



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS RFRP/NPFF1R Y
Kiss1/Gpr54 EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN
REPRODUCTORA Y DE LA HOMEOSTASIS
METABÓLICA**

Silvia León Téllez

Córdoba, Febrero de 2014

TITULO: *Análisis de los sistemas RFRP/NPFF1R y Kiss1/Gpr54 en la regulación de la función reproductora y de la homeostasis metabólica*

AUTOR: *Silvia León Téllez*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS RFRP/NPFF1R Y Kiss1/Gpr54 EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA Y DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Silvia León Téllez**, licenciada en biología por la Universidad de Córdoba, para optar al grado de **Doctora** en Ciencias.

Los Directores,

Dr. Manuel Tena Sempere
Catedrático de Fisiología de la
Universidad de Córdoba

Dra. Leonor Pinilla Jurado
Catedrática de Fisiología de la
Universidad de Córdoba



TÍTULO DE LA TESIS: ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS RFRP/NPFF1R Y Kiss1/Gpr54 EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA Y DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA.

DOCTORANDO/A: Silvia León Téllez

1.1.1.1 INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de Tesis Doctoral titulado "Análisis de los sistemas RFRP/NPFF1R y Kiss1/Gpr54 en la regulación de la función reproductora y de la homeostasis metabólica" ha sido realizado satisfactoriamente por Dña. Silvia León Téllez, Licenciada en Biología, entre los años 2010-2013 en la sección de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología bajo nuestra dirección. El objetivo general de esta Tesis fue avanzar en la caracterización del papel fisiológico de los sistemas RFRP/NPFF1R y Kiss1/Gp54 en la regulación del eje reproductor y su relación con otros sistemas homeostáticos relevantes, como los de control metabólico. Para ello se utilizó un modelo de ratón con ausencia generalizada y congénita del receptor NPFF1R para RFRP y un modelo de ratón con presencia exclusiva del receptor Gpr54 para Kiss1 en las neuronas GnRH. El grado de aprovechamiento y la adquisición de conocimientos, por parte de la doctoranda durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido muy satisfactorios. Prueba de ello es la realización de un trabajo científico que está en fase de revisión en una de las revistas de mayor índice de impacto en el campo de la Endocrinología (directamente relacionado con la temática de esta Tesis Doctoral) y otros dos trabajos que están siendo redactados para ser enviados a revistas de primer cuartil en el Área. Adicionalmente, la doctoranda ha participado de forma relevante durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral, en la realización de otros trabajos de investigación llevados a cabo por nuestro grupo y que se detallan a continuación:

1. Garcia-Galiano D, van Ingen Schenau D, Leon S, Krajnc-Franken MA, Manfredi-Lozano M, Romero-Ruiz A, Navarro VM, Gaytan F, van Noort PI, Pinilla L, Blomenrohr M, and Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* 153: 316-328, 2012.

2. Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido MA, Garcia-Galiano D, Hobbs SJ, Manfredi-Lozano M, Leon S, Sangiao-Alvarellos S, Castellano JM, Clifton DK, Pinilla L, Steiner RA, and Tena-Sempere M. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 2388-2397, 2012.

3. Gaytan F, Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Garcia-Galiano D, Ruiz-Pino F, Romero-Ruiz A, Leon S, Morales C, Cordido F, Pinilla L, and Tena-Sempere M. Distinct expression patterns predict differential roles of the miRNA-binding proteins, Lin28 and Lin28b, in the mouse testis: studies during postnatal development and in a model of hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinology* 154: 1321-1336, 2013.

4. Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Garcia-Galiano D, Manfredi-Lozano M, Leon S, Romero-Ruiz A, Dieguez C, Pinilla L, and Tena-Sempere M. Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. *Endocrinology* 154: 3387-3400, 2013.

5. Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Ruiz-Pino F, Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Leon S, Dieguez C, Cordido F, Matagne V, Dissen GA, Ojeda SR, Pinilla L, and Tena-Sempere M. Changes in hypothalamic expression of the Lin28/let-7 system and related microRNAs during postnatal maturation and after experimental manipulations of puberty. *Endocrinology* 154: 942-955, 2013.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 9 de Enero de 2014

Firma del/de los director/es

Fdo.: Manuel Tena Sempere

Fdo.: Leonor Pinilla Jurado

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL.....	1
1.1.1. HIPOTÁLAMO	2
1.1.2. HIPÓFISIS.....	6
1.1.3. GÓNADAS.....	8
1.1.3.1. TESTÍCULOS.....	8
1.1.3.2. OVARIOS.....	10
1.2. REGULACIÓN DEL EJE HHG	12
1.2.1. REGULADORES CENTRALES	12
1.2.1.1. SEÑALES EXCITATORIAS	12
1.2.1.2. SEÑALES INHIBIDORAS	16
1.2.2. REGULADORES PERIFÉRICOS	17
1.2.2.1. FACTORES GONADALES.....	17
1.2.2.2. OTROS FACTORES PERIFÉRICOS	19
1.3. SISTEMA Kiss1/Gpr54	20
1.3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	20
1.3.2. ELEMENTOS PRINCIPALES: Kiss1, KISSPEPTINAS Y Gpr54	21
1.3.3. EXPRESIÓN DEL SISTEMA Kiss1/Gpr54.....	22
1.3.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS KISSPEPTINAS.....	23
1.3.5. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS POR LAS NEURONAS Kiss1	24
1.3.5.1. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE GnRH.....	25
1.3.5.2. REGULACIÓN POR RETROALIMENTACIÓN NEGATIVA DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS	26
1.3.6. PAPEL DEL SISTEMA Kiss1/Gpr54 EN EL CONTROL DE LA PUBERTAD	27
1.3.7. PAPEL DEL SISTEMA Kiss1/Gpr54 EN EL CONTROL DEL PICO PRE-OVULATORIO DE GnRH/LH	28
1.3.8. MODELOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN EL ESTUDIO DEL SISTEMA Kiss1/Gpr54	30
1.3.8.1. MODELOS ANIMALES MUTANTES EN EL SISTEMA Kiss1/Gpr54.....	31
1.3.8.2. ANÁLISIS DEL FENOTIPO MUTANTE PARA Kiss1 Y Gpr54: MODELO DE HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPO	33
1.3.8.3. MODELOS ANIMALES DE AUSENCIA DE Gpr54 RESTRINGIDA A NEURONAS GnRH	35
1.4. SISTEMA RFRP/NPFF1R	35
1.4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS: DESCUBRIMIENTO DEL GnIH.....	35
1.4.2. IDENTIFICACIÓN DE ORTÓLOGOS DE GnIH EN MAMÍFEROS: RFRPs	37
1.4.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS NEURONAS GnIH/RFRP	38
1.4.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE GnIH/RFRP	40
1.4.5. ACCIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DE GnIH/RFRP	41
1.5. CONTROL INTEGRADO DEL BALANCE ENERGÉTICO Y LA FUNCIÓN REPRODUCTORA	44
1.5.1. FACTORES PERIFÉRICOS EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y LA REPRODUCCIÓN	45
1.5.2. FACTORES CENTRALES EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y LA REPRODUCCIÓN	47
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	58
3.1.1. GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL MUTANTE PARA NPFF1R: RATÓN NPFF1R KO.....	58

3.1.2.	<i>GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE LAS KISSPEPTINAS MEDIADAS POR EN NEURONAS GnRH: RATÓN Gpr54 KI</i>	59
3.1.3.	<i>GENOTIPADO</i>	60
3.1.3.1.	<i>EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO</i>	60
3.1.3.2.	<i>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</i>	61
3.2.	<i>DROGAS</i>	64
3.3.	<i>PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES</i>	64
3.3.1.	<i>CANULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (I.C.V.) DE DROGAS</i> ...	64
3.3.2.	<i>INCUBACIÓN ESTÁTICA DE TEJIDO HIPOFISARIO Y TESTICULAR</i>	65
3.4.	<i>PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS GENERALES</i>	65
3.4.1.	<i>RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) Y PCR SEMICUANTITATIVA A TIEMPO FINAL</i>	65
3.4.2.	<i>HIBRIDACIÓN IN SITU</i>	66
3.4.3.	<i>ANÁLISIS HISTOLÓGICOS</i>	68
3.4.4.	<i>RADIOINMUNOENSAYO (RIA)</i>	68
3.4.5.	<i>MEDIDA DE GLUCOSA EN PLASMA</i>	69
3.5.	<i>DISEÑOS EXPERIMENTALES</i>	69
3.5.1.	<i>ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL SISTEMA RFRP/NPFF1R EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS Y DE SUS POSIBLES INTERACCIONES CON OTRAS SEÑALES CENTRALES Y PERIFÉRICAS</i>	69
3.5.1.1.	<i>CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO NPFF1R KO</i>	69
3.5.1.1.1.	<i>Validación funcional del modelo mutante NPFF1R KO</i>	70
3.5.1.1.2.	<i>Caracterización fenotípica de la función reproductora en los ratones NPFF1R KO</i>	71
3.5.1.1.3.	<i>Caracterización fenotípica de la función reproductora de los ratones doble mutantes NPFF1R/Gpr54 KO</i>	72
3.5.1.2.	<i>ESTUDIO EN MUTANTES NPFF1R KO DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS</i>	72
3.5.1.2.1.	<i>Análisis de la participación del RFRP como mediador del feedback negativo de los esteroides gonadales en la regulación de la liberación de gonadotropinas</i>	72
3.5.1.3.	<i>ESTUDIO EN MUTANTES NPFF1R KO DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN CENTRAL EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS</i>	73
3.5.1.3.1.	<i>Análisis de las interacciones entre RFRP y GnRH en el control de la liberación de gonadotropinas</i>	73
3.5.1.3.2.	<i>Análisis de las interacciones entre el RFRP y las kisspeptinas en el control de la liberación de gonadotropinas</i>	74
3.5.1.3.3.	<i>Análisis de las interacciones entre el RFRP y la NKB en el control de la liberación de gonadotropinas</i>	75
3.5.2.	<i>ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA Y LA REPRODUCCIÓN</i>	75
3.5.2.1.	<i>REPERCUSIÓN DE ESTRÉS METABÓLICO SOBRE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS Y EL PESO CORPORAL</i>	76
3.5.2.1.1.	<i>Análisis de la implicación del RFRP en el control de la liberación de gonadotropinas y peso corporal en respuesta al ayuno</i>	76
3.5.2.1.2.	<i>Análisis de la implicación del RFRP en el control de la liberación de gonadotropinas y peso corporal en respuesta a una HFD</i>	76
3.5.2.1.3.	<i>Análisis de la posible implicación del RFRP en los cambios de peso corporal en respuesta a OVX</i>	77
3.5.2.2.	<i>ANÁLISIS DE LA POSIBLE IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA</i>	77
3.5.2.3.	<i>TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT) Y ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE INSULINA EN EL MUTANTE NPFF1R KO</i>	78
3.5.3.	<i>ESTUDIO IN VIVO EN RATONES Gpr54 KI DE LAS ACCIONES DIRECTAS DE LAS KISSPEPTINAS SOBRE NEURONAS GnRH</i>	79

3.5.3.1.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y HORMONAL DE LA FUNCIÓN REPRO-DUCTORA EN RATONES Gpr54 KI	79
3.5.3.2.	ESTUDIO EN MUTANTES Gpr54-/-T DEL PAPEL DIRECTO DE LAS KISSPEPTINAS EN LA FUNCIÓN GONADAL	80
3.5.3.2.1.	Valoración funcional del testículo en las ratones Gpr54 KI	80
3.5.3.3.	ESTUDIO EN MUTANTES Gpr54-/-T DEL EFECTO GONADOTRÓPICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH Y KP-10.....	81
3.5.3.3.1.	Análisis en mutantes Gpr54-/-T del efecto de la administración de GnRH	81
3.5.3.3.2.	Análisis en mutantes Gpr54-/-T del efecto de la administración de Kp-10.....	81
3.5.3.4.	ESTUDIO EN MUTANTES Gpr54-/-T DE LA DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS KISSPEPTINAS Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO Y CENTRAL	82
3.5.3.4.1.	Análisis en mutantes Gpr54-/-T de la participación de kisspeptinas como mediadoras del feedback negativo de los esteroides gonadales	82
3.5.3.4.2.	Análisis en mutantes Gpr54 -/-T de las interacciones entre las kisspeptinas y el glutamato	83
3.5.3.4.3.	Análisis en mutantes Gpr54-/-T de interacciones entre las kisspeptinas y el GABA	83
3.5.3.4.4.	Análisis en mutantes Gpr54-/-T de las interacciones entre las kisspeptinas y las taquiquininas	84
3.5.3.5.	ANÁLISIS EN RATONES Gpr54-/-T DE LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA.	85
3.6.	PRESENTACIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA	85
4.	RESULTADOS	89
4.1.	ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DEL EJE GONADOTRÓPICO Y DE SUS POSIBLES INTERACCIONES CON OTRAS SEÑALES CENTRALES Y PERIFÉRICAS	89
4.1.1.	<i>VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO NPFF1R KO</i>	89
4.1.1.1.	VALIDACIÓN INICIAL DEL MODELO MUTANTE NPFF1R KO	89
4.1.1.2.	VALIDACIÓN FUNCIONAL DEL MODELO MUTANTE NPFF1R KO.....	90
4.1.1.3.	CARACTERIZACIÓN DEL MODELO NPFF1R KO: ESTUDIOS DE PUBERTAD	91
4.1.1.4.	FUNCIÓN REPRODUCTORA EN EDAD ADULTA EN RATONES NPFF1R KO.....	95
4.1.1.5.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA DE LOS RATONES DOBLE MUTANTES NPFF1R/Gpr54 KO	97
4.1.2.	<i>ANÁLISIS DE INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO EN EL CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS MEDIANTE ESTUDIOS EN MUTANTES NPFF1R KO</i>	98
4.1.2.1.	ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DEL RFRP COMO MEDIADOR DEL FEEDBACK NEGATIVO DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS	98
4.1.3.	<i>ANÁLISIS DE INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN CENTRAL EN EL CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS MEDIANTE ESTUDIOS EN MUTANTES NPFF1R KO</i>	100
4.1.3.1.	ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE RFRP Y GnRH EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS	100
4.1.3.2.	ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y LAS KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS.....	100
4.1.3.3.	ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y LA NKB EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS	101
4.1.3.4.	EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE KISS1 EN EL RATÓN NPFF1R KO.....	102
4.2.	ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA Y LA REPRODUCCIÓN EN RATONES MUTANTES NPFF1R KO	103
4.2.1.	<i>ANÁLISIS DE RESPUESTAS GONADOTRÓPICAS AL ESTRÉS METABÓLICO EN EL RATÓN NPFF1R KO</i>	103
4.2.1.1.	ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DE LAS GONADOTROPINAS Y EL PESO CORPORAL EN RESPUESTA AL AYUNO	103

4.2.1.2.	ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DE GONADOTROPINAS Y PESO CORPORAL EN RESPUESTA A UNA DIETA ALTA EN GRASA (HFD)	104
4.2.1.3.	ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DE CAMBIOS DE PESO CORPORAL EN RESPUESTA A OVX	105
4.2.2.	ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA	107
4.2.3.	TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT) Y ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE INSULINA EN RATONES MUTANTES NPFF1R KO.....	109
4.3.	ESTUDIO IN VIVO DE LAS ACCIONES DIRECTAS E INDIRECTAS DE KISSPEPTINAS SOBRE NEURONAS GnRH EN EL CONTROL DEL EJE GONADOTRÓPICO Y EL METABOLISMO: ANÁLISIS EN EL RATÓN GPR54-/-T	111
4.3.1.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y HORMONAL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA DE LOS RATONES Gpr54-/-T.....	111
4.3.2.	ESTUDIO EN MUTANTES Gpr54-/-T DEL PAPEL DIRECTO DE LAS KISSPEPTINAS EN LA FUNCIÓN GONADAL.....	117
4.3.3.	ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH Y KP-10 EN RATONES Gpr54-/-T	118
4.3.3.1.	EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH EN RATONES Gpr54-/-T.....	118
4.3.3.2.	EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE KP-10 EN RATONES Gpr54-/-T.....	118
4.3.4.	ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE LAS KISSPEPTINAS Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO Y CENTRAL EN RATONES MUTANTES Gpr54-/-T	119
4.3.4.1.	ANÁLISIS DEL FEEDBACK NEGATIVO DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN RATONES MUTANTES Gpr54-/-T	119
4.3.4.2.	EFECTOS DEL AGONISTA GLUTAMATÉRGICO, NMDA, EN RATONES MUTANTES Gpr54-/-T....	121
4.3.4.3.	EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN DEL GABA EN RATONES Gpr54-/-T	121
4.3.4.4.	ANÁLISIS EN MUTANTES Gpr54-/-T DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUIQUININAS SOBRE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS.....	122
4.3.4.5.	ANÁLISIS DE RESPUESTAS RELATIVAS DE SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS A LOS DIFERENTES REGULADORES EN RATONES Gpr54-/-T.....	125
4.3.5.	ANÁLISIS EN RATONES Gpr54-/-T DE LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTOS.....	126
5.	DISCUSIÓN	132
6.	CONCLUSIONES	158
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	163

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

3v (Tercer ventrículo cerebral)	Dyn (Dinorfinas)
Aa (Aminoácidos)	E2 (17 β -estradiol)
ABP (Proteína fijadora de andrógenos intratesticular)	EEAA (Aminoácidos excitatorios)
ACTH (Hormona estimulante de la corteza adrenal)	EOPs (Péptidos opioides endógenos)
ADNc (Ácido desoxirribonucleico complementario)	ER α (Receptor de estrógenos α)
AMPA (Ácido 2-amino-3-hidroxy-5metil-4-isoxazolpropiónico)	Er β (Receptor de estrógenos β)
AR (Receptor de andrógenos)	FSH (Hormona folículo-estimulante)
ARC (Núcleo Arcuato)	GABA (Ácido γ -aminobutírico)
ARNm (Ácido ribonucleico mensajero)	GAL (Galanina)
AUC (Área bajo la curva)	GALP (Péptido similar a galanina)
AV (Apertura vaginal)	GAP (Péptido asociado a GnRH)
AVPV (Área anteroventral del núcleo periventricular)	Gfp (Proteína verde fluorescente)
CART (Transcrito relacionado con cocaína y anfetamina)	GH (Hormona del crecimiento)
CL (Cuerpo lúteo)	GnIH (Hormona inhibidora de Gonadotropinas)
CLR (Cuerpo lúteo en regresión)	GnIH-ir (Neuronas GnIH inmunoreactivas)
COC (Complejo ovocito-cúmulo)	GnRH (Hormona liberadora de gonadotropinas)
D-1 (Diestro-1)	GNX (Gonadectomía)
D-2 (Diestro-2)	GPCR (Receptor de superficie acoplado a proteína G)
DHA (Área hipotalámica dorsal)	Gt (Gene trapped)
DHT (Dihidrotestosterona)	hCG (Gonadotropina coriónica)
DMN (Núcleo ventromedial)	HH (Hipogonadismo hipogonadotrópico)
	HHG (Hipotálamo-Hipófiso Gonadal)
	i.c.v. (Intracerebroventricular)

Abreviaturas

IHC (Inmunohistoquímica)	PeVN (Núcleo periventricular)
ip (Intraperitoneal)	POAl (Área preóptica lateral)
ISH (Hibridación <i>in situ</i>)	POAm (Área preóptica medial)
KA (Kainato)	POMC (Proopiomelanocortina)
KO (knock-out)	PR (Receptores de progesterona)
Kp-10 (kisspeptina-10)	PRL (Prolactina)
Kp-ir (Fibras inmunoreactivas a kisspeptinas)	PRO (Proestro)
LH (Hormona luteinizante)	PVN (Núcleo paraventricular)
LHA (Área hipotalámica lateral)	PYY (Polipéptido YY)
mGluRs (Receptores metabotrópicos)	RFRP-1 (Péptido relacionado con los RF-amida tipo 1)
NK1R (Receptor de taquiquininas tipo 1)	RFRP-3 (Péptido relacionado con los RF-amida tipo 3)
NK1R (Receptor de taquiquininas tipo 2)	RFRPs (Péptidos relacionados RF-amida)
NK3R (Receptor 3 de neuroquinina B)	RIA (Radioinmunoensayo)
NKB (neuroquinina B)	RT (Retrotranscripción)
NMDA (N-metil D-aspartato)	SBP (Separación balano prepucial)
NO (Óxido nítrico)	SHBG (Globulina de unión a hormonas sexuales)
NOS (Óxido nítrico sintasa)	SNC (Sistema nervioso central)
NPFF (Neuropéptido FF)	SON (Núcleo supraóptico)
NPFF1R (Receptor de GnIH/RFRPs)	T (Testosterona)
NPFF2R (Receptor de PQRFa/NPFF)	TSH (Hormona estimulante del tiroides)
NPY (Neuropéptido Y)	Veh (Vehículo)
ob-R (Receptor de leptina)	WT (Wild type)
ORX (orquidectomía)	β -END (β -endofinas)
OVX (Ovariectomía)	
pb (pares de bases)	

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción es una función esencial para la supervivencia de las especies y se caracteriza por la capacidad de generar gametos fertilizables en el caso de las hembras y fertilizantes en el caso de los machos. Al igual que el resto de funciones del organismo, la función reproductora se encuentra regulada por los sistemas nervioso y endocrino, que interactúan entre sí a nivel del denominado eje neuroendocrino de la reproducción o eje Hipotálamo-Hipófisis Gonadal (HHG).

1.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GONADAL

El eje HHG se organiza en torno a tres elementos fundamentales:

1.- Las neuronas GnRH, que sintetizan y liberan la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y que se localizan en el hipotálamo.

2.- Las células gonadotropas hipofisarias, que se localizan en la hipófisis anterior o adenohipófisis y que sintetizan y liberan la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH). En su conjunto, ambas hormonas reciben el nombre de gonadotropinas.

3.- Las gónadas, testículos en el caso de los machos y ovarios en el de las hembras.

Los elementos del eje HHG interactúan entre sí de la siguiente manera: las neuronas GnRH liberan este neuropéptido, en forma de descargas pulsátiles, a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria desde donde llega a la adenohipófisis e interactúa con sus receptores específicos en las células gonadotropas. La unión de GnRH a sus receptores estimula la síntesis y posterior liberación pulsátil de LH y FSH a la circulación sistémica [1, 2]. Una vez que las gonadotropinas llegan a las gónadas, actúan sobre receptores específicos localizados en diferentes tipos celulares generando la correcta producción de gametos maduros a partir de la pubertad (gametogénesis), así como la síntesis de hormonas de naturaleza esteroidea y proteica (hormonogénesis). Las hormonas gonadales participan, entre otras, en la regulación funcional del eje gonadotrópico mediante circuitos de retroalimentación negativa y positiva, siendo estos últimos exclusivos del sexo femenino [3] (*Fig. 1*).

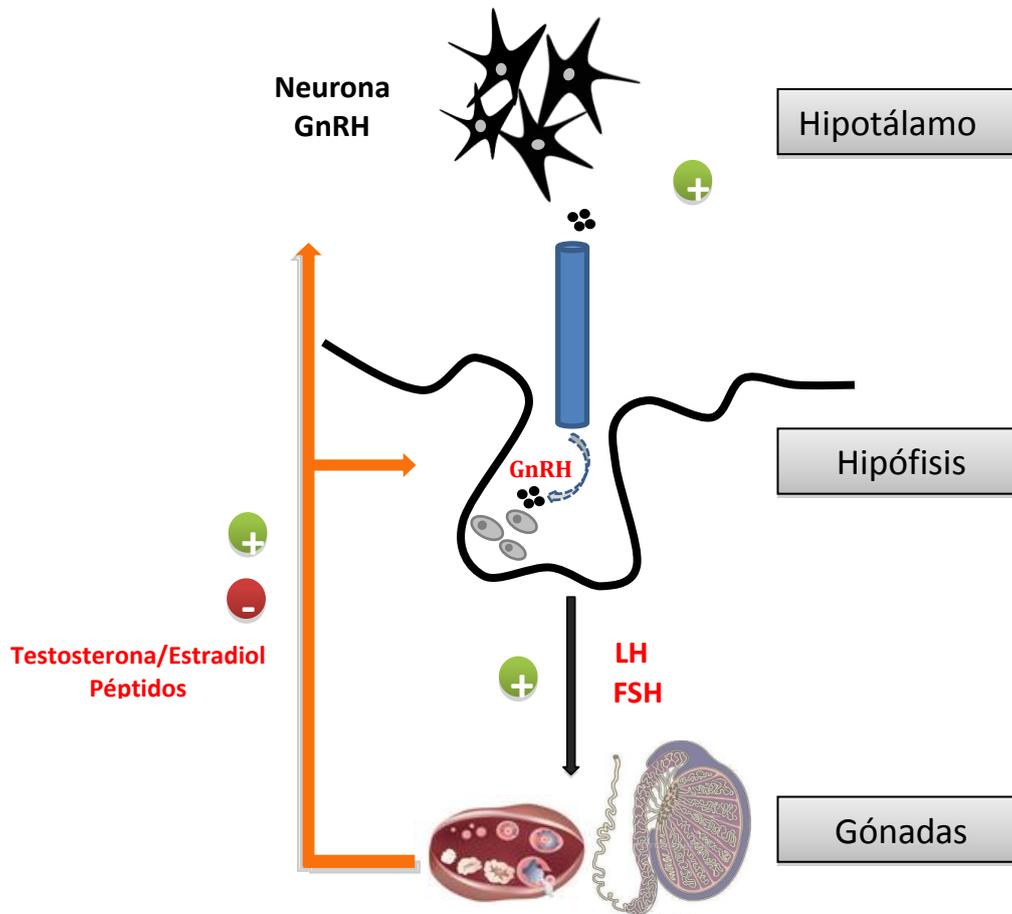


Figura 1. Representación esquemática del eje Hipotálamo-Hipófisis Gonadal

1.1.1 HIPOTÁLAMO

El hipotálamo se encuentra situado en la base del encéfalo, concretamente en la zona inferior del diencéfalo, entre el tálamo y el tercer ventrículo cerebral (3v). El límite inferior viene delimitado por una delgada pared en forma de embudo, el tuber cinereum, que se prolonga hacia abajo, abarcando el tallo hipofisario y el proceso infundibular de la neurohipofisis [4]

Desde el punto de vista funcional, las neuronas hipotalámicas se agrupan en núcleos y áreas que se disponen en tres zonas, que en sentido rostro-caudal se denominan: rostral o supraóptica, medial o tuberal y caudal o mamilar (**Fig. 2**).

❖ **Zona rostral:** en ella se agrupan diferentes núcleos, como el área preóptica medial y lateral (POAm y POAl), el núcleo supraóptico (SON) y el núcleo paraventricular (PVN). El POA es clave en el control del eje reproductor, ya que

contiene la mayor parte de las neuronas productoras de GnRH. SON y PVN constituyen los componentes fundamentales del hipotálamo anterior y sus axones se proyectan hacia la neurohipófisis formando el tracto magnocelular hipotálamo-hipofisario.

- ❖ **Zona medial:** formada por el área hipotalámica lateral (LHA), el área hipotalámica dorsal (DHA), el núcleo infundibular o arcuato (ARC), el núcleo ventromedial (VMN) y el núcleo dorsomedial (DMN). Estos tres últimos núcleos constituyen los principales componentes de la porción medial, y sus neuronas se proyectan hacia los capilares de la eminencia media donde vierten sus productos de secreción a través de los cuales intervienen en el control de la síntesis y liberación de las hormonas de la adenohipófisis. Es destacable que las neuronas de estos núcleos están interconectadas, permitiendo la modulación dinámica de los *inputs* nerviosos estimuladores e inhibidores que controlan a las diferentes hormonas hipofisarias [5, 6]
- ❖ **Zona caudal:** los cuerpos mamilares constituyen los principales núcleos de esta zona y su función endocrina es menos conocida.

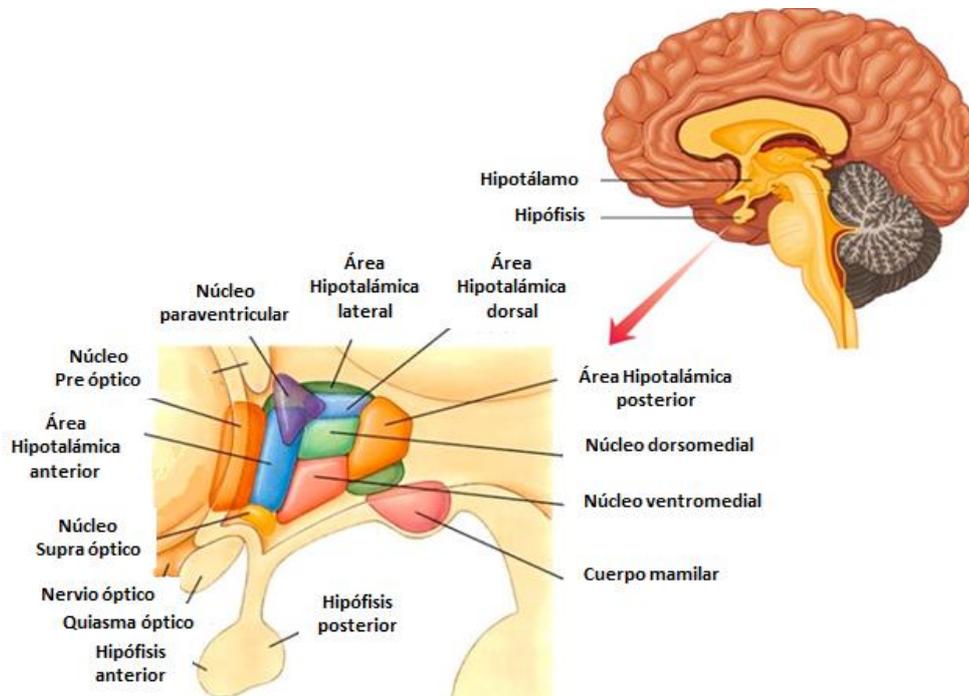


Figura 2. Representación esquemática de los principales núcleos y áreas hipotalámicas.

❖ **Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)**

GnRH es un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) caracterizado por primera vez en hipotálamos ovinos y porcinos en la década de los 70 por Roger Guillemin y Andrew W. Schally [7, 8]. Se han identificado tres variantes de este neuropéptido en diversas especies de vertebrados, a las que se le ha denominado GnRH-I, GnRH-II y GnRH-III.

- ❖ GnRH-I: variante hipotalámica, es considerada el efector final del conjunto de reguladores centrales y periféricos que intervienen en el control neuroendocrino de la reproducción. Durante el presente trabajo la denominaremos exclusivamente como GnRH [9].
- ❖ GnRH-II: variante mesencefálica, que parece estar implicada en la regulación del comportamiento sexual, de la ingesta de alimentos y del balance energético [10, 11].
- ❖ GnRH-III: variante telencéflica, ha sido identificada únicamente en peces teleosteos y, además de estar implicada en el control del comportamiento reproductor, también ha sido sugerida su participación como un posible factor hipofisiotrópico [12, 13].

Durante el desarrollo, las neuronas GnRH se originan en la placoda olfativa y migran de forma ordenada y dirigida hasta ubicarse en las áreas rostrales del hipotálamo, particularmente en el septo medio, la banda diagonal de Broca y el POA. En primates y roedores se ha localizado adicionalmente una región de núcleos inmunoreactivos a GnRH en la porción caudal del área retroquiasmática, en el hipotálamo medio-basal y en el núcleo ARC [14, 15]. A pesar de la amplia distribución neuroanatómica de las neuronas GnRH, la práctica totalidad de ellas extienden sus prolongaciones axónicas sobre los plexos capilares de la eminencia media, donde liberan el neuropéptido en forma de pulsos altamente sincronizados [16].

El GnRH se sintetiza, a partir de la expresión de un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en forma de un precursor de 921 aminoácidos (aa) denominado preproGnRH [17](**Fig. 3**). Este gran péptido incluye un péptido señal de 23 aa, el decapeptido GnRH seguido de un sitio de procesamiento proteolítico (Gly-Lys-Arg), y otro péptido de 56 aa denominado péptido asociado a GnRH

(GAP). La conformación biológicamente activa de GnRH contiene un pliegue en la región central de la molécula (Gly6) [18].

El perfil de secreción de GnRH no es constante a lo largo del desarrollo. En roedores y humanos, la secreción de GnRH se incrementa durante el periodo fetal tardío y neonatal temprano y, posteriormente, disminuye, manteniéndose en niveles mínimos hasta la pubertad [18, 19]. Tras la pubertad, la liberación de la hormona de incrementa y se realiza de forma pulsátil, con pulsos de liberación cada 30-120 min que, a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario, llegan a los gonadotropos donde estimulan la síntesis y liberación de gonadotropinas [20].

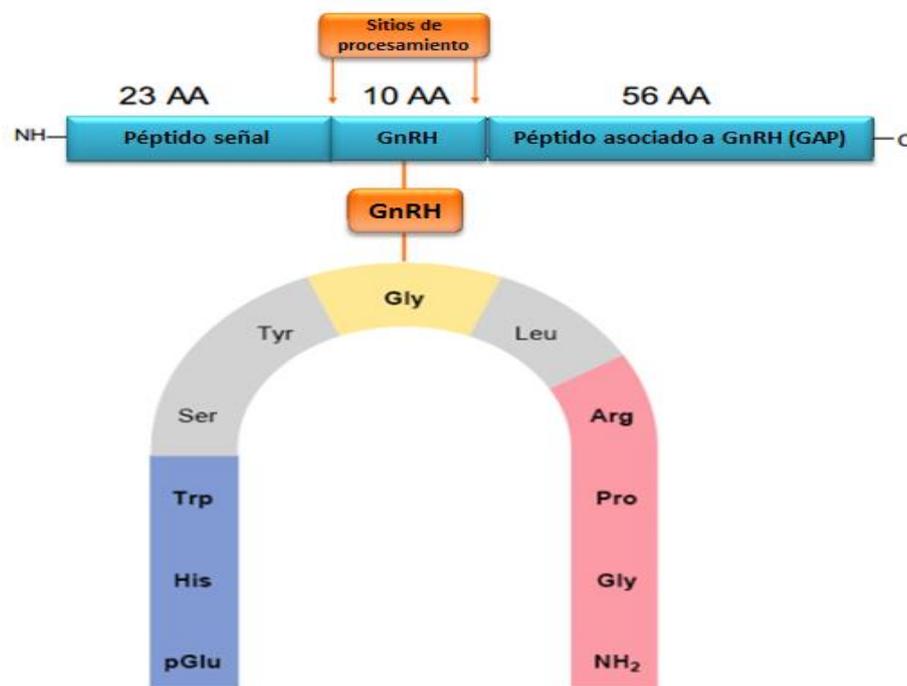


Figura 3. Síntesis de GnRH y relación entre estructura y afinidad del péptido. Los residuos amino-terminales (azul) intervienen en la activación del receptor, mientras que el residuo Gly en posición 6 (amarillo) permite al GnRH adquirir la conformación necesaria (giro- β) necesario para interactuar con los receptores de mamíferos. Los residuos del extremo carboxiterminal (rosa) son requeridos para la especificidad y unión de alta afinidad con el receptor de GnRH. Tomado con modificaciones de [21].

Las acciones biológicas de GnRH se llevan a cabo tras su interacción con un receptor de superficie acoplado a proteína G (GPCR) denominado GnRH-R. Éste posee un dominio NH₂-terminal seguido de 7 hélices transmembrana conectadas

entre sí por medio de 3 dominios extracelulares y 3 intracelulares. Los dominios extracelulares y las regiones superficiales de los dominios transmembrana son las responsables de la unión a GnRH, mientras que las hélices transmembrana parecen estar implicadas en la configuración y el cambio conformacional que sufre el receptor como consecuencia de su activación [22].

1.1.2. HIPÓFISIS

La hipófisis está situada en la silla turca del esfenoides y se conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisario, mediante una zona de unión denominada eminencia media (**Fig.4**). Fisiológicamente puede dividirse en dos regiones:

- ❖ **Adenohipófisis:** procede de la evaginación de la bolsa de Rathke del ectodermo bucal y está compuesta por la pars distalis, la pars tuberalis y la pars intermedia. El conjunto de la pars distalis y la pars tuberalis constituyen el lóbulo anterior. En la adenohipófisis hay dos tipos fundamentales de células: las granulares, que sintetizan hormonas y las agranulares. Dentro de las granulares existen varias poblaciones y todas responden a neurotransmisores y péptidos hipotalámicos que llegan a través de la circulación portal hipotálamo-hipofisaria. Estas poblaciones celulares reciben su nombre en función de la(s) hormona(s) que sintetizan y así encontramos: células somatotropas o productoras de hormona del crecimiento (GH); lactotropas o productoras de prolactina (PRL); lactosomatotropas o productoras tanto de GH como de PRL; tiotropas o productoras de hormona estimulante del tiroides (TSH); corticotropas o productoras de hormona estimulante de la corteza adrenal (ACTH); y gonadotropas, que sintetizan LH y FSH [23].
- ❖ **Neurohipófisis:** procede de una evaginación de la base del 3v del ectodermo neural [2]. Está compuesta por la pars nervosa, la pars infundibularis y la eminencia media. El conjunto de la pars nervosa y la pars infundibularis forma el lóbulo posterior. Contiene los terminales nerviosos de neuronas cuyos somas se localizan en el SON y PVN, y almacena y libera oxitocina y hormona antidiurética o vasopresina.

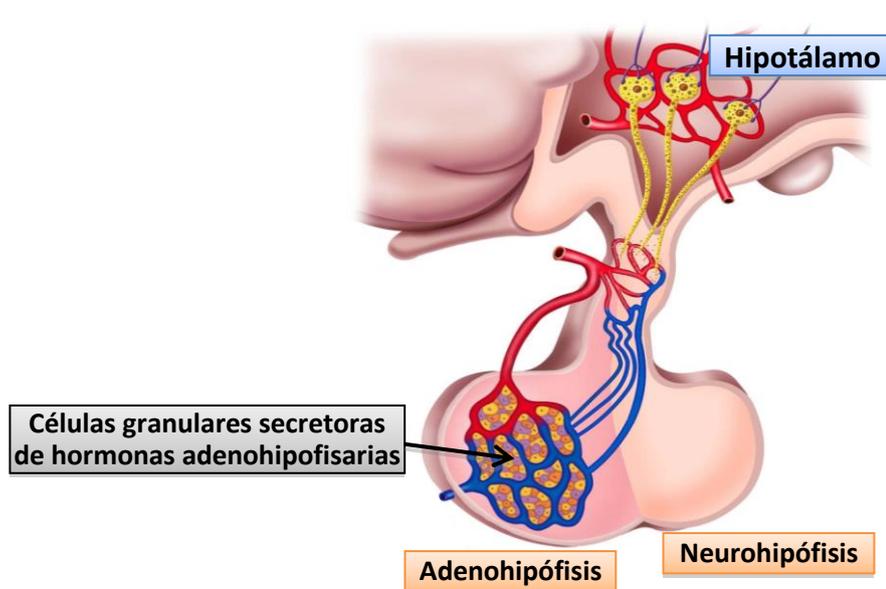


Figura 4. Representación esquemática de la hipófisis.

❖ Gonadotropinas LH y FSH

Las gonadotropinas LH y FSH, junto a la gonadotropina coriónica (hCG) y la TSH, se integran en la familia de hormonas glicoprotéicas, caracterizada por poseer glicosilaciones postraduccionales [24]. La LH, FSH y TSH son producidas por la hipófisis, mientras que la hCG procede de la placenta. Todas están formadas por dos subunidades asociadas de forma no covalente, una subunidad α común, con una estructura polipeptídica idéntica de 92 aa y codificada por un gen localizado, en humanos, en el cromosoma 6 y una subunidad β que es específica de cada hormona. La actividad biológica de las gonadotropinas requiere de la asociación de ambas subunidades, siendo la subunidad β la que confiere la actividad específica de cada hormona.

Los genes que codifican para la subunidad β están localizados en cromosomas diferentes, excluyendo la LH y hCG que forman un clúster de genes (un gen LH β y seis genes hCG β) en el cromosoma 19 [25]. En humanos, las distintas subunidades β presentan entre 111-145 aa [26]. En roedores, las gonadotropinas hipofisarias presentan características estructurales similares a las humanas, si bien no existe producción placentaria de gonadotropina coriónica.

Las gonadotropinas ejercen sus acciones mediante su unión a receptores de superficie acoplados a proteína G [27]. Tanto la LH como la hCG comparten el

mismo receptor (el receptor de LH/hCG o LH-R), mientras que la FSH emplea un receptor específico (FSH-R) [24]. Los receptores para gonadotropinas, a través de su interacción con las proteínas G, activan varias isoenzimas adenilatoclasas, resultando en la elevación de los niveles intracelulares de AMPc en las células diana. Adicionalmente, se ha comprobado que estos receptores pueden activar otras rutas de señalización, incrementando el recambio de fosfatidilinositoles, elevando así el Ca²⁺ intracelular [28-30].

La localización de los receptores de gonadotropinas es fundamentalmente gonadal, aunque hallazgos relativamente recientes han puesto de manifiesto la expresión de LH-R en tejidos extragonadales [31]. En el ovario, el LH-R se expresa mayoritariamente, en las células de la teca, las células lúteas y las células intersticiales [32] y media las acciones ováricas de la LH tales como la síntesis de estrógenos y progesterona, la ovulación o la formación del cuerpo lúteo. En el testículo, ha sido identificado, principalmente, en las células de Leydig siendo indispensable para la síntesis de testosterona por las mismas. En cuanto al FSH-R, se expresa en el ovario, fundamentalmente, en las células de la granulosa donde es necesario para el desarrollo folicular y la síntesis de hormonas de naturaleza proteica (activinas, inhibinas y folistatina) [33], mientras que en el testículo ha sido identificado principalmente en las células de Sertoli, resultando imprescindible para la síntesis de proteínas tales como la proteína que fija andrógenos o las inhibinas [34].

1.1.3. GÓNADAS

Las gónadas, testículos y ovarios, desempeñan una doble función en ambos sexos, la producción de gametos maduros a partir de células germinales (gametogénesis) y la síntesis y liberación de hormonas (hormonogénesis), que regulan entre otras, la producción de dichos gametos.

1.1.3.1. TESTÍCULOS

Los testículos de mamíferos son estructuras pares y ovaladas cuyas principales funciones son la producción de espermatozoides y la síntesis de andrógenos y hormonas de naturaleza proteica como la hormona antimulleriana o las inhibinas. Las distintas funciones del testículo se apoyan en una estructura celular diversa, en la que son necesarias interacciones entre las distintas

poblaciones celulares para lograr la función gonadal completa. El testículo se organiza en dos compartimentos celulares distintos, el intersticial y el tubular [35].

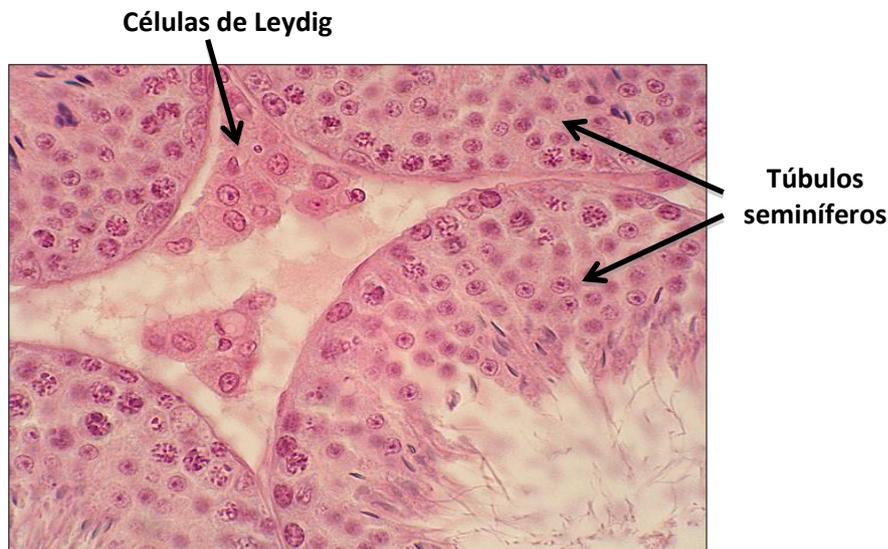


Figura 5. Organización del testículo en dos compartimentos principales: uno es el espacio intersticial, cuyo tipo celular principal son las células endocrinas o de Leydig; el otro es el compartimento tubular formado por los túbulos seminíferos.

En el intersticio testicular se localizan los siguientes tipos celulares: células de Leydig, macrófagos, linfocitos, células fibroblásticas del estroma y células endoteliales [36]. El principal tipo de células del compartimento intersticial son las células de Leydig (**Fig.5**) que en respuesta a la unión de la LH a sus correspondientes receptores sintetizan testosterona (T) a partir del colesterol, así como otros tipos de hormonas de naturaleza esteroidea [37]. Parte de la T sintetizada permanece en el testículo, donde estimula la espermatogénesis, y parte es secretada a la circulación sistémica, donde se transporta de forma mayoritaria unida a proteínas plasmáticas como la albúmina o globulinas, entre éstas especialmente a la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG). El efecto androgénico de la T en los tejidos diana periféricos requiere de su metabolización a dihidrotestosterona (DHT) [38]. Por el contrario, las acciones centrales de la T se llevan a cabo como tal o tras su aromatización a estradiol. Las principales funciones de los andrógenos son la regulación de la secreción de LH y FSH por las células gonadotropas hipofisarias (mediante mecanismos de retroalimentación negativa tanto hipotalámica como hipofisaria), el estímulo de las fases tardías de la

espermatogénesis, la diferenciación sexual del embrión, la maduración sexual en la pubertad, así como el mantenimiento de las características sexuales secundarias y el comportamiento sexual del macho [38].

En los túbulos seminíferos se localizan las células germinales, las células de Sertoli y las células peritubulares (**Fig.5**) [36]. Las células de Sertoli sirven de sostén a las células germinales [39] y presentan receptores a FSH. Sintetizan numerosas proteínas esenciales para el correcto funcionamiento del testículo entre las que se encuentran la proteína fijadora de andrógenos intratesticular (ABP) y las activinas e inhibinas que, una vez liberadas a la circulación general, actúan a nivel hipofisario regulando específicamente la liberación de FSH [40-42].

1.1.3.2. OVARIOS

Las principales funciones de los ovarios son la producción de gametos fertilizables (oogénesis) y la síntesis y secreción de hormonas de naturaleza esteroidea y peptídica esenciales, entre otras funciones, para la regulación del eje reproductor [38, 42]. El primer nivel de organización folicular es el *folículo primordial*, constituido por un oocito primario rodeado por una monocapa de células foliculares denominadas células de la granulosa. Este folículo primordial, tras sufrir una serie transformaciones sucesivas, conduce a la formación de los *folículos primarios*, donde el oocito aumenta de tamaño y comienza la acumulación de polisacáridos entre el oocito y las células de la granulosa; los *folículos secundarios* se caracterizan por un aumento de las células de la granulosa, que determinarán la producción del principal estrógeno en hembras, el 17β -estradiol (E2) y el reclutamiento de las células que originarán la teca interna; los *folículos antrales*, que se caracterizan por el incremento de capas de células de la granulosa y el reclutamiento de unas células intersticiales que formarán una capa rodeando a la teca interna, dando lugar a la teca externa y la formación del antro folicular; y, finalmente el *folículo pre-ovulatorio o de De Graaf* que, tras su ruptura mediada por la LH, permite la salida del oocito secundario del ovario (**Fig.6**).

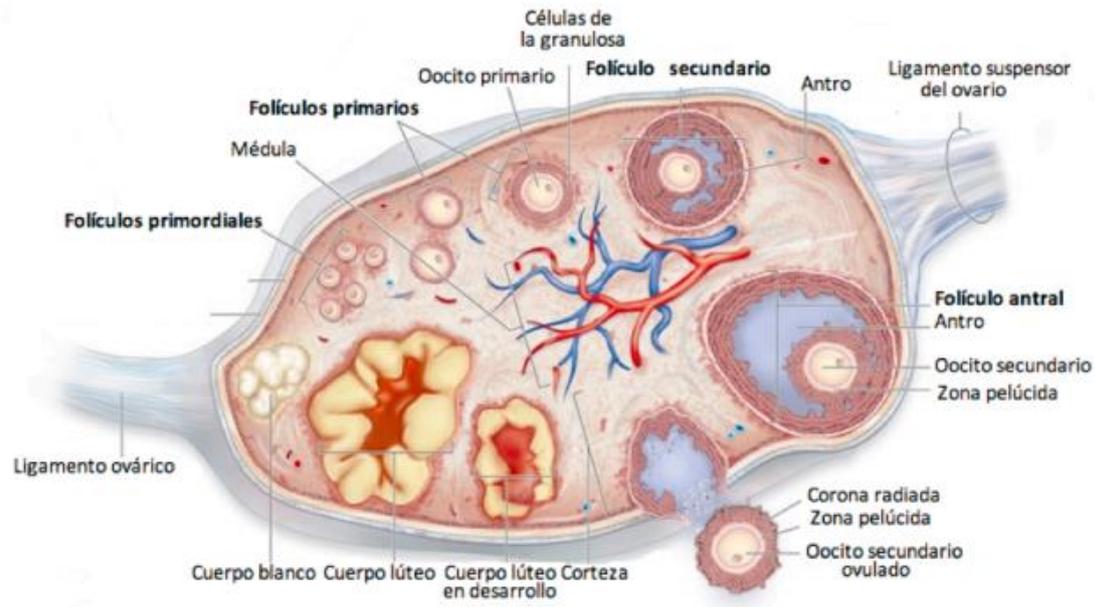


Figura 6. Estructura anatómica del ovario. El ciclo folicular consta de dos fases separadas por la ovulación: 1) fase folicular, donde maduran los folículos y 2) fase lútea, en la que se origina el cuerpo lúteo tras la ovulación. Tomado de [43].

El control de la función ovárica es llevado a cabo por la LH y la FSH, siendo fundamentales en el proceso de crecimiento folicular. Además, diversos factores paracrinos también intervienen en la modulación del crecimiento folicular, destacando entre ellos el estradiol, algunos factores de crecimiento (IGF-1 y 2, EGF, TGF- α y β y FGF- β), inhibinas y citoquinas (IL-1) [3, 44, 45].

Las hormonas sexuales producidas en el ovario son fundamentalmente el 17β -estradiol y la progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de 17α -hidroxiprogesterona, androstenediona, testosterona y estrona.

La rata hembra presenta variaciones cíclicas en su actividad reproductora y cambios en el epitelio vaginal que se repiten cada 4 días. Entre estas variaciones, el epitelio vaginal muestra cambios que coinciden con las diferentes fases del ciclo ovárico denominadas, diestro-1 (D-1), diestro-2 (D-2), proestro (PRO) y estro que son el resultado de los cambios en la secreción ovárica de esteroides (**Fig.7**). La ovulación se produce en las primeras horas del día del estro y es desencadenada por la liberación preovulatoria de gonadotropinas que tiene lugar en la tarde del proestro [46, 47]. En el caso de la ratona, la duración de los ciclos estrales varía de 4-6 días según las líneas de ratones de laboratorio.

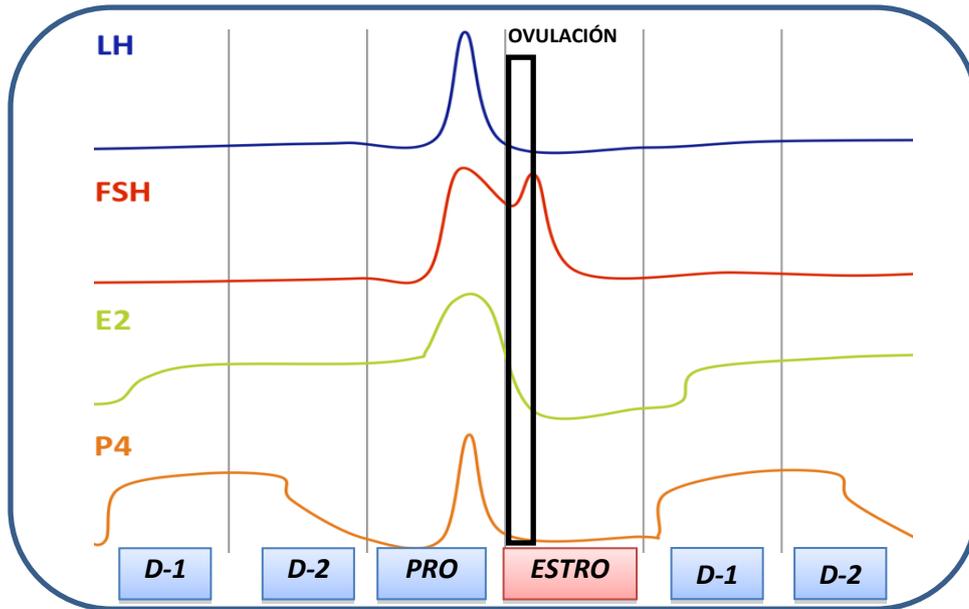


Figura 7. Perfiles de secreción de las hormonas hipofisarias y ováricas durante el ciclo estral de la rata. Fases del ciclo estral: D-1: diestro-1; D-2: diestro-2; PRO: proestro; y Estro. E2: estradiol. P: progesterona. Tomado con modificaciones de [48]

1.2. REGULACIÓN DEL EJE HHG

Sobre el eje HHG opera un elevado número de señales de origen central y periférico que actúan modulando la actividad de las neuronas GnRH, siendo este péptido el efector final de un conjunto amplio de reguladores que intervienen en el control neuroendocrino de la reproducción.

1.2.1. REGULADORES CENTRALES

Se ha descrito un gran número de neurotransmisores y neuropéptidos con capacidad para estimular o inhibir la síntesis y/o secreción de GnRH. Entre ellos destacamos los siguientes:

1.2.1.1. SEÑALES EXCITATORIAS

- ❖ **Kisspeptinas.** Las Kisspeptinas se han mostrado como una de las señales más relevantes en el control de la función reproductora y, por su especial interés en esta tesis, serán descritas en la sección 1.3.

❖ **Aminoácidos excitatorios (EAA).** El EAA más representativo es el glutamato o ácido L-glutámico. Además, es considerado el EAA excitatorio más potente a nivel hipotalámico y esto es debido, en parte, a que las neuronas GnRH reciben directamente proyecciones de neuronas glutamatérgicas [49]. Este EAA ejerce sus acciones a través de dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los *receptores ionotrópicos* son canales iónicos y se clasifican en varios subtipos denominados: N-metil D-aspartato (NMDA), kainato (KA) y ácido 2-amino-3-hidroxy-5metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) [50, 51]. La aplicación de técnicas electrofisiológicas ha permitido determinar que estos receptores pueden coexistir en un mismo tipo neuronal [52]. Los *receptores metabotrópicos* (mGluRs) están acoplados a proteínas G y de ellos existen, al menos, 8 subtipos que han sido clasificados en tres grupos. El primer grupo (mGluR1 y mGluR5) activa a una fosfolipasa C, mientras que los miembros del segundo (mGluR2 y mGluR3) y el tercer grupo (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8), a excepción del mGluR6 que activa a una GMPC fosfodiesterasa, están acoplados negativamente a la adenilatociclasa [53, 54].

Las neuronas GnRH expresan en sus terminaciones axónicas en la eminencia media receptores ionotrópicos al glutamato [55, 56]. *In vivo*, la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de agonistas de receptores de glutamato es capaz de inducir la liberación de LH [57] e, *in vitro*, se han demostrado acciones directas del glutamato, a nivel hipofisario, sobre la secreción de LH (58). Adicionalmente, los antagonistas de los receptores tipo NMDA y no-NMDA son capaces de bloquear el efecto estimulador previamente desencadenado por sus agonistas [58]. Además, el glutamato media parte de los efectos que los esteroides gonadales ejercen en el control de la secreción de GnRH. Así, estudios inmunohistoquímicos (IHC) demostraron la colocalización de los receptores de hormonas esteroideas ($ER\alpha$, $ER\beta$ y AR) con los receptores tipo NMDA y no-NMDA en varios núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la liberación de GnRH [59]. La importancia de la señalización glutamatérgica mediada por mGluRs sobre las neuronas GnRH no está del todo estudiada.

❖ **Neuroquinina B (NKB).** La neuroquinina B (NKB) es un neuropéptido de 10 aa perteneciente a la familia de las taquiquininas. Está codificado por el gen

TAC3 en humanos y por el gen *Tac2* en roedores. Las taquiquininas tienen en común un motivo carboxilo FXGLM-NH₂, donde X es un residuo hidrófobo determinante para la activación de su receptor y actúan sobre tres tipos de receptores acoplados a proteína G, denominados NK1R, NK2R y NK3R [60]. NK3R es el receptor más selectivo y con más alta afinidad de unión y activación por la NKB [61]. Dada la amplia distribución cerebral del sistema NKB/NK3R, en los últimos años se ha propuesto la participación de la NKB en el control nervioso de múltiples funciones, como la modulación de la corteza motora y la regulación de la función reproductora [62, 63]. En este sentido, los primeros análisis por IHC de la expresión del NK3R se realizaron en rata y ratón y pusieron de manifiesto la presencia de NK3R en los axones de las neuronas GnRH, apoyando la hipótesis de un posible efecto directo de NKB sobre estas neuronas [64]. Más recientemente, en ovejas, los análisis por IHC han demostrado la existencia de numerosas neuronas y fibras inmuno-reativas a NK3R (NK3R-IR) en el POA y varias regiones del hipotálamo como el núcleo arcuato ARC [65]. A pesar de los efectos contradictorios de NKB sobre la secreción de LH que se encontraron en los primeros estudios [61, 63, 66] y el hecho de que ratones mutantes para *Tacr3* han mostrado ser aparentemente fértiles [67], datos recientes obtenidos en diferentes especies (oveja, mono, rata y ratón) señalan un efecto estimulador de NKB sobre la secreción de GnRH/LH [68-71]. Además, el sistema NKB/NK3R ha sido implicado recientemente en la regulación del eje reproductor en humanos tras la identificación de mutaciones inactivantes en los genes *TAC3/TACR3* en casos de hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) [72]; fenotipo que ha sido recientemente confirmado, al menos de forma parcial, en ratones [73].

- ❖ **Catecolaminas.** Se ha considerado que las neuronas adrenérgicas, a través de la adrenalina y la noradrenalina (NE), juegan un papel relevante en el proceso de activación de las neuronas GnRH y en la modulación de la liberación pulsátil de GnRH/LH [74, 75]. Existen diferentes tipos de receptores adrenérgicos: α_1 , α_2 , β_1 y β_2 , cada uno de los cuales presenta agonistas y antagonistas específicos, teniendo los receptores- α una acción opuesta a la de los receptores- β en el control de la función reproductora. Las primeras evidencias que hicieron sospechar la posible implicación de las catecolaminas

en el control de la secreción de GnRH surgieron de la observación de que, tanto la eliminación de neuronas noradrenérgicas en el tronco encefálico, como la inhibición de los receptores α -adrenérgicos provocaban una disminución de la secreción pulsátil de LH [76]. En apoyo del control catecolaminérgico de la función reproductora, se comprobó que las neuronas noradrenérgicas del tronco encefálico emitían proyecciones hacia las neuronas GnRH, propiciando el establecimiento de sinapsis entre ambas [76]. Además, se ha demostrado la presencia de receptores α -adrenérgicos en neuronas GnRH y células GT1-7 [77]. Por otra parte, la adrenalina parece estar implicada en la estimulación de la liberación pulsátil y preovulatoria de GnRH, mientras que la noradrenalina se encuentra más relacionada con la frecuencia de pulsos de LH [78].

- ❖ **Galanina (GAL).** La GAL es un neuropéptido de 29 aa [79] que actúa a través de su interacción con 3 tipos de receptores de membrana acoplados a proteína G: GAL-R1, GAL-R2 y GAL-R3 [80]. En varias especies, que incluyen a la rata y al ratón, se ha descrito que un pequeño número de neuronas GnRH expresan GAL y su receptor GAL-R1 [81-83], lo que ha reforzado la idea del posible control por GAL de la liberación de GnRH [84]. A estos receptores también se une el péptido GALP (péptido similar a galanina). Este péptido hipotalámico, de acción similar a la galanina, está regulado positivamente por diversos factores relacionados con el metabolismo energético como son la leptina, la insulina o las hormonas tiroideas, lo que hace pensar que podría estar implicado en el control integrado del metabolismo y la reproducción [85].
- ❖ **Óxido nítrico (NO).** El NO es sintetizado en el organismo por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Diversos estudios farmacológicos demuestran que el NO es un modulador importante de la secreción de GnRH, contribuyendo al establecimiento del pico pre-ovulatorio de GnRH/LH [86]. Además, la infusión de un inhibidor de la NOS, el L-NAME, dentro de la región preóptica o en la eminencia media, causa la disrupción de la ciclicidad estral en la rata [87]. Del mismo modo, el tratamiento con el precursor del NO en el POA y la eminencia media produce un incremento en los niveles de GnRH [88]. Adicionalmente, se

ha comprobado que el NO es capaz de estimular la liberación de GnRH *in vitro* en neuronas GT1-7 [89, 90].

1.2.1.2. SEÑALES INHIBIDORAS

- ❖ **Ácido γ -aminobutírico (GABA).** El GABA es el neurotransmisor inhibitorio aminoacídico más abundante en el cerebro [91] y es liberado tras la entrada de Ca^{2+} extracelular [92]. Existen tres tipos de receptores para el GABA: GABA_A , GABA_B y GABA_C . La mayor parte de las acciones descritas para el GABA a través de sus receptores GABA_A y GABA_B en neuronas GnRH y la línea neuronal GT1-7 indican que este neuropéptido inhibe la secreción de GnRH tanto directa como indirectamente [93, 94]. Aunque estudios farmacológicos atribuyen un efecto inhibitorio del GABA sobre la liberación de GnRH, estudios electrofisiológicos en ratonas adultas sugieren que GABA podría tener también efectos excitatorios [95]. Estudios posteriores en neuronas GT1-7 demostraron que existía una acción bifásica del GABA sobre la secreción GnRH, donde la estimulación inicial va seguida de una inhibición prolongada [96]. La aplicación *in vivo* de agonistas específicos de los receptores GABA_A y GABA_B indican que las acciones del GABA están mediadas, mayoritariamente, por los receptores GABA_A , ejerciendo un efecto inhibidor de la secreción pulsátil y preovulatoria de GnRH/LH [97].
- ❖ **Opioides endógenos (EOPs)** Los péptidos opioides endógenos (EOPs) se clasifican en tres grupos: encefalinas, β -endorfinas (β -END) y dinorfinas (Dyn). Estos ejercen sus efectos en el sistema nervioso central (SNC) actuando sobre tres tipos de receptores μ , κ y δ . La β -END y la Dyn, actúan vía μ -receptor y κ -receptor, respectivamente [98, 99]. Los EOPs son potentes inhibidores fisiológicos de la secreción de GnRH/LH [100]. Así, el sistema β -END/ μ -receptor parece jugar un importante papel en el control del pico de GnRH/LH [101] y el sistema Dyn/ κ -receptor desarrollaría un efecto inhibidor sobre la secreción de GnRH mediando el fenómeno de retroalimentación negativa ejercida por la progesterona sobre la frecuencia de pulsos de LH [102]. Dado que no se ha detectado la expresión de receptores para EOPs en neuronas GnRH, pero que estos se localizan en el área preóptica y el hipotálamo [103, 104], se ha sugerido que la acción inhibitoria de la β -END y

la Dyn sobre las neuronas GnRH podría desarrollarse mediante neuronas interpuestas [76].

- ❖ **Neuropéptido Y (NPY)** El NPY es uno de los neurotransmisores más abundantes del SNC [105], y está considerado como un modulador esencial en el control de la función reproductora. Se expresa en el núcleo ARC y en el tallo encefálico y su expresión está regulada, en parte, por los estrógenos. Ejerce sus efectos mediante la activación de GPCR, de los que se han descrito 5 tipos: Y1, Y2 Y4, Y5 e Y6. Se ha comprobado que las neuronas GnRH expresan el Y5 [106] y que éste está implicado en el efecto inhibitorio de NPY sobre la secreción de LH [107]. La acción inhibitoria de NPY sobre la secreción de GnRH/LH ha sido demostrada tanto en machos como en hembras. Así, la infusión i.c.v. de NPY en animales con bajos niveles circulantes de esteroides gonadales, como ratas ovariectomizadas (OVX), resulta en la inhibición de la secreción pulsátil de LH, probablemente a través de la supresión hipotalámica de GnRH [81-83, 108]. Del mismo modo, el tratamiento crónico con NPY en el ventrículo lateral inhibe el eje HHG en ratas macho [109].
- ❖ **Hormona inhibidora de Gonadotropinas (GnIH)**, es un inhibidor de la síntesis y liberación de gonadotropinas, identificado inicialmente en aves, que por su especial interés en esta tesis, será descrito en la sección 1.4.

1.2.2. REGULADORES PERIFÉRICOS

La función del eje HHG está regulada de manera precisa por la acción concertada de un grupo diverso de señales de origen periférico. A continuación detallaremos el papel de los factores gonadales en este control, así como el de factores periféricos que informan del estado metabólico del organismo y que también están implicados en esta regulación.

1.2.2.1. FACTORES GONADALES

Los **esteroides gonadales** (estrógenos, andrógenos y progesterona) son producidos principalmente en las gónadas, aunque también, pero en menor medida, en las glándulas adrenales, el cerebro (neuroesteroides) y otros tejidos. Los esteroides gonadales y los neuroesteroides ejercen una gran variedad de efectos sobre el SNC que van desde el control funcional de múltiples circuitos y

neurotransmisores centrales, la regulación de la plasticidad neuronal y el desarrollo cerebral, hasta mecanismos de neuroprotección frente a agentes lesivos [110].

Los esteroides gonadales ejercen la mayor parte de sus acciones a través de su unión a receptores intracelulares denominados: receptor de andrógenos (AR), receptores de progesterona (PR), PR-A y PR-B, y receptores de estrógenos (ER): ER α y ER β . Recientemente se ha descrito que parte de los efectos de los estrógenos se llevan a cabo tras su interacción con receptores ionotrópicos y metabotrópicos que se localizan en la membrana plasmática, activando cascadas de señalización intracelular [111].

Los receptores para los esteroides gonadales se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC (incluyendo el hipotálamo) y en la hipófisis. A nivel hipotalámico se expresan en núcleos relevantes para la regulación de la homeostasis energética, así como también en núcleos implicados en el control de la función reproductora, como el núcleo ARC y el área anteroventral del núcleo periventricular (AVPV) [111, 112].

Hoy en día se ha propuesto que los esteroides gonadales, actuando sobre sus receptores localizados en el núcleo ARC, ejercerían sus efectos de retroalimentación negativa sobre la secreción de LH y FSH, mientras que los estrógenos actuando sobre los ER del AVPV, participarían en la retroalimentación positiva que ellos ejercen sobre la secreción de LH en la hembra [113]. Aunque los estrógenos ejercen una acción directa sobre las neuronas GnRH a través de receptores ER β , que son los únicos que se encuentran en estas neuronas, sus principales efectos parecen estar mediados por neuronas interpuestas que expresarían tanto ER α como ER β . En todo caso, evidencias genéticas y farmacológicas han demostrado que el principal ER implicado en el control de GnRH/LH por retroalimentación, tanto positiva como negativa, es el ER α [114, 115].

Los **péptidos gonadales** (inhibinas, activinas y folistatina) son hormonas que regulan la liberación de gonadotropinas a nivel hipofisario, y que, además, ejercen una acción paracrina sobre las gónadas.

- ❖ *Inhibinas A y B*: son glicoproteínas heterodiméricas formadas por dos subunidades unidas mediante puentes disulfuro. La subunidad inhibina- α

es común para ambas inhibinas que difieren en la subunidad inhibina- β , siendo β -A para la inhibina A (α,β -A) y β -B para la inhibina B (α,β -B) [116]. Estas proteínas son producidas en el testículo por las células de Sertoli y en el ovario por las células de la granulosa. Ambas inhibinas tienen la capacidad de inhibir selectivamente la secreción de FSH por las células gonadotropas [117], además de ejercer una acción paracrina sobre las propias gónadas.

- ❖ *Activinas A, B y AB*: son glicoproteínas heterodiméricas formadas por dos subunidades inhibina β , resultando en la activina A ($\beta A\beta A$), la activina B ($\beta B\beta B$) y la activina AB ($\beta A\beta B$). Se producen en diversos tejidos pero, especialmente, en el ovario y la hipófisis. Todas estimulan directamente la secreción de FSH [118, 119], siendo especialmente destacable la función de las activinas producidas en la hipófisis, que actúan de forma paracrina sobre las células gonadotropas [120, 121].
- ❖ *Folistatinas 315 y 288*: son glicoproteínas de cadena simple con un peso molecular comprendido entre 31 y 49 kDa. Mediante procesamiento (splicing) alternativo, a partir del gen de la folistatina se generan dos proteínas de 315 aa (folistatina 315) y 288 aa (folistatina 288). La variante de 315 aa puede ser posteriormente degradada a folistatina 303. De forma similar a las activinas, las folistatinas se sintetizan en diversos tejidos, incluidos el ovario y la hipófisis, donde ejercen una acción paracrina [122]. Las folistatinas 315 y 288 tienen la capacidad de inhibir, tanto *in vitro* como *in vivo*, la liberación de FSH mediante el bloqueo de las activinas [123].

1.2.2.2. OTROS FACTORES PERIFÉRICOS

Otras señales periféricas, como las hormonas adrenales y tiroideas, pueden influir en la secreción de gonadotropinas. Así, se ha descrito que los glucocorticoides pueden afectar a la función gonadal inhibiendo directamente la síntesis y liberación de GnRH, demostrándose que una elevación de los niveles de glucocorticoides inhibe la secreción de LH en ovejas OVX (139). Igualmente, la disfunción tiroidea tiene un efecto sobre la secreción de GnRH, como se pone de manifiesto por el hecho de que el hipotiroidismo o la tiroidectomía en la rata ejercen un efecto inhibitorio de la secreción de GnRH (140).

Por otro lado, el eje HHG es muy sensible al estado metabólico y energético del organismo. Las señales metabólicas responsables de transmitir esta información al SNC serán tratadas más en detalle en el apartado 1.5.

1.3. SISTEMA Kiss1/Gpr54

En la última década, la demostración de la implicación del sistema Kiss1/Gpr54 en la regulación de la secreción de GnRH ha supuesto un gran avance en el conocimiento de los mecanismos centrales que intervienen en el control de la función reproductora.

Con el propósito de unificar criterios con respecto a la nomenclatura utilizada en esta tesis, utilizaremos *KISS1* y *Kiss1* para denominar al gen y sus transcritos (ARNm) en primates y en roedores, respectivamente. Los productos proteicos del gen *KISS1/Kiss1* se denominarán kisspeptinas. Por otra parte, se denominará al receptor de las kisspeptinas como GPR54 y Gpr54, en primates y roedores, respectivamente, mientras que para los genes/ARNm correspondientes emplearemos *GPR54* y *Gpr54*. Para indicar globalmente el sistema ligando/receptor sin referirnos al tipo de especie, emplearemos el término Kiss1/Gpr54.

1.3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El sistema Kiss1/Gpr54 es un sistema ligando (Kiss1)/receptor (Gpr54), inicialmente identificado en el área de la biología del cáncer. En 1996, el gen *KISS1* fue identificado como un gen supresor de metástasis en una línea celular de melanoma y al ARNm de *KISS1* como un transcrito que estaba sobre-expresado en células tumorales con metástasis suprimida [124], de ahí que al producto derivado de la expresión del gen se le denominara inicialmente metastina. De forma independiente, en 1999, el gen *Gpr54* fue aislado y clonado del cerebro de rata, identificándose en principio como un receptor huérfano asociado a proteínas G, con una homología de más del 40% con el receptor de GAL, pero que no era activado por este péptido [125]. Finalmente, en 2001, tres grupos independientes vincularon funcionalmente al gen *Kiss1* y a la metastina con el receptor Gpr54, definiendo el denominado sistema Kiss1/Gpr54 [126-128].

No fue hasta finales del año 2003 cuando se publicaron las primeras evidencias sobre el papel de este sistema en el control de la función reproductora.

En ese momento, se identificaron diversas deleciones y mutaciones inactivantes del gen *GPR54* en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrofo idiopático (IHH). Esta forma de hipogonadismo central fue observada igualmente en ratones manipulados genéticamente en los que se había inactivado el gen *Gpr54* [129, 130]. El conjunto de estas observaciones sugerían un papel crucial de este sistema en los mecanismos de regulación del eje gonadotrópico.

1.3.2. ELEMENTOS PRINCIPALES: *Kiss1*, KISSPEPTINAS Y *Gpr54*

El gen *KISS1* consta de 3 exones y 2 intrones [131]. El primer exón no es traducido a proteína, el segundo exón contiene 38 pares de bases (pb) no codificantes seguidas de un codón de inicio translacional al que siguen 100 pb codificantes y, finalmente, el tercer exón está compuesto por 332 pb codificantes y un codón de terminación de la translación seguido de una señal de poliadenilación. En el ratón, el gen *Kiss1* consta de 2 exones codificantes, el primero codifica para el péptido señal y parte de la proteína prepro-kisspeptina y el segundo codifica para la secuencia restante de la proteína precursora [132] (**Fig.8**).

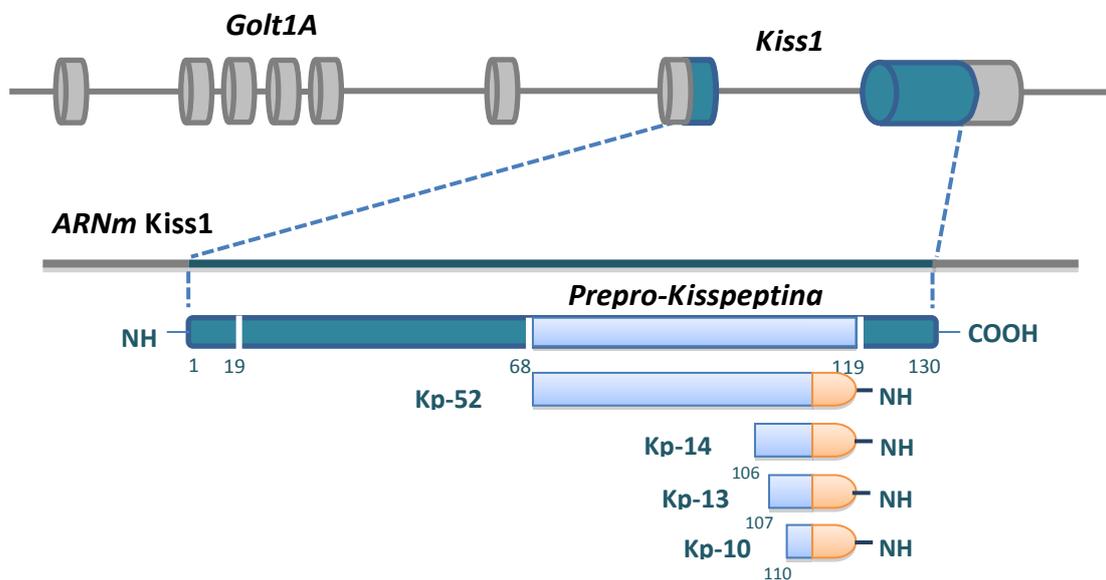


Figura 8. Representación esquemática de la generación de las kisspeptinas a partir del gen *Kiss1* en roedores. La región codificante para las kisspeptinas está localizada en los dos exones del gen *Kiss1*, que se encuentra próxima al gen *Golt1a*. La proteína generada es una proteína precursora, prepro-kisspeptina. El procesamiento proteolítico genera los diferentes fragmentos activos, Kp-52, Kp-14, Kp-13 y Kp-10 en el extremo amino terminal. Tomada con modificaciones de [133].

Las kisspeptinas se obtienen por el procesamiento proteolítico diferencial de un precursor común denominado prepro-kisspeptina que consta de 145 aa y que da lugar, como producto mayoritario, a la metastina o kisspeptina-54 (Kp-54) en humanos o kisspeptina-52 en roedores. A partir de la Kp-54/Kp-52 se originan una serie de fragmentos que, dependiendo del número de aa de que están compuestos, se denominan Kp-14, Kp-13 y Kp-10, siendo este último el fragmento más pequeño con actividad biológica [126, 128, 134]. Todos los fragmentos comparten la región C-terminal de Kp-54/Kp-52, que contiene un motivo ArgPhe-NH₂ característico de la familia de péptidos RF-amida. Aunque el grado de homología de las secuencias de la proteína precursora entre roedores y humanos es de un 54%, la secuencia proteica de la Kp10 se encuentra altamente conservada en ratón y humano, variando sólo en 1 aa: en la secuencia de Kp-10 de ratón, en posición 10, encontramos un residuo Tyr (YNWNSFGLRY-NH₂) mientras que la secuencia de humano posee un residuo Phe [135].

La organización genómica del gen *GPR54* presenta un mayor grado de homología en su secuencia entre las distintas especies. Este gen consta de 4 intrones y de 5 exones codificantes que transcriben una proteína de 396 aa, que se organiza en un extremo amino-terminal extracelular, responsable de la unión al ligando, seguido por 7 dominios transmembrana y un extremo carboxiterminal intracelular asociado a proteína G [128]. El alto grado de conservación de la secuencia de ARNm y proteína entre especies es indicativo de la importancia de este sistema.

1.3.3. EXPRESIÓN DEL SISTEMA Kiss1/Gpr54

La distribución del sistema Kiss1/Gpr54 ha sido estudiada en una gran diversidad de especies y, aunque su localización y patrones de expresión pueden variar entre ellas, ésta se encuentra íntimamente relacionada con los centros neuroendocrinos reguladores de la función reproductora.

Los primeros estudios en humanos indicaban la presencia del ARNm de *KISS1* en placenta, páncreas, intestino delgado, hígado, testículo y en distintas áreas del SNC, con una expresión destacada en los ganglios de la base y el hipotálamo [124, 126, 127]. La expresión de *Kiss1* en el hipotálamo ha sido demostrada igualmente en otras especies de mamíferos, incluidos los primates no

humanos [114, 136-139]. Aunque se ha demostrado en hipotálamo la presencia de fibras inmunoreactivas a kisspeptinas (Kp-ir) en POA, SON, PVN y DMN [136], estudios realizados en roedores han demostrado que a este nivel, las dos principales poblaciones de neuronas Kiss1 se localizan en el núcleo ARC [63, 71, 140] y en la zona más rostral del 3v, que incluye a los núcleos AVPV y periventricular (PeVN) [137, 138]. Dentro del núcleo ARC, la mayoría de las neuronas Kiss1 coexpresan kisspeptinas con NKB y Dyn y, por ello, se han denominado como neuronas KNDy [62, 141]. En cuanto a la población de neuronas Kiss1 localizada en la zona más rostral del 3v, hay que destacar que muestran un claro dimorfismo sexual, con un mayor número de neuronas Kiss1 en el AVPV de las hembras que en los machos [113, 142].

Las poblaciones de neuronas Kiss1 del núcleo ARC y del AVPV muestran diferencias anatómicas importantes en términos de proyecciones a las neuronas GnRH. En este sentido, se ha descrito un mayor número de proyecciones directas de neuronas Kiss1 procedentes del AVPV [143] que del núcleo ARC, aunque recientemente se han mostrado proyecciones de neuronas Kiss1 de ARC hacia el POA [144], donde se encuentran la mayoría de los somas de las neuronas GnRH. La mayor parte de los trabajos indican que las neuronas de esta localización y más en concreto las neuronas KNDy, proyectan hacia la eminencia media [71, 141], que es donde se encuentran los terminales axónicos de las neuronas GnRH. Esto último hace pensar que, posiblemente, las neuronas KNDy actúen sobre estos terminales o usen neuronas interpuestas para intervenir en el control de la liberación de GnRH.

Gpr54 presenta una distribución similar a la descrita para Kiss1. Así, se localiza principalmente en placenta, páncreas, hígado, músculo esquelético, gónadas, hipófisis, y en distintas áreas del SNC como la corteza cerebral, el cerebelo, el putamen, el tálamo, la médula espinal y el hipotálamo [114, 136-139, 145]. Dentro de este área, en el ratón, se ha detectado la expresión del ARNm de Gpr54 en las neuronas GnRH [146].

1.3.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS KISSPEPTINAS

Los análisis de los mecanismos moleculares mediante los cuales las kisspeptinas ejercen sus efectos sobre las células diana indican que su unión a Gpr54, como receptor acoplado a proteínas Gαq/11, activa a una fosfolipasa C.

Esto produce la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato provocando una acumulación del inositol-(1,4,5)-trifosfato y de diacilglicerol que inducen la movilización del Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} extracelular [126-128, 147]. Adicionalmente, la traducción de las acciones biológicas de las kisspeptinas implica a rutas relacionadas que incluyen a la proteína quinasa C, al ácido araquidónico y la activación de quinasas tipo ERK1/2 y p38 [127, 128, 147].

1.3.5. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS POR LAS NEURONAS Kiss1

Ya en el año 2004, poco después de la descripción del cuadro de HH en humanos derivado de mutaciones inactivantes de *GPR54*, se demostró el potente efecto estimulador de la Kp-10 y la metastina sobre la secreción de LH en los roedores de ambos sexos [148-151]. Estudios posteriores indicaron que la administración, tanto i.c.v. como periférica, de las kisspeptinas induce en mamíferos una potente secreción de LH y FSH en diferentes etapas del desarrollo y diferentes estados fisiológicos, como el embarazo y la lactancia [147-149, 152-157].

Una de las características más destacables de estos estudios fue la observación del incremento rápido y prolongado (>3-h) de LH después de la administración central y periférica de Kp-10 [154, 158], así como también el rango de sensibilidad a Kisspeptina, con dosis mínimas efectivas de 100 fmol/1pmol para la administración central y 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la administración periférica [149, 153, 154, 156, 158]. Estudios farmacológicos detallados han demostrado que los patrones de respuesta de LH y FSH a Kp-10 son diferentes. Así, en estudios en ratas macho se detecta una rápida respuesta (entre 5 a 15 min) y un muy potente efecto (un aumento de hasta 10 veces sobre los niveles basales) en la secreción de LH tras la administración central de Kp-10. En cambio, la secreción de FSH se incrementa solo a partir de los 30 min tras la administración y el aumento que se produce es de ~2 veces respecto a la basal [153]. Igualmente, la sensibilidad de LH y FSH a Kp-10 es diferente, siendo necesarias dosis de Kp-10 de ~2 pmol para LH y de 400 pmol para FSH para obtener el 50% de las respuestas máximas efectivas. Esto podría estar justificado por el hecho de que la secreción de FSH es más constitutiva que la de LH [159] y que la secreción de FSH está regulada, de forma selectiva, por péptidos gonadales como las inhibinas [160].

Otro aspecto de la farmacología de las kisspeptinas es la desensibilización de la respuesta de gonadotropinas después de la exposición mantenida a la señal. Así, la infusión continua de kisspeptinas en ratas, tras una primera fase de hipersecreción de LH, cursa con una falta de respuesta de LH a las 48 horas de iniciarse la administración [161-163].

1.3.5.1. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE GnRH

Tras conocerse el potente efecto que ejercen las kisspeptinas sobre la liberación de gonadotropinas, varios estudios se dirigieron a determinar su lugar principal de acción. Como primera hipótesis se planteó que las kisspeptinas llevaran a cabo su acción estimuladora de LH y FSH a través de la activación de las neuronas GnRH en el hipotálamo. Esta vía de acción fue confirmada, en roedores y monos, por la anulación completa del efecto de las kisspeptinas sobre la liberación de gonadotropinas al administrarse después de un tratamiento con antagonistas de GnRH [149, 150, 153, 154, 164]. Igualmente el efecto directo se confirmó en ratones y ratas al demostrarse que las kisspeptinas son capaces de inducir en las neuronas GnRH la expresión de c-fos [150, 157], así como la despolarización de estas neuronas [152, 165]. Una evidencia más de la acción directa de las kisspeptinas sobre GnRH son los estudios realizados sobre la línea neuronal GT1-7, que responde a la administración de kisspeptinas con un aumento de liberación de GnRH [165, 166]. Recientemente, se ha propuesto la participación de las señales procedentes de las neuronas Kiss1 del núcleo ARC en la regulación de la secreción pulsátil de GnRH [133]. Esta idea quedó reforzada por los estudios en ratas hembras que muestran que la infusión continua de un antagonista de las kisspeptinas en el ARC suprime de manera significativa la pulsatilidad de GnRH [167].

Como vimos en el apartado 1.3.3, en el núcleo ARC existe una población de neuronas KNDy, las cuales coexpresan kisspeptinas con NKB y Dyn; por ello, se ha planteado la posibilidad de la implicación de estos tres péptidos en el control de la secreción pulsátil de GnRH (**Fig.9**). La hipótesis más comúnmente aceptada propone que NKB operaría de forma positiva y Dyn de forma negativa sobre la liberación pulsátil de kisspeptinas por las neuronas KNDy [63, 140]. Aunque los perfiles de expresión y los datos funcionales avalan este modelo, aún no son del

todo conocidas las características anatómicas de esta red; es decir, si las proyecciones de las neuronas KNDy actuarían de forma directa sobre las neuronas GnRH y si esta acción se llevaría a cabo sobre el soma o los terminales nerviosos de las neuronas GnRH [63, 168].

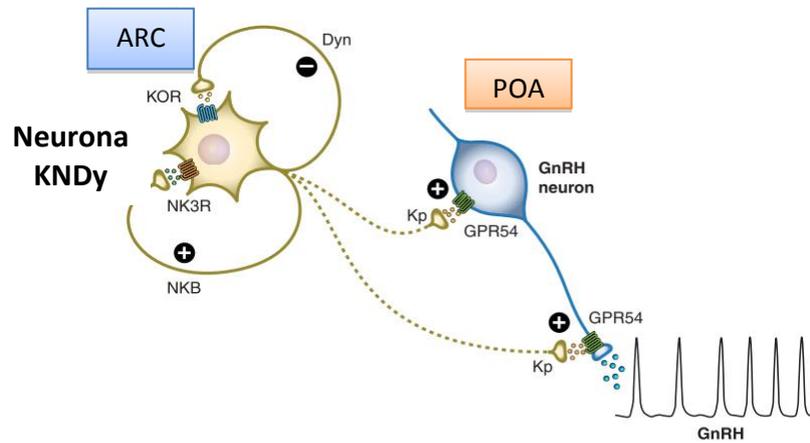


Figura 9. Modelo para explicar el control por las neuronas KNDy del núcleo ARC de los mecanismos de generación pulsátil de GnRH. KOR, receptor- κ opioide de Dyn; NK3, receptor de NK1. Tomado con modificaciones de [169].

1.3.5.2. REGULACIÓN POR RETROALIMENTACIÓN NEGATIVA DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS

Las primeras evidencias de la participación de las neuronas kisspeptérgicas en el feedback negativo de los esteroides gonadales sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas se obtuvieron analizando la expresión hipotalámica de *Kiss1* en roedores gonadectomizados (GNX) reemplazados o no con esteroides sexuales. La GNX en hembras y machos adultos produce un incremento en los niveles de expresión de *Kiss1* que va acompañado también de un aumento de los niveles circulantes de gonadotropinas. Por su parte, el reemplazamiento con T en machos orquidectomizados (ORX) y con E₂ en hembras OVX disminuye tanto los niveles de expresión del gen *Kiss1* como los niveles de gonadotropinas que se encontraban incrementados en respuesta a la GNX [114, 138, 151, 157].

Inicialmente, mediante estudios de hibridación *in situ* (ISH) realizados en rata y ratón, se determinó que los cambios en los niveles del ARNm del gen *Kiss1* indicados anteriormente se producían, específicamente, en el núcleo ARC. Estos estudios se han ampliado y confirmado posteriormente en otras especies de mamíferos que incluyen al humano [139, 170-172].

Con respecto a los receptores implicados, una característica de las neuronas Kiss1 del ARC es que prácticamente todas expresan el ER α , así como el PR y AR [141, 173], mientras que sólo una fracción expresan ER β [114, 138]. Estudios de genómica funcional y farmacológicos han demostrado que el ER α es el principal mediador de los efectos de feedback negativo que los estrógenos ejercen sobre la expresión de *Kiss1* en el ARC [114, 115]. En el mismo sentido, se ha demostrado recientemente en ratones pre-puberales que la eliminación selectiva del ER α en las neuronas Kiss1 del núcleo ARC produce en este núcleo un incremento en la expresión del ARNm de *Kiss1* [174].

Los estudios acerca de los receptores que vehiculan el feedback negativo de la T sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas mediado por las neuronas kisspeptidérgica indican que este se realiza a través del AR y el ER α [114].

De igual modo, se ha propuesto al sistema Kiss1 como mediador de los efectos por retroalimentación positiva de los estrógenos sobre la liberación de GnRH/LH, aspecto que será tratado más ampliamente en el apartado 1.3.7.

1.3.6. PAPEL DEL SISTEMA Kiss1/Gpr54 EN EL CONTROL DE LA PUBERTAD

La pubertad es un periodo crucial para el desarrollo ya que durante este se alcanza la capacidad reproductora. Una pieza clave para desencadenar el inicio de la pubertad es el aumento progresivo de la actividad neurosecretora de las neuronas GnRH, lo que permite alcanzar una máxima liberación de gonadotropinas, posibilitando así la maduración y desarrollo completo de la función gonadal [175, 176]. Se piensa que los patrones de secreción de GnRH que se producen al comienzo de la pubertad son consecuencia del efecto combinado de un aumento de los *inputs* excitatorios y una disminución de los *inputs* inhibitorios que se proyectan sobre estas neuronas [175, 177].

La primera evidencia del papel esencial de la señalización por kisspeptinas en la puesta en marcha de la función reproductora se obtuvo al observar la incapacidad de alcanzar la pubertad en ratones y humanos con mutaciones inactivantes de *Gpr54/GPR54* [130, 178]. Posteriormente, para caracterizar la relevancia fisiológica del sistema Kiss1/Gpr54 en este proceso, se analizaron los patrones de expresión hipotalámica de los elementos de este sistema durante la pubertad. Los resultados obtenidos en estudios realizados en ratas macho y

hembra demostraron un incremento de los niveles de expresión de *Kiss1* y *Gpr54* en el hipotálamo coincidiendo con la llegada de la pubertad [151], un fenómeno que ha sido confirmado en primates, donde se ha demostrado que la expresión del ARNm de *KISS1* y *GPR54* en el hipotálamo de hembras aumenta hasta 3 veces durante la transición de la etapa juvenil al estado puberal [179].

Más específicamente, dentro del hipotálamo, mediante estudios de IHC realizados en rata y ratón, se ha detectado un aumento de neuronas Kp-ir en el AVPV durante el inicio de la pubertad, aunque este aumento es mayor en hembras que en machos [180, 181]. Esta elevación del tono kisspeptidérgico en el AVPV en el momento de la pubertad coincide con un aumento de las proyecciones Kp-ir desde esta área hacia las neuronas GnRH [180]. Los estudios realizados en el núcleo ARC muestran también un aumento de la señal kisspeptidérgica durante la transición puberal en este área [168, 182], aunque de una magnitud más modesta que producida en el AVPV, especialmente en hembras [182].

Con respecto a *Gpr54*, los datos iniciales indicaban que, tanto en rata como mono, se producía un incremento moderado en su expresión hipotalámica durante la pubertad, [151, 179]. Análisis de expresión por ISH y estudios de electrofisiología en ratonas apuntan sin embargo, a que no se produce un incremento detectable del contenido de ARNm de *Gpr54* por célula, sino un aumento gradual de las neuronas GnRH que expresan *Gpr54*, así como un incremento de la eficiencia de este receptor para acoplarse a su efector endógeno en la transición puberal [152].

Todos los datos indicados anteriormente sugieren un aumento del tono kisspeptidérgico durante la pubertad; posibilidad que se ve apoyada por el aumento detectado en el mono de la liberación pulsátil de Kp-54 en la eminencia media durante esta etapa, coincidiendo con la elevación de la frecuencia de pulsos de GnRH característico del inicio de la pubertad [183]. En apoyo del papel esencial de las kisspeptinas en la puesta en marcha de la función reproductora, se ha demostrado que la administración central repetida de Kp-10 en ratas hembras pre-puberales induce un adelanto de la apertura vaginal (utilizado como signo externo de pubertad) y una activación temprana del eje HHG con la consecuente elevación de las gonadotropinas circulantes [184]. De hecho, se ha demostrado que ratas en

estadios tempranos de maduración son capaces de responder a la administración exógena de Kp-10 con una elevación de los niveles de LH [147].

La relevancia funcional de la señalización por kisspeptinas en la maduración puberal ha sido confirmada recientemente por la observación de un retraso en la llegada a pubertad en ratas puberales tras la administración de un antagonista de las kisspeptinas, el péptido 234 [185]. Sin embargo, datos más recientes obtenidos en ratonas evidencian la complejidad de la regulación de la maduración puberal por neuronas Kiss1, puesto que sorprendentemente se ha demostrado que la eliminación congénita de esta población neuronal parece compatible con la adquisición de la capacidad reproductora. Estas observaciones podrían ser indicativas de la activación de mecanismos compensadores (en condiciones extremas de ausencia de neuronas Kiss1) y/o de la implicación de otras poblaciones, distintas de las neuronas Kiss1, con un papel fundamental en la activación puberal del eje HHG [186].

1.3.7. PAPEL DEL SISTEMA Kiss1/Gpr54 EN EL CONTROL DEL PICO PRE-OVULATORIO DE GnRH/LH

Como hemos descrito anteriormente, además de la población de neuronas Kiss1 del núcleo ARC existe, principalmente en roedores, una segunda población de estas neuronas en el AVPV en las que se ha demostrado la presencia del ER α [138]. A diferencia de las neuronas Kiss1 del ARC, estas neuronas responden a la eliminación de los esteroides gonadales (especialmente estrógenos) disminuyendo los niveles del ARNm de *Kiss1* y aumentándola tras el reemplazamiento de estos. Por ello, se ha propuesto un papel mediador de esta población en el efecto de feedback positivo de los estrógenos sobre la secreción de gonadotropinas (**Fig.9**). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que en ratas adultas cíclicas, en la tarde del proestro, se detecta un aumento de la expresión del ARNm de *Kiss1* en el AVPV, coincidiendo con el pico pre-ovulatorio de LH y por la constatación del aumento de la expresión de *Kiss1* en esta localización en las ratas OVX y tratadas con E₂ para inducir exógenamente el pico de LH [113, 187]. Finalmente, la implicación del sistema Kiss1 en la generación del pico pre-ovulatorio de GnRH/LH se ve apoyada por estudios farmacológicos en los que la administración de bloqueantes selectivos de ER α provocan un bloqueo del pico pre-ovulatorio

endógeno de LH y la supresión de la respuesta de LH a la administración de kp-10 en la fase pre-ovulatoria [188].

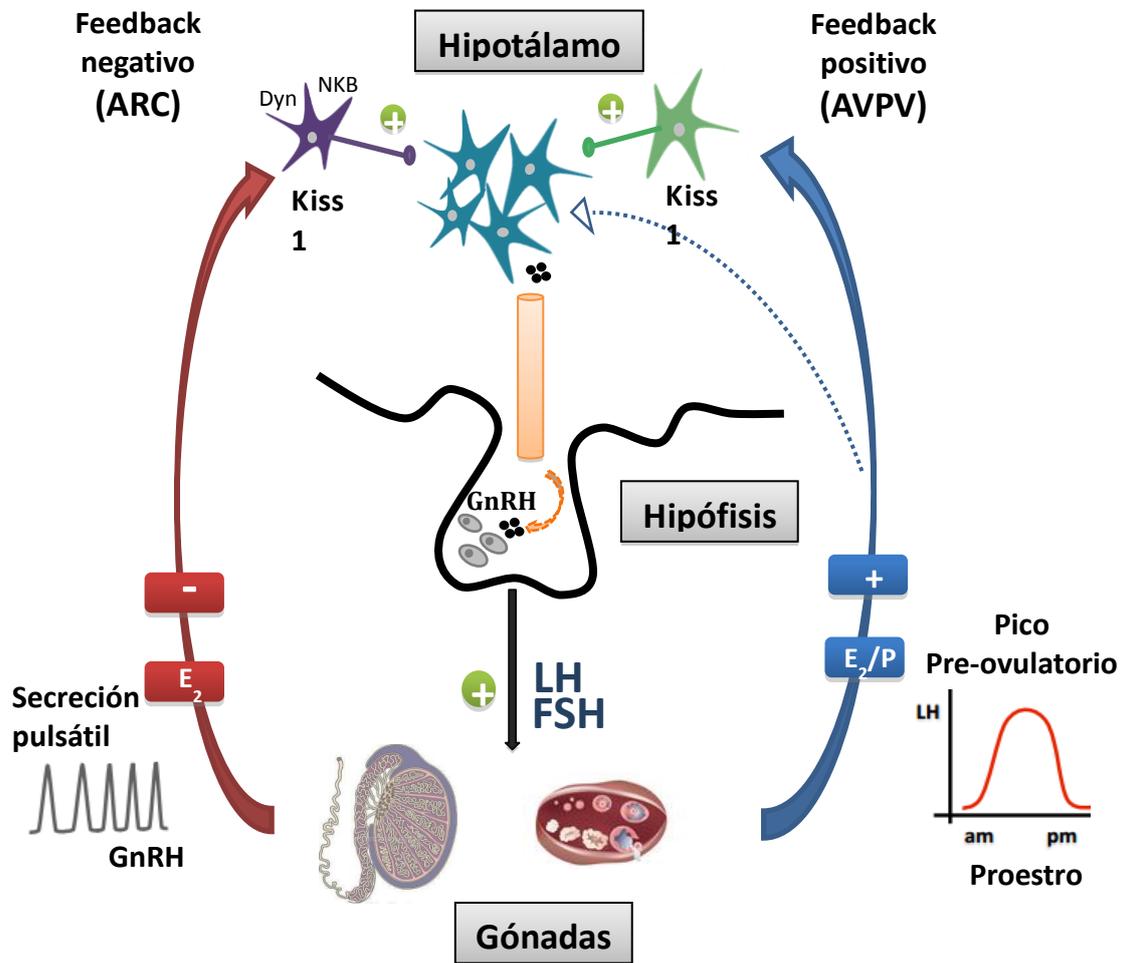


Figura 9. Representación esquemática de los efectos reguladores de los esteroides gonadales (T, E2 y P), en la regulación transcripcional de *Kiss1*. Se ha propuesto a la población de neuronas NKDy del ARC como mediador de los efectos por retroalimentación negativa de la T y el E2 y como reguladora de la secreción pulsátil de GnRH; en cambio, los efectos estimuladores de los esteroides gonadales en el pico pre-ovulatorio estarían mediados por la población neuronal Kiss1 del AVPV.

1.3.8. MODELOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN EL ESTUDIO DEL SISTEMA *Kiss1/Gpr54*

El fenotipo de HH en humanos causado por la inactivación de *GPR54* ha sido reproducido en ratones inactivando los genes *Kiss1* y *Gpr54* mediante mutagénesis dirigida. Aunque éstos ratones son viables desde el punto de vista del desarrollo, son infértiles, por lo que para obtenerlos es necesario el cruce entre parentales heterocigotos [130, 178]. A continuación se realizará una descripción

detallada de los diferentes modelos mutantes del sistema Kiss1/Gpr54 generados hasta hoy.

1.3.8.1 MODELOS ANIMALES MUTANTES EN EL SISTEMA Kiss1/Gpr54

En la actualidad hay descritas cuatro líneas mutantes para *Gpr54* y dos para *Kiss1* [189]. Una de las cuatro líneas transgénicas existentes para *Gpr54* fue generada por inserción retroviral y las otras 3 fueron generadas utilizando la técnica de mutagénesis dirigida (tm, del inglés *targeted mutagenesis*) del locus de *Gpr54*, con deleciones de diferentes longitudes en la secuencia codificante. La nomenclatura de estas líneas transgénicas está regida por las directrices marcadas por el Comité Internacional de Nomenclatura Genética Estandarizada para ratones (www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/index.shtml).

Los dos primeros modelos knock-out (KO) para *Gpr54* aparecieron en el año 2003 (**Fig.10**). Uno de estos modelos fue generado en el laboratorio de W.H. Colledge por Seminara y colaboradores en asociación con Paradigm Therapeutics (PTL). Este ratón, denominado *Gpr54*^{tm1^{PTL}}, posee una deleción de 702 pb en el gen *Gpr54*, que se corresponden con 92 pb de la región codificante del exón 1, la región completa del intrón 1 (509 pb) y las primeras 101 pb del exón 2 [130]. El segundo modelo denominado *Gpr54*^{tm1^{SPR}} fue generado por Schering Plough Research (SPR), y en este caso, fueron deleccionadas 52 pb dentro del exón 2 [178]. Ambas líneas incluyen la región codificante para la enzima β -galactosidasa gracias a lo cual puede detectarse la actividad del promotor de *Gpr54* por el marcaje X-gal de la β -galactosidasa.

En 2007 fueron descritas dos líneas adicionales de mutantes para *Gpr54* (**Fig.10**). Una de ellas, denominada *Gpr54*^{tm1^{HPC}}, fue generada en el laboratorio de S.B. Seminara por Lapatto y colaboradores en asociación con Harvard Partners Centre (HPC). Para la obtención de esta línea se llevó a cabo una deleción completa del exón 2 (125 pb) [132]. La segunda línea, denominada *Gpr54*^{Gt10mer} fue generada por el laboratorio Omeros Corporation (Omer) en asociación con el laboratorio de R. Steiner. En este caso, el modelo fue generado mediante la inserción retroviral de secuencias de terminación de la transcripción (gt, del inglés *gene trapped*) en el intrón 2, sin pérdida de secuencia codificante de *Gpr54*. El retrovirus utilizado consta de dos secuencias señal de poliadenilación después del

exón 2 para detener la transcripción iniciada por el promotor de *Gpr54* [190]. La construcción para *Gpr54^{Gt10mer}* posee además una secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (Gfp) como gen reportero y también una zona que codifica para la proteína transactivadora en respuesta a tetraciclina (rtTA) [190].

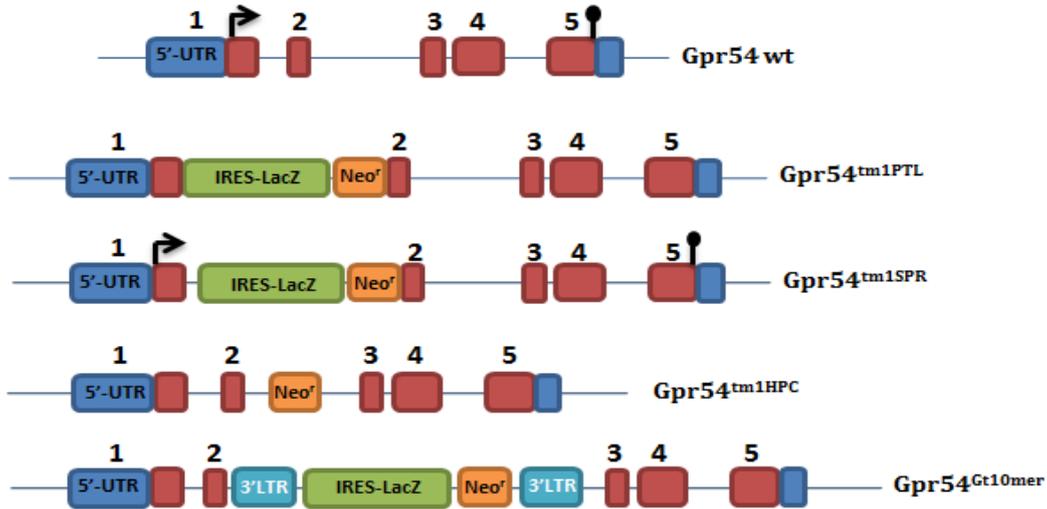


Figura 10. Estructura genómica de *Gpr54* de ratón (wt) y de las diferentes líneas mutantes generadas para *Gpr54*. Generado con modificaciones de (188).

En cuanto a las líneas de ratones mutantes para *Kiss1*, estas fueron descritas por primera vez en 2007. La línea *Kiss1^{tm1PTL}* posee una pérdida completa de la secuencia codificante para *Kiss1* y fue generada en el laboratorio de W.H. Colledge [191]. La segunda línea fue generada en el laboratorio de SB. Seminara, se denominó *Kiss1^{HPC}* y porta una delección en el locus de *Kiss1* del primer exón y, por tanto, la pérdida del codón ATG de inicio de la transcripción [132] (**Fig.11**).

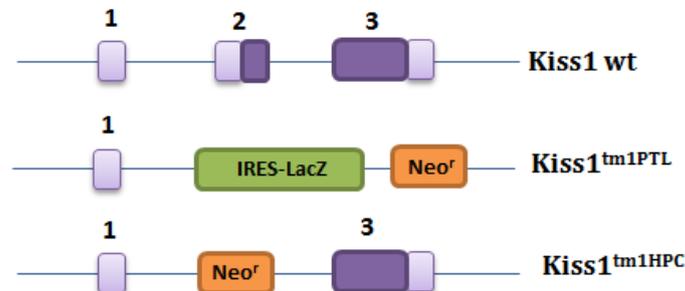


Figura 11. Estructura genómica de *Kiss1* en ratón (wt) y de las diferentes líneas mutantes (KO) generadas. Generado con modificaciones de (188).

1.3.8.2 ANÁLISIS DEL FENOTIPO MUTANTE PARA *Kiss1* Y *Gpr54*: MODELO DE HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPO

Las diferentes líneas de mutantes para *Kiss1* y *Gpr54* presentan un fenotipo general común, lo que indica la ausencia de compensación por otro ligando o la activación de otro receptor. Todos los ratones mutantes se caracterizan por la ausencia de llegada de la pubertad y la presencia de hipogonadismo. A pesar de manifestar un fenotipo similar, los diferentes KOs pueden presentar un cierto grado de variabilidad, siendo esta mayor en los ratones *Kiss1* KO [132].

❖ Análisis anatómico de los animales mutantes en el sistema *Kiss1/Gpr54*.

En 2003, Seminara y colaboradores describen en su primer estudio a los ratones *Gpr54* heterocigotos (*Gpr54*^{+/-}) como fenotípicamente normales y fértiles y a los *Gpr54* KO como infértiles, ya que no presentan ninguno de los rasgos característicos de la maduración sexual [130, 132]. En todas las líneas transgénicas, los machos KO para *Gpr54* y *Kiss1* presentan micro penes y una falta de desarrollo de los órganos sexuales secundarios accesorios. Estos ratones tienen una distancia ano-genital disminuida y los testículos son más pequeños, con pesos de entre un 4% a un 28% del peso respecto a valor de los wild type (WT) (**Fig.12**). Además, presentan una espermatogénesis cualitativa y cuantitativamente anormal y ausencia de espermatozoides en los epidídimos [130].



Figura 12. Análisis macroscópico de los ratones macho adultos *Gpr54*^{+/+} y *Gpr54*^{-/-}. Puede observarse en detalle que los ratones *Gpr54*^{-/-} presentan micropenes (flecha) y una distancia ano-genital reducida. Además, se muestran en detalle los epidídimos (A) y los testículos (B) de ambos genotipos.

Las hembras adultas, tanto *Gpr54*^{-/-} como *Kiss1*^{-/-}, presentan una deficiencia en el desarrollo sexual, con un retraso de varios días en la apertura vaginal en las

mutantes de las líneas $Gpr54^{tm1HPC}$ y $Kiss1^{tm1HPC}$ [132] y un retraso en la apertura más acusado en las líneas $Gpr54^{tm1PTL}$ y $Kiss1^{tm1PTL}$ [130, 191]. Las citologías vaginales de las hembras mutantes de la línea HPC presentan un epitelio no queratinizado y un bloqueo de la ciclicidad estral. Los ovarios de las diferentes líneas son significativamente más pequeños con una reducción de 60-80% del peso con respecto a las hembras WT (**Fig.13**). El análisis histológico de los ovarios muestra un menor número de folículos primarios y secundarios y, ocasionalmente, algún folículo antral temprano, pero en ningún caso folículos de De Graaf o cuerpos lúteos, lo que evidencia ausencia de ovulación. Hay que destacar que esto contrasta con los datos obtenidos en las líneas mutantes $Gpr54^{tm1HPC}$ y $Kiss1^{tm1HPC}$, en las que algunas hembras presentan una foliculogénesis parcial, pero sin evidencias de ovulación [192].



Figura 13. Análisis macroscópico de las ratonas adultas $Gpr54^{+/+}$ y $Gpr54^{-/-}$. Puede observarse en detalle que las ratonas $Gpr54^{-/-}$ no presentan apertura vaginal (flecha). Además, se muestran en detalle los ovarios y el útero de ambos genotipos.

Los machos $Gpr54$ KO de las diferentes líneas mutantes para $Gpr54$ que se han generado presentan un peso corporal inferior en relación a los ratones $Gpr54^{+/+}$, aunque esta diferencia solo es apreciable después de la llegada de la pubertad en los animales WT. En líneas generales, tanto los ratones macho mutantes $Gpr54^{-/-}$ como $Kiss1^{-/-}$ presentan una reducción significativa del peso corporal con respecto al ratón WT [130, 132, 178, 190, 191]; sin embargo, los ratones machos de la línea $Kiss1^{tm1HPC}$ presenta una menor reducción de peso corporal con respecto al ratón WT de la misma edad.

En el caso de las ratonas hembra $Gpr54$ KO, no se aprecia la diferencia de peso corporal que presentan los machos $Gpr54$ KO [130, 178].

El resto de sistemas y órganos son normales tanto en machos como en hembras mutantes para $Gpr54$ y $Kiss1$ de las diferentes líneas descritas.

1.3.8.3 MODELOS ANIMALES DE AUSENCIA DE *Gpr54* RESTRINGIDA A NEURONAS *GnRH*

En la actualidad se disponen de dos nuevos modelos de ratones para el estudio del sistema Kiss1/*Gpr54*, que han sido generados en los laboratorios de A.E. Herbison y G. Schütz.

En el primer modelo, *GnRH-Cre;Gpr54^{f/f}*, se eliminó de forma selectiva *Gpr54* en las neuronas *GnRH*, dando como resultado animales incapaces de llegar a pubertad y por lo tanto infértiles. Por ello, estos ratones, al igual que el modelo *Gpr54* KO, deben ser generados por el cruce de parentales heterocigotos (*GnRH-Cre^{+/-};Gpr54^{f/f}*). En líneas generales, los ratones *GnRH-Cre;Gpr54^{f/f}* muestran el mismo fenotipo que los ratones *Gpr54* KO globales y se caracterizan por no presentar signos externos de llegada de la pubertad, una reducción del 90% del peso de ovarios y testículos, y una disminución significativa de los niveles circulantes de LH y FSH.

En el segundo modelo, *Gpr54^{-/-};Tg*, se llevó a cabo una re-introducción selectiva de *Gpr54* en las neuronas *GnRH*, sobre la base de ratones *Gpr54* KO globales. La fertilidad en estos animales *Gpr54^{-/-};Tg* fue rescatada con el inserto del transgen. En cuanto al fenotipo, éste será descrito en detalle en el apartado 4.3.1., toda vez empleamos el mismo para cubrir algunos de los objetivos de esta Tesis.

1.4. SISTEMA RFRP/NPFF1R

La búsqueda de nuevas señales reguladoras del eje gonadotrópico ha permitido la identificación del GnIH y sus homólogos, los RFRPs, como inhibidores de la liberación de gonadotropinas.

1.4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS: DESCUBRIMIENTO DEL GnIH

La superfamilia de péptidos RF-amida se caracteriza porque todos sus constituyentes tienen en común un motivo Arg-Phe-NH₂ en su extremo C-terminal. En mamíferos, esta familia está formada por 5 grupos denominados: GnIH/RFRP, PQRFa/NPFF, Kisspeptinas, QRFP/26RFa y PrRP, constituido, cada uno de ellos por diferentes péptidos (**Fig.14**).

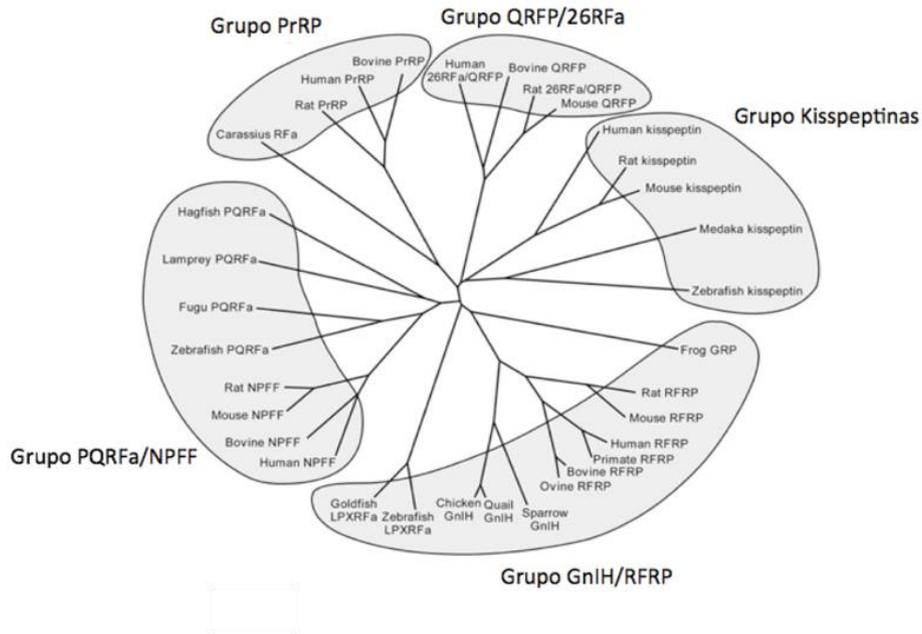


Figura 14. Árbol filogenético de la superfamilia de péptidos RF-amida. Tomado de [193].

En atención a los objetivos de esta Tesis, describiremos con detalle dos de estos grupos de péptidos: el grupo de los PQRFa/NPFF y el grupo de los GnIH/RFRPs. Al primer grupo pertenecen los primeros péptidos RF-amida descritos en mamíferos, el FMRFa (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), que fue identificado en 1977 en el sistema nervioso de invertebrados [194] y, posteriormente en el sistema nervioso de vertebrados [195, 196], el neuropéptido AF (NPAF) y el neuropéptido FF (NPFF) [197], que derivan del procesamiento proteolítico de una pro-hormona codificada por un único gen [198, 199]. Al segundo grupo pertenecen el GnIH aviar y sus homólogos en mamíferos, los RFRP 1 y 3 [200-203].

La primera sugerencia de una posible participación de estos péptidos en el control de la función hipofisaria provino de la observación de que algunas neuronas inmunoreactivas para FMRFa envían proyecciones hacia una región hipotalámica cercana a la hipófisis; participación que ha sido puesta de manifiesto por estudios realizados con posterioridad [195, 196].

En el contexto de los estudios sobre la relevancia fisiológica de los constituyentes de la familia RFamida en el control de la liberación de gonadotropinas, en el año 2000 Tsutsui y colaboradores descubrieron en aves un neuropéptido hipotalámico de 12 aa, SIKPSAYLPLRF-amida (Ser-Ile-Lys-Pro-Ser-Ala-Tyr-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH₂), que poseía la capacidad de inhibir la secreción de gonadotropinas hipofisarias, y por ello fue llamado GnIH (del inglés, *Gonadotropin*

inhibitory hormone) [202]. El interés de este descubrimiento aumentó en 2006 cuando se propuso que los RFRPs podrían jugar un papel en la regulación inhibitoria de la secreción de gonadotropinas en vertebrados superiores [204]

1.4.2. IDENTIFICACIÓN DE ORTÓLOGOS DE GnIH EN MAMÍFEROS: RFRPs

El gen para GnIH aviar codifica para una proteína precursora de 173 aa que, tras su procesamiento proteolítico, da lugar a tres péptidos denominados GnIH, y GnIH-RP-1 y 2 [203, 205]. Estos péptidos tienen un motivo común en su extremo C-terminal, Leu-Pro-Xxx-Arg-Phe-NH₂, donde Xxx puede ser Leu o Gln. En la prohormona, estas secuencias están flanqueadas por una Gly en el extremo C-terminal, una señal de amidación y un aminoácido básico en el otro extremo como sitios de procesamiento proteolítico (**Fig.15**) [206].

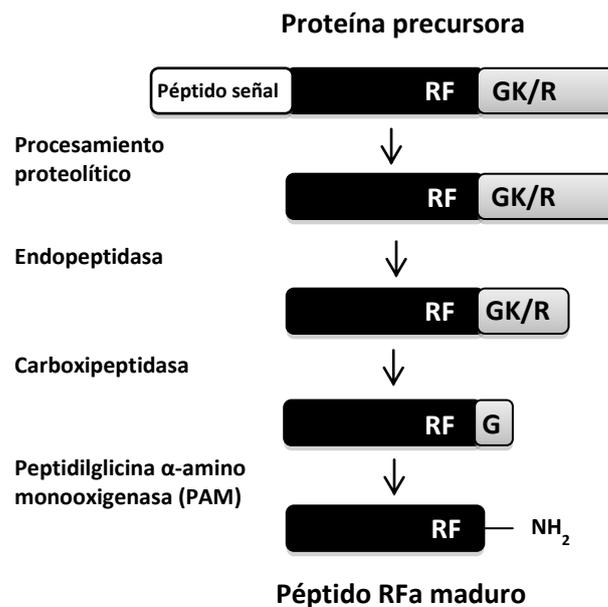


Figura 15. Procesamiento proteolítico necesario para generar un péptido RF-amida maduro a partir de una proteína precursora. Tomado con modificaciones de (201)

La búsqueda de secuencias similares en las bases de datos proteómicas identificaron homólogos de estos péptidos en diferentes especies de mamíferos (**Tabla 1**).

Tabla 1: Algunos de los péptidos RFRP identificados en mamíferos. Además, se muestra la secuencia del GnIH para la comparación.

Especie	Péptido	Secuencia
Ratón	RFRP-1* RFRP-3*	VPHSAANLPLRFa NMEAGTRSHFPSLPQRFa
Rata	RFRP-1* RFRP-3	VPHSAANLPLRFa ANMEAGTMSHFPSLPQRFa
Humano	RFRP-1* RFRP-3	MPHSFANLPLRFa VPNLPQRFa
Codorniz	GnIH GnIH-RP-1* GnIH-RP-2	SIKPSAYLPLRFa SLNFEEMKDWGSKNFMKVNTPTVNVKVPNSVANLPLRFa SSIQSLNLPQRFa

* Deducida de la secuencia de ADNc.

En general, en mamíferos, el gen encargado de las síntesis de estos péptidos codifica dos péptidos, RFRP-1 y RFRP-3 (**Fig.16**) (116-119), de los que el último es considerado el ortólogo funcional del GnIH aviar.



Figura 16. Secuencia aminoacídica (203 aa) de la proteína precursora de los RFRPs en rata. En rojo los dos péptidos maduros resultantes del procesamiento proteolítico. Referencia PubMed: NP_076442.1

1.4.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS NEURONAS GnIH/RFRP

En el año 2000, Tsutsui y colaboradores identificaron en el PVN y entre este núcleo y el VMN de aves los cuerpos celulares de las neuronas GnIH [202]. Un año más tarde, usando un anticuerpo contra el GnIH aviar, se detectaron en ratón neuronas GnIH inmunoreactivas (GnIH-ir) en el diencéfalo, protuberancia y médula espinal [207] y, más recientemente, mediante el uso de anticuerpos y de ISH, se han visualizado neuronas GnIH/RFRP-ir en el DMN de hamsters, ratones y ratas [204, 208] y en la región ventral del PVN en ovejas [209-211]. En humanos, se han identificado neuronas RFRP en el DMN [212].

En aves, las neuronas GnIH proyectan sus axones hacia las neuronas GnRH I y II [213], y hacia la eminencia media [202, 214, 215]. En mamíferos, las proyecciones de las neuronas RFRP se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro [216]. En rata, estudios de inmunotinción pusieron de manifiesto que el 75% de las neuronas GnRH se encontraban muy próximas a las fibras y terminaciones nerviosas de las neuronas GnIH [216], mientras otros estudios en hámster y oveja han revelado que el 40% de las neuronas GnRH se encuentran en estrecho contacto con las terminaciones de las neuronas RFRP [204, 209, 210]. Por su parte, se han identificado terminales axónicos de las neuronas RFRP en las proximidades de las neuronas GnRH en el cerebro humano, aunque el alcance de estas proyecciones no ha sido cuantificado [212].

En hamsters y ovejas se han observado proyecciones de las neuronas RFRP hacia la eminencia media [204, 209, 210], no así en ratas [208, 216], a pesar de haberse encontrado en estos animales acciones directas del péptido a nivel hipofisario [217]. En el cerebro de primates no humanos [218] y humanos [212], se han observado proyecciones de las neuronas RFRP hacia la eminencia media. En su conjunto, estos hechos sugieren que en mamíferos los péptidos RFRPs podrían, actuando sobre GnRH o tras ser liberados a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria y actuando directamente sobre los gonadotropos hipofisarios, controlar el funcionamiento del eje HHG.

Junto a su expresión a nivel central, se ha descrito expresión periférica de RFRPs. En concreto, en hámster, se ha observado expresión de RFRP en células germinales [219], mientras en el mono se ha detectado en células de Leydig, espermatogonias y espermatoцитos en machos. A su vez, en monos y humanos RFRP se expresa en células de granulosa, folículos preantrales y cuerpo lúteo [220].

Hasta la fecha, se sabe poco a cerca de los mecanismos que regulan la expresión de GnIH en aves y RFRPs en otras especies. En aves, se ha estudiado hasta el momento es la participación de la melatonina, como señalizadora de las horas luz-oscuridad, en el control de la expresión de GnIH. En este sentido, se ha demostrado que la melatonina incrementa *in vivo* la expresión del ARNm de GnIH [221], que estas neuronas poseen receptores de melatonina 1c [222] y que la administración en codornices de la hormona a explantes hipotalámicos aumenta, de forma dosis-dependiente, la expresión del ARNm de GnIH y la liberación de este

al medio, lo que se acompaña *in vivo* del descenso de los niveles circulantes de LH. En el mismo sentido, se ha demostrado que durante los períodos de oscuridad se produce un incremento de la liberación de melatonina y GnIH, y un descenso de los niveles de LH que es exactamente opuesto de lo que ocurre durante los períodos de luz.

En mamíferos, se ha analizado la posible participación de los esteroides gonadales, del estrés y de la melatonina en animales con reproducción estacional, sobre los niveles de expresión de los RFRPs y su liberación. En este sentido, los datos obtenidos indican que los estrógenos, a través de los ER α que se encuentran en las neuronas RFRP, participan en el control de la expresión de esta señal en ratonas y hámster OVX y tratadas con estrógenos [204, 223], pero no en ovejas. Tampoco se ha detectado modificación de la expresión de RFRPs en hámster ORX o tratados con testosterona [224].

En cuanto al papel de la melatonina en la regulación de la expresión de los RFRPs en mamíferos, se ha descrito que esta hormona induce la expresión del ARNm de *RRFP* en la línea celular de ratas rHypoE-7 (neuronas RFRP) [225]. A su vez, en animales con reproducción estacional como el hámster siberiano y la oveja, la melatonina regula la expresión del ARNm de los RFRPs y el número de proyecciones de estas neuronas hacia las neuronas GnRH. En concreto, durante los periodos favorables a la reproducción, disminuye la expresión del precursor de los RFRPs, el número de neuronas RFRP-ir y las proyecciones de estas hacia las neuronas GnRH en dichas especies con reproducción estacional [226].

Finalmente, entre las señales implicadas en la regulación de la expresión de los RFRPs, se ha propuesto al estrés. En situaciones de estrés hay una activación del eje hipotálamo-hipófiso adrenal que cursa con un incremento de los niveles circulantes de glucocorticoides y una inhibición del eje HHG. Ha sido demostrado que, en ratas macho, el 53% de las neuronas RFRP expresan receptores a glucocorticoides y que en situaciones de estrés incrementa el número de neuronas RFRP-ir y la expresión del gen que codifica esta señal [227].

1.4.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE GnIH/RFRP

La familia de péptidos GnIH/RFRPs ejerce sus acciones mediante su unión a receptores de membrana acoplados a proteínas G que fueron identificados usando

una estrategia de análisis de posibles ligandos para GPR huérfanos. En 2000, Bonini y cols habían indicado la existencia de dos receptores para el NPY a los que denominaron NPY1R (antiguo receptor huérfano GPR147) y NPY2R (antiguo receptor huérfano GPR74) [228]. Ese mismo año, Hinuma y cols indicaron que, en ratas, RFRP-1 y RFRP-3 ejercen sus acciones tras su interacción con un receptor al que denominaron OT7T022 [200]. Estudios posteriores demostraron que el denominado NPY1R coincidía con el OT7T022 y vehicula las acciones de los péptidos RFamide de la familia GnIH/RFRPs, mientras que el NPY2R vehicula las acciones de los péptidos de la familia PQRFa/NPY [229, 230].

En ratas, el ARNm del NPY1R se expresa en SNC, concretamente, en el hipotálamo, en la médula espinal, la amígdala, el hipocampo y la sustancia negra y en tejidos periféricos como la hipófisis, las gónadas y el ojo [200, 228]. Estudios en aves confirmaron la expresión del receptor de GnIH en cerebro e hipófisis [231, 232]. Además, la expresión del NPY1R se ha demostrado en hipófisis de oveja y gonadotropos humanos [210, 212, 233]. En hámster se ha observado expresión de NPY1R en todos los tipos de células germinales, incluidos los espermatozoides, y de NPY2R en las células germinales más diferenciadas. Los receptores para RFRPs se localizan en el mono en células de Leydig, espermatogonias y espermatozoides, en monos y humanos, en células de la granulosa, folículos preantrales y cuerpo lúteo [220].

1.4.5. ACCIONES CENTRALES Y PERIFÉRICAS DE GnIH/RFRP

Actualmente, está claramente establecido, tanto *in vivo* como *in vitro*, el efecto inhibitorio de GnIH sobre la liberación de gonadotropinas en aves [202, 205]. Puesto que nuestros estudios se han realizado en roedores, nos centraremos en la descripción de los efectos de GnIH/RFRP en estos, así como también en diferentes especies de mamíferos.

- ❖ **Hámster:** En estos animales, el papel del sistema RFRP/NPY1R en el mantenimiento de los niveles basales de gonadotropinas viene avalado por la observación de que, en ellos, la administración central de GnIH induce una rápida disminución de los niveles séricos de LH [204]. En el mismo sentido, la posible participación de las neuronas RFRP en la mediación del feedback negativo de los estrógenos sobre la liberación de gonadotropinas está

sustentada en el hecho de haberse demostrado en estos animales que el 40% de estas neuronas presentan el ER α , respondiendo a la administración de estrógenos con un aumento de la expresión de c-fos [204]. En las hembras de esta especie se ha implicado al RFRP en el desencadenamiento del pico pre-ovulatorio de LH, debido a una disminución de la actividad de las neuronas RFRP durante este periodo [234]. Así mismo, algunos autores han postulado al RFRP como un mediador de los efectos de factores ambientales, tales como la disponibilidad de alimentos o el estrés, sobre los cambios en la actividad del eje HHG que se producen en las diferentes fases estacionales durante el ciclo reproductor anual del hámster [235, 236]. En esta especie, tampoco es descartable un efecto directo de RFRP a nivel hipofisario, ya que la administración periférica del péptido induce una rápida disminución de los niveles séricos de LH [204]. Finalmente, la presencia del sistema RFRP/NPFF1R a nivel del testículo permite presuponer un posible papel del péptido en el proceso de diferenciación de las células germinales, lo que sería clave para la adquisición y mantenimiento de la función reproductora en los machos [219].

- ❖ **Rata:** Los escasos datos (indirectos) disponibles hasta la fecha parecen indicar que, en esta especie, la participación del sistema RFRP/NPFF1R durante el periodo silente del eje HHG que ocurre antes de la pubertad no es determinante. Esta hipótesis se basa en el hecho que la administración central en machos de GnIH o de un anti nucleótido anti sentido de GnIH no modifican la edad de puesta en marcha de la función reproductora [237]. Del mismo modo, en ambos sexos, los niveles de expresión de GnIH en el hipotálamo no se ven modificados durante la transición puberal [227, 238].

Por el contrario, en la edad adulta, al igual que en el hámster, el sistema parece participar en ambos sexos en el mantenimiento de los niveles basales de gonadotropinas, ejerciendo un efecto inhibitor del eje HHG como lo demuestra el que la administración central de GnIH o del análogo del mismo, el RFRP3-8, induzcan una rápida disminución de los niveles séricos de LH [239], al igual que su administración central durante el pico pre-ovulatorio de LH [240]. En ratas, el efecto directo de RFRP sobre la hipófisis es aún un tema controvertido ya que algunos autores no detectaron proyecciones de las fibras GnIH-ir hacia la eminencia media [208] y, sin embargo, se ha demostrado la expresión en

hipófisis del NPPF1R [227, 238] y una rápida disminución de LH tras la administración periférica de GnIH. [217, 240]. En apoyo de un efecto directo del RFRP sobre la hipófisis, estudios en cultivos hipofisarios han demostrado que éste induce una inhibición de la liberación basal y estimulada de LH y de prolactina [239, 240].

- ❖ **Ratón:** Estudios electrofisiológicos han demostrado un efecto inhibitor de RFRP-3 sobre la excitabilidad de las neuronas GnRH en ratones macho y hembra [241], lo que vendría a confirmar en esta especie el papel inhibitor de los RFRPs en el funcionamiento del eje HHG. La ausencia hasta el momento de estudios sobre las consecuencias del déficit de RFRP y/o de su receptor NPPF1R mediante el uso de ratones transgénicos dificulta el conocimiento de la relevancia fisiológica de este sistema en ratones. Nuestra Tesis viene a llenar este hueco, ya que presenta el primer trabajo en el cual se ha caracterizado el impacto producido por el déficit de señalización de los RFRPs mediante el uso de un ratón mutante NPPF1R KO.
- ❖ **Vaca y oveja:** Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado un efecto inhibitor de GnIH sobre la reproducción en ambas especies. En concreto, en ovejas la administración periférica de GnIH disminuyó la amplitud de los pulsos de LH, e *in vitro* GnIH disminuyó la liberación de LH y FSH [209] y la expresión de las subunidades LH β y FSH β [242]. En becerros ORX, la administración i.c.v. de GnIH disminuyó la amplitud de los pulsos de LH e *in vitro*, GnIH disminuyó la respuesta de LH a GnRH en cultivos de hipófisis procedentes de animales ORX [243].
- ❖ **Primates no humanos y humanos:** La presencia del sistema RFRP/NPPF1R en las gónadas de primates hizo suponer que el sistema ejercería un papel en el control de la fisiología gonadal. En este sentido, se ha comprobado que cultivos de células de la granulosa en presencia de RFRP-3 presentan una disminución significativa de la liberación de progesterona inducida por gonadotropinas [244].

1.5. CONTROL INTEGRADO DEL BALANCE ENERGÉTICO Y LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

La subordinación de la función reproductora al grado de reservas energéticas se conoce intuitivamente desde la antigüedad y buena prueba de ello es que, en la mayoría de las culturas, las diosas de la fertilidad se representan como mujeres obesas. Las bases neuroendocrinas que nuestro actual conocimiento de las relaciones entre el balance energético y la función reproductora se obtienen de observaciones resultantes de estudios llevados a cabo en las décadas de los 60 y 70 del siglo XX, que permitieron proponer la existencia de un umbral de peso o masa crítica necesaria para la activación puberal y el posterior mantenimiento de la capacidad reproductora en la edad adulta [245-247]. En este sentido, también son destacadas las situaciones en las que el problema no es la falta de depósitos energéticos sino la incapacidad de utilizarlos; un ejemplo de este tipo de desórdenes metabólicos es la diabetes [248].

Así mismo, se tiene constancia de que no sólo situaciones de déficit en la magnitud de depósitos energéticos producen graves desórdenes en la función reproductora, sino también estados metabólicos totalmente opuestos, como es el caso de la obesidad mórbida, tienen consecuencias adversas sobre el funcionamiento del eje reproductor [249, 250].

La adecuación de la función reproductora a las reservas energéticas depende en gran medida de una serie de factores responsables de informar sobre el estado energético y metabólico del organismo a los centros neuronales que gobiernan la función reproductora. Estos factores son tanto de origen central como periférico y, a continuación, pasaremos a hacer una serie de consideraciones sobre los mismos. En todo caso, en líneas generales, aplica el principio que las señales de suficiencia energética y, por tanto anorexigénicas, estimulan la función reproductora, mientras las de insuficiencia energética estimulan la ingesta de alimentos e inhiben en funcionamiento del eje HHG.

1.5.1 FACTORES PERIFÉRICOS EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y LA REPRODUCCIÓN

- ❖ La **leptina** es una hormona de naturaleza proteica sintetizada a partir de la expresión del gen *ob* (del inglés *obese* gene), que fue identificado y clonado en 1994 [251]. Este gen codifica para la proteína OB de 17 kDa. La síntesis de la hormona se realiza principalmente en el tejido adiposo blanco, desde donde es vertida a la circulación sanguínea en proporción directa a la cantidad de este tejido. La leptina ejerce un papel fundamental en el control de la ingesta como señal de suficiencia energética ejerciendo un efecto anorexigénico. La ausencia de leptina (ratones mutantes *ob/ob*) o de su receptor (ratones *db/db*; rata Zucker) produce un cuadro de obesidad asociada a hiperfagia, así como resistencia a la insulina e infertilidad [252]. Este cuadro se ve revertido, en los ratones *ob/ob*, tras la administración de la hormona [250]. Además, la leptina ha demostrado ser un factor permisivo para la llegada de la pubertad y la fertilidad, ya que su falta o deficiencia produce ausencia de pubertad e HH [253-255]. Los mecanismos de acción de la leptina sobre la secreción de GnRH han sido considerados principalmente indirectos, debido a la ausencia de receptores para la hormona (Ob-R) en las neuronas GnRH. Esta acción indirecta podría estar mediada por neuronas productoras de NPY, ya que la leptina tiene la capacidad de inhibir tanto la expresión del gen NPY como su secreción [256-259]. Dado que se ha observado expresión de Ob-R en neuronas POMC/CART [260] y GALP [261], estas han sido consideradas mediadoras de los efectos de la leptina en el control metabólico de la función reproductora. Adicionalmente, datos recientes han mostrado que el Ob-R se localiza en neuronas Kiss1, por lo que este péptido podría mediar, al menos en parte, el efecto permisivo de la leptina sobre la puesta en marcha y mantenimiento de la función reproductora [262, 263] (Ver apartado 1.5.2.).
- ❖ La **insulina** es una hormona de naturaleza proteica sintetizada en las células β -pancreáticas cuyos niveles circulantes se incrementan con el aumento de principios inmediatos en sangre, principalmente de glucosa, que se produce tras la ingesta. Es una señal de suficiencia energética que interviene en el control de la ingesta ejerciendo un efecto anorexigénico e,

igualmente, está implicada en el control de la secreción de GnRH/LH participando en el control metabólico de la función reproductora. Los datos que avalan esta participación se basan en la demostración de que en el hipotálamo de varias especies se ha identificado la presencia de receptores de insulina y, en particular, en neuronas próximas a las neuronas GnRH en la eminencia media y el núcleo ARC [264]. Además, se ha demostrado la presencia de receptores de insulina en neuronas GnRH cultivadas *in vitro* [265]. Al igual que ocurre con la leptina, la falta del receptor de insulina en modelos de ratones mutantes da lugar a un fallo reproductor asociado a una disminución de los niveles de GnRH [266]. Por otra parte, resulta destacable que el conjunto de déficits reproductores que se asocian a la patología diabética, tales como retraso puberal, infertilidad, ausencia o disminución de la secreción pulsátil de GnRH/LH, puedan ser revertidos o mejorados mediante la administración de insulina [267].

- ❖ La **Ghrelina** es un péptido de 28 aa que fue identificado en 1999 como el ligando endógeno del receptor de secretagogos de GH (GHS-R) [268]. Se expresa principalmente en estómago aunque, en humanos y roedores, se ha encontrado su expresión en el hipotálamo y otros tejidos como las gónadas [269-272]. Sus niveles circulantes se correlacionan inversamente con el índice de masa corporal, por lo que actúa como señal de insuficiencia energética. Además de su papel estimulador de la liberación de GH, una de las facetas fisiológicas más importantes de la ghrelina es su capacidad de estimular la ingesta de alimentos y adecuar la función reproductora al grado de reservas energéticas del organismo [273, 274]. En este sentido y de acuerdo a su papel como señalizadora de insuficiencia energética, se ha descrito que la ghrelina tiene un efecto predominantemente inhibitorio sobre la secreción de gonadotropinas y su administración crónica i.c.v. produce un retraso de la llegada de la pubertad en la rata y una disminución de los niveles circulantes de LH [275]. En concordancia con estos datos se ha demostrado que su administración crónica a ratas gestantes reduce significativamente el número de crías/embarazo [276].
- ❖ El **polipéptido YY** (PYY) es una hormona de naturaleza proteica que se sintetiza, principalmente, en las células L del tracto gastrointestinal distal

[277]. Se libera como PYY1-36, una molécula de 36 aa que contiene un residuo de tirosina en cada uno de sus extremos. Sin embargo, alrededor del 40% del PYY liberado pierde sus dos aminoácidos iniciales y se convierte en PYY3-36, siendo esta la forma mayoritaria en sangre circulante [278]. PYY3-36 ejerce sus acciones mediante su unión a los receptores Y2 e Y5 que se encuentran en el hipotálamo, principalmente en el núcleo ARC, el hipocampo, la hipófisis, el intestino y el nervio vago. La unión de PYY a sus receptores le permite intervenir en el control de la ingesta como señal de suficiencia energética y en el control del eje HHG, sobre el que ejerce un efecto, predominantemente, estimulador de la liberación de LH y FSH actuando a nivel hipotalámico y, directamente, a nivel hipofisario [279].

1.5.2. FACTORES CENTRALES EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y LA REPRODUCCIÓN

El **sistema Kiss1/Gpr54** se ha propuesto recientemente como mediador de la subordinación de la función reproductora al grado de reservas energéticas [280] ya que en ratas y ratones puberales sometidos a ayuno, se ha comprobado que la expresión hipotalámica de *Kiss1* se encuentra disminuida, lo que se asocia con una disminución de los niveles circulantes de LH [281, 282]. Además, puesto que las neuronas GnRH no presentan receptores para leptina y si lo presentan el 40% de las neuronas kisspeptidérgicas del núcleo ARC, se ha planteado el posible papel del sistema Kiss1/Gpr54 como mediador del efecto estimulador de esta hormona sobre la liberación de GnRH. En este sentido, se ha descrito una disminución de los niveles de ARNm de *Kiss1* en los ratones deficientes en leptina, que se recupera tras el tratamiento con la hormona [262]. En el mismo sentido se ha demostrado recientemente que las ratas hembras prepúberes sometidas a una subnutrición crónica durante la lactancia muestran una disminución de la expresión hipotalámica del ARNm de *Kiss1* asociada a hipoleptinemia y a una disminución de las neuronas Kp-ir en el ARC. En concordancia con estos datos, la sobrealimentación postnatal induce un adelanto puberal asociado a hiperleptinemia y aumento de la expresión del ARNm de *Kiss1* en el hipotálamo durante el periodo

puberal, que se asoció a una tendencia al aumento del número de fibras Kp-ir en el AVPV [283].

En contra de la participación del sistema Kiss1/Gpr54 como mediador de los efectos de la leptina sobre el eje HHG, un estudio reciente indica que la eliminación selectiva del receptor de leptina en las neuronas Kiss1, parece no tener un efecto deletéreo sobre la pubertad o la fertilidad, lo que sugeriría una posible acción indirecta de leptina sobre la regulación de la expresión de *Kiss1* [284].

Destacablemente, estudios moleculares y electrofisiológicos han sugerido recientemente que las neuronas Kiss1 podrían interactuar con sistemas clave en el control del balance energético y la ingesta, tales como las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP [285, 286], que podrían contribuir a explicar no sólo los mecanismos por los que el estado metabólico de organismo modula el sistema Kiss1, sino también los posibles efectos anorexigénicos sugeridos para las kisspeptinas [285, 287]. En este sentido, se ha propuesto que las kisspeptinas podrían actuar directamente sobre neuronas POMC [285], como mecanismo de regulación de la ingesta y el metabolismo. Sin embargo, el papel fisiológico de dicha señalización y su implicación en la mediación de las acciones de hormonas clave en dicho control metabólico son por completo desconocidos. De hecho, parte de los estudios incluidos en esta Tesis vienen a cubrir esta laguna en nuestro conocimiento.

El **sistema RFRP/NPFF1R** podría igualmente participar en el control integral del metabolismo y la reproducción. Además de su papel inhibitorio del eje HHG, datos farmacológicos obtenidos en aves, ratones, ovejas y primates no humanos indican que GnIH/RFRPs intervienen en el control de la ingesta, ejerciendo un efecto orexigénico como señalizadores de insuficiencia energética [216, 217, 237, 288, 289]. Dado que una parte importante de las señales que controlan el metabolismo energético adecuan la actividad del eje reproductor al grado de reservas energéticas y que existen proyecciones de las neuronas RFRP hacia las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART en el núcleo ARC [290], se ha propuesto que el sistema RFRP/NPFF1R podría intervenir en el control metabólico de la reproducción utilizando como mediadoras a estas neuronas. En este sentido, datos recientes muestran un efecto inhibitorio de GnIH sobre las neuronas POMC [285]. En cualquier caso, las evidencias disponibles acerca del papel de este sistema en el control de la ingesta son eminentemente indirectas, sin que exista un

conocimiento real de la relevancia fisiológica del mismo en la homeostasis metabólica. Parte de los estudios experimentales incluidos en esta Tesis vienen a abordar este aspecto concreto de la fisiología del sistema RFRP/NPFF1R.

Finalmente, las **orexinas** (orexina A y B) pertenecen a una familia de péptidos que se expresan principalmente en el LHA. Diversos estudios han demostrado que la administración central de las orexinas estimula la ingesta de alimentos; concretamente, la orexina A ha demostrado ser la forma más efectiva [291]. Sorprendentemente, dado que son señales de insuficiencia energética, los datos parecen apuntar a un papel estimulador de estas señales sobre la actividad del eje HHG. En este sentido se ha descrito que las concentraciones de orexinas varían a lo largo del ciclo estral, presentando valores máximos en la fase de proestro [292]. Por otra parte, las orexinas son capaces de estimular la secreción de LH en ratas OVX tratadas con estrógenos y progesterona e inhibirla en ratas OVX [293-295]. También resulta especialmente destacable que la administración central de orexinas permita recuperar el pico pre-ovulatorio de LH en ratas sometidas a ayuno [296].



OBJETIVOS

2. Objetivos

En las sociedades desarrolladas existe un especial interés en la manipulación de la capacidad reproductora, ya sea para su supresión/inhibición temporal, bien para su restauración en condiciones de infertilidad, o para el tratamiento de diversas patologías relacionadas con la misma. Esto ha impulsado un avance considerable en el conocimiento de nuevas señales implicadas en el control fisiológico del eje reproductor.

La función reproductora se encuentra altamente regulada mediante sistemas específicos que integran señales tanto de origen central como periférico, incluidos los factores gonadales, así como las señales que informan del estado metabólico del organismo.

La reciente identificación de la participación del sistema RFRP/NPFF1R en el control inhibitorio del eje gonadotrópico en vertebrados superiores ha permitido iniciar estudios farmacológicos y de expresión dirigidos a definir la relevancia de este sistema. Sin embargo, estos datos muestran algunas discrepancias importantes en cuanto a la magnitud, sitios de acción y relevancia fisiológica de los efectos biológicos de este sistema.

Por su parte, el sistema Kiss1/Gpr54 ha demostrado ser esencial en el control del eje gonadotrópico y su caracterización ha sido posible al menos en parte, gracias a la combinación de estudios farmacológicos y al empleo de modelos genéticamente manipulados. Pero a pesar del avance sustancial del conocimiento acerca de la fisiología de este sistema y su papel clave en el control de la reproducción, las interacciones de éste con otros reguladores esenciales del eje HHG permanecen en gran medida desconocidas.

En este contexto, el **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis fue el avanzar en la caracterización del papel fisiológico de los sistemas RFRP/NPFF1R y Kiss1/Gp54 en la regulación del eje reproductor, y su relación con otros sistemas homeostáticos relevantes, como los de control metabólico. Para la consecución de este objetivo general, se fijaron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. Caracterizar la posible implicación del sistema RFRP/NPFF1R en el control del eje gonadotrópico y de sus posibles interacciones con otras señales centrales y

periféricas, empleando como modelo una línea de ratón genéticamente modificado deficiente en el receptor, NPFF1R (NPFF1R KO).

2. Evaluar la posible implicación del sistema RFRP/NPFF1R en la mediación de los efectos reguladores de señales periféricas de interés metabólico, incluyendo la leptina y la ghrelina, sobre los centros que gobiernan la función reproductora, empleando para el modelo NPFF1R KO.

3. Caracterizar las acciones directas del sistema Kiss1/Gpr54 sobre las neuronas GnRH, empleando para ello roedores Gpr54 KI con expresión exclusiva de Gpr54 en neuronas GnRH.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En la realización de esta tesis se utilizaron ratones transgénicos que portaban en su genoma deleciones en el locus de NPFF1R y ratones transgénicos con expresión de *Gpr54* exclusivamente en neuronas GnRH, cuya generación se explica en el apartado 3.1.1 de esta Tesis. Una vez generados, los ratones fueron criados y estabulados en el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (UCO). El día del nacimiento fue considerado como día 1 de vida. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (14 horas de luz/10 horas de oscuridad) y temperatura (22°C) y alimentados con una dieta estándar libre de soja, con una dieta control (LFD) o una dieta alta en grasa (HFD), estas dos últimas suministradas por Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ). La LFD (D12450B) contiene 3.85 Kcal/g, de las cuales, un 10% proceden de grasas, un 20% de proteínas y un 70% de hidratos de carbono, mientras que la HFD (D12451) contiene 4,71 Kcal/g, de las cuales, un 45% proceden de grasas, un 20% de proteínas y un 35% de hidratos de carbono. Los protocolos de experimentación realizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la UCO y fueron llevados a cabo de acuerdo conforme al Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero de 2013 sobre la protección de animales de experimentación aparecido en el BOE de 8 de febrero de 2013. Adicionalmente, conviene destacar que, en la presente Tesis, se realizaron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento y reducir en número de animales empleados.

3.1.1 GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL MUTANTE PARA NPFF1R: RATÓN NPFF1R KO

Los ratones mutantes para NPFF1R fueron desarrollados por Lexicon Pharmaceuticals (The Woodlands, TX, USA). Estos ratones fueron generados por recombinación homóloga en células pluripotenciales, usando una estrategia que se representa en la **Fig.16**, donde el exón 3 del gen NPFF1R fue sustituido por un casete LacZ/ NEO, que interrumpe el marco de lectura abierto del gen. Por tanto, los animales homocigotos carecen de síntesis del ARNm maduro y, por lo tanto, de la proteína NPFF1R. Para la obtención de los ratones NPFF1R^{+/+} utilizados en los

experimentos descritos en esta Tesis, se procedió al cruce de ratones NPFF1R^{+/+} entre sí, y del mismo modo, dado que son fértiles, para la obtención de ratones NPFF1R^{-/-} se cruzaron mutantes NPFF1R^{-/-} entre sí.

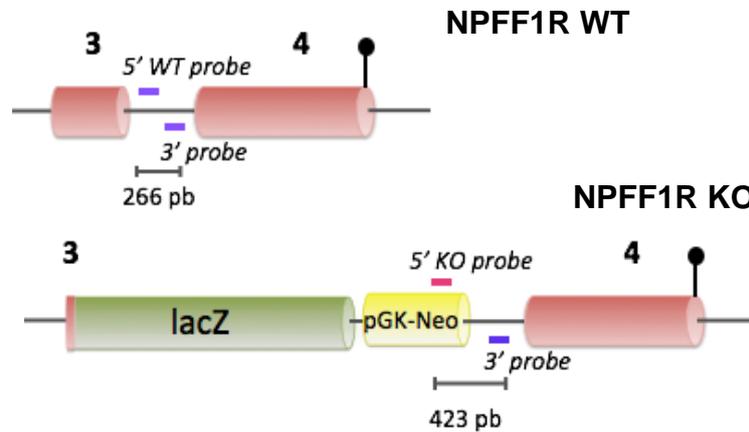


Figura 16. Esquema representativo de la estrategia utilizada para la generación de ratones NPFF1R KO.

La identificación de los animales NPFF1R^{+/+} y NPFF1R^{-/-} se realizó mediante el genotipado de los ratones generados (apartado 3.1.3.). En adelante, los ratones NPFF1R^{+/+} se denominarán WT y los ratones NPFF1R^{-/-} como NPFF1R KO.

3.1.2 GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE LAS KISSPEPTINAS MEDIADAS POR EN NEURONAS GnRH: RATÓN Gpr54 KI

Los ratones Gpr54 KI, con expresión exclusiva de Gpr54 en células GnRH, fueron desarrollados por los laboratorios de Günther Schütz y Allan E. Herbison [297]. La estrategia seguida para la generación de estos animales fue la re-introducción selectiva de Gpr54 en ratones mutantes globales para Gpr54^{-/-} (background Gpr54^{tm1SPR} con delección de 52 pb dentro del exón 2 de Gpr54) [178]. La re-introducción de Gpr54 se llevó a cabo mediante el uso de un cromosoma artificial bacteriano (BAC), como vector de clonación (**Fig.17a**). La especificidad de esta estrategia fue evaluada por la generación de otra línea de ratones mutantes a

los que se les insertó un BAC que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), de forma que esta solo se expresaba en células GnRH (**Fig.17b**).

Puesto que la inserción específica del transgen de Gpr54 en los ratones mutantes globales Gpr54^{-/-} rescataba el fenotipo fértil de estos, la obtención de los animales Gpr54^{+/+^T} y Gpr54^{-/-^T} se llevó a cabo por el cruce de ratones Gpr54^{-/-^T}, Gpr54^{+/+^T} y Gpr54^{+/-^T} con ratones Gpr54^{+/+} y Gpr54^{+/-} sin transgen.

La identificación de los animales Gpr54^{-/-}, Gpr54^{+/+} y Gpr54^{+/-}, con o sin transgen, se realizó mediante el genotipado de los ratones generados (apartado 3.1.3.).

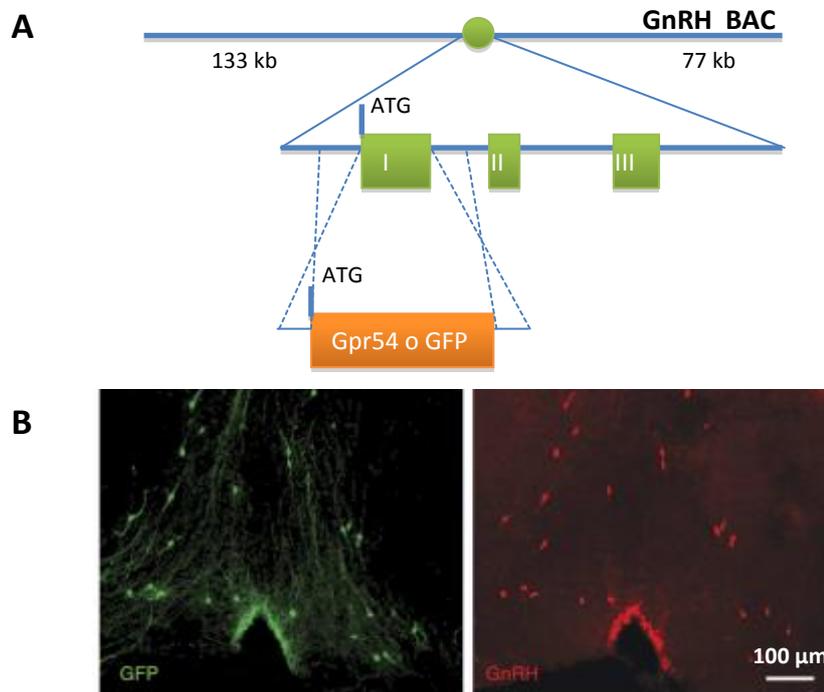


Figura 17. Generación de ratones Gpr54 KI. **(A)** Esquema del GnRH-BAC que alberga Gpr54 o GFP. **(B)** Doble inmunofluorescencia donde se muestra la expresión de GFP (verde) y GnRH (rojo) en el área preóptica de los ratones GnRH-BAC-GFP. Se observa una completa coincidencia entre las neuronas GnRH y la expresión de GFP. Tomado con modificaciones de [178].

3.1.3 GENOTIPADO

3.1.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se aisló el ADN genómico de tejido procedente de la oreja de los ratones. El material obtenido se sometió a un proceso de digestión, durante 2 horas a 55°C, en buffer de lisis (10 mM Tris HCl pH=8; 1 mM EDTA; SDS 1%; 0.4 M acetato sódico y

proteínasa K 8 mg/ml) (Promega, Madison, WI, USA) para la ruptura de las membranas celulares y la degradación de las proteínas. A continuación, las proteínas degradadas se desnaturalizaron y precipitaron con cloruro sódico saturado, recogiendo el sobrenadante. Una vez aislado, el ADN genómico se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Posteriormente, el ADN genómico se secó y se reconstituyó con agua libre de nucleasas.

3.1.3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la realización de las reacciones de PCR de genotipado se emplearon 4 µl de la dilución final del ADN genómico y se amplificaron las correspondientes secuencias mediante el uso de primers específicos para los loci WT y NPFF1R KO, diseñados por la Unidad de Investigación de la compañía Organon a partir de las secuencias conocidas procedentes de los vectores utilizados en las clonaciones. En el caso de los mutantes con expresión específica de Gpr54 en neuronas GnRH, se utilizaron los primers T1003E, T1003TE y NeoT para el loci Gpr54^{+/+} y Gpr54^{-/-} y, los primers GnRH_F y GnRH_R para detectar la presencia del transgen inserto en neuronas GnRH. Estos fueron diseñados en los grupos de los Drs. Schütz y Herbison, en los que se desarrolló esta línea.

Para la reacción se utilizó la siguiente mezcla:

- 10 µl de tampón de PCR (75 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄ (Promega).
- 4 µl de 50 mM MgCl₂ (Promega).
- 2 µl de 5 mM dNTPs (Promega).
- 1 µl de cada cebador específico 10 mM.
- 2.5 unidades (0.25 µl) ADN polimerasa (Promega).
- 4 µl ADN genómico.
- Agualibre de nucleasas.

El volumen final de la reacción fue de 50 µl. Los primers utilizados para el genotipado fueron los siguientes

PRIMER	SECUENCIA
5'NPF1R WT	5'-GACAATGCCACATGCAAGATG-3'
3'NPF1R WT	5'-TGGTACCCAGGATGCAGACTG -3'
3'NPF1R KO	5'-CGTTGGCTACCCGTGATATTG-3'
T1003E	5'GCCTAAGTTTCTCTGGTGGAGGATG3'
T1003TE	5'CGCGTACCTGCTGGATGTAGTTGAC 3'
NeoT	5'GGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCT 3'
GnRH_F	5'GGTTTCAGGGAACCCAAATTA 3'
GnRH_R	5'ACCAATGAGTTTCCGACCAG3'

La reacción de PCR se realizó en un termociclador iCycler iQ®5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min seguido de un número variable de ciclos de amplificación que incluían, una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un anillamiento a una temperatura específica de 57.5°C para NPF1R, 63°C para Gpr54 y 57°C para el transgen, durante 30 segundos, y una extensión a 72°C durante 1 min. A continuación se aplicó un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min.

Los fragmentos generados por PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 2% en TBE 1X (TBE 10X: 10% Tris-HCl, 5% ácido bórico y 4% EDTA) y visualizados con bromuro de etidio (1µg/ml). Los amplicones de PCR presentaban un tamaño estimado de 266 pb para la banda WT y 423 pb para la banda NPF1R KO (**Fig.18**) y de 253 pb para la banda Gpr54^{+/+}, 455 pb para la banda Gpr54^{-/-} y 439 pb para el transgen (**Fig.19**).

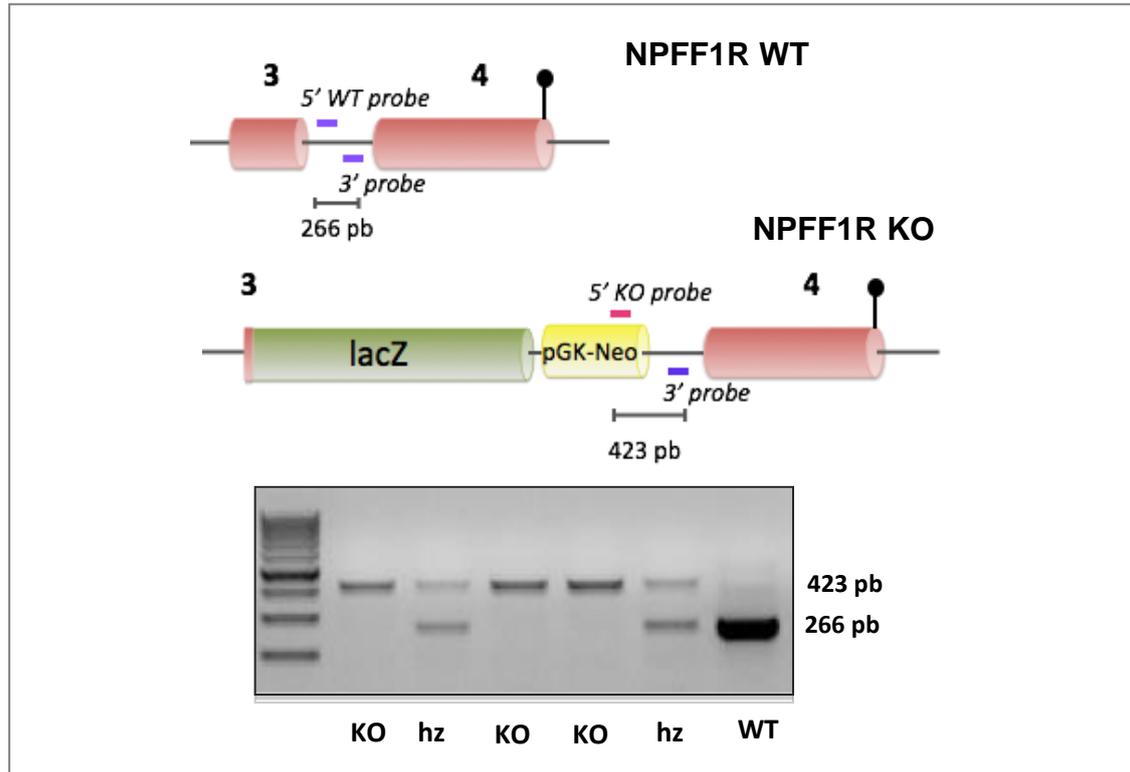


Figura 18. Imagen de un gel de agarosa en el que se muestran los fragmentos para NPFF1R^{-/-}, NPFF1R^{+/+} y NPFF1R^{+/-} obtenidos mediante PCR (WT, wild-type; hz, heterocigotos; KO, NPFF1R KO)

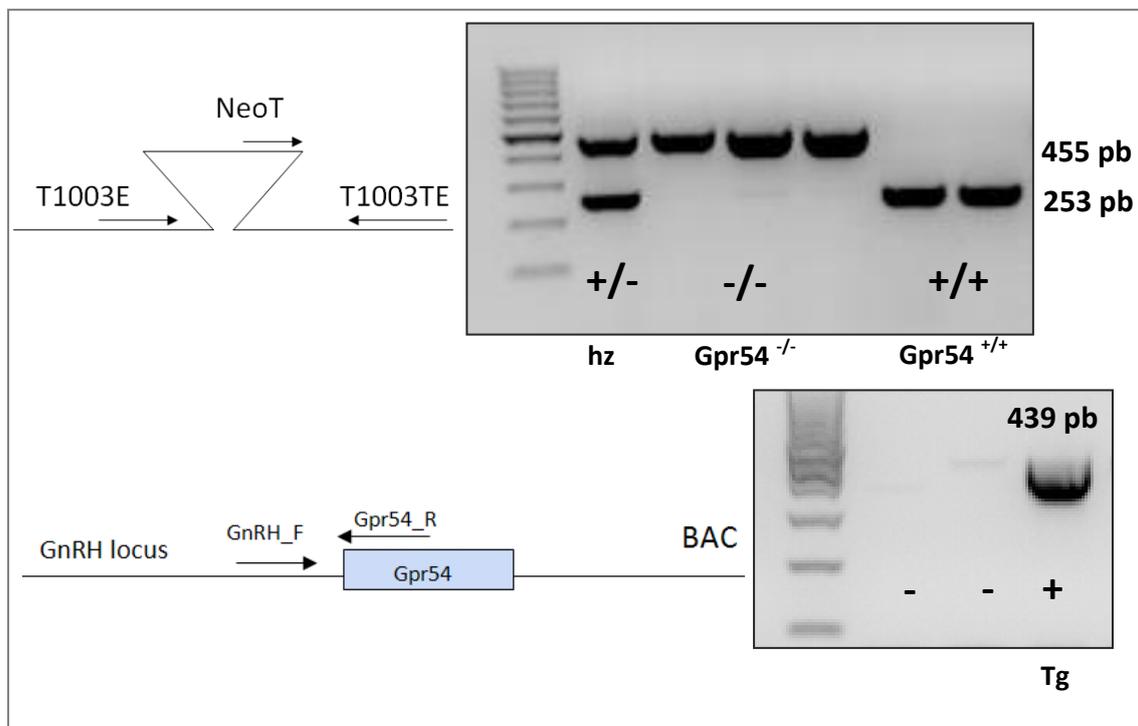


Figura 19. Imagen de geles de agarosa en los que se muestran los fragmentos para Gpr54^{-/-}, Gpr54^{+/+} y Gpr54^{+/-} obtenidos mediante PCR (hz, heterocigotos) y el fragmento obtenido para el transgen de Gpr54 (Tg).

3.2 DROGAS

La Kp-10 (kisspeptina₁₁₀₋₁₁₉-NH₂) de ratón/rata fue obtenida de Phoenix Pharmaceuticals Ltd. (Belmont, CA, Estados Unidos). El GnRH (L7134), y el agonista de receptores ionotrópicos del glutamato tipo NMDA, N-metil-D-Aspartato (NMDA, M3262) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, Estados Unidos). Los agonistas de los receptores de NKB, NK1R (GR 73632), NK2R (GR 64349), NK3R (senktide), y el antagonista del receptor tipo GABA_A (PHP 501 trifluoroacetate) fueron obtenidos de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). El agonista del sistema RFRP/NPFF1R, el RFRP₃₋₈, fue cedido por Merck Sharp & Dome (MSD, Oss, Holanda). La hCG fue adquirida de Lepori-Farma (Barcelona). La glucosa fue suministrada por Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España). La leptina recombinante fue proporcionada por ProSpec-Tany TechnoGene Ltd (Rehovot, Israel). La ghrelina (H-4862.0500) fue adquirida de Bachem (Bubendorf Switzerland). El medio mínimo esencial para las incubaciones (medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco -DMEM-BE12-917F) fue adquirido a Lonza (Verviers, Bélgica).

Todas las drogas fueron disueltas, inmediatamente antes de su uso, en solución salina (NaCl 0.9%), a excepción del PHP 501 y el RFRP₃₋₈ que fueron disueltos en DMSO al 0.1% y 5% respectivamente.

3.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

3.3.1 CANULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (I.C.V.) DE DROGAS

Los ratones fueron canulados i.c.v. 48 horas antes del inicio de los diferentes estudios con el objeto de permitir la administración en el ventrículo lateral de los distintos compuestos. Las cánulas (INTRADEMIC Polyethylene Tubing, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) fueron introducidas hasta una profundidad de 2 mm por debajo de la superficie del cráneo y el punto de inserción se situó 1 mm posterior y 1.2 mm lateral a Bregma [282]. Una vez canulados, los animales se mantuvieron en jaulas individuales hasta la finalización de los experimentos. Las dosis de los diferentes compuestos se administraron en un volumen final de 5 µl.

3.3.2 INCUBACIÓN ESTÁTICA DE TEJIDO HIPOFISARIO Y TESTICULAR

En determinados estudios experimentales de esta Tesis, se analizó la respuesta hipofisaria y testicular a las acciones directas de diversos factores. Para ello, se emplearon incubaciones estáticas de tejido hipofisario o testicular. Como procedimiento general, una vez extraídos los tejidos, se depositaron en viales de centelleo que contenían DMEM (Lonza) libre de rojo fenol, en un incubador Dubnoff a temperatura (32°C los testículos y 37°C las hipófisis) y agitación (60 ciclos/min) constantes, bajo una atmósfera de 95% O₂-5% CO₂, según referencias previas [298]. Tras un periodo de 30/60 min (preincubación), el medio fue recogido y sustituido por medio sólo o conteniendo las diferentes drogas. Para las determinaciones hormonales se recogieron los medios a los 60 ó 90 min de incubación (hipófisis y testículos, respectivamente).

3.4 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS GENERALES

3.4.1 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT) Y PCR SEMICUANTITATIVA A TIEMPO FINAL

El ARN total de los diferentes tejidos se extrajo empleando el reactivo TRIsure™ Reagent (Bioline, Londres, UK), de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante. Las reacciones de RT se llevaron a cabo a partir de 2 µg de ARN total cuantificado en espectrofotómetro DU®530 (Beckman). Previamente, las muestras de ARN fueron tratadas con 2 unidades de DNasa (a 37°C durante 30 min, Promega) y a continuación se detuvo la reacción (a 65°C durante 10 min).

Se realizó una mezcla de diferentes componentes para llevar a cabo la reacción de RT:

- 6 µl de tampón de RT (250nM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 50 nM DTT, 2.5 mM; Promega).
- 2 µl de dNTPs 5 mM (Promega).
- 0.5 µl de hexámeros random (Promega).
- 0.5 µl (20 unidades) de inhibidor de ARNsas (ARNSin), (Promega).
- 7.5 unidades de AMV^{RT} (Promega).

El volumen final de la mezcla fue de 30 μ l, que posteriormente se incubó durante 5 min a 25°C, seguido de 60 min a 42°C y se inactivó la enzima a 85°C durante 5 min. Finalmente, el volumen de reacción fue diluido en agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen total de 100 μ l.

Para la realización de las reacciones de PCR se emplearon 10 μ l de la dilución final de RT y se amplificaron los correspondientes ADNc mediante el uso de primers específicos (**Tabla 2**), obtenidos a partir de las secuencias de los distintos genes estudiados publicadas en GeneBank y diseñados para saltar secuencias intrónicas. Como control interno se amplificó un fragmento de ARNm de la proteína ribosomal L19, según las condiciones recogidas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Primers usados para la amplificación por RT-PCR de los distintos genes estudiados.

Gen	Gen-Bank	Primers	Tamaño amplicón	Temperatura de Melting (T _m)
NPFF1R	NM_001177511.1	Sen:5'-TGGACAACCTTATCACCGGTTGGC-3' Anti:5'-TGC GCGGTACATCACCCACG-3'	411 pb	63 °C
NPFF2R	NM_133192.3	Sen:5'-GATCAGTGGGCTGGTGAAGGG-3' Anti:5'-CTGCTTGCCTGTGCAGTGTGC-3'	133 pb	63 °C
GPR54	NM_053244	Sen:5'-CGGAAACTCATTGGTCA-3' Anti:5'-TGTGGCTTGCACCGAGA-3'	214 pb	52,4°C
RP-L19	NM_009078	Sen:5'-GAAATCGCCAATGCCAACTC-3' Anti:5'-ACCTTCAGGTACAGGCTGTG-3'	290 pb	55°C

El volumen final de la reacción de PCR fue de 50 μ l. Las temperaturas y los tiempos utilizados para la amplificación fueron optimizados para cada una de las señales estudiadas; ver **Tabla 2** [272, 299]. Se usó la misma cantidad de ADNc molde en cada reacción de RT. La especificidad de los productos de PCR fue confirmada mediante secuenciación directa en la Unidad de Ácidos Nucleicos del Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

3.4.2 HIBRIDACIÓN IN SITU

Para el análisis de la expresión génica y la distribución neuroanatómica de *Kiss1* en núcleo ARC y AVPV de los tejidos hipotalámicos obtenidos de los diferentes grupos experimentales, se utilizó la técnica de hibridación *in situ* (ISH).

Para ello se cortaron 5 series de secciones hipotalámicas (20 μm) en un criostato y fueron guardadas a -80°C hasta su análisis.

En el desarrollo de esta técnica se empleó una ribosonda antisentido específica para el ARNm de *Kiss1* de ratón con secuencia 5'-TGG TGA ACC CTG AAC CCAC A-3', localizada entre los nucleótidos 352-371 (Genbank NM 181692.1). El marcaje de esta ribosonda se realizó con UTP- P^{33} al ser transcrita por la polimerasa del fago T7 (Promega) a partir de la secuencia del ADNc de *Kiss1* y se purificó utilizando micro-columnas Illustra™ ProbeQuant™ G-50 (GE Healthcare, UK).

Para procesar las secciones hipotalámicas y facilitar la unión de la ribosonda, estas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 15 min, estabilizadas con tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4) a temperatura ambiente durante 20 min y pre-tratadas con trietanolamina y ácido acético anhidro para disminuir las uniones inespecíficas. A continuación, se realizó una deshidratación de los tejidos en series crecientes de etanol y, finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora.

La hibridación de la ribosonda de *Kiss1* en el tejido hipotalámico se realizó durante 16 horas a 55°C . La solución de hibridación contenía 4x SCC (citrato salino estándar), 50% de formamida desionizada, 1x solución Denhardt's y 50% de dextrán sulfato. A esta solución de hibridación se añade la ribosonda desnaturada a una concentración de 0.03 pmol/ml junto con ARN_t (10mg/ml).

Después de la hibridación, se lavaron las secciones mediante agitación en 4x SCC durante 30 min, se incubaron a 37°C en una solución de 10 mg/ml de ARNsa A (Roche Biochemical) durante 1 hora, se volvieron a lavar en 0.1x SCC en agitación durante 1 hora a 65°C y, finalmente, se realizó una deshidratación en series crecientes de etanol. Tras 1 hora de secado a temperatura ambiente, los cortes fueron sumergidos en emulsión Kodak Autoradiography type NTB (Eastman Kodak), secados y conservados a 4°C durante una semana protegidos de la luz. Tras este periodo de tiempo, los cortes fueron revelados siguiendo las instrucciones del proveedor (3 min en Kodak Dektol Developer; 10 seg en agua destilada; 5 min en Kodak Fixer; 5 min en agua destilada). Para el montaje de las secciones, se deshidrataron previamente y se aclararon con citrasol (Sigma). Se utilizó Permaslip (Sigma) como medio de montaje.

Para el estudio cuantitativo, las principales secciones hipotalámicas con expresión del ARNm de *Kiss1* fueron analizadas utilizando un microscopio de campo oscuro acoplado a una cámara de vídeo. Los resultados fueron expresados como el número de células (agrupaciones de granos de plata) y números de granos/célula presentes en los distintos núcleos o áreas hipotalámicas estudiadas.

3.4.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Los análisis histológicos de los testículos y ovarios de los ratones se prepararon según el siguiente protocolo:

- Fijación de las muestras durante 24 horas en Bouin (solución acuosa saturada de ácido pícrico, formol y ácido acético glacial).
- Deshidratación mediante una serie gradual de alcoholes, iniciada con alcohol al 50 %, luego con una solución al 70%, otra al 90% y, finalmente, una al 100 %.
- Traspaso a xilol (una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar).
- Inclusión en parafina para formar un bloque que permita realizar cortes.
- Corte mediante micrótopo para obtener láminas de 4-6 μm .
- Eliminación de la parafina con xilol.
- Rehidratación de la muestra mediante una serie decreciente de alcoholes, hasta llegar a una solución 100% de agua.
- Tinción con hematoxilina-eosina.
- Visualización en un microscopio Nikon Eclipse 400.

3.4.4 RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Los niveles hormonales de LH y FSH circulantes se determinaron en un volumen de 10-50 μL usando un método de doble anticuerpo y kits de radioinmunoensayo proporcionados por el National Institutes of Health, NIH (Dr. Parlow, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases National Hormone and Peptide Program, Bethesda, MD, USA). Las hormonas suministradas por el NIH (LH-I-10, FSH-I-9) fueron marcadas con I^{125} mediante el método de

Iodo-gen® (Pierce Chemical Col., Rockford, IL) y las concentraciones de gonadotropinas fueron expresadas usando como referencia una preparación de LH-RP-3 y FSH-RP-2. La sensibilidad del ensayo fue de 75 pg/mL y 0.4 ng/mL para LH y FSH, respectivamente. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo de ambas hormonas, fueron menores del 8 y 10%, respectivamente. La fiabilidad de las determinaciones fue confirmada mediante la medida de muestras de suero de rata con concentraciones conocidas de las hormonas de interés.

Los niveles de T en suero fueron analizados usando un kit comercial suministrado por MP Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA), procediendo según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng/mL y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores del 5 y el 8%, respectivamente.

Los niveles séricos de insulina se determinaron usando un kit comercial proporcionado por Linco Research (St. Charles, MO, USA), procediendo según las indicaciones del fabricante. La sensibilidad de los ensayos fue de 0.1 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores del 5 y 10%, respectivamente.

3.4.5 MEDIDA DE GLUCOSA EN PLASMA

La glucemia basal y tras sobrecarga de glucosa fue analizada mediante un glucómetro ACCU-CHEK® (Aviva, Roche Diagnostics). Los valores se expresan en mg/dL.

3.5 DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.5.1 ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL SISTEMA RFRP/NPFF1R EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS Y DE SUS POSIBLES INTERACCIONES CON OTRAS SEÑALES CENTRALES Y PERIFÉRICAS

3.5.1.1 CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO NPFF1R KO

Con el objetivo de analizar el posible papel del sistema RFRP/NPFF1R en el control del eje HHG y su implicación en la regulación de la liberación de gonadotropinas, en un primer grupo de experimentos realizamos la

caracterización y validación del modelo de ratón NPFF1R KO generado en nuestro laboratorio.

3.5.1.1.1 Validación funcional del modelo mutante NPFF1R KO

Como se apuntó en otras secciones de esta Memoria, estudios farmacológicos previos demostraron un efecto inhibitor, tanto a nivel central como periférico, del sistema RFRP/NPFF1R sobre la liberación de gonadotropinas [239]. Por ello, con el objeto de validar la ausencia funcional del NPFF1R en nuestro modelo, en el **experimento 1**, ratonas hembra adultas WT y NPFF1R KO, sometidas a OVX 4 semanas antes, recibieron i.c.v. una dosis de RFRP₃₋₈ (5 nmol/ratón en 5 μ l) o vehículo [239]. Se procedió a la toma de sangre por punción yugular, 15 min después de la administración de las drogas.

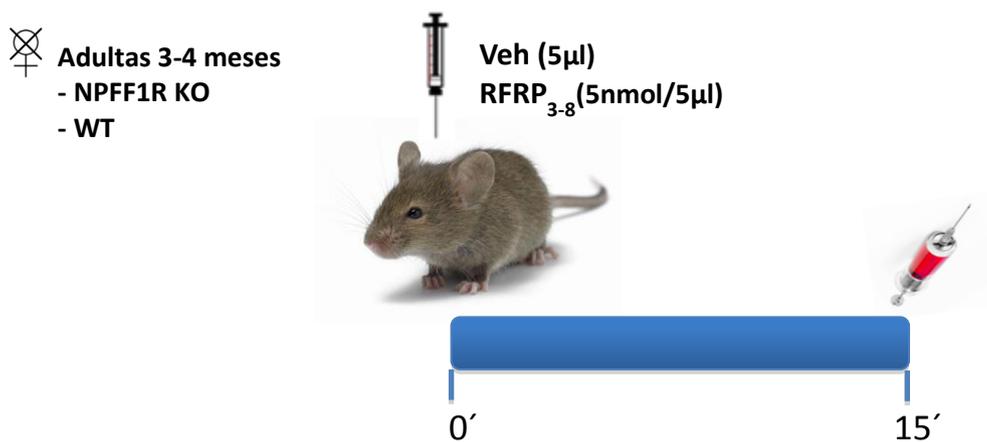


Figura 20. Representación esquemática del diseño implementado en el **experimento 1**.

De otra parte, en el **experimento 2** se analizó la capacidad del RFRP₃₋₈ de modular la liberación de LH de forma directa en ambos genotipos. Así, hipófisis procedentes de ratones macho adultos NPFF1R KO y WT fueron pre-incubadas durante 30 min con DMEM. Una vez transcurrido este tiempo, el medio fue recogido y sustituido por 1 mL de DMEM. Tras 1h de incubación el medio fue recogido y las hipófisis incubadas durante 60 min con GnRH (10^{-8} M). Finalmente, tras recoger el medio, las hipófisis se incubaron durante 1h con RFRP₃₋₈ (10^{-8} M).



Figura 21. Representación esquemática del diseño realizado en el *experimento 2*.

3.5.1.1.2 Caracterización fenotípica de la función reproductora en los ratones NPFF1R KO

En el *experimento 3* procedimos al estudio, en ratones macho y hembra NPFF1R KO y WT, de diferentes parámetros indicadores del estado de la función reproductora. Se analizaron marcadores externos de llegada a pubertad, como la apertura vaginal (AV) en el caso de las hembras y la separación balano prepucial (SBP) en el caso de los machos. También se realizó el estudio histológico de las gónadas en ratones pre-púberes de ambos sexos y se procedió a la medida de los niveles circulantes de gonadotropinas, LH y FSH, a estas edades.

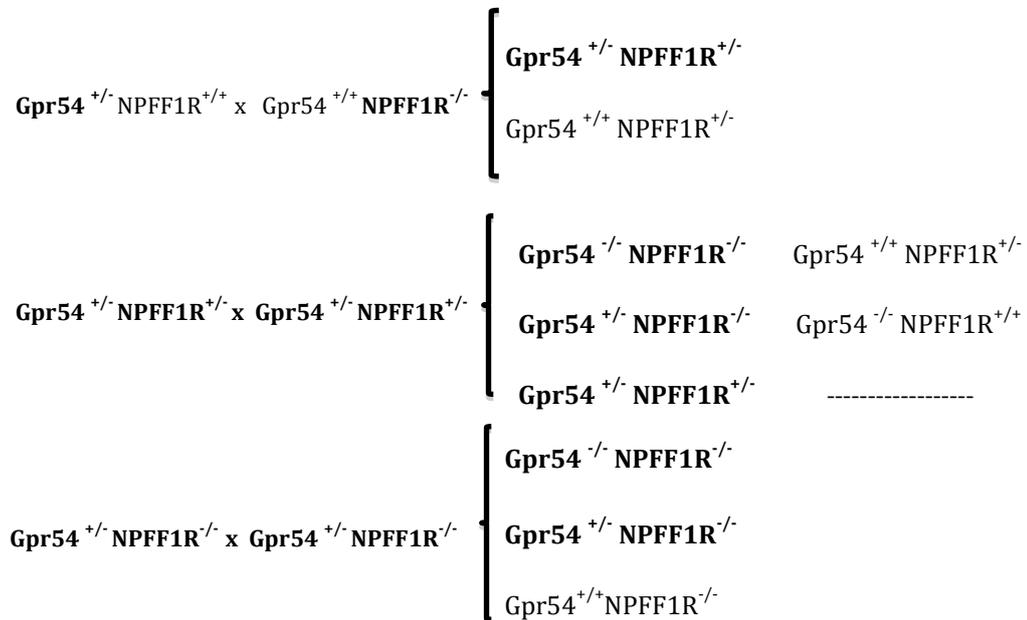
En el estudio morfométrico de los ovarios, la maduración ovárica se determinó mediante la identificación de la etapa más avanzada del desarrollo folicular. Para ello, los folículos fueron clasificados en las siguientes fases: SF ($\leq 250 \mu\text{m}$), F1 (250-300 μm), F2 (301-350 μm), F3 (351-400 μm) y F4 ($>400 \mu\text{m}$) y se evaluó semi-cuantitativamente, considerando la etapa más avanzada del desarrollo folicular (en ratonas que no han ovulado) o la edad del cuerpo lúteo (en ratonas que han pasado por una primera ovulación). En los ratones macho, se consideró la etapa más avanzada de desarrollo espermátide (Fase VIII).

Adicionalmente, en hembras se monitorizó la ciclicidad estral mediante citología vaginal durante 30 días, la magnitud del pico pre-ovulario, mediante una muestra de sangre en la tarde del proestro (18:00 h; punto en el que está establecido que se produce el pico de LH en ratonas [300]), la fertilidad tras su cruce con ratones de su mismo background genético, la duración del embarazo, el número y peso de las crías al nacimiento y su supervivencia.

Igualmente, evaluamos mediante ISH en ratones macho adultos, WT y NPFF1R KO, las posibles alteraciones sobre la expresión hipotalámica de *Kiss1* en el ARC y el AVPV inducidas por la ausencia de señalización por RFRP.

3.5.1.1.3 Caracterización fenotípica de la función reproductora de los ratones doble mutantes NPFF1R/Gpr54 KO

A fin de valorar la interacción entre los sistemas *Kiss1/Gpr54* y *RFRP/NPFF1R*, se generaron ratones dobles mutantes *Gpr54/NPFF1R* KO. Para ello, se procedió en primer lugar a la generación de los parentales *Gpr54*^{+/-}; *NPFF1R*^{+/-} y *Gpr54*^{+/-}; *NPFF1R*^{-/-}, que posteriormente fueron cruzados, según la siguiente estrategia:



Una vez obtenidas hembras mutantes para *Gpr54* y *NPFF1R*, en el **experimento 4**, se llevó a cabo un análisis fenotípico en estos animales que incluyó el estudio del día de llegada de la pubertad (AV) y el análisis en la edad adulta del peso de ovarios y útero y de los niveles circulantes de LH y FSH.

3.5.1.2 ESTUDIO EN MUTANTES NPFF1R KO DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS

3.5.1.2.1 Análisis de la participación del RFRP como mediador del feedback negativo de los esteroides gonadales en la regulación de la liberación de gonadotropinas

Para analizar la participación del sistema RFRP/NPFF1R en la regulación por retroalimentación negativa que ejercen los esteroides gonadales sobre la liberación de LH y FSH, en el **experimento 5** ratones macho y hembra adultos NPFF1R KO y WT fueron gonadectomizados (GNX). Se realizaron tomas de sangre por punción yugular, antes y 2, 7, 21, 30 (sólo en hembras) y 40 días después de la GNX para el posterior análisis de los niveles circulantes de gonadotropinas. Como controles se utilizaron ratones WT sometidos al mismo protocolo experimental.

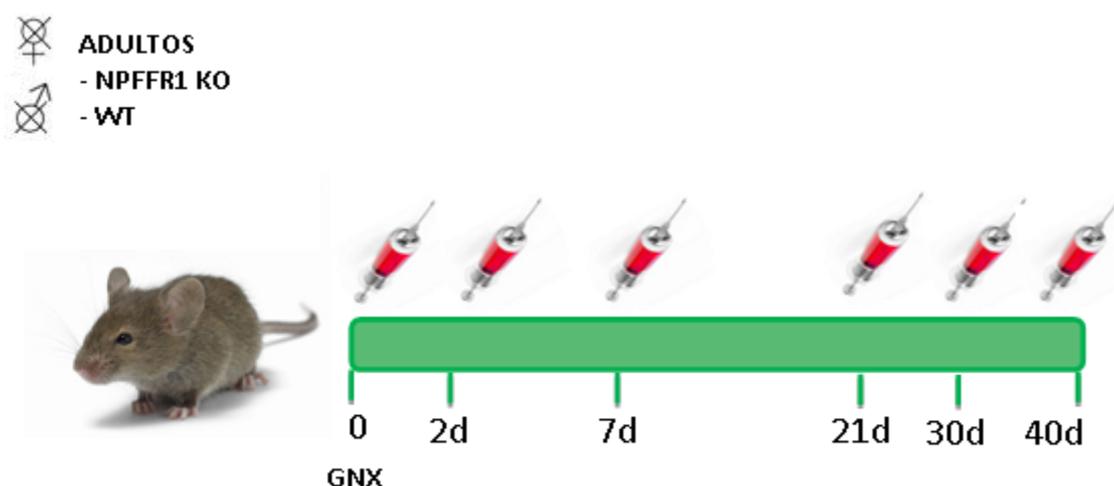


Figura 22. Representación esquemática del diseño aplicado en el **experimento 5**.

3.5.1.3 ESTUDIO EN MUTANTES NPFF1R KO DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN CENTRAL EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS

3.5.1.3.1 Análisis de las interacciones entre RFRP y GnRH en el control de la liberación de gonadotropinas

Para analizar las posibles interacciones entre RFRP y GnRH en el control de la liberación de gonadotropinas, en el **experimento 6**, se procedió a la administración i.p. de GnRH (0.25 µg/ratón en 100 µl) o vehículo, en ratones macho NPFF1R KO y WT. Se procedió a la recogida de sangre por punción yugular, 30 min después de la inyección.

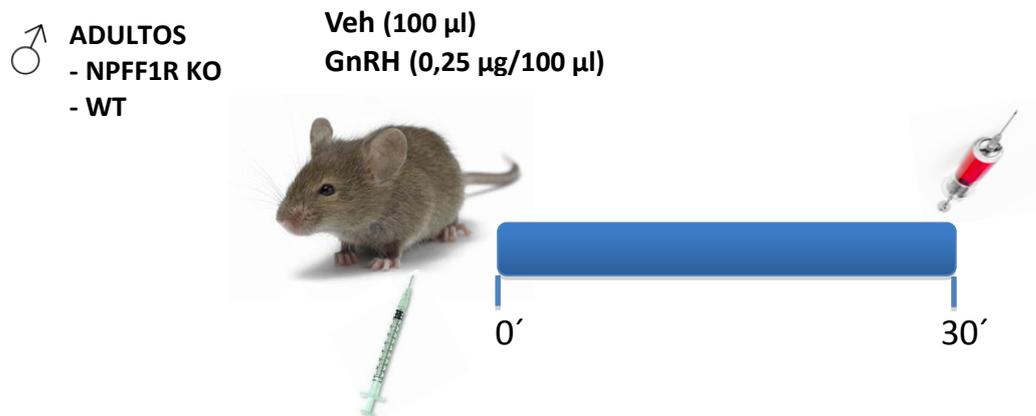


Figura 23. Representación esquemática del diseño implementado en el *experimento 6*.

3.5.1.3.2 Análisis de las interacciones entre el RFRP y las kisspeptinas en el control de la liberación de gonadotropinas

Para analizar las posibles interacciones entre RFRP y las kisspeptinas en el control de la liberación de gonadotropinas, en el *experimento 7*, se procedió a la administración i.c.v. de Kp-10 (50 pmol/ratón en 5 μ l) o vehículo, en ratones macho adultos NPFF1R KO y WT. Se procedió a la recogida de una muestra de sangre por punción yugular, 15 min después de la inyección.

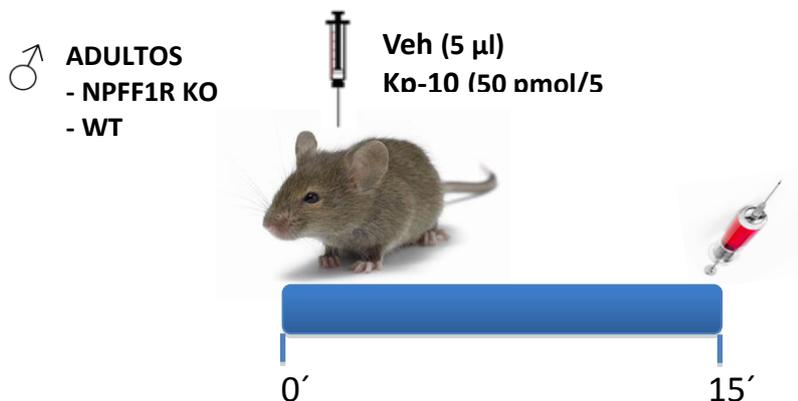


Figura 24. Representación esquemática del diseño aplicado en el *experimento 7*.

3.5.1.3.3 Análisis de las interacciones entre el RFRP y la NKB en el control de la liberación de gonadotropinas

En el *experimento 8* se estudiaron los efectos de la activación del NK3R sobre la liberación de gonadotropinas en ausencia de señalización por RFRP. Para ello, ratones macho adultos NPFF1R KO y WT fueron inyectados i.c.v. con el agonista de NKB, Senktide (600 pmol/ratón en 5µl), o vehículo. Se procedió a la recogida de una muestra de sangre por punción yugular, 15 min después de la inyección.

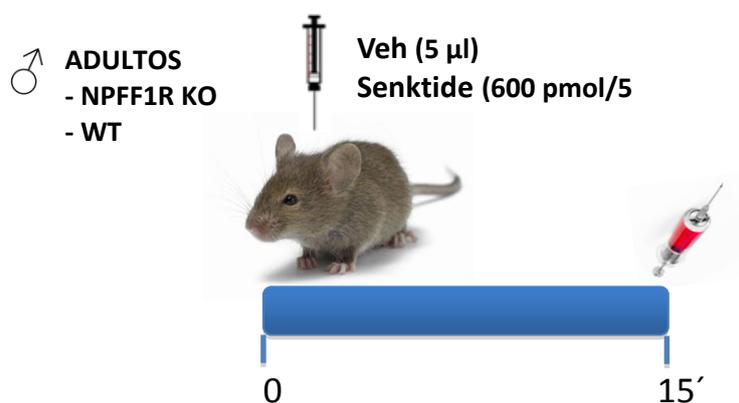


Figura 25. Representación esquemática del diseño desarrollado en el *experimento 8*.

3.5.2 ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA Y LA REPRODUCCIÓN

Como hemos visto anteriormente, el RFRP tiene un efecto estimulador sobre la ingesta [216, 217, 288], jugando un posible papel como mediador entre el control de la reproducción y la homeostasis metabólica [289]. Por ello, en el siguiente bloque de experimentos nos marcamos como objetivo evaluar la posible participación del sistema RFRP/NPFF1R en la mediación de señales procedentes del metabolismo periférico sobre los centros que gobiernan la función reproductora durante la edad adulta.

3.5.2.1 REPERCUSIÓN DE ESTRÉS METABÓLICO SOBRE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS Y EL PESO CORPORAL

Para determinar las repercusiones del estrés metabólico sobre la función reproductora, se analizó la respuesta de LH y del peso corporal al ayuno de corta duración y a la alimentación con una HFD.

3.5.2.1.1 Análisis de la implicación del RFRP en el control de la liberación de gonadotropinas y peso corporal en respuesta al ayuno

En el **experimento 9** se emplearon ratones macho adultos NPFF1R KO y WT, los cuales fueron sometidos a un período de ayuno de 12 y 24 horas. Antes y después del periodo de ayuno se analizaron los niveles circulantes de LH y el peso corporal en estos animales.

3.5.2.1.2 Análisis de la implicación del RFRP en el control de la liberación de gonadotropinas y peso corporal en respuesta a una HFD

En este estudio nos propusimos analizar el posible papel del RFRP en el control del peso corporal y la liberación de gonadotropinas en animales con obesidad inducida por dieta. Para ello, en el **experimento 10**, ratones macho adultos NPFF1R KO y WT fueron alimentados *ad libitum* durante un periodo de 9 semanas con a una LFD o una HFD. Al final del periodo de estudio se registró el peso corporal y se tomó una muestra de sangre por punción yugular para el análisis de los niveles circulantes de LH.

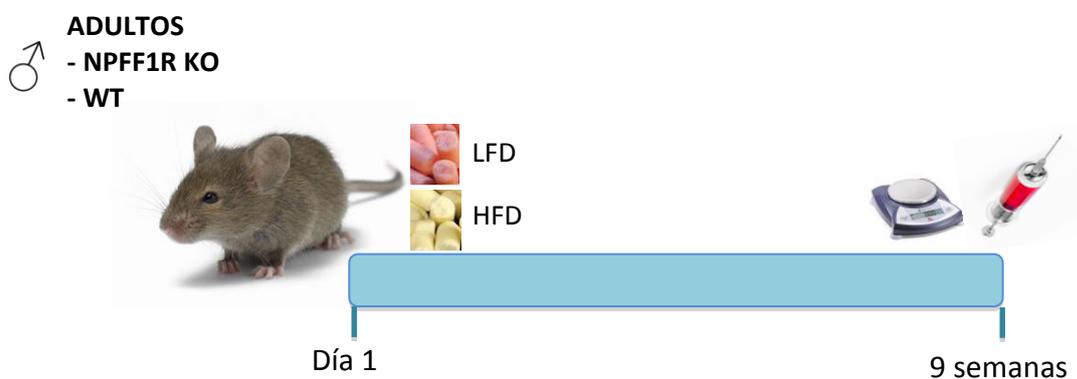


Figura 26. Representación esquemática del diseño seguido en el **experimento 10**.

3.5.2.1.3 Análisis de la posible implicación del RFRP en los cambios de peso corporal en respuesta a OVX

En este estudio nos propusimos analizar el posible papel del RFRP en el efecto sinérgico que se produce entre los estímulos nutricionales y el déficit de estrógenos. Para ello, en el **experimento 11**, ratonas hembra adultas NPFF1R KO y WT fueron alimentados *ad libitum* durante un periodo de 12 semanas con a una LFD o una HFD. Trascurridas las 12 semanas, las ratonas fueron OVX o sometidas a una simulación del proceso de OVX (Sham-OVX) continuando la alimentación con una LFD o HFD durante un periodo de 6 y 16 semanas. El peso corporal fue monitorizado semanalmente durante todo el experimento. Ratonas WT sometidos al mismo procedimiento experimental sirvieron como controles.

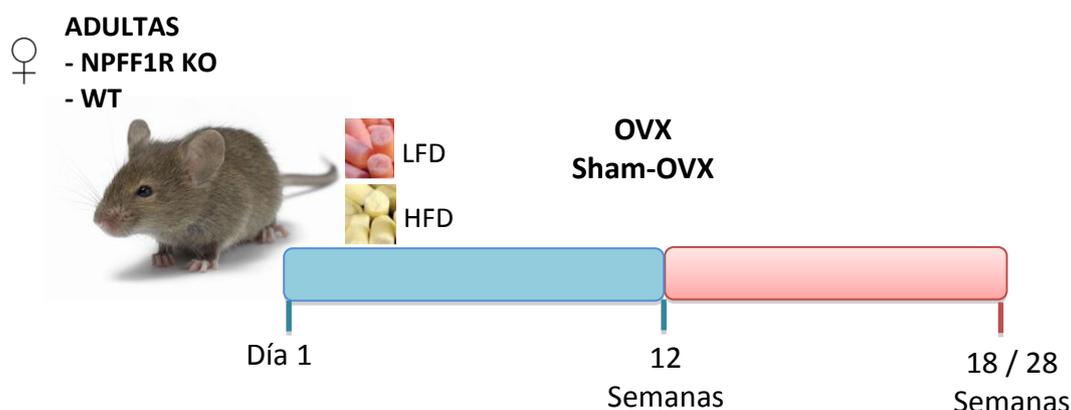


Figura 27. Representación esquemática del diseño aplicado en el **experimento 11**.

3.5.2.2 ANÁLISIS DE LA POSIBLE IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA

Con la finalidad de estudiar la posible mediación del sistema RFRP/NPFF1R en el control que la leptina y la ghrelina ejercen sobre la ingesta de alimentos, en el **experimento 12** procedimos a la administración i.c.v. leptina (2µg/ratón), ghrelina (5µg/ratón) o vehículo en ratones macho adultos NPFF1R KO y WT previamente alimentados *ad libitum* durante un periodo de 9 semanas con a una LFD o una HFD. La ingesta fue monitorizada 1, 3, 6, 10 y 24 horas después de la administración de las drogas.

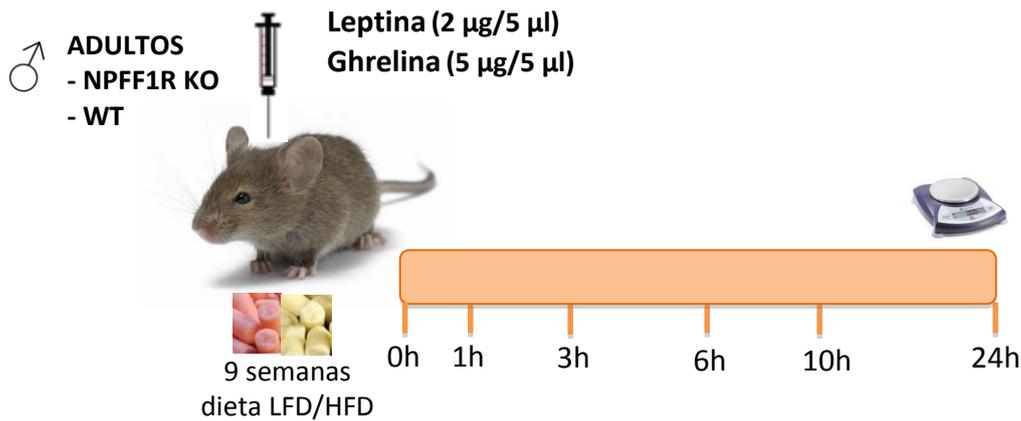


Figura 28. Representación esquemática del diseño aplicado en el *experimento 12*.

3.5.2.3 TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT) Y ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE INSULINA EN EL MUTANTE NPFF1R KO

En el *experimento 13* se evaluó la tolerancia a la sobrecarga de glucosa, en ratones macho adultos NPFF1R KO y WT previamente alimentados *ad libitum* durante un periodo de 9 semanas con a una LFD o una HFD. El día anterior al experimento, los animales se sometieron a ayuno durante toda la noche. A la mañana siguiente, se procedió a la extracción de sangre por punción yugular para la medida de la glucemia e insulinemia basal. Tras una hora de descanso, se les administró una inyección i.p. de glucosa (1g de glucosa/Kg de peso corporal) y se extrajeron muestras de sangre por punción yugular a los 20, 60 y 120 min y para la determinación de los niveles de glucosa circulante.

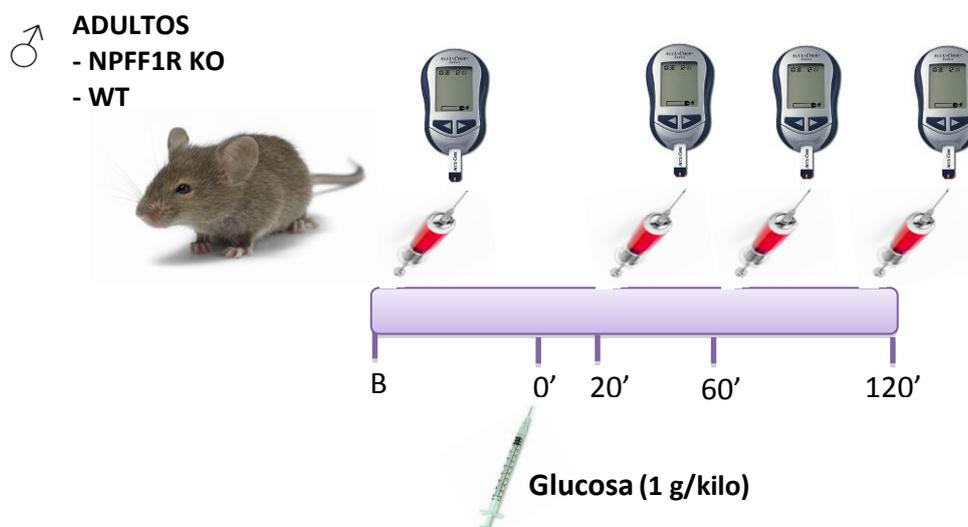


Figura 29. Representación esquemática del diseño implementado en el *experimento 13*.

3.5.3 ESTUDIO *IN VIVO* EN RATONES Gpr54 KI DE LAS ACCIONES DIRECTAS DE LAS KISSPEPTINAS SOBRE NEURONAS GnRH

Con el objetivo de analizar la importancia de la señalización kisspeptidérgica sobre neuronas GnRH en la mediación del efecto que diferentes señales ejercen en el control de la liberación de gonadotropinas, se realizaron toda una serie de diseños experimentales utilizando como modelo animal a ratones Gpr54-KI.

3.5.3.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y HORMONAL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA EN RATONES Gpr54 KI

En el *experimento 14* se llevó a cabo el estudio fenotípico de ratones Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-} que incluyó el análisis del peso corporal, del peso de gónadas y epidídimo y el análisis de los niveles circulantes de LH y FSH. También se llevaron a cabo estudios histológicos gonadales en ratones adultos de ambos sexos. En el estudio morfométrico de los testículos se determinó la proporción de túbulos seminíferos que presentaban células en apoptosis, así como el número de células apoptóticas por sección tubular en 50 secciones tubulares por animal. En el estadio XI del ciclo del epitelio seminífero se contó el número de espermátocitos I en zigotene y en diacinesis y de espermátides en fase 11 de la espermiogénesis por sección tubular en 25 secciones tubulares por animal. Este estadio se seleccionó ya que es fácilmente reconocible y los tipos celulares presentes son relativamente fáciles de contar. Los cambios en el número de cada uno de estos tipos celulares reflejan la muerte celular acumulativa que ha ocurrido en los estadios previos. En el estudio morfométrico de los ovarios se realizaron secciones seriadas de 7 µm. El número de ovulaciones durante el último ciclo se valoró contando el número de cuerpos lúteos del ciclo actual en cada ovario. Los cuerpos lúteos en regresión del ciclo previo son fácilmente distinguibles debido a su menor tamaño y a la vacuolización de las células. Además, en las hembras Gpr54 KI, la ciclicidad estral fue monitorizada mediante citología vaginal durante 30 días.

3.5.3.2 ESTUDIO EN MUTANTES $Gpr54^{-/-T}$ DEL PAPEL DIRECTO DE LAS KISSPEPTINAS EN LA FUNCIÓN GONADAL

3.5.3.2.1 Valoración funcional del testículo en las ratones $Gpr54$ KI

En el *experimento 15* se incubaron testículos de ratones macho adultos $Gpr54^{-/-}$, tratados previamente i.p. durante 5 días con hCG (5 UI/ratón/día), así como hemi-testículos de ratones $Gpr54^{-/-T}$ y $Gpr54^{+/+T}$ tratados previamente i.p. con solución salina. A las 48 horas tras la última inyección, se extrajeron los testículos y se procedió a su incubación (ver apartado 1.3.2). Tras 1 hora de preincubación con 1 ml de DMEM, este se recambió por 500 μ l de DMEM y se analizó la liberación de testosterona al medio a los 90 min.

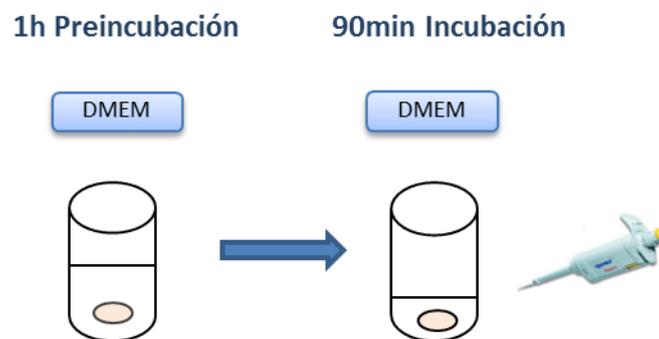


Figura 30. Representación esquemática del diseño aplicado en el *experimento 15*.

3.5.3.3 ESTUDIO EN MUTANTES $Gpr54^{-/-T}$ DEL EFECTO GONADOTRÓPICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH Y KP-10

3.5.3.3.1 Análisis en mutantes $Gpr54^{-/-T}$ del efecto de la administración de GnRH

Para analizar las posibles interacciones entre kisspeptinas y GnRH en el control de la liberación de gonadotropinas, en el **experimento 16**, se procedió a la administración i.p. de GnRH (0.25 μg /ratón en 100 μl) o vehículo a ratones macho $Gpr54^{-/-T}$, $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/-}$. Se procedió a la toma de una muestra de sangre por punción yugular, 30 min después de la inyección.

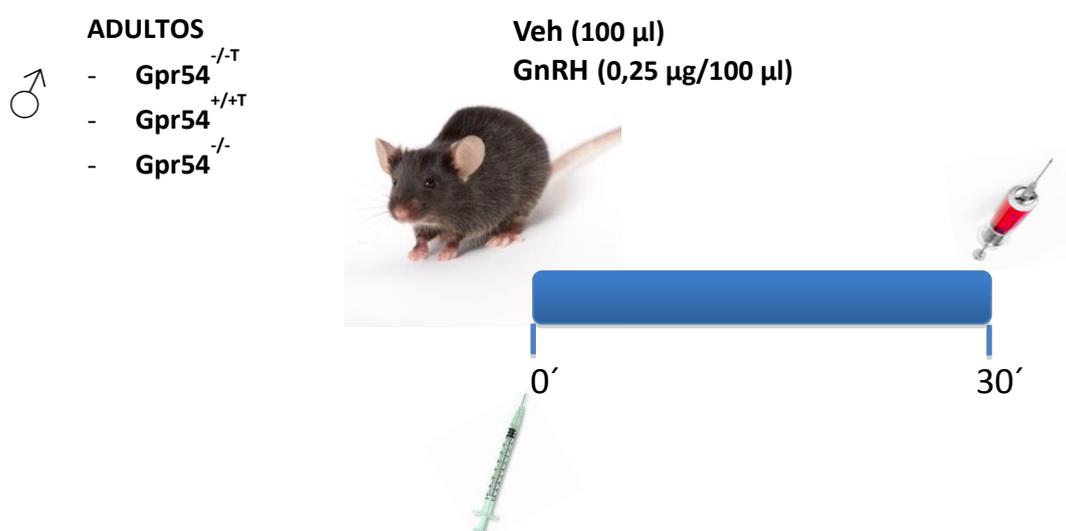


Figura 31. Representación esquemática del diseño aplicado en el **experimento 16**.

3.5.3.3.2 Análisis en mutantes $Gpr54^{-/-T}$ del efecto de la administración de Kp-10

Previamente a la realización de este análisis, los ratones $Gpr54^{-/-}$ fueron sometidos a un protocolo de primado con GnRH con el fin de normalizar la capacidad de respuesta hipofisaria a los diversos estímulos. El protocolo de primado consistió en cinco bolos consecutivos i.p. de GnRH (0.15 μg /ratón). El primer día se inyectó a las 10:00, 17:00 y 23:50 horas y el segundo día a las 8:00 y a las 16:00 horas. A las 10:00 h. de la mañana del día siguiente (tercer día) se realizaron los estudios endocrinos correspondientes.

Para analizar la acción específica de las kisspeptinas sobre las neuronas GnRH, en el control de la liberación de gonadotropinas, en el **experimento 17**, se procedió a la administración i.c.v. de Kp-10 (50 pmol/ratón en 5 μl) o vehículo, en

ratones macho adultos $Gpr54^{-/-T}$, $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/-}$. Se tomó una muestra de sangre por punción yugular, 15 min después de la inyección.

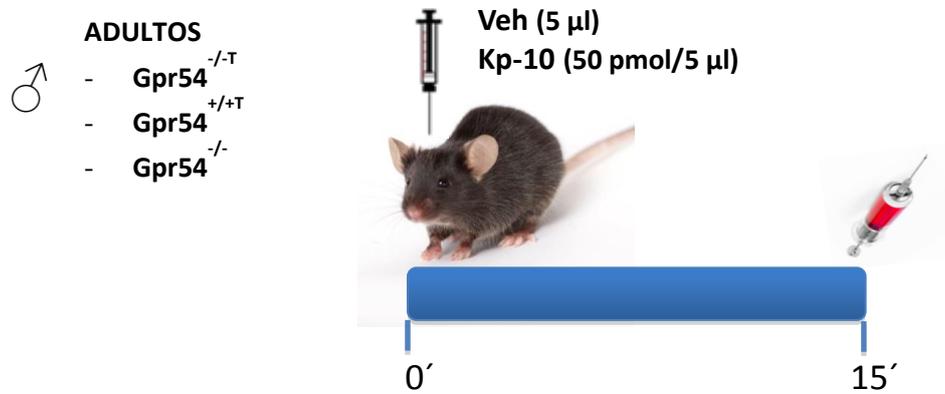


Figura 32. Representación esquemática del diseño aplicado en el *experimento 17*.

3.5.3.4 ESTUDIO EN MUTANTES $Gpr54^{-/-T}$ DE LA DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS KISSPEPTINAS Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO Y CENTRAL

3.5.3.4.1 Análisis en mutantes $Gpr54^{-/-T}$ de la participación de kisspeptinas como mediadoras del feedback negativo de los esteroides gonadales

En el *experimento 18* ratones macho y hembra adultos $Gpr54^{-/-T}$, $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/-}$ fueron GNX, según lo descrito en epígrafes previos. Se realizaron tomas de sangre por punción yugular, antes y 2, 7 y 21 días después de la GNX para el posterior análisis de gonadotropinas.

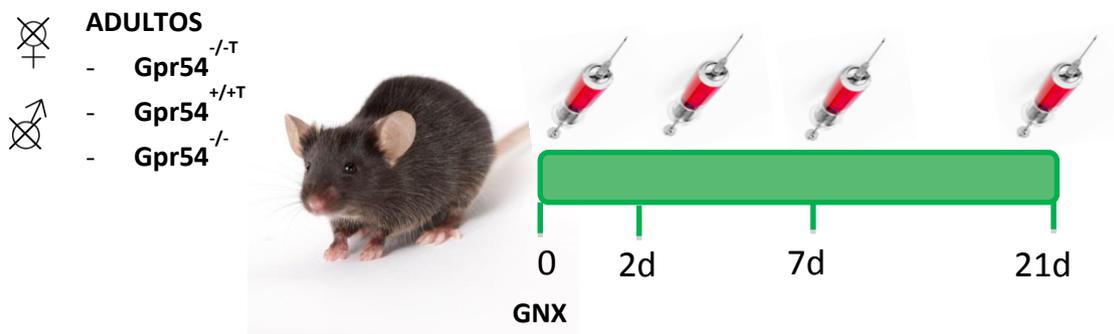


Figura 33. Representación esquemática del diseño aplicado en el *experimento 18*.

3.5.3.4.2 Análisis en mutantes $Gpr54^{-/-T}$ de las interacciones entre las kisspeptinas y el glutamato

En el *experimento 19* analizamos los efectos de la activación glutamatergica, a través de receptores tipo NMDA, sobre la liberación de gonadotropinas, en ratones macho adultos $Gpr54^{-/-T}$, $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/-}$, estos últimos sometidos a un protocolo de primado con GnRH descrito previamente. Para ello, los ratones fueron inyectados i.c.v. con NMDA (1nmol/ratón), o vehículo. Se tomaron muestras de sangre por punción yugular, 15 min después de la administración de las drogas.

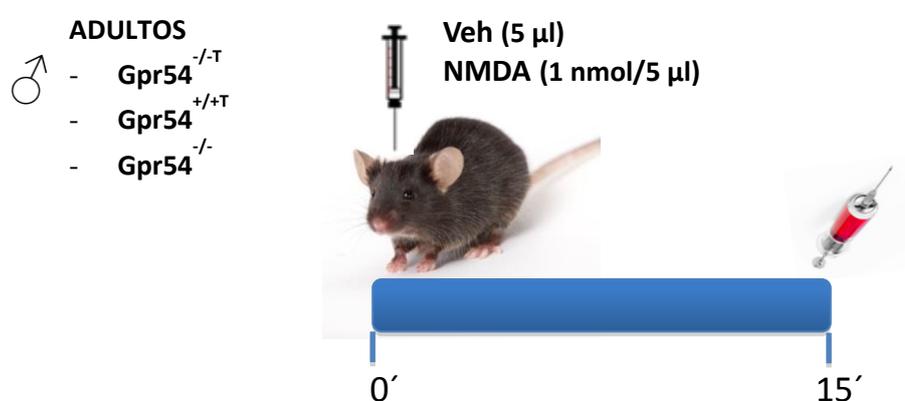


Figura 34. Representación esquemática del diseño aplicado en el *experimento 19*.

3.5.3.4.3 Análisis en mutantes $Gpr54^{-/-T}$ de interacciones entre las kisspeptinas y el GABA

En el *experimento 20* analizamos los efectos de la inactivación de los receptores $GABA_A$ sobre la liberación de gonadotropinas en ratones macho adultos $Gpr54^{-/-T}$, $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/-}$, estos últimos sometidos a un protocolo de primado con GnRH descrito previamente. Los animales fueron inyectados i.c.v. con PHP_{501} (0,5nmol/ratón), o vehículo. Se tomó una muestra de sangre por punción yugular, 15 min después de la administración de la droga.

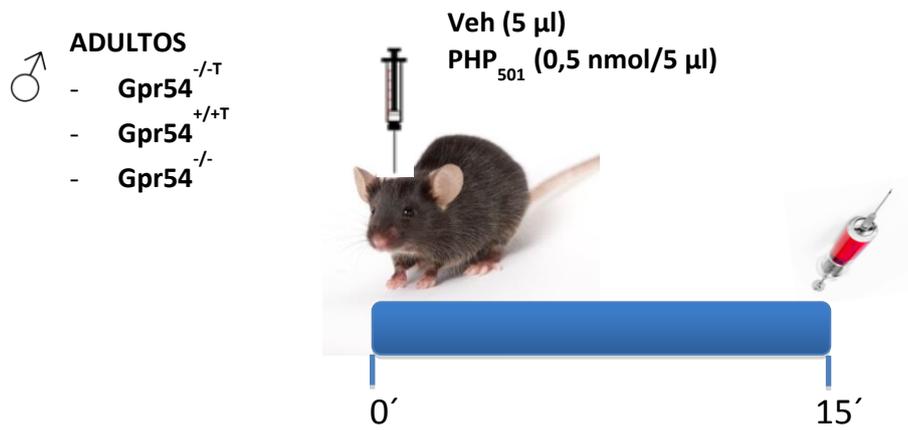


Figura 35. Representación esquemática del diseño implementado en el *experimento 20*.

3.5.3.4.4 Análisis en mutantes *Gpr54*^{-/-T} de las interacciones entre las kisspeptinas y las taquiquininas

Dada la co-expresión de kisspeptinas y neuroquinina B (NKB) en las neuronas KNDy del núcleo ARC, fueron analizadas las posibles interacciones entre estos dos péptidos.

Para ello, en el *experimento 21* se estudiaron los efectos de la activación selectiva de los receptores tipo 1, 2 y 3 de taquiquininas (NK1R, NK2R y NK3R) en ratones macho adultos *Gpr54*^{-/-T}, *Gpr54*^{+/-T} y *Gpr54*^{-/-}, estos últimos sometidos a un protocolo de primado con GnRH descrito previamente. Los animales fueron inyectados i.c.v. con el agonista NK1R, GR_73632 (600pmol/ratón), el agonista NK2R, GR_64349 (600pmol/ratón), el agonista NK3R, Senktide (600pmol/ratón), o vehículo. Se tomó una muestra de sangre por punción yugular, 15 min después de la administración de las drogas.

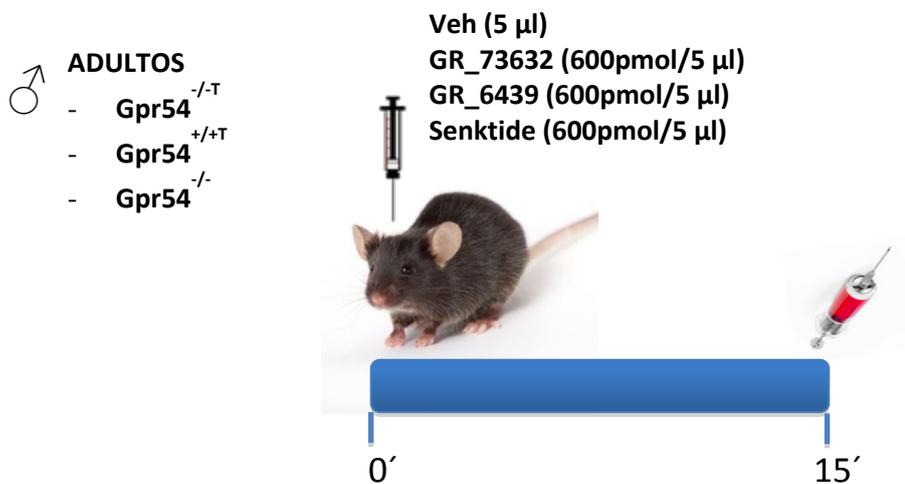


Figura 36. Representación esquemática del diseño aplicado en el *experimento 21*.

3.5.3.5 ANÁLISIS EN RATONES $Gpr54^{-/-T}$ DE LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA

Con la finalidad de estudiar la posible influencia del sistema Kiss1/Gpr54 en el control que la leptina y la ghrelina ejercen sobre la ingesta de alimentos, en el **experimento 22** procedimos a la administración i.c.v. de leptina (2 μ g/ratón), ghrelina (5 μ g/ratón) o vehículo, en ratones macho adultos $Gpr54^{-/-T}$ y $Gpr54^{-/-}$. La ingesta fue monitorizada 1, 3, 6, 10 y 24 horas después de la administración de las drogas. Ratones $Gpr54^{+/+T}$ sometidos al mismo procedimiento experimental sirvieron como controles.

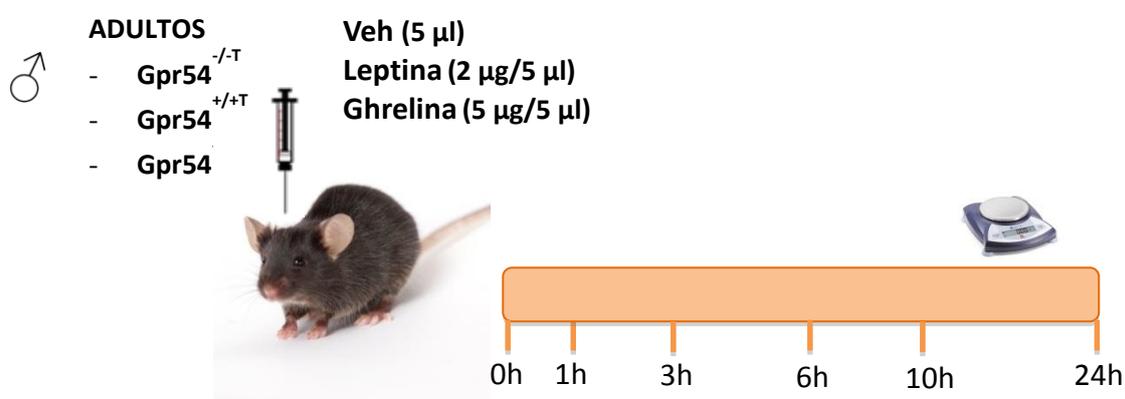


Figura 37. Representación esquemática del diseño aplicado en el **experimento 22**.

3.6 PRESENTACIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Los datos de peso corporal, niveles hormonales e hibridación in situ son presentados como la media \pm SEM (error estándar de la media). Los ensayos de hibridación in situ incluyeron, al menos, 5 muestras de cerebro por cada grupo experimental. El número de muestras incluidas por grupo para los distintos estudios hormonales se indica en la sección de Resultados. Los datos obtenidos fueron analizados para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas usando ANOVA seguida de un test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls o test *t*-Student (Prism GraphPad 5.0, GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA, USA). Para que las diferencias fueran consideradas significativas se estableció como límite $P \leq 0.05$.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DEL EJE GONADOTRÓPICO Y DE SUS POSIBLES INTERACCIONES CON OTRAS SEÑALES CENTRALES Y PERIFÉRICAS

Con el objetivo de analizar el posible papel que la señalización por RFRP ejerce en el control de diversos aspectos de la función del eje gonadotrópico, incluyendo la regulación de la liberación de gonadotropinas, se realizaron toda una serie de diseños experimentales utilizando como modelo animal a ratones deficientes en el receptor canónico de este ligando, el ratón NPFF1R KO.

4.1.1. VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO NPFF1R KO

4.1.1.1. VALIDACIÓN INICIAL DEL MODELO MUTANTE NPFF1R KO

El primer análisis llevado a cabo en nuestro modelo fue su genotipado; el procedimiento y los resultados obtenidos se muestran en el apartado 3.1.3.2 de la sección de Materiales y Métodos, donde se evidencia la ausencia de alelo silvestre (WT) del gen *Npff1r* en los ratones NPFF1R KO. Adicionalmente, a efectos de validación, se llevaron a cabo estudios de expresión del ARNm de NPFF1R, así como del mensajero de NPFF2R, en una selección de tejidos relevantes, como hipotálamo, hipófisis, gónadas, corazón, hígado y pulmón, de ratones WT y NPFF1R KO. Nuestros análisis mostraron la expresión del transcrito de NPFF1R selectivamente en las muestras de hipotálamo, hipófisis y gónadas procedentes de ratones WT. En cambio, el transcrito de NPFF2R se encontró en hipotálamo, hipófisis y gónadas de ratones WT y NPFF1R KO (*Fig.38*).

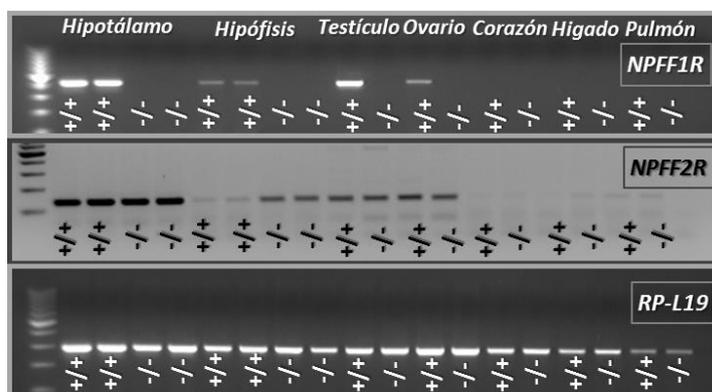


Figura 38. Análisis de expresión mediante PCR de los ARNm de NPFF1R y NPFF2R en hipotálamo, hipófisis, testículo, ovarios, corazón, hígado y pulmón procedentes de los ratones WT (+/+) y NPFF1R KO (+/-).

4.1.1.2. VALIDACIÓN FUNCIONAL DEL MODELO MUTANTE NPFF1R KO

Adicionalmente, se implementaron estudios funcionales *in vivo* e *in vitro* con el fin de comprobar experimentalmente la ausencia de efectos biológicos de RFRP en nuestro modelo mutante NPFF1R KO.

In vivo, analizamos en hembras adultas OVX de ambos genotipos (WT y NPFF1R KO) la respuesta de LH a la administración i.c.v. del fragmento activo, RFRP₃₋₈. Según se muestra en la **Fig.39 (A)**, el grupo NPFF1R KO OVX presenta niveles de LH ligeramente superiores a los de animales WT OVX, aunque este incremento no es significativo. Además, en ausencia de NPFF1R, la administración de RFRP₃₋₈ no produce el descenso de los niveles de LH que se observa en los animales WT OVX, 15 min después de la administración del péptido.

In vitro, analizamos en incubaciones de hipófisis procedentes de machos adultos WT y NPFF1R KO, la liberación de LH al medio en respuesta al tratamiento con GnRH y RFRP₃₋₈. Según se muestra en la **Fig.39 (B)**, en condiciones basales, la liberación de LH al medio de incubación es similar entre los grupos NPFF1R KO y WT. Sin embargo, las hipófisis carentes del NPFF1R liberan significativamente más LH en respuesta a la estimulación con GnRH que las procedentes de los animales WT, pero son incapaces de responder con una disminución de LH a la administración de RFRP₃₋₈; efecto que sí se observa en los animales WT.

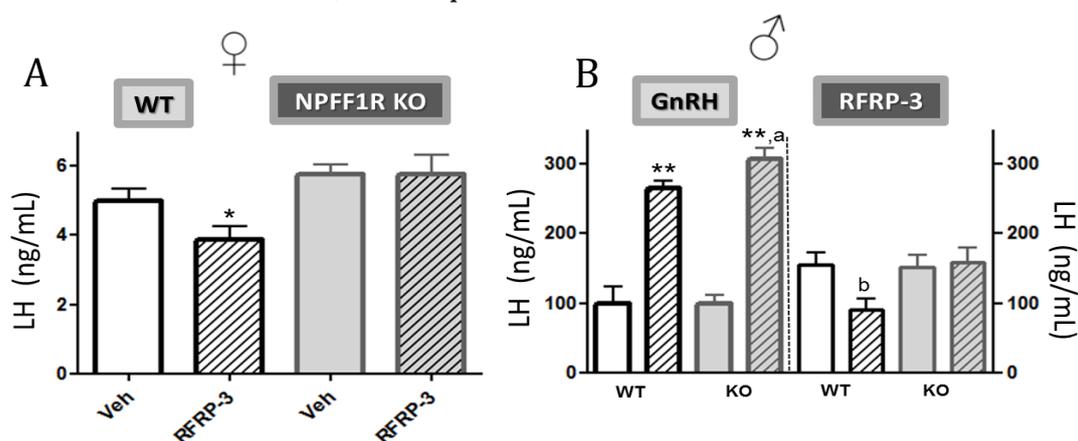


Figura 39. (A) Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratonas hembra WT y NPFF1R KO OVX, 15-min tras la inyección i.c.v. de RFRP₃₋₈ o vehículo. **(B)** Niveles de LH (ng/mL) secretados al medio de incubación por hipófisis de ratones macho WT y NPFF1R KO, 60-min tras ser incubadas con medio solo (DMEM; barras lisas) o medio conteniendo GnRH (10⁻⁸M) o RFRP₃₋₈ (10⁻⁸M); barras rayadas. Los datos son la media ± SEM de hasta 8 determinaciones independientes por grupo. *, p≤0.05 vs valores correspondientes a los animales inyectados con vehículo. **, p≤0.01 vs valores incubados con DMEM solo; **a**, p≤0.01 vs valores en WT; **b**, p≤0.01 vs valores del grupo DMEM en incubaciones con RFRP₃₋₈ (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.1.1.3. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO NPFF1R KO: ESTUDIOS DE PUBERTAD

En hembras peri-puberales NPFF1R KO, los análisis hormonales no muestran cambios significativos de los niveles circulantes de LH y FSH antes (30d) y durante (36d) la pubertad (*datos FSH no mostrados*) (**Fig.40**).

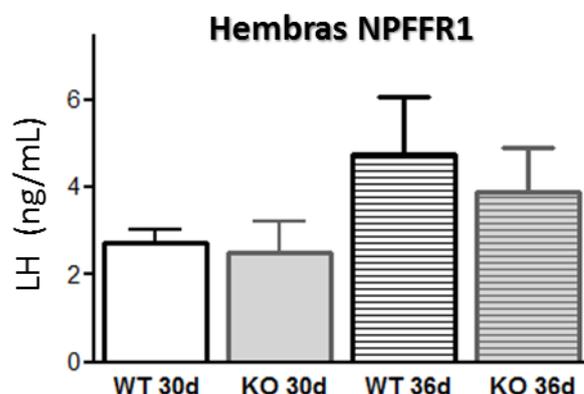


Figura 40. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratonas WT y NPFF1R KO peri-puberales. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 7 determinaciones independientes por grupo.

La eliminación congénita de NPFF1R no parece alterar la progresión puberal, como se deduce por la similitud en la evolución y la edad media de aparición de la AV en ratonas WT y NPFF1R KO (**Fig.41**). Tampoco se apreciaron diferencias en la edad de presentación del primer estro (*datos no mostrados*).

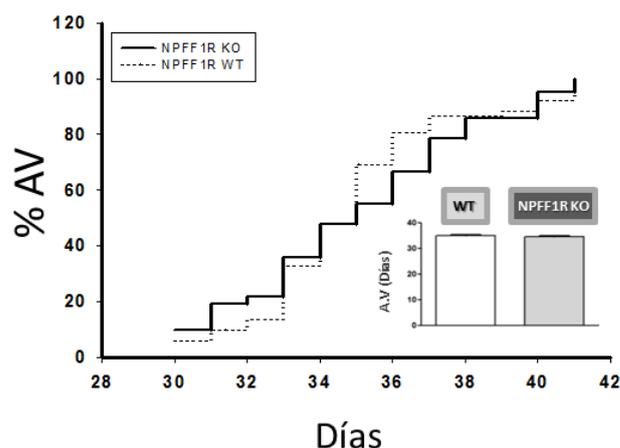


Figura 41. Evolución (días) y edad media (días) de la aparición de la AV. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 19 determinaciones independientes por grupo.

Además, la maduración ovárica así como la dinámica ovulatoria son similares en ratonas peri-puberales WT y NPPF1R KO, como revela el análisis histológico de sus ovarios (**Fig.42 y 43**).

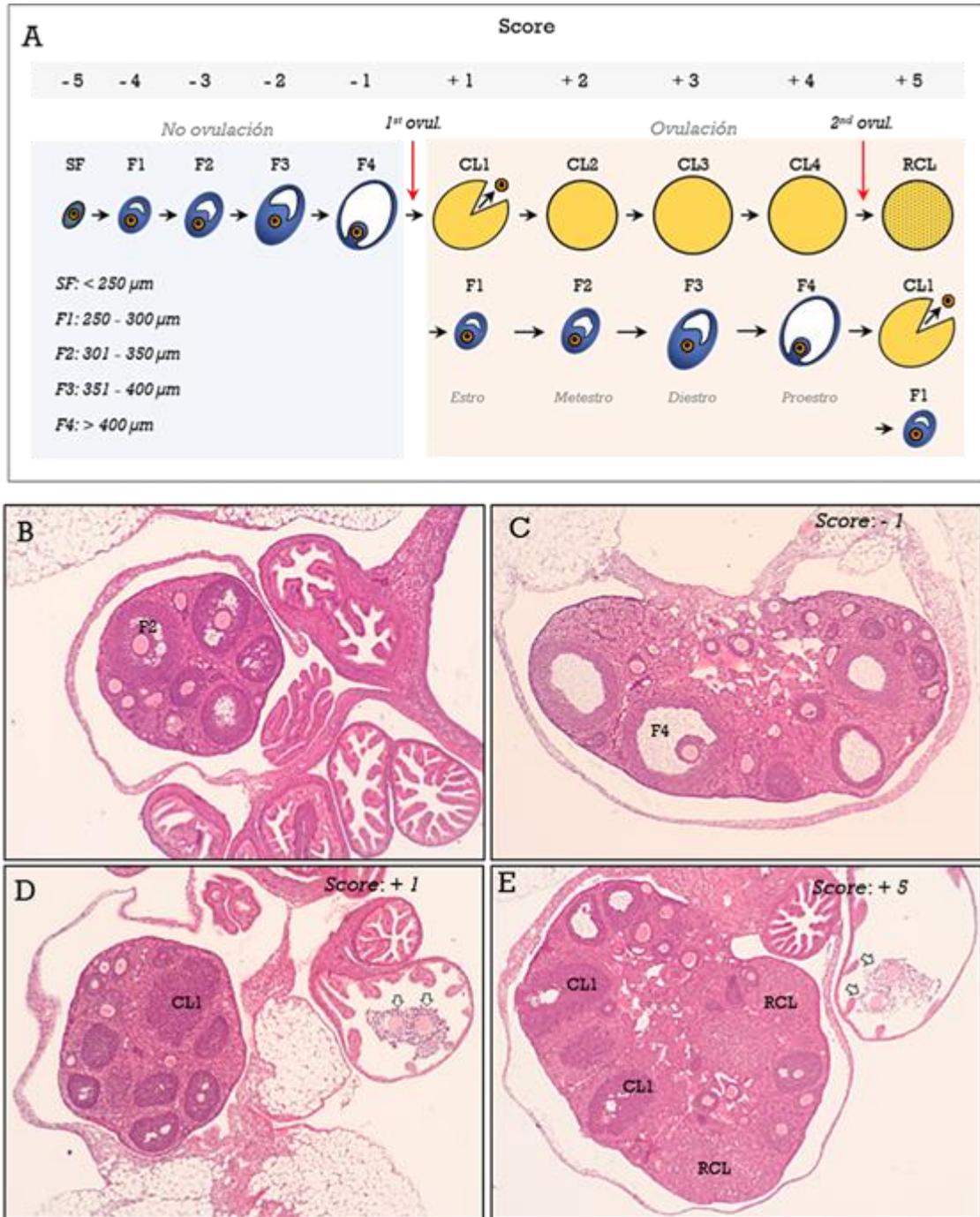


Figura 42. (A) Esquema utilizado en la evaluación semicuantitativa de la función ovárica. Los folículos fueron clasificados en las siguientes fases: SF ($\leq 250 \mu\text{m}$), F1 (250-300 μm), F2 (301-350 μm), F3 (351-400 μm) y F4 ($>400 \mu\text{m}$). (B-E) Ejemplos de cortes histológicos de ovarios de ratonas WT y NPPF1R KO de 36 días de edad donde pueden observarse cuerpos lúteos (CL1) y los cuerpos lúteos en regresión (RCL).

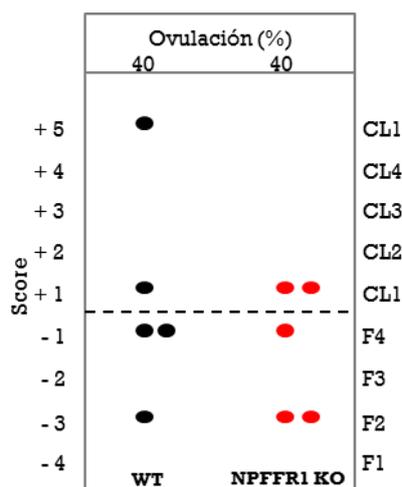


Figura 43. Maduración ovárica en ratones WT y NPFF1R KO peri-puberales (36 días). También se muestra el porcentaje de animales que han presentado ovulación ese día.

En ratones macho, los análisis hormonales en animales WT y NPFF1R KO peri-puberales muestran una elevación de los niveles circulantes de LH antes (35d) y durante (43d) la pubertad, mientras que las concentraciones de FSH fueron similares durante las edades estudiadas (*datos no mostrados*) (**Fig.44**).

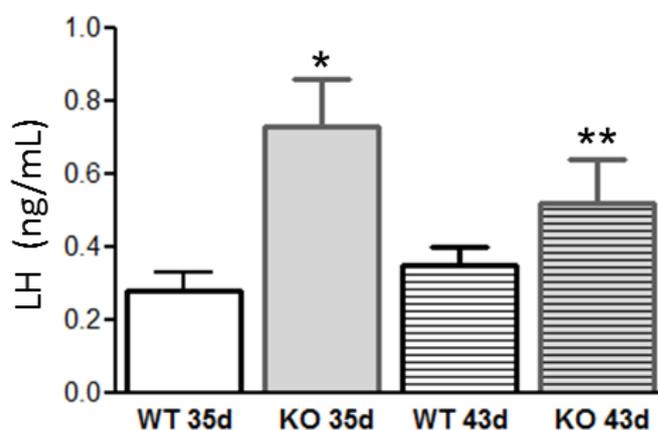


Figura 44. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratones WT y NPFF1R KO peri-puberales. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 7 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs valores en WT (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

La progresión puberal, al igual que ocurre en hembras, no parece estar alterada por la eliminación congénita de NPFF1R como se aprecia por la similitud en la evolución y edad media de aparición de la SBP, como signo externo de pubertad en machos (**Fig.45**).

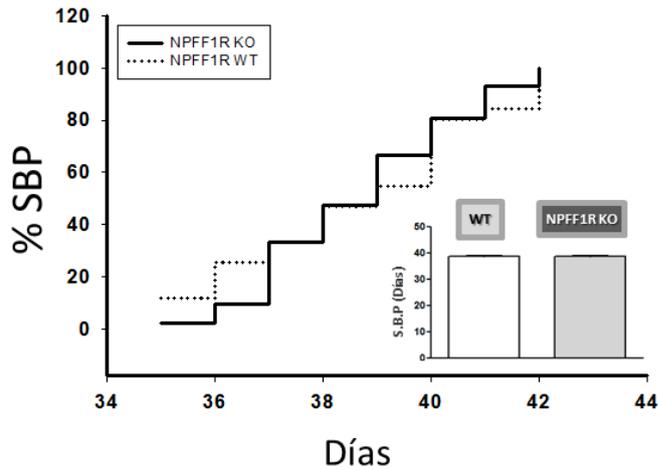


Figura 45. Evolución (días) y edad media (días) de la aparición de la SBP. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 19 determinaciones independientes por grupo.

En la misma línea, el análisis histológico de testículos de ratones WT y NPFF1R KO peri-puberales no mostró diferencias morfológicas significativas (**Fig.46**).

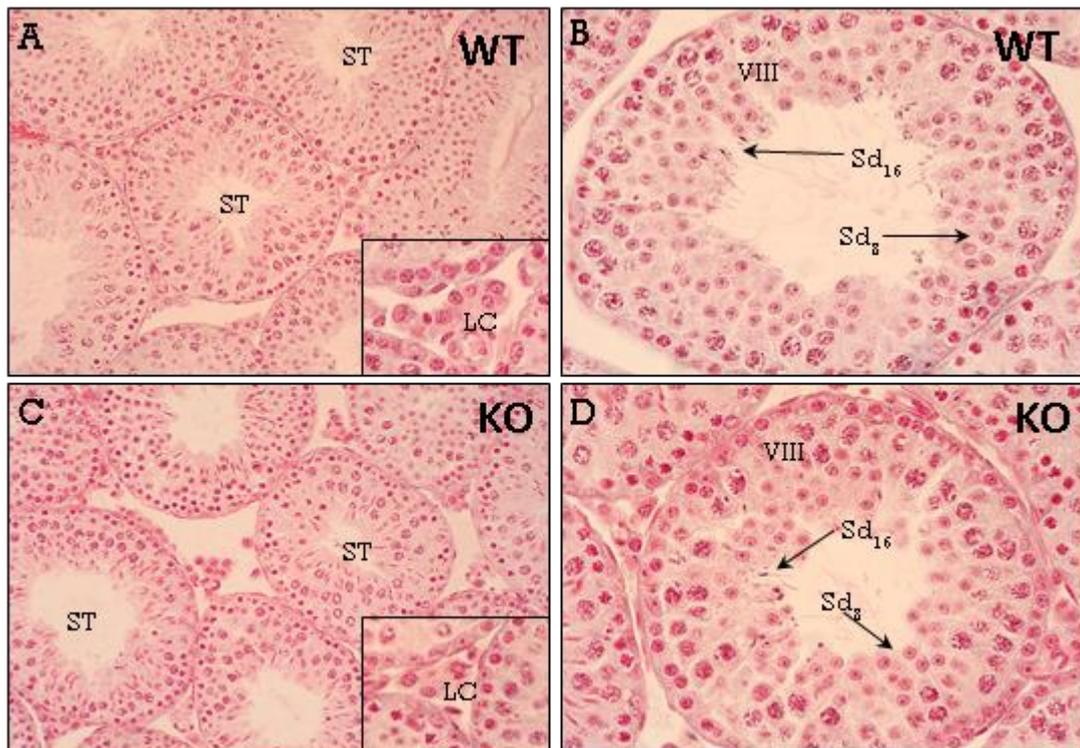


Figura 46. (A,C) Cortes histológicos representativos de testículos de ratones WT y NPFF1R KO de 35 días de edad, donde se muestran túbulos seminíferos normales (ST) y células de Leydig diferenciadas (LC, recuadro). (B,D) La finalización de la primera onda espermatogénica se evidencia por la presencia de túbulos en la fase VIII que contienen espermátides en fase 8 (Sd8) y espermátides en fase 16 (Sd16).

4.1.1.4. FUNCIÓN REPRODUCTORA EN EDAD ADULTA EN RATONES NPFF1R KO

Nuestros resultados indican que las ratonas hembra adultas NPFF1R KO no presentan diferencias en cuanto al tamaño y el peso corporal con respecto a los ratones WT. El peso de ovarios está ligeramente aumentado (8%), aunque no es significativo, lo que puede ser debido al aumento significativo de los niveles circulantes de FSH. En cuanto a los niveles circulantes de LH, estos son similares en ambos genotipos (*Tabla 3*).

Tabla 3. Peso corporal (g), peso de ovario (mg) y niveles séricos de LH y FSH (ng/mL) en ratonas hembra adultas WT y NPFF1R KO. **, $p < 0.01$ vs correspondientes valores en el grupo WT (Student t-test).

	P. Corporal (g)	Ovarios (mg)	LH (ng/mL)	FSH (ng/mL)
NPFF1R WT	22,21±0,32 (n=47)	20,22±1,85 (n=9)	0,3±0,02 (n=83)	3,92±0,41 (n=67)
NPFF1R KO	23,55±0,33 (n=53)	21,67±3,18 (n=12)	0,33±0,02 (n=84)	5,63**±0,65 (n=52)

Además, en hembras adultas NPFF1R KO, la amplitud del pico pre-ovulatorio de LH no muestra diferencias con respecto a las ratonas WT (*Fig.47*) y también tienen conservada la ciclicidad estral (monitorizada mediante citología vaginal) (*Fig.48*).

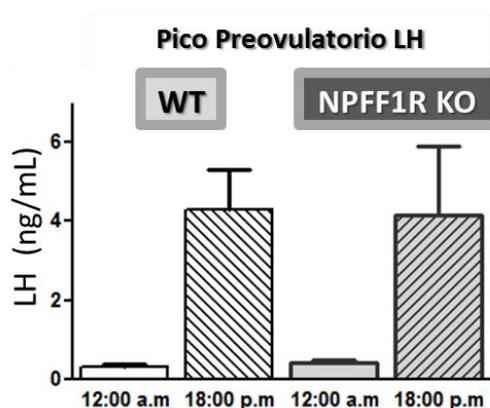


Figura 47. Magnitud del pico pre-ovulatorio en hembras WT y NPFF1R; comparación entre los niveles de LH (ng/mL) a las 12:00h y las 18:00h del día de proestro. Los datos se representan como la media ± SEM de, al menos, 6 determinaciones independientes por grupo.

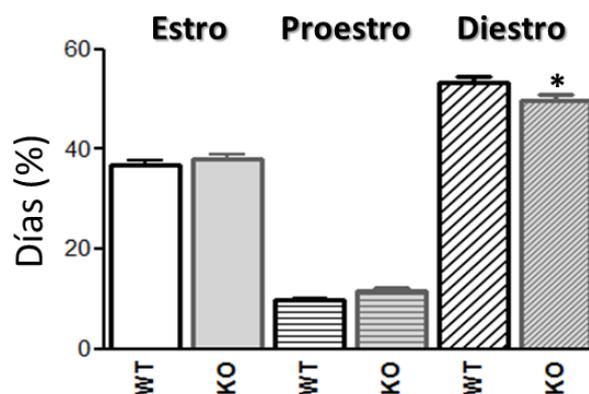


Figura 48. Dinámica de la ciclicidad estral en hembras adultas WT y NPFF1R KO, estimada como el número de días en cada fase del ciclo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$ vs valores en WT. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Las hembras NPFF1R KO también mantienen conservada su fertilidad y tras el cruce con machos de su mismo genotipo, la duración del embarazo y el peso corporal de las crías el día de nacimiento son similares a los que presentan las ratonas WT. Sin embargo, el número de crías por camada es significativamente mayor en las ratonas NPFF1R KO (**Fig.49**).

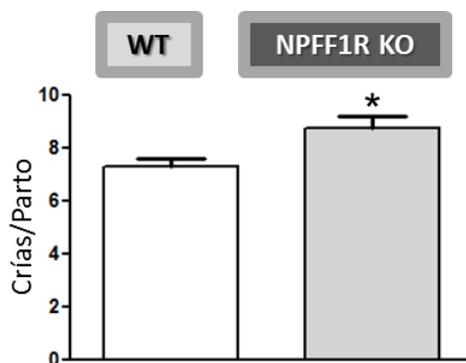


Figura 49. Representación del número de crías por camada en hembras WT y NPFF1R KO. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 29 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$ vs valores en WT (Student t-test).

Los ratones macho adultos NPFF1R KO, al igual que las hembras, no presentan diferencias en cuanto a tamaño y peso corporal con respecto a los ratones WT. En cuanto al peso de testículos, se observa un ligero aumento (10%) no significativo, que puede ser debido al aumento significativo de los niveles de FSH. En cuanto a los niveles circulantes de LH, estos son similares en ambos genotipos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Peso corporal (g), peso de testículo (mg) y niveles séricos de LH y FSH (ng/mL) en ratones macho adultos WT y NPFF1R KO. **, $p \leq 0.01$ vs correspondientes valores en el grupo WT (Student t-test)

	P. corporal (g)	Testículos (mg)	LH (ng/mL)	FSH (ng/mL)
NPFF1R WT	28,21±0,32 (n=39)	191,23±4,22 (n=26)	0,45±0,04 (n=83)	16,23±0,49 (n=86)
NPFF1R KO	29,1±0,33 (n=41)	212,91±6,84 (n=22)	0,38±0,03 (n=84)	18,96**±1,01 (n=87)

4.1.1.5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA DE LOS RATONES DOBLE MUTANTES NPFF1R/Gpr54 KO

Tras la caracterización del modelo NPFF1R KO, procedimos al estudio fenotípico y endocrino de la función reproductora de ratones dobles mutantes NPFF1R y Gpr54, comparándolos con ratones WT, NPFF1R KO y Gpr54 KO.

Nuestros resultados indican que, al igual que el genotipo Gpr54 KO, las ratonas NPFF1R/Gpr54 KO no presentan signos externos de pubertad (AV) y, en comparación con hembras WT, muestran un descenso significativo del peso de ovarios y útero. Adicionalmente, estas ratonas también mostraban unos niveles circulantes basales de gonadotropinas significativamente disminuidos (**Fig. 50**).

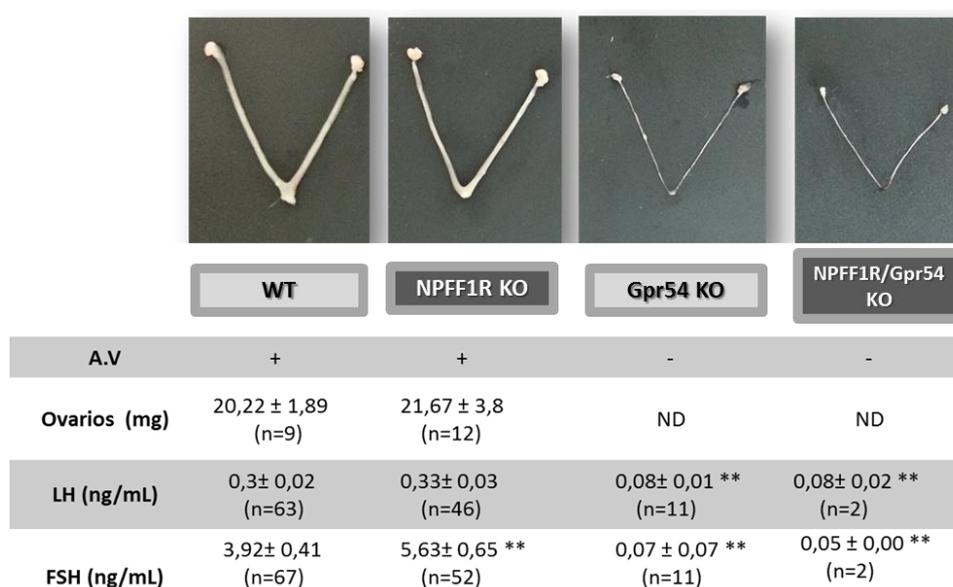


Figura 50. Fotografías representativas de los ovarios y úteros de los genotipos estudiados (WT, NPFF1R KO, Gpr54 KO y doble mutante NPFF1R/Gpr54 KO). Índices reproductivos adicionales que incluye apertura vaginal (AV), peso de ovarios y niveles basales circulantes de LH y FSH. **, $p \leq 0.01$ vs correspondientes valores en WT (Student t-test).

4.1.2. ANÁLISIS DE INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO EN EL CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS MEDIANTE ESTUDIOS EN MUTANTES NPFF1R KO

4.1.2.1. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DEL RFRP COMO MEDIADOR DEL FEEDBACK NEGATIVO DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS

Con este objeto, analizamos los niveles circulantes de gonadotropinas en ratones WT y NPFF1R KO en presencia o ausencia de esteroides gonadales.

Como se muestra en la **Fig.51**, en ratonas adultas WT, la retirada de estrógenos por OVX produjo un incremento significativo de los niveles circulantes de LH (**A**) y FSH (**B**) desde las 48h tras OVX, que permanece hasta la finalización del estudio, 40 días después. En los animales NPFF1R KO este aumento es significativamente mayor al que se produce en los ratones WT a partir de 48 h tras OVX; sin embargo, en el día 40 tras OVX, estos animales mostraron unos niveles circulantes de LH similares a los de sus controles WT. En cuanto a los niveles circulantes de FSH, a las 48h de la OVX se produce un aumento significativo de estos niveles en las ratonas WT; aumento que no se observa en las ratonas NPFF1R KO hasta los 7d tras OVX.

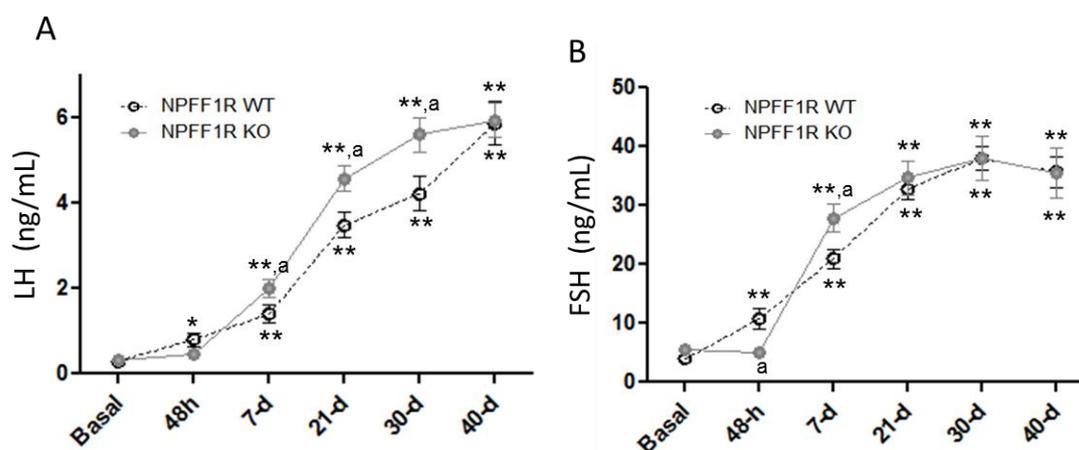


Figura 51. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en hembras adultas WT y NPFF1R KO antes (Basal) y 48-h, 7, 21, 30 y 40 días después de la OVX. Los datos se representan como la media ± SEM de, al menos, 8 determinaciones independientes por grupo. *, p ≤ 0.05 vs basal; **, p ≤ 0.01 vs basal; a, p ≤ 0.05 vs valores WT (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Análisis similares se llevaron a cabo en machos. Como se muestra en la **Fig.52**, en ratones macho adultos WT, la retirada de T por ORX produjo un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH (**A**) y FSH (**B**) desde las 48h que permanece hasta la finalización del estudio, 40 días después. En los animales NPFF1R KO este aumento a las 48h es significativamente inferior al que se produce en los ratones WT. Sin embargo, a la finalización del estudio alcanzan unos niveles circulantes de LH similares a los observados en sus controles WT. En cuanto al aumento de la concentración FSH tras la ORX, en líneas generales no se encontraron diferencias significativas entre los ratones NPFF1R KO y WT, salvo en el día 21 tras ORX, en el que los valores de FSH fueron ligeramente inferiores en los ratones NPFF1R KO.

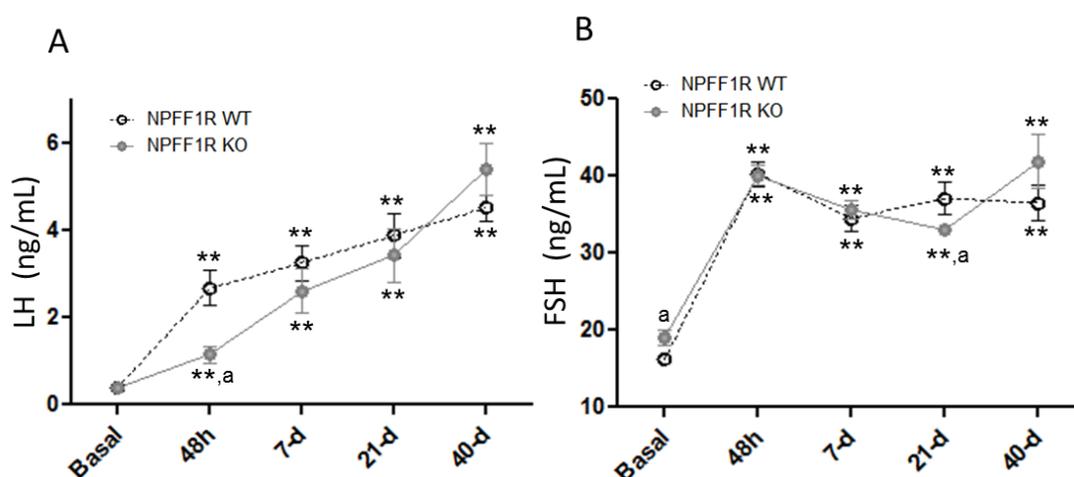


Figura 52. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en machos adultos WT y NPFF1R KO antes (Basal) y 48h, 7, 21 y 40 días después de la ORX. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 8 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs basal; **a**, $p \leq 0,05$ vs valores WT (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.1.3. ANÁLISIS DE INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y SEÑALES DE ORIGEN CENTRAL EN EL CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS MEDIANTE ESTUDIOS EN MUTANTES NPFF1R KO

4.1.3.1. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE RFRP Y GnRH EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS

Para determinar las posibles interacciones entre RFRP y GnRH en el control de la secreción de gonadotropinas, utilizamos como modelo experimental a ratones macho adultos WT y NPFF1RR KO al que aplicamos el protocolo descrito en el *experimento 6*.

Nuestros resultados indican que la administración intraperitoneal de GnRH (0.25 μ g/ratón) produce un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH y FSH, en ambos genotipos, 30 minutos después de la inyección del péptido (*Fig.53*). Sin embargo, para LH, este incremento fue significativamente mayor en los ratones NPFF1RR KO en comparación con los ratones WT.

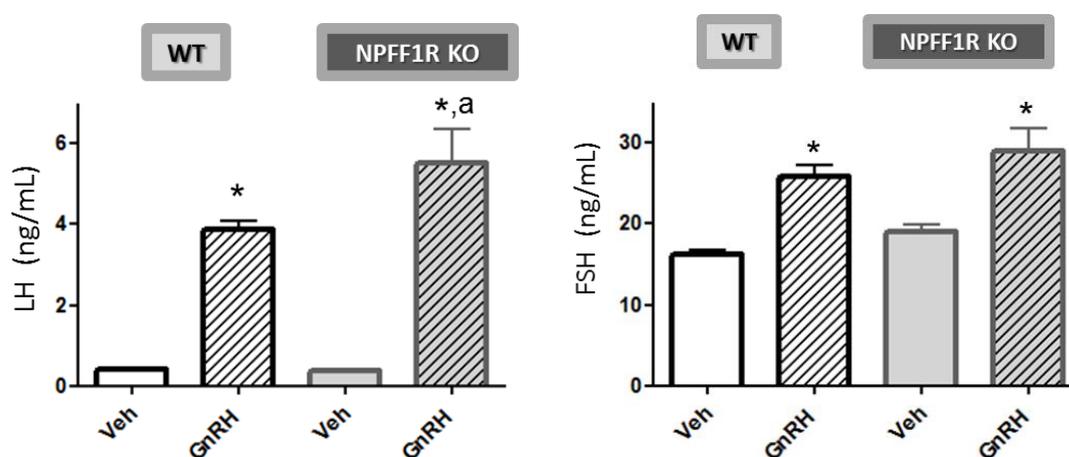


Figura 53. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratones macho adultos WT y NPFF1RR KO, 30 min después de la administración i.p. de GnRH o vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 9 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$ vs valores correspondientes a los animales inyectados con vehículo; a, $p \leq 0.05$ vs valores WT. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

4.1.3.2. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y LAS KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS

En este estudio, analizamos las posibles interacciones entre RFRP y las kisspeptinas en el control de la liberación de gonadotropinas utilizando el modelo

de ratón WT y NPFF1RR KO. Tras llevar a cabo el protocolo descrito en el **experimento 7**, nuestros resultados muestran que la administración central de kp-10 a los ratones WT cursa con un aumento muy significativo de los niveles circulantes de LH y FSH 15 minutos después de la administración del péptido. En el caso de los ratones NPFF1RR KO también observamos un aumento en los niveles circulantes de gonadotropinas con unos valores similares a los obtenidos en los animales WT (**Fig.54**).

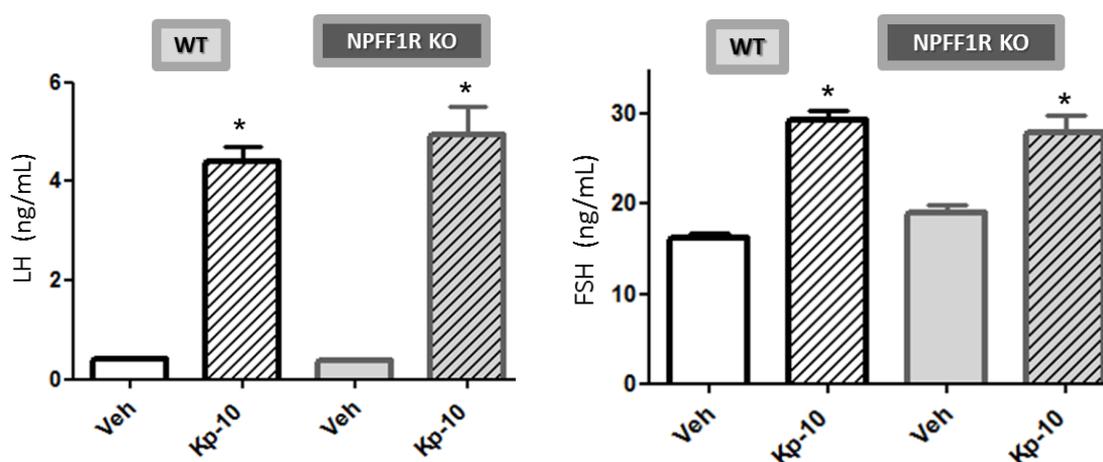


Figura 54. Niveles séricos de LH y FSH (ng/mL) en ratones macho adultos, WT y NPFF1RR KO, 15 min después de la administración i.c.v. de kp-10 o vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 11 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$ vs valores correspondientes a los animales inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.1.3.3. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL RFRP Y LA NKB EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS

Para llevar a cabo este estudio, analizamos los niveles de gonadotropinas circulantes tras la activación del receptor NK3R, mediante la administración del agonista, senktide, en ratones macho adultos WT y NPFF1RR KO, según el protocolo descrito en el **experimento 8**. Nuestros resultados indican que la administración central de senktide produce un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH y FSH, en ambos genotipos, 15 minutos después de la administración. Sin embargo, este aumento fue significativamente inferior en los ratones NPFF1RR KO en comparación con los ratones WT (**Fig.55**).

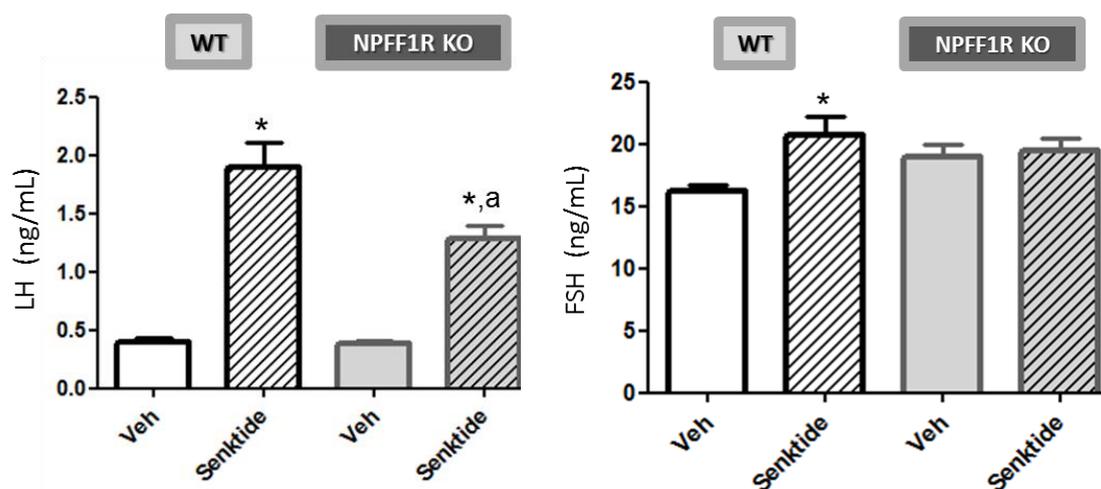


Figura 55. Niveles séricos de LH y FSH (ng/mL) en ratones macho adultos, WT y NPFF1R KO, 15 min tras la administración central de senktide o vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 13 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$ vs valores correspondientes a los animales inyectados con vehículo; a, $p \leq 0.05$ vs valores WT (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.1.3.4. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE *KISS1* EN EL RATÓN NPFF1R KO

Adicionalmente, se estudió, en ratones macho adultos WT y NPFF1R KO, la expresión hipotalámica de ARNm de *Kiss1* en sus dos principales áreas de localización, el núcleo ARC y el AVPV. Nuestros resultados indican que el número de células *Kiss1* y expresión total de *Kiss1* en el núcleo ARC de los ratones NPFF1R KO es significativamente mayor en relación con sus controles WT (Fig.56 y 57).

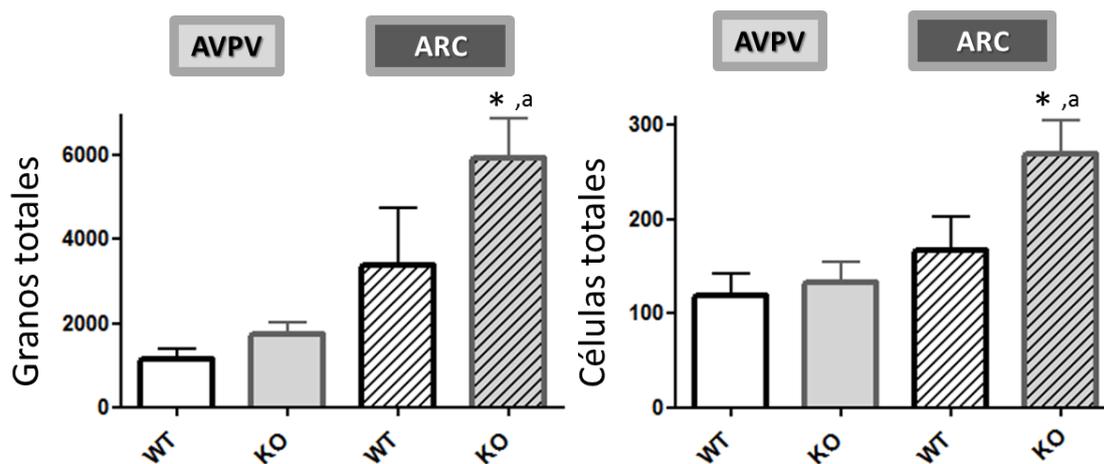


Figura 56. Datos cuantitativos de los niveles de ARNm de *Kiss1* en el AVPV y ARC de ratones macho adultos WT y NPFF1R KO; se ofrecen datos de expresión total (valorados como granos en los análisis ISH) y número de células con expresión *Kiss1*. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 4 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$ vs valores correspondientes al AVPV; a, $p \leq 0.05$ vs valores WT (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

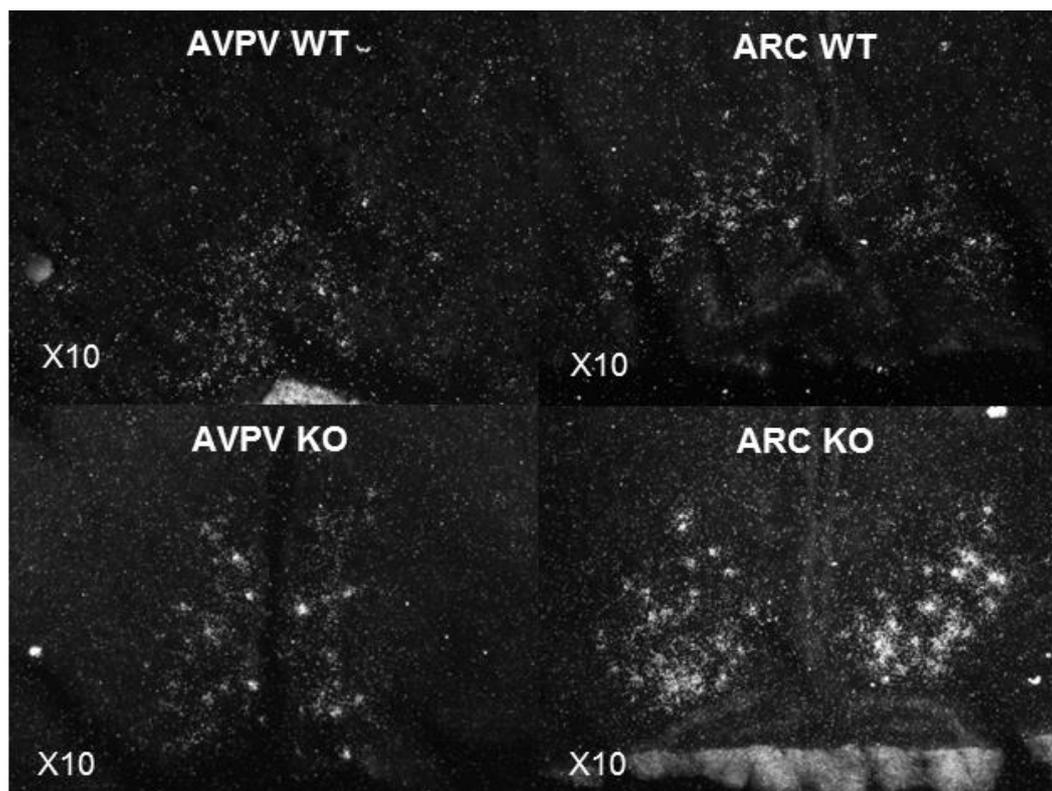


Figura 57. Fotomicrografías representativas de expresión de Kiss1 en el AVPV y el núcleo ARC de ratones macho adultos WT y NPFF1R KO analizados mediante ISH.

4.2. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LA REGULACIÓN INTEGRADA DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA Y LA REPRODUCCIÓN EN RATONES MUTANTES NPFF1R KO

4.2.1. ANÁLISIS DE RESPUESTAS GONADOTRÓPICAS AL ESTRÉS METABÓLICO EN EL RATÓN NPFF1R KO

Para determinar los efectos del estrés metabólico sobre el control de la función reproductora en ratones deficientes en NPFF1R se realizaron los *experimentos 9 y 10*.

4.2.1.1. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DE LAS GONADOTROPINAS Y EL PESO CORPORAL EN RESPUESTA AL AYUNO

Para analizar la implicación del sistema RFRP/NPFF1R en el control de la liberación de gonadotropinas y en el peso corporal, en el *experimento 9*, utilizamos ratones macho adultos WT y NPFF1R KO. Nuestros resultados muestran

que los ratones WT y NPFF1R KO parten de un peso corporal similar y que tras un ayuno de 12/24h se produce una caída del peso en ambos genotipos. Sin embargo, a las 12h, esta disminución de peso es mayor en los animales NPFF1R KO frente a la observada en sus controles WT (**Fig.58 A**). Los niveles circulantes de LH, en los ratones WT, se encuentran disminuidos tras 12h de ayuno, mientras que en los ratones NPFF1R KO, esta bajada no se observa hasta las 24h, alcanzando en estos momentos unos niveles similares a los de los ratones WT (**Fig.58 B**).

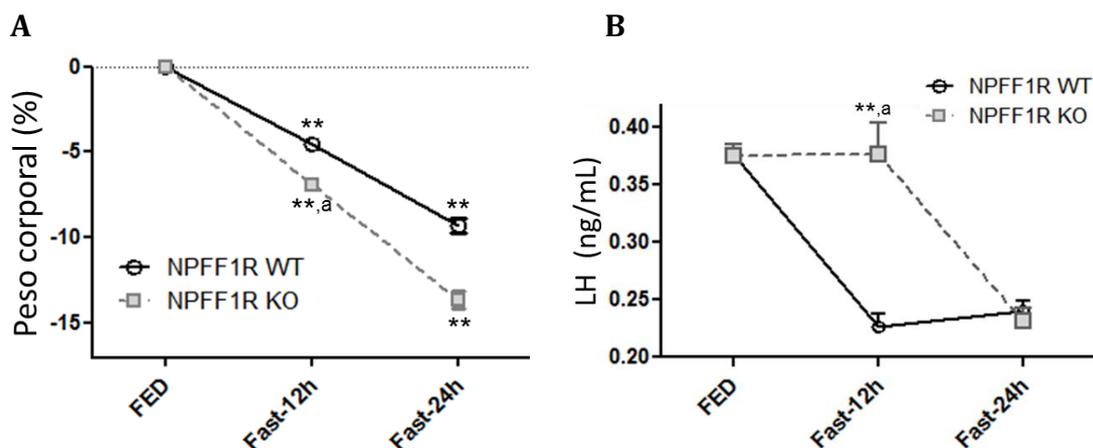


Figura 58. (A) Disminución del peso corporal (%) en ratones macho WT y NPFF1R KO sometidos a ayuno (FED, alimentación ad libitum; Fast-12h, ayuno 12h; Fast-24h, ayuno 24h). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 9 determinaciones independientes por grupo. **(B)** Disminución de los niveles circulantes de LH (ng/mL) en ratones macho WT y NPFF1R KO tras ayuno. Los datos son la media \pm SEM de, al menos, 9 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs valores FED; a, $p \leq 0.05$ vs valores WT (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.2.1.2. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DE GONADOTROPINAS Y PESO CORPORAL EN RESPUESTA A UNA DIETA ALTA EN GRASA (HFD)

Para llevar a cabo este estudio, en el **experimento 10**, se utilizaron ratones macho adultos WT y NPFF1R KO. Nuestros resultados muestran que tras 9 semanas de HDF se produce un aumento del peso corporal aproximadamente del 40% en ratones WT y NPFF1R KO con respecto a los animales alimentados con LFD, sin observarse diferencias entre ambos genotipos (**Fig.59 A y B**). Por otro lado, la determinación de los niveles circulantes de LH en estos animales muestra, en ratones WT, una disminución del 50% tras 9 semanas de dieta HFD vs valores

en ratones en dieta control. Sin embargo, los niveles de LH son similares en los ratones NPFF1RKO alimentados con HFD o su dieta control (**Fig.59 C**).

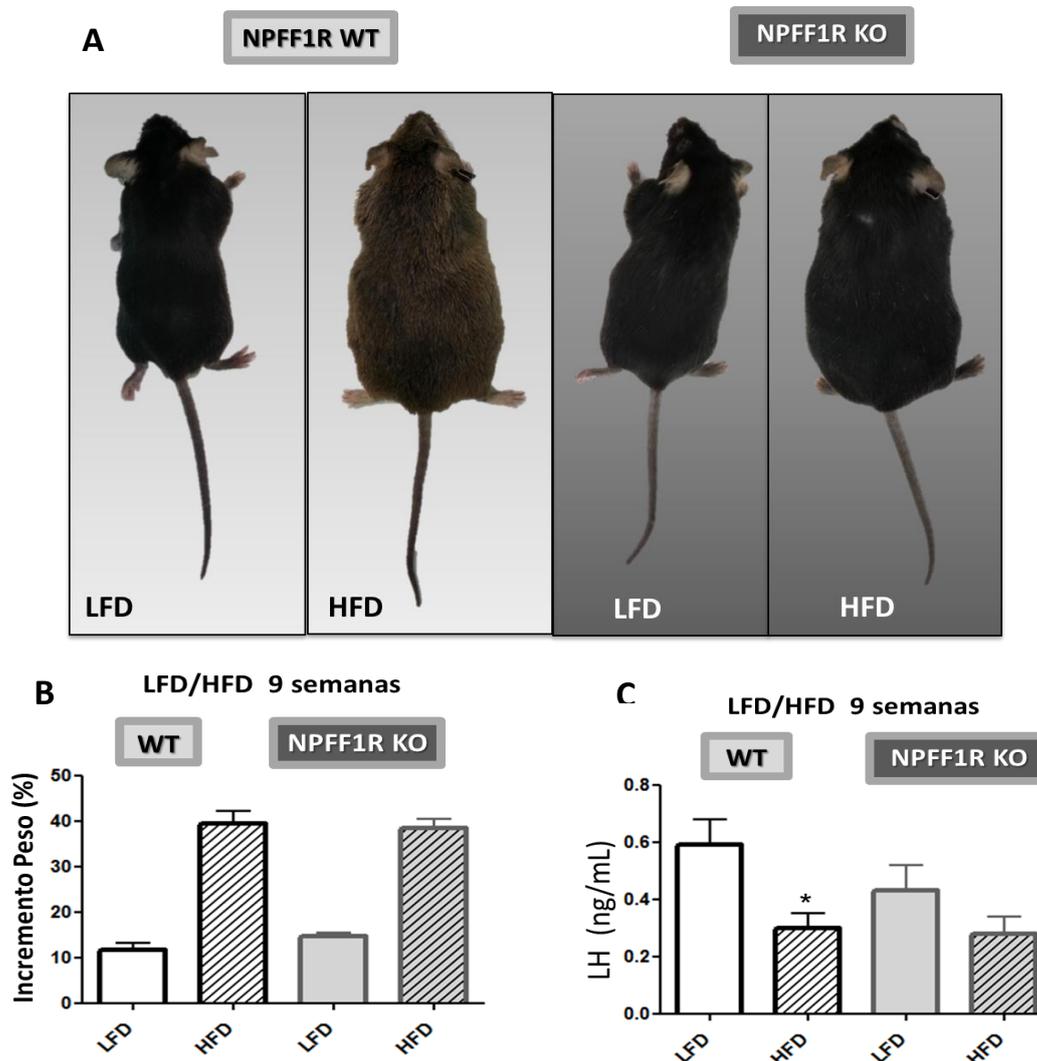


Figura 59. (A) Ratones macho WT y NPFF1R KO sometidos a una dieta LFD o HFD durante 9 semanas. **(B)** Incremento del peso corporal (%) en ratones macho WT y NPFF1R KO tras 9 semanas de dieta LFD o HFD. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 30 determinaciones independientes por grupo. **(C)** Niveles circulantes de LH en ratones macho WT y NPFF1R KO tras 9 semanas de dieta LFD o HFD ($n \geq 19$). * $p \leq 0,05$ vs valores LFD (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.2.1.3. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN EL CONTROL DE CAMBIOS DE PESO CORPORAL EN RESPUESTA A OVX

Para la realización de este estudio, utilizamos ratonas WT y NPFF1R KO previamente alimentadas ad libitum durante 12 semanas con una dieta HFD o LFD. En este momento fueron ovariectomizadas (OVX) y se monitorizó su peso a las 6- y 16-semanas tras la OVX (**experimento 11**). Este estudio nos permite identificar un

posible papel del RFRP en el cambio del peso corporal que se produce tras la OVX, una dieta HFD y el efecto combinado de ambas.

En concreto, nuestros resultados muestran que en las ratonas WT, la OVX se sigue de un incremento del peso corporal que solo es significativo tras 16 semanas y que se potencia con la alimentación con una HFD (**Fig.60 A y B**). Por su parte, en las ratonas NPFF1R KO el incremento de peso corporal que produce la OVX ya es significativo a las 6 semanas y solo se ve ligeramente potenciado por la alimentación con una HFD (**Fig.60 A y B**). Además, en ratonas WT, la alimentación con una HFD solo induce un incremento de peso significativo a las 16 semanas. En ratonas NPFF1R KO este aumento es significativo ya desde las 6 semanas (**Fig.60 C y D**).

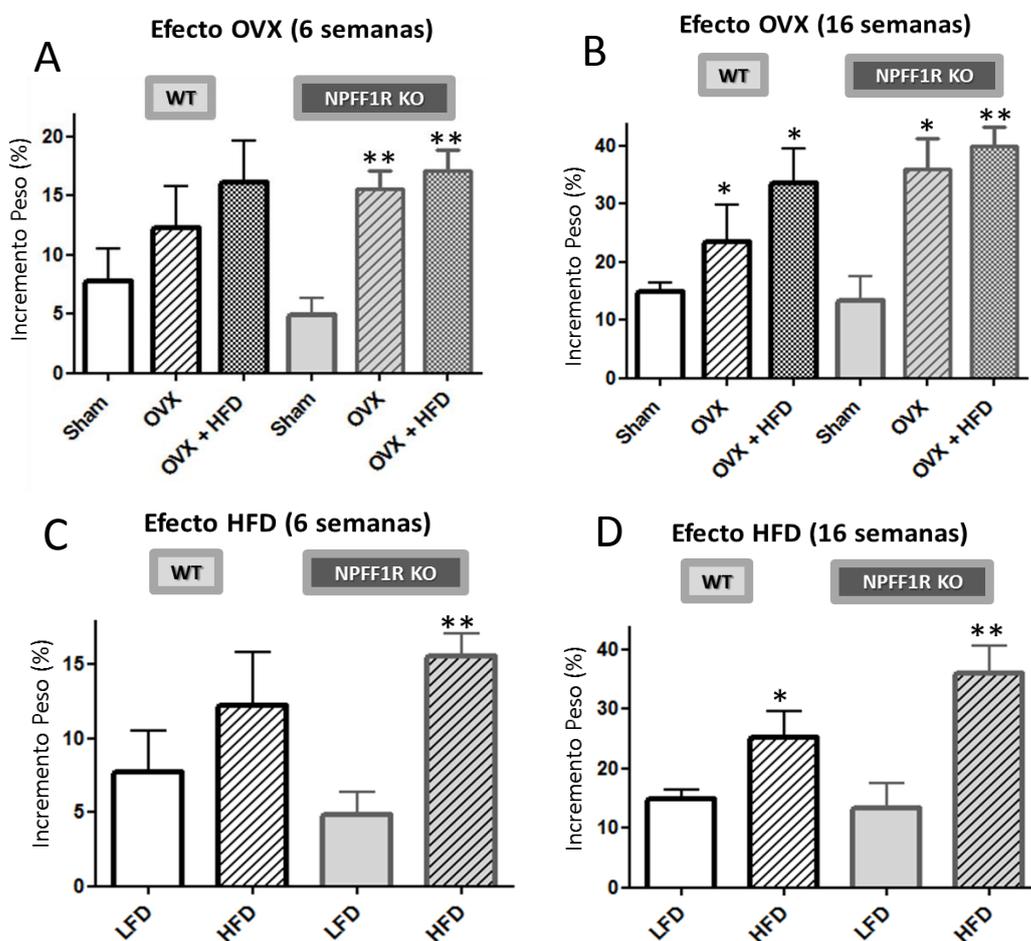


Figura 60. (A, B) Incremento del peso corporal (%) en ratonas WT y NPFF1R KO tras 6 y 16 semanas de OVX. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 6 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs valores Sham. (C, D) Incremento del peso corporal (%) en ratonas WT y NPFF1R KO tras 6 y 16 semanas en alimentación con HFD. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 6 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.05$ vs valores LFD (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.2.2. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DEL RFRP EN LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA

Para la realización de este estudio, en el *experimento 12*, procedimos a la administración i.c.v. de leptina, ghrelina o vehículo a ratones macho adultos NPFF1R KO y WT, alimentados previamente durante 9 semanas con una HFD o una LFD.

Nuestros datos muestran que, en los animales WT, la administración central de leptina disminuye la ingesta de alimentos, al menos, durante las 24 h que siguen al tratamiento. En los animales alimentados con una LFD, la disminución de la ingesta inducida por la leptina es significativa a partir de las 10 h., mientras que en los alimentados con una HFD lo es desde la primera hora (*Fig. 61*). En los ratones NPFF1R KO, la leptina inhibe de forma significativa la ingesta de alimentos, al menos, durante las 24 h que siguen al tratamiento y lo hace de forma significativa desde la primera hora, independientemente del tipo de dieta consumida por los animales previamente (*Fig. 61*).

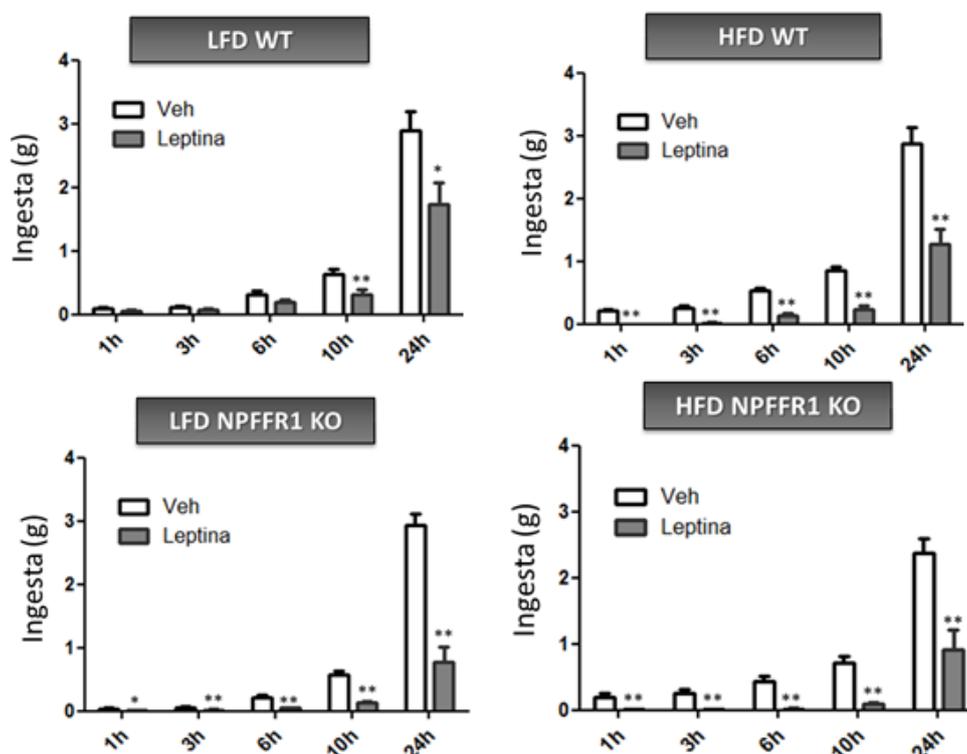


Figura 61. Monitorización de la ingesta en ratones macho WT y NPFF1R KO tras la administración i.c.v. de vehículo o leptina. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 19 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs valores ratones inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Nuestros datos también indican que, en los animales WT alimentados con una LFD, la administración central de ghrelina incrementa significativamente la ingesta durante las 10 primeras horas que siguen al tratamiento, mientras que en los alimentados con una HFD, el incremento de la ingesta inducido por la ghrelina solo se establece 3 h después del tratamiento, pero permanece, al menos, hasta 24 h después (**Fig. 62**). Nuestros datos también muestran que, en los animales NPFF1R KO, la administración de ghrelina solo incrementa la ingesta en los animales alimentados previamente con una LFD y que, igual que ocurre en los animales WT, este efecto solo es significativo durante las 10 horas que siguen al tratamiento (**Fig. 62**).

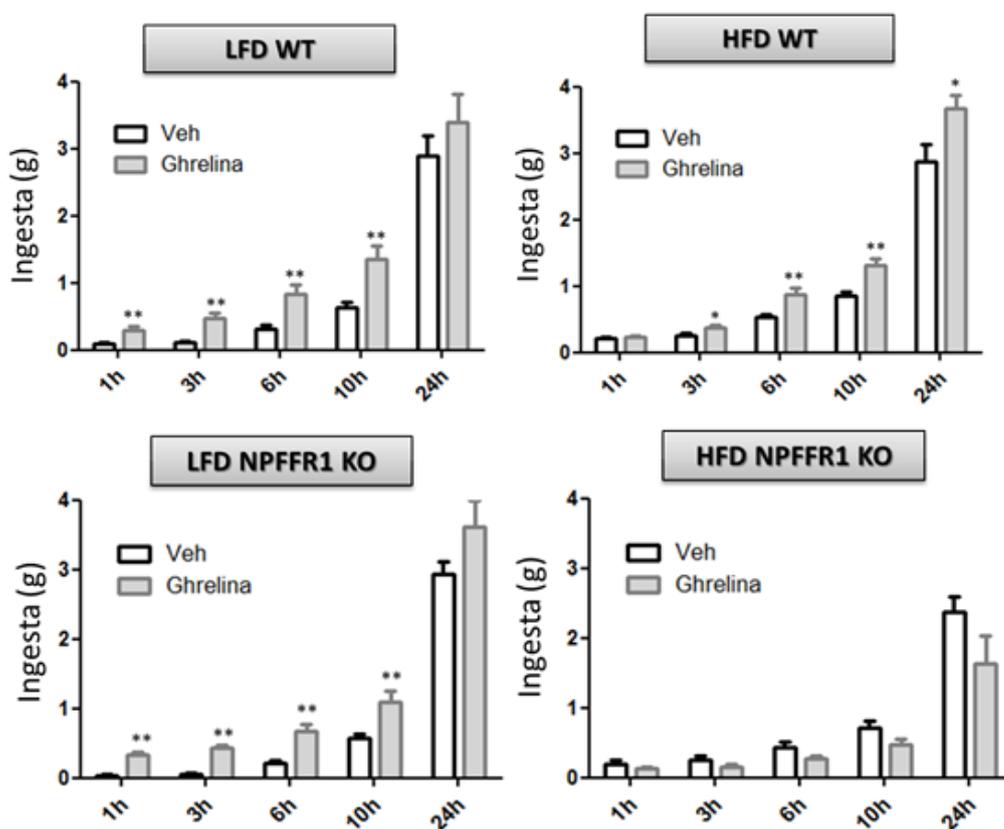


Figura 62. Monitorización de la ingesta en ratones macho WT y NPFF1R KO tras la administración i.c.v. de vehículo o ghrelina. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 21 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs valores ratones inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.2.3. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT) Y ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE INSULINA EN RATONES MUTANTES NPFF1R KO

En el *experimento 13* exploramos, en ratones macho adultos WT y NPFF1R KO, los niveles circulantes de glucosa e insulina en condiciones basales, así como la homeostasis de la glucosa mediante un GTT.

Nuestros resultados indican que la ausencia de NPFF1R no produce modificaciones significativas de los niveles circulantes de glucosa e insulina en ninguno de los sexos cuando los animales son alimentados con una dieta LFD (*Fig. 63*). Sin embargo, en machos y hembras WT y NPFF1R KO la alimentación durante con una HFD produce un incremento de los niveles circulantes de glucosa, de igual magnitud en ambos genotipos, que no se acompaña de modificaciones significativas de los niveles circulantes de insulina (*Fig. 63*).

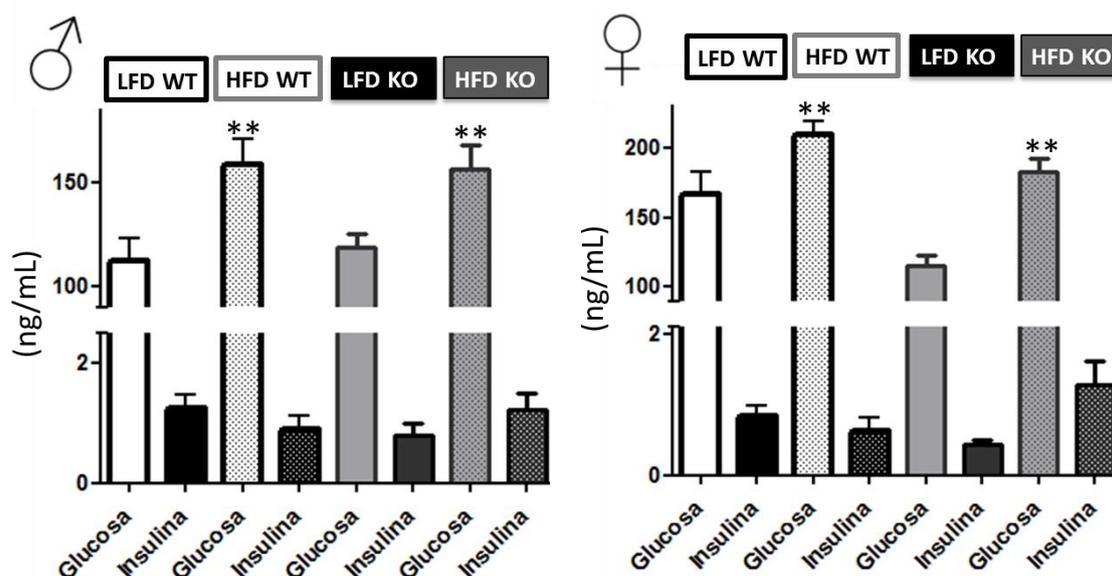


Figura 63. Niveles séricos insulina (ng/mL) y glucosa (mg/dL) en ratones macho y hembra WT y NPFF1R KO sometidos a una dieta LFD o HFD. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 6 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs grupo control alimentado con LFD (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Nuestros resultados también muestran que la administración i.p. de glucosa produce, en todos los grupos, un incremento de los niveles circulantes de glucosa que es evidente y similar a los 20 min de la inyección y que, salvo en los ratones NPFF1R KO alimentados con una HFD, va decreciendo paulatinamente hasta alcanzar niveles similares a los previos al test, 120 min después de la

administración de glucosa (**Fig. 64**). Por el contrario, en los animales NPFF1R KO alimentados con una HFD, los niveles circulantes de glucosa permanecen significativamente incrementados, al menos, durante 2 h después de la administración del bolo de glucosa y, por ello, la masa total de glucosa en sangre (AUC) durante el periodo de estudio es también significativamente mayor en ratones NPFF1R KO alimentados con HFD (**Fig. 64**).

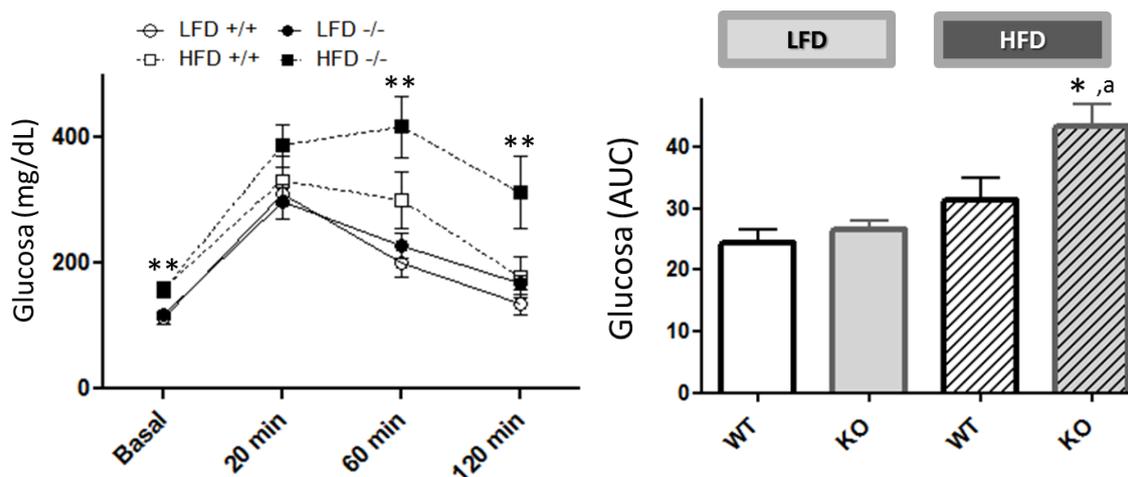


Figura 64. Niveles séricos de glucosa (mg/dL), antes y 20, 60 y 120 min después de la administración i.p. de glucosa (1g/Kg), en ratones WT y NPFF1R, alimentados con una dieta HFD o LFD. En el panel de la derecha, se muestran los niveles integrados de glucosa (área bajo la curva; AUC) a lo largo del periodo de estudio. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 6 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs grupo control alimentado con LFD; a, $p \leq 0.05$ vs ratones WT (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3. ESTUDIO *IN VIVO* DE LAS ACCIONES DIRECTAS E INDIRECTAS DE KISSPEPTINAS SOBRE NEURONAS GnRH EN EL CONTROL DEL EJE GONADOTRÓPICO Y EL METABOLISMO: ANÁLISIS EN EL RATÓN *Gpr54*^{-/-T}

Con el objetivo de analizar la importancia de la señalización kisspeptidérgica directa sobre neuronas GnRH, frente a posibles acciones sobre otras dianas centrales, en la mediación del efecto que diferentes señales ejercen en el control de la liberación de gonadