF/GAPDH se expresan en unidades relativas (UR). N = 4 para neonatos; N = 5 para grupo fértil y N = 4 para grupo subfértil. La significancia se obtuvo utilizando un ANOVA de una vía, seguido por una prueba de comparaciones múltiples.  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,001 = ***$ . Los asteriscos indican diferencias significativas entre neonatos y fértiles (\*\*\*) y entre fértiles y subfértiles (\*). Los resultados se expresan como la media de las razones  $\pm$  SEM.

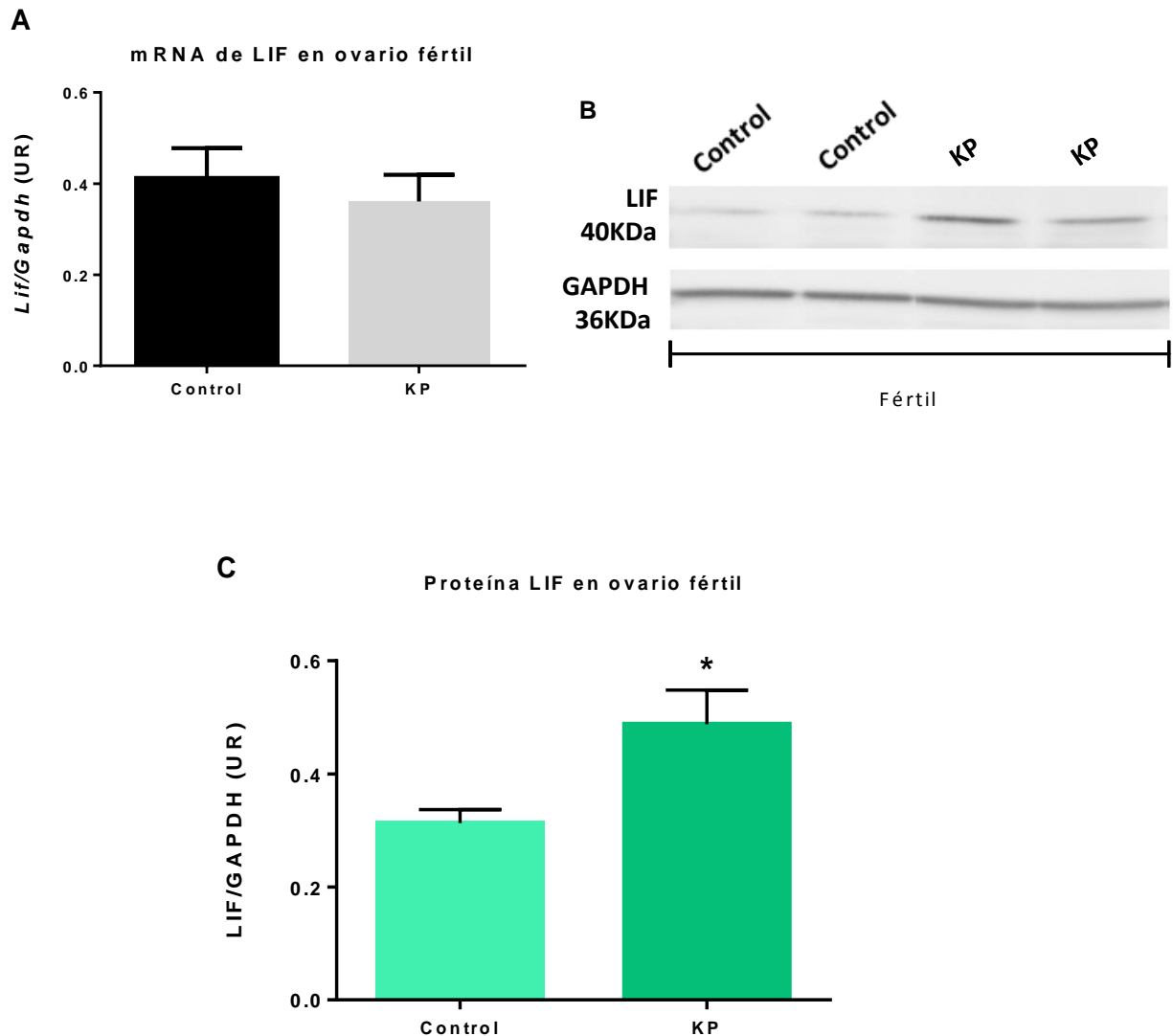
**Objetivo 2: Determinar *in vitro* si Kisspeptina es capaz de ejercer una regulación sobre la expresión de LIF en ratas neonatas y adultas (fértiles y subfértiles).**

## **8.2. Efecto *in vitro* de KP sobre la expresión de LIF en ovarios neonatos, fértiles y subfértiles.**

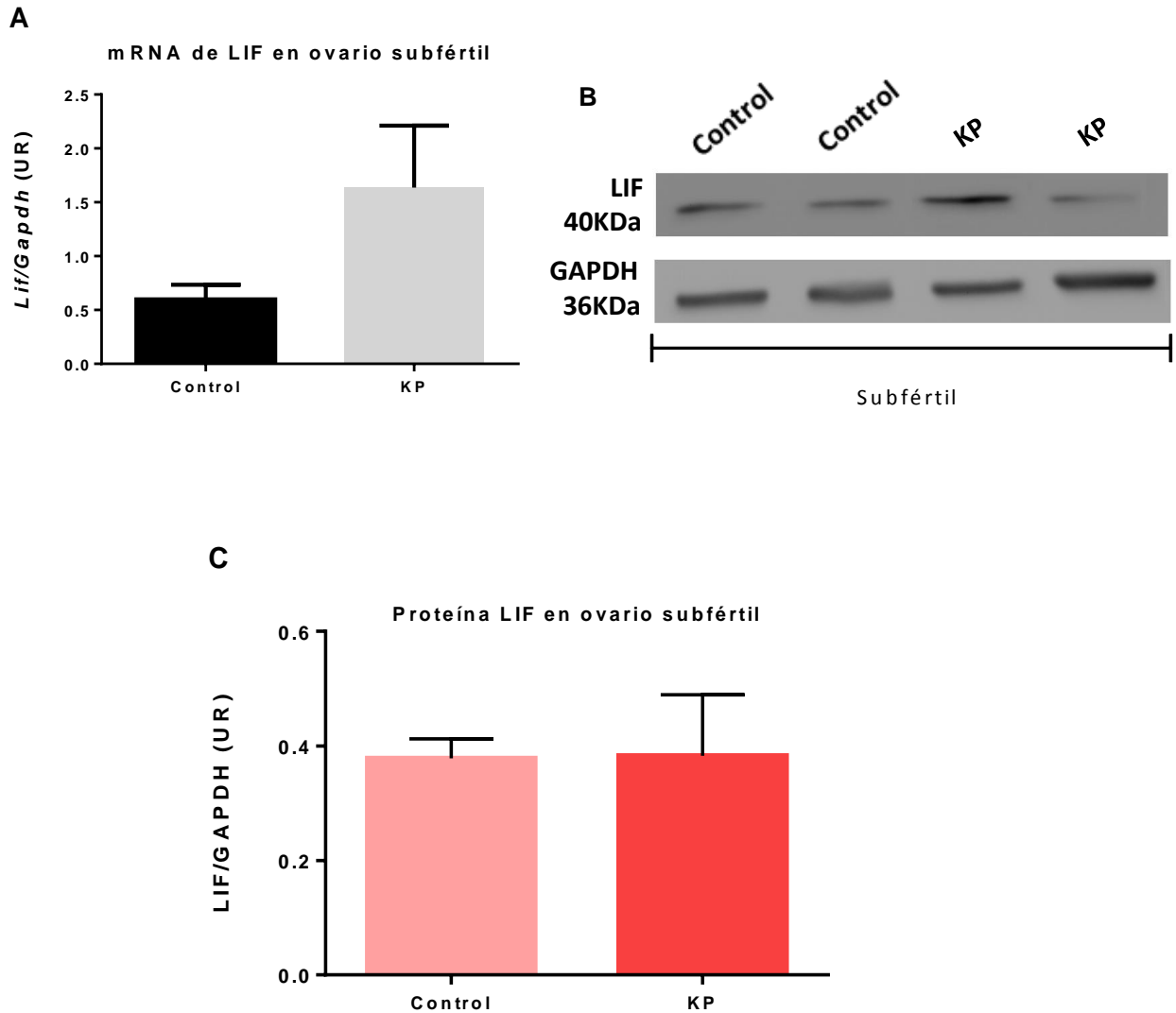
Quisimos evaluar si KP era capaz de inducir un aumento en los niveles de expresión de LIF en ovario de rata y dentro del contexto del envejecimiento. Para dicho fin, se incubaron ovarios de rata fértiles y subfértiles durante 3 horas, para evaluar cambios a nivel de mRNA, y por 8 horas, para evaluar cambios a nivel de proteína. Se ensayaron dos condiciones; ovarios incubados en medio control y ovarios incubados con KP. Al evaluar los niveles de mRNA de LIF no se detectaron diferencias significativas entre el control y KP en ninguna etapa del desarrollo reproductivo (Figura 6A, 7A y 8A). No obstante, al cuantificar los niveles proteicos de LIF en ovario, se observó un aumento significativo durante el periodo fértil, producto de la estimulación con KP, con respecto al control (Figura 7B-C). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre el control y KP tanto en neonatos (Figura 6B-C) como en el grupo subfértil (Figura 8B-C). Por lo tanto, nuestros resultados dan cuenta de que KP es capaz de aumentar los niveles de proteína de LIF en el ovario de rata durante el período fértil.



**Figura 6. Kisspeptina no induce cambios en la expresión de LIF en ovario neonato de rata *in vitro*.** A) mRNA de *Lif* en ovario neonato incubado con KP por 3 horas; N = 5 para la condición Control y N = 6 para la condición KP. Los niveles de mRNA se cuantificaron mediante RT-qPCR. Los niveles de mRNA de *Lif* se normalizaron con respecto al gen *Gapdh*. Las razones *Lif/Gapdh* se expresan en unidades relativas (UR). B) Figura representativa de un WB de LIF en cada condición en ovario neonato. C) Proteína LIF en ovario neonato incubado con KP por 8 horas; N = 4 para la condición Control y N = 5 para la condición KP. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante WB. Los valores de LIF se normalizaron con respecto a la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J. Las razones LIF/GAPDH se expresan en unidades relativas (UR). La estadística se obtuvo con un t-test de Student entre el Control y KP. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar ambas condiciones tanto a nivel de mRNA como de proteína ( $p > 0,05$ ). Los resultados se expresan como la media de las razones  $\pm$  SEM.



**Figura 7. Kisspeptina induce un aumento en los niveles de proteína de LIF en ovario de rata fértil *in vitro*.** A) mRNA de *Lif* en ovario fértil incubado con KP por 3 horas; N = 6 para la condición Control y N = 6 para la condición KP. Los niveles de mRNA se cuantificaron mediante RT-qPCR. Los niveles de mRNA de *Lif* se normalizaron con respecto al gen *Gapdh*. Las razones *Lif/Gapdh* se expresan en unidades relativas (UR). B) Figura representativa de un WB de LIF en cada condición en ovario fértil. C) Proteína LIF en ovario fértil incubado con KP por 8 horas; N = 4 para la condición Control y N = 5 para la condición KP. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante WB. Los valores de LIF se normalizaron con respecto a la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J. Las razones LIF/GAPDH se expresan en unidades relativas (UR). La significancia se obtuvo con un t-test de Student entre el Control y KP ( $p < 0,05 = *$ ). El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control a nivel de proteína. Los resultados se expresan como la media de las razones  $\pm$  SEM.



**Figura 8. Kisspeptina no induce cambios en la expresión de LIF en ovario de rata subfétil *in vitro*.** A) mRNA de *Lif* en ovario subfétil incubado con KP por 3 horas; N = 5 para la condición Control y N = 6 para la condición KP. Los niveles de mRNA se cuantificaron mediante RT-qPCR. Los niveles de mRNA de *Lif* se normalizaron con respecto al gen *Gapdh*. Las razones *Lif/Gapdh* se expresan en unidades relativas (UR). B) Figura representativa de un WB de LIF en cada condición en ovario subfétil. C) Proteína LIF en ovario subfétil incubado con KP por 8 horas; N = 4 para la condición Control y N = 6 para la condición KP. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante WB. Los valores de LIF se normalizaron con respecto a la proteína GAPDH. Los píxeles se contabilizaron usando el software Image-J. Las razones LIF/GAPDH se expresan en unidades relativas (UR). La estadística se obtuvo con un t-test de Student entre el Control y KP. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar ambas condiciones tanto a nivel de mRNA como de proteína ( $p > 0,05$ ). Los resultados se expresan como la media de las razones  $\pm$  SEM.

## 9. DISCUSIÓN

El hallazgo de las funciones de LIF, particularmente en el ámbito reproductivo, lo han posicionado como un factor clave para la implantación uterina y la continuidad de la preñez. Sin embargo, LIF no solo cumpliría un rol esencial a nivel uterino, sino que también tendría una importante participación a nivel ovárico. En alusión a esto último, se ha demostrado su intervención en el desarrollo folicular, promoviendo la transición de folículos primordiales a primarios (Nilsson et al., 2002) y, en etapas más tardías, favoreciendo la ovulación (Murphy et al., 2016). No obstante, su rol a nivel ovárico aún no ha sido completamente dilucidado. A este respecto, no se ha identificado aún qué rol podría estar jugando durante el envejecimiento ovárico, ni cuáles serían los factores implicados en la regulación de su expresión durante dicho periodo.

En este sentido, se ha planteado recientemente la posibilidad de que la expresión de LIF esté siendo controlada por la expresión de KP, lo cual ha sido evidenciado, por ejemplo, en útero, donde ratones Kiss<sup>-/-</sup> muestran una significativa disminución en los niveles de proteína de LIF a nivel de las glándulas uterinas en comparación a los ratones WT (Calder et al., 2014). De ser así, KP podría estar regulando de manera similar los niveles de expresión de LIF en otros tejidos, como el ovario, lo que tomaría mayor relevancia durante el período subfértil, es decir, cuando ocurre un aumento significativo en los niveles de expresión de KP en el ovario (Fernandois et al., 2016). En vista de lo anterior, se propuso caracterizar el patrón de expresión de mRNA y proteína de LIF en ovarios de ratas Sprague Dawley



fértiles y subfértiles. Además, se estudió el patrón de expresión de LIF en ovarios de ratas fértiles y subfértiles cuando éstos eran estimulados con KP.

Como se mencionó anteriormente, estudios previos (Nilsson et al., 2002) han demostrado la presencia de LIF en CG de folículos primordiales, primarios, pre-antrales y antrales de ovarios neonatos de rata. A su vez, se ha confirmado una marcada presencia en ovocitos de folículos pre-antrales y antrales de ovarios de 25 días de edad. Por esta razón, en todos nuestros experimentos, se decidió utilizar ovarios neonatos de rata como control positivo de la expresión de LIF. Los resultados obtenidos de ambos objetivos se discuten a continuación.

### **9.1. Los niveles de mRNA de LIF se mantienen constantes durante el envejecimiento reproductivo**

Los presentes resultados muestran que no existen variaciones en el contenido de mRNA de LIF durante el período de subfertilidad, al ser comparado con el periodo de fertilidad. Los antecedentes señalan que durante el período de subfertilidad la población de folículos en desarrollo decrece (Almeida et al., 2012; Atkins et al., 2014; Jones et al., 1961; Mandl et al., 1959). Por otro lado, es de conocimiento que la expresión de LIF está confinada a este tipo de folículos (Nilsson et al., 2002) que se van perdiendo en número durante el periodo de subfertilidad, por lo tanto, hasta antes de la realización de este experimento se esperaba observar una disminución en los niveles de mRNA de LIF durante el periodo de subfertilidad. No obstante, los niveles de mRNA de LIF se mantuvieron constantes durante este periodo, lo que hace suponer, que la baja población folicular presente en este

estadio produce una mayor cantidad de LIF que estaría equiparando la producción observada en ovarios neonatos y fértiles. Esta producción “aumentada” podría deberse a que, durante el envejecimiento reproductivo aumenta la KP ovárica (Fernandois et al., 2016), producto de un aumento en la actividad simpática de las fibras nerviosas que inervan el ovario. Por lo tanto, la expresión de LIF en ovario podría verse condicionada a la expresión de KP, tal como se ha descrito en Calder et al., 2014, donde se exhibió una notable disminución en los niveles de LIF en el lumen glandular de útero de ratones *Kiss1<sup>-/-</sup>*, sugiriendo que la señalización kisspeptinérgica uterina estaría regulando los niveles glandulares de LIF. Por lo tanto, el aumento espontáneo en los niveles de KP intraovárica durante el envejecimiento podría estar conduciendo a un aumento en los niveles de mRNA de LIF, lo que compensaría la pérdida en producción que ocurre como resultado de la disminución de la reserva folicular y en consecuencia, de las células encargadas de expresar LIF (granulosa y ovocito).

## **9.2. Los niveles de proteína LIF aumentan significativamente durante el período fértil**

En contraste al resultado anterior, en donde no se observaron cambios en los niveles de mRNA a lo largo de todas las edades, al evaluar los niveles de proteína se observó un mayor contenido de LIF durante el periodo fértil, el cuál fue significativo respecto del grupo de neonatos y del grupo subfértil. Una de las posibilidades que podrían explicar este resultado, es que esté ocurriendo una menor degradación proteica en el período fértil, lo que se traduciría en un mayor

contenido proteico que el encontrado en los ovarios neonatos y subfértiles. Otra posibilidad es que, en este estadio, al haber un mayor número de folículos preantrales y antrales (y en menor proporción primordiales y primarios), exista una mayor producción de LIF, ya que en estos tipos foliculares es en donde se ha detectado la presencia de esta citoquina, específicamente en CG y, con mayor intensidad, en ovocito (Nilsson et al., 2002).

Sin embargo, lo que resulta aún más interesante de este resultado, es que el contenido proteico encontrado en ovarios neonatos y subfértiles es prácticamente el mismo. Sabiendo que LIF es producido principalmente por las CG de folículos primordiales y primarios y, teniendo en cuenta que en el período subfértil este tipo de folículos se encuentran notoriamente disminuidos, lo más lógico hubiese sido pensar que en la etapa subfértil existiría una menor producción de LIF que en neonatos. No obstante, como se explicó más arriba para el caso del mRNA, es probable que el mayor contenido intraovárico de KP esté regulando positivamente la expresión de LIF en los ovarios senescentes, esto haría que el contenido proteico de LIF se nivele o iguale al contenido observado en neonatos. Para comprobar este punto, se podría llevar a cabo una denervación ovárica (disección del nervio ovárico superior) o un tratamiento con propanolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) en el grupo subfértil de ratas, con el fin de inhibir la actividad simpática sobre el ovario (Fernandois et al., 2017; Ricu et al., 2012). Se ha visto que ambos procedimientos son capaces de disminuir la expresión de KP en ovarios subfértiles (Fernandois et al., 2017). De este modo, se podría dilucidar si la KP intraovárica es la responsable de igualar los niveles de expresión de LIF

durante el periodo subfétil, llegando a niveles similares a lo encontrado en neonatos.

Volviendo al punto anterior, en donde señalamos que en el período subfétil la expresión de LIF se asemeja a la expresión encontrada en los neonatos, es importante hacer notar que como las poblaciones foliculares de ambos estadios son tan distintas, no es posible realizar una comparación entre ellas. Sin embargo, considerando que en el período subfétil, la reserva de folículos se encuentra disminuida, y con ello, las CG, no se puede descartar que exista una contribución de LIF por otros tipos celulares presentes en el ovario. En efecto, ya se ha determinado que existe una expresión diferencial de LIF a lo largo de los diferentes estadios del desarrollo folicular. A este respecto, es importante destacar que, de acuerdo a la inmunocitoquímica de Nilsson et al., 2002, se aprecia también una marcada expresión de LIF en el ovocito de folículos pre-antrales y antrales. Si bien, durante el envejecimiento, la población folicular va disminuyendo, y por ende las CG, aún quedan ovocitos cuyo tamaño es considerablemente superior al de las otras células de los folículos, por lo que el aporte del ovocito podría estar ayudando a contrarrestar la pérdida en producción de las CG que se van agotando durante este estadio.

### **9.3. KP induce un aumento en los niveles de expresión de LIF en ovarios de ratas fértiles**

Estudios recientes realizados en ratones, han demostrado que LIF es una citoquina fundamental para el proceso de implantación (Stewart et al., 1994) y

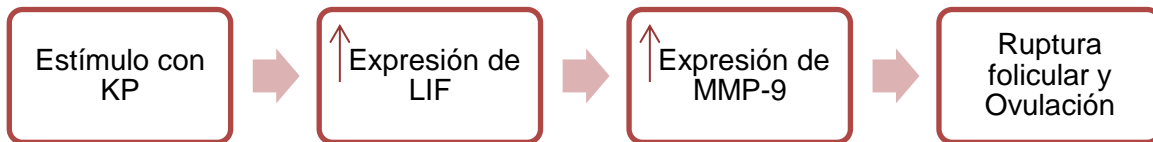
cuya expresión estaría regulada por la expresión de KP. Lo anterior se sustenta sobre la base de que hembras de ratón *Kiss1*<sup>-/-</sup> cruzadas con machos WT mostraron una marcada reducción en los niveles de expresión de LIF a nivel de las glándulas uterinas, condición que condujo en una etapa posterior a la interrupción en la implantación del embrión (Calder et al., 2014). Este es el primer estudio que condujo a plantear que la expresión de LIF sería dependiente de la expresión de KP. Por lo anterior, se efectuó un experimento *in vitro* (Figuras 6-8) para determinar si se podría estar llevando a cabo una regulación similar en el ovario fértil y subfértil.

Al evaluar los niveles de mRNA de LIF en ovarios estimulados con KP, no se registraron cambios en el contenido del transcrito, tanto en el periodo de fertilidad como en el periodo de subfertilidad, al ser comparados con la condición control. No obstante, los resultados obtenidos en el periodo fértil no coinciden con lo encontrado a nivel de proteína en el mismo período. Al respecto, en este último experimento, se apreció un incremento intraovárico en los niveles de proteína de LIF en el periodo fértil, producto de la estimulación con KP, incremento considerado significativo al ser comparado con el control. Lo anterior sugiere que KP es capaz de inducir un aumento en la expresión de LIF, donde dicho aumento podría estar asociado a los mecanismos que controlan el proceso ovulatorio. Esto se ha visto, por ejemplo, en Macaco Rhesus (Murphy et al., 2016), donde LIF y sus efectores río abajo son inducidos en el folículo periovulatorio luego de un estímulo ovulatorio con hCG. Por otro lado, Fernandois et al., 2016, sustenta el hecho de que KP cumple un rol favorable en la ovulación, al demostrar que una

administración *in vivo* de KP en ratas fértiles aumentaba el número de cuerpos lúteos, especialmente de aquellos  $\geq 850 \mu\text{m}$  que corresponden a los de los folículos recientemente ovulados.

En este sentido, se plantea la posibilidad de que LIF actúe como un intermediario entre la acción de KP y los mecanismos que controlan el proceso ovulatorio.

Por otro lado, un estudio previo (Peluffo et al., 2011) ha confirmado la regulación positiva de ciertas metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) en el folículo periovulatorio de Macaco Rhesus, luego de la aplicación de un estímulo ovulatorio con hCG, cuya actividad proteolítica sería fundamental para la ruptura de dicho folículo (Curry et al., 2003). El patrón de aumento observado en la expresión de estas MMPs es bastante similar al patrón de expresión de LIF descrito por Murphy et al., 2016. Por lo tanto, el aumento en la expresión de LIF podría inducir aumento en la expresión de ciertas MMPs, donde dicho sistema podría estar comandado por la acción de KP. En línea con lo anterior, resultados de nuestro laboratorio (Las Heras M., 2016. Tesis de Magister), han demostrado que durante el periodo fértil y subfértil ocurre un aumento en los transcritos de KP y MMP-9, tanto en proestro temprano como tardío. Esto sugiere que KP podría estar regulando la expresión de MMP-9, y en este contexto, LIF podría ser situado como un posible intermediario entre la acción de KP y MMP-9, como se resume en el siguiente esquema:



**Figura 9. Representación esquemática de la probable regulación de KP sobre LIF durante el periodo de fertilidad.** El diagrama muestra como la expresión de LIF aumenta en respuesta a KP y, subsecuentemente, como aumenta la expresión de MMP-9, donde ésta última dará paso al proceso ovulatorio.

Sin embargo, para poder dilucidar el papel de LIF en el desarrollo folicular de la rata, serán necesarios experimentos *in vivo* que involucren la administración local de LIF en el ovario con el fin de observar si ocurren alteraciones desde el punto de vista morfológico y, de esta manera, determinar si LIF tendría una relevancia en el proceso ovulatorio en ratas. Sumado a lo anterior, sería interesante evaluar como varían los niveles de LIF durante el ciclo estral y determinar si estos se encuentran aumentados en el momento previo a la ovulación (proestro tardío), como es el caso de KP y MMP-9 (Castellano et al., 2006; Las Heras M., 2016. Tesis de Magister).

Contrario a lo que ocurre en el periodo fértil, KP no fue capaz de influir sobre los niveles de expresión de LIF en ratas subfértiles, en vista de que no se observaron diferencias en su expresión, producto de la estimulación, al ser comparado con el control. Como se mencionó anteriormente, tampoco se registraron cambios en el contenido del transcrito de LIF producto de la estimulación con KP en el periodo de subfertilidad. Al respecto, es importante hacer notar, que al suministrar KP al medio de cultivo de los ovarios senescentes, se está aumentando más aun la concentración de KP intraovárica de manera artificial, y debemos considerar que

estos ovarios ya presentan un alto contenido de KP en su interior (Fernandois et al., 2016). Por lo tanto, y considerando este factor, hemos planteado que podría estar ocurriendo una desensibilización de los receptores de KP, lo que impediría que estos respondan, y que no se desencadene la activación de la vía de transducción que podría estar controlando la expresión de LIF. Esto coincide con lo reportado previamente por Roa et al., 2008, donde se demostró que ante una administración intracerebral continua de KP-10 a un grupo heterogéneo de ratas hembras, se observó una desensibilización del receptor de KP a nivel hipotalámico, afectando la secreción de gonadotrofinas. Aunque en dicho trabajo no se determinó el mecanismo mediante el cual el receptor de KP podría estar desensibilizándose, se ha descrito que al ser del tipo GPCR podría ser por internalización de éste vía  $\beta$ -arrestina, como se ha visto anteriormente en Pampillo et al., 2009. No obstante, para confirmar que los receptores de KP están respondiendo ante el estímulo, se podría medir los niveles de progesterona en los sobrenadantes del cultivo, ya que se ha demostrado que al estimular los ovarios con KP se genera la secreción de esta hormona al medio (Peng et al., 2013; Xiao et al., 2011).

Es importante destacar, que de acuerdo a resultados de nuestro laboratorio (Fernandois D., 2016. Tesis de Doctorado), el transcrito para el receptor de KP aumenta significativamente a partir de los 10 meses de edad en ratas. Por lo tanto, la ausencia de señalización kisspeptinérgica, no sería por la carencia del receptor durante el periodo subfétil, más bien, pareciera ser que la ausencia de un efecto



ante la estimulación se atribuye a una desensibilización del receptor por las razones anteriormente expuestas.

***En resumen:***

A partir del presente estudio, se determinó que LIF se expresa en el ovario de rata a lo largo del desarrollo reproductivo de ésta, es decir, desde la etapa post-natal hasta la entrada al período de subfertilidad. Particularmente, observamos que los niveles de mRNA de LIF en el ovario de rata no varían significativamente entre los distintos periodos, sin embargo, se encontró que el contenido intraovárico de la proteína de LIF aumenta significativamente durante el periodo de fertilidad, en comparación al grupo neonato y subfétil.

En relación a los experimentos de estimulación *in vitro* de los ovarios con KP, no se produjeron cambios sustanciales en los niveles de mRNA de LIF, ni tampoco hubo un efecto sobre los niveles de proteína de LIF en el grupo de neonatos y en el grupo subfétil. No obstante, la estimulación con KP condujo a un aumento significativo en el contenido proteico intraovárico de LIF durante el periodo fértil, en comparación al control.

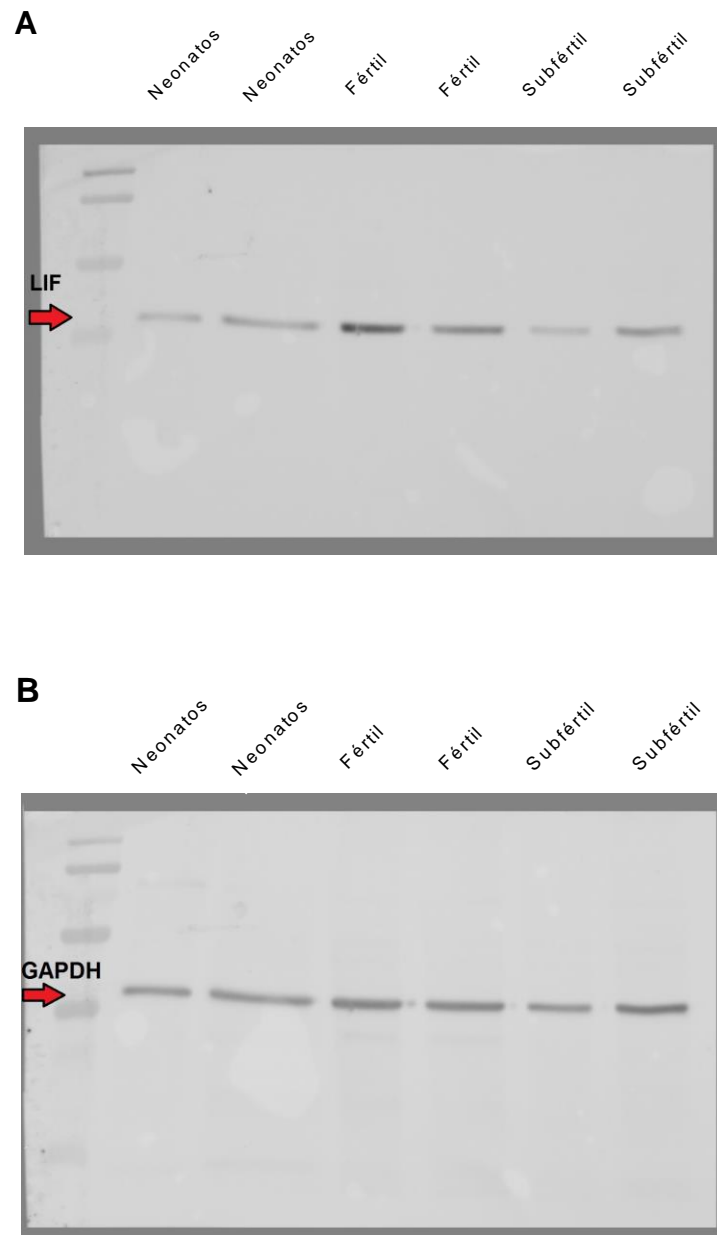
En vista de lo anterior, se rechaza la hipótesis puesto que se demostró que KP no es capaz de incidir sobre los niveles de expresión de LIF en el ovario de rata durante el período de subfertilidad. Sin embargo, se observó que KP tuvo un efecto sobre los niveles de expresión de LIF durante el periodo de fertilidad, produciendo un aumento en el contenido proteico intraovárico de LIF en este

estadio. Al respecto, hemos propuesto que dicho aumento podría influir sobre la regulación del desarrollo folicular, donde esta citoquina se posicionaría como un factor intermediario de las acciones de KP. En este sentido, LIF podría estar contribuyendo al aceleramiento del reclutamiento folicular y podría ser emplazado como un posible blanco terapéutico con el fin de enlentecer la pérdida de la reserva folicular. No obstante, para dilucidar en profundidad las acciones de LIF sobre el desarrollo folicular en la rata, será necesario ejecutar experimentos de estimulación *in vivo* con LIF y posteriores análisis morfométricos, además de mediciones hormonales, que den cuenta de las alteraciones que podrían estar ocurriendo a nivel folicular. Por otro lado, no se descarta que el aumento en los niveles de LIF durante el periodo de fertilidad pudiera conducir a la regulación de la expresión de otros mediadores implicados en el control del desarrollo folicular, lo cual necesitará ser estudiado con mayor detalle.

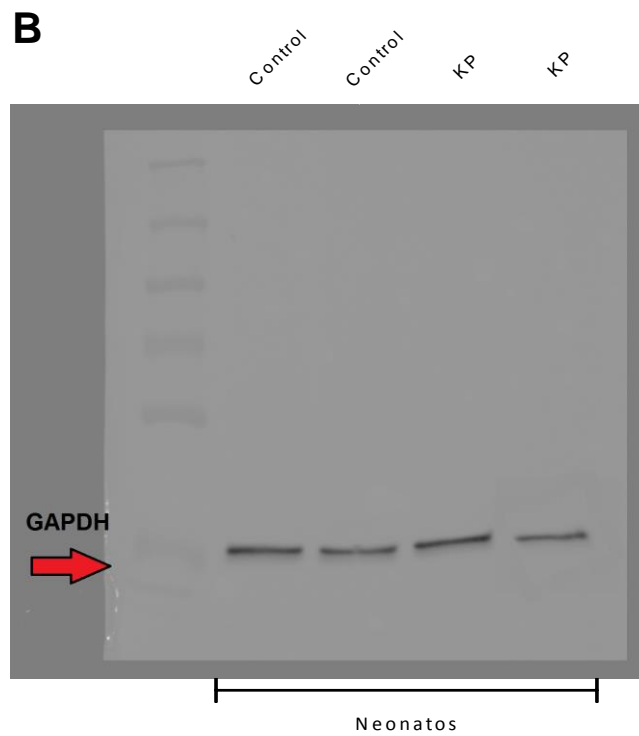
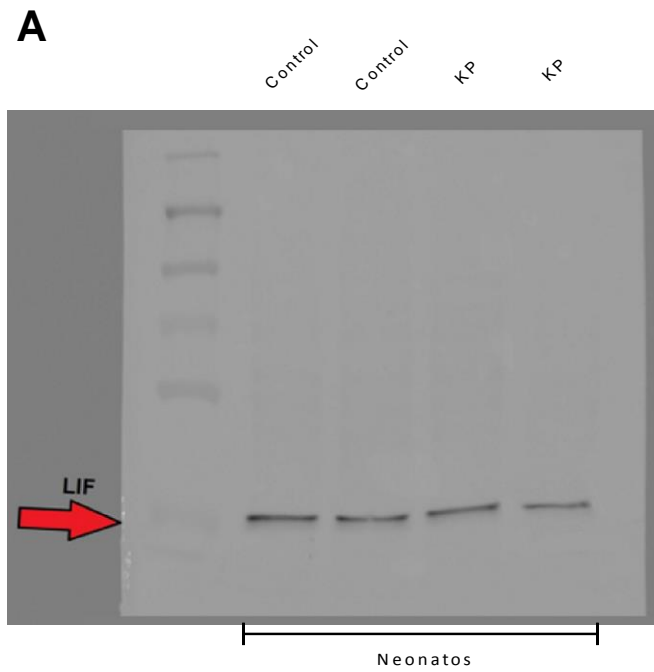
## 10. CONCLUSIÓN

A partir de este estudio, se concluyó que los niveles de proteína LIF se encuentran aumentados en el ovario de rata durante el periodo de fertilidad y que la estimulación *in vitro* de los ovarios con KP conduce a un aumento significativo en el contenido proteico de LIF durante el periodo fértil, sugiriendo una posible regulación de KP sobre la expresión de LIF en este estadio.

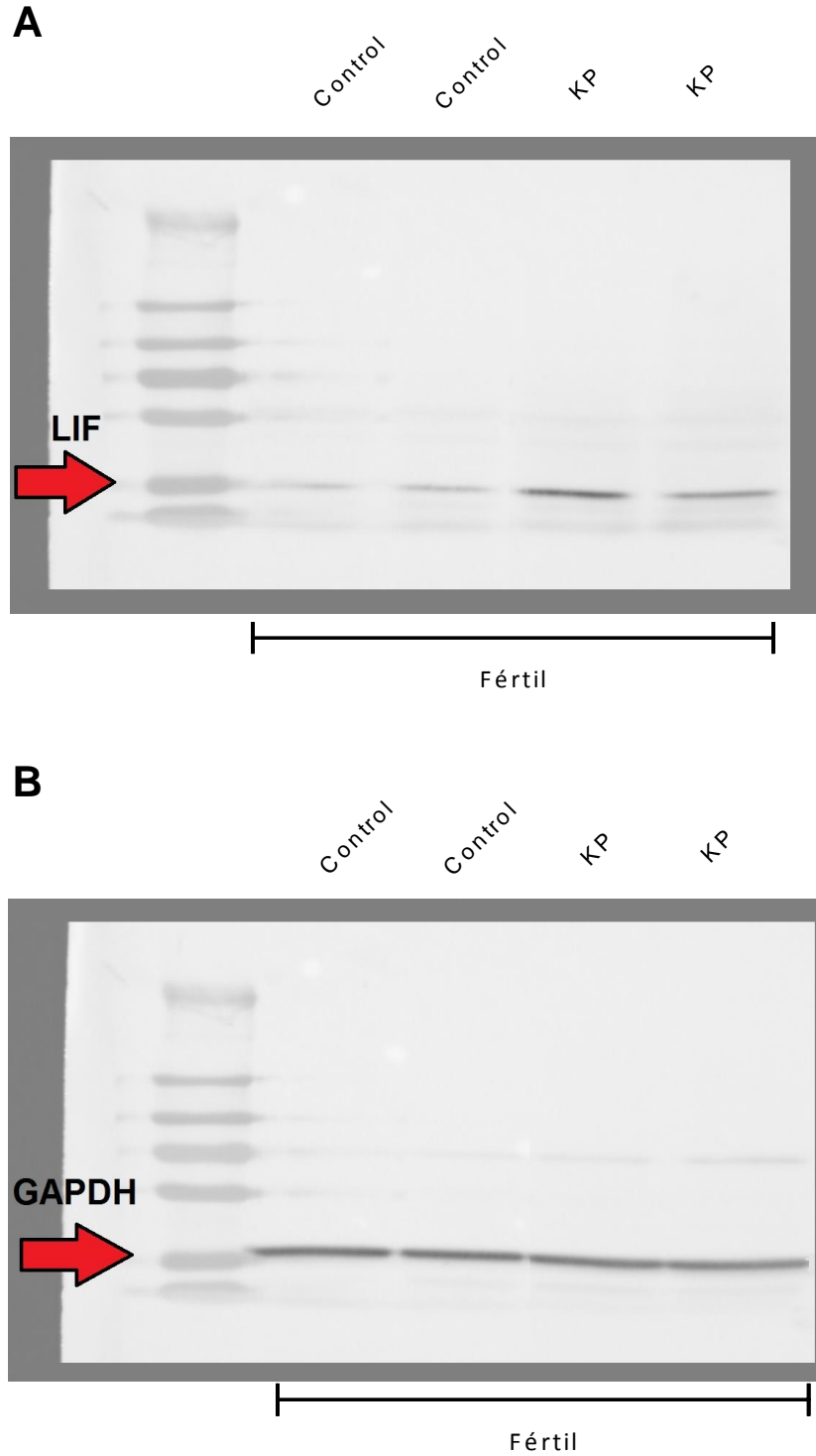
## 11. ANEXO



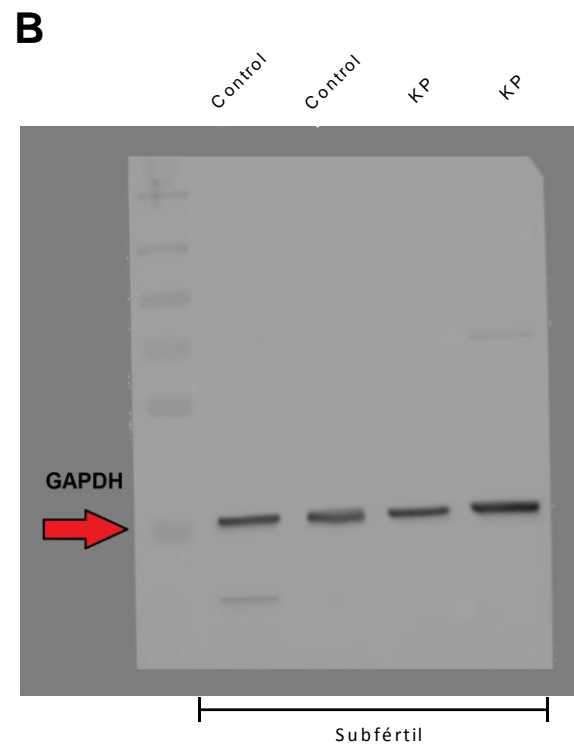
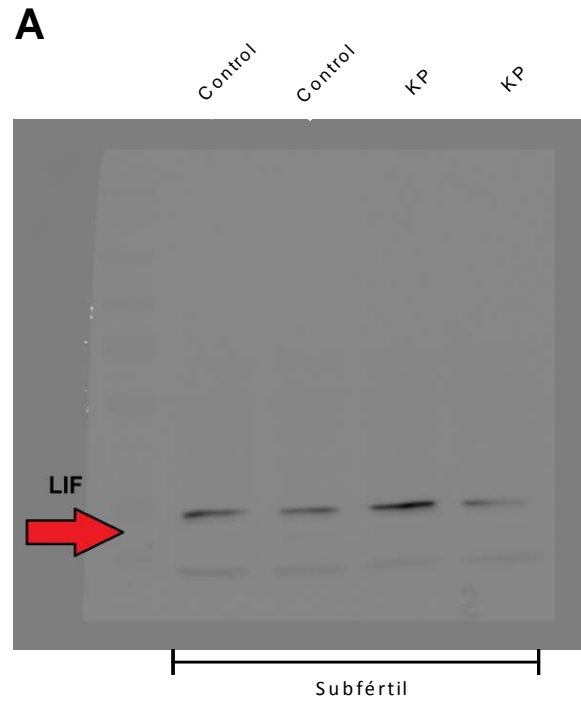
**Figura 10. Fotos de membranas de WB completas correspondientes al objetivo 1. A) Membrana completa de un WB de LIF en cada grupo etario. B) Membrana completa de un WB de GAPDH en cada grupo etario.**



**Figura 11. Fotos de membranas de WB completas correspondientes al grupo de neonatos del objetivo 2. A) Membrana completa de un WB de LIF en ovario de rata neonato en cada condición (control y KP). B) Membrana completa de un WB de GAPDH en ovario de rata neonato en cada condición (control y KP).**



**Figura 12. Fotos de membranas de WB completas correspondientes al grupo fértil del objetivo 2.** A) Membrana completa de un WB de LIF en ovario de rata fértil en cada condición (control y KP). B) Membrana completa de un WB de GAPDH en ovario de rata fértil en cada condición (control y KP).



**Figura 13. Fotos de membranas de WB completas correspondientes al grupo subfertil del objetivo 2. A) Membrana completa de un WB de LIF en ovario de rata subfertil en cada condición (control y KP). B) Membrana completa de un WB de GAPDH en ovario de rata subfertil en cada condición (control y KP).**

## 12. REFERENCIAS

Acuña, E., Fornes, R., Fernandois, D., Garrido, M. P., Greiner, M., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2009). Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 7, 64. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-64>

Almeida, D. V., Santos, R. R., Scalercio, S. R., Leão, D. L., Haritova, A., Oskam, I. C., & Domingues, S. F. S. (2012). Morphological and morphometrical characterization, and estimation of population of preantral ovarian follicles from senile common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Animal Reproduction Science*, 134(3–4), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.028>

Atkins, H. M., Willson, C. J., Silverstein, M., Jorgensen, M., Floyd, E., Kaplan, J. R., & Appt, S. E. (2014). Characterization of ovarian aging and reproductive senescence in vervet monkeys (*chlorocebus aethiops sabaeus*). *Comparative Medicine*, 64(1), 55–62.

Baumann, H., Symes, a J., Comeau, M. R., Morella, K. K., Wang, Y., Friend, D., Gearing, D. P. (1994). Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells. *Molecular and Cellular Biology*, 14(1), 138–146. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.1.138>

Bhatt, H., Brunet, L. J., & Stewart, C. L. (1991). Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11408–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11408>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Calder, M., Chan, Y. M., Raj, R., Pampillo, M., Elbert, A., Noonan, M., Babwah, A. V. (2014). Implantation failure in female Kiss1<sup>-/-</sup> mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. *Endocrinology*, 155(8), 3065–3078. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1916>

Castellano, J. M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V. M., Bellido, C., Tena-Sempere, M. (2006). Expression of KiSS-1 in rat ovary: Putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*, 147(10), 4852–4862. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0117>

Chen, C., Shen, L., Cao, S., Li, X., Xuan, W., Zhang, J., Liao, Y. (2014). Cytosolic CARP promotes angiotensin II- or pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy through calcineurin accumulation. *Plos one*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104040>



Chomczynski, P. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction, 159, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)

Cruz, G., Fernandois, D., & Paredes, A. H. (2017). Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction*, 153(2), R59–R68. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>

Curry, T. E., & Osteen, K. G. (2003). The matrix metalloproteinase system: Changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine Reviews*, 24(4), 428–465. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0005>

Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., & Wang, H. (2004). Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, 25(3), 341–373. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0020>

Faddy, M. J., Gosden, R. G., Gougeon, A., Richardson, S. J., & Nelson, J. F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*, 7(10), 1342–1346. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137570>

Fernandois, D. (2016). *Participación de kisspeptina en el reclutamiento folicular durante el envejecimiento ovárico*. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile.

Fernandois, D., Cruz, G., Na, E. K., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2017). Kisspeptin level in the aging ovary is regulated by the sympathetic nervous system. *Journal of Endocrinology*, 232(1), 97–105. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0181>

Fernandois, D., Na, E., Cuevas, F., Cruz, G., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2016). Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *Journal of Endocrinology*, 228(3), 161–170. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0429>

Gearing, D. P., Gough, N. M., King, J. a, Hilton, D. J., Nicola, N. a, Simpson, R. J., Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *The EMBO Journal*, 6(13), 3995–4002.

Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Steiner, R. A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145(9), 4073–4077. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0431>

Graf, U., Casanova, E. A., & Cinelli, P. (2011). The role of the leukemia inhibitory factor (LIF) - Pathway in derivation and maintenance of murine pluripotent stem cells. *Genes*, 2(1), 280–297. <https://doi.org/10.3390/genes2010280>

Hirshfield, a N., & Midgley Jr., a R. (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod*, 19, 597–605. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/363183>

Hu, Q., Huang, C., Wang, Y., & Wu, R. (2015). Expression of leukemia inhibitory

factor in the rat retina following acute ocular hypertension. *Molecular Medicine Reports*, 6577–6583. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4287>

Jones, E. C., & Krohn, P. L. (1961). The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *The Journal of Endocrinology*, 21, 469–495. <https://doi.org/10.1038/nature09368>

Larrañaga, O. (2003). Participación laboral de la mujer en Chile: 1958-2003. *El Eslabón Perdido. Familia, modernización y bienestar en Chile*. Taurus, Santiago. <http://economaiynegocios.uahurtado.cl/pdf/seminarios/larranaga.pdf>

Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., & Cartner, S. (2013). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. American Veterinary Medical Association. <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50009-1>

Leung, P. C. K., Adashi, E. Y., & Gougeon, A. (2003). *The Ovary*. *The Ovary*. <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50003-3>

Las Heras, M. (2016). *Efecto 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 de Magister. Universidad de Chile.

Mandl, B. A. M. (1959). A quantitative study of oocytes in young and old nulliparous laboratory rats quantitative study. *Journal of Endocrinology*, 18(4), 444-450. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0180444>

Matzuk, M. M. (2002). Intercellular Communication in the Mammalian Ovary: Oocytes Carry the Conversation. *Science*, 296(5576), 2178–2180. <https://doi.org/10.1126/science.1071965>

Mayerhofer, A., Dissen, G. A., Costa, M. E., & Ojeda, S. R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 138(8), 3320–3329. <https://doi.org/10.1210/en.138.8.3320>

McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/er.21.2.200>

Moreau, J. F., Donaldson, D. D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J., Clark, S. C., & Wong, G. G. (1988). Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature*, 336(6200), 690–2. <https://doi.org/10.1038/336690a0>

Murphy, M. J., Halow, N. G., Royer, P. A., & Hennebold, J. D. (2016). Leukemia inhibitory factor is necessary for ovulation in female rhesus macaques. *Endocrinology*, 157(11), 4378–4387. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1283>

Neill, J. D. (2006). *Physiology of Reproduction*. *Annual review of physiology* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.13.030151.002055>

Nilsson, E. E., Kezele, P., & Skinner, M. K. (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188(1–2), 65–73. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00746-8)

Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(3), 326–337. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60347-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60347-1)

Pampillo, M., Camuso, N., Taylor, J. E., Szereszewski, J. M., Ahow, M. R., Zajac, M., Babwah, A. V. (2009). Regulation of GPR54 Signaling by GRK2 and  $\beta$ -Arrestin. *Molecular Endocrinology*, 23(12), 2060–2074. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0013>

Pawar, S., Starosvetsky, E., Orvis, G. D., Behringer, R. R., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2013). STAT3 Regulates Uterine Epithelial Remodelling and Epithelial-Stromal Crosstalk During Implantation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(C), 1–17. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1206>

Peluffo, M. C., Murphy, M. J., Baughman, S. T., Stouffer, R. L., & Hennebold, J. D. (2011). Systematic analysis of protease gene expression in the rhesus macaque ovulatory follicle: Metalloproteinase involvement in follicle rupture. *Endocrinology*, 152(10), 3963–3974. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1172>

Peng, J., Tang, M., Zhang, B. P., Zhang, P., Zhong, T., Zong, T., Kuang, H. Bin. (2013). Kisspeptin stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1436–1443.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.008>

Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: Mammalian female germ cell development. *Genesis*. <https://doi.org/10.1002/dvg.20258>

Pepling, M. E. (2012). Follicular assembly: Mechanisms of action. *Reproduction*, 143(2), 139–149. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0299>

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiological Reviews*, 92(3), 1235–1316. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2010>

Rajah, R., Glaser, E. M., & Hirshfield, A. N. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Developmental Dynamics*, 194(3), 177–192. <https://doi.org/10.1002/aja.1001940303>

Ricu, M. A. (2013). *Participación de kisspeptina en la función ovárica y sus cambios durante la activación del sistema nervioso simpático inducida por el estrés por frío en la rata*. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile.

Ricu, M. A., Ramirez, V. D., Paredes, A. H., & Lara, H. E. (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), 4966–4977. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1279>

Roa, J., Vigo, E., García-Galiano, D., Castellano, J. M., Navarro, V. M., Pineda, R., Tena-Sempere, M. (2008). Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 294, E1088–E1096. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90240.2008>.

Salas, C., Julio-Pieper, M., Valladares, M., Pommer, R., Vega, M., Mastronardi, C., Romero, C. (2006). Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(6), 2396–2403. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1925>

Shen, M. M., & Leder, P. (1992). Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17), 8240–8244. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8240>

Stewart, C. L. (1994). Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 39(2), 233–8. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080390217>

Sun, X., Bartos, A., Whitsett, J. a, & Dey, S. K. (2013). Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(9), 1492–501. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1086>

Xiao, Y., Ni, Y., Huang, Y., Wu, J., Grossmann, R., & Zhao, R. (2011). Effects of kisspeptin-10 on progesterone secretion in cultured chicken ovarian granulosa cells from preovulatory (F1–F3) follicles. *Peptides*, 32(10), 2091–2097. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.09.001>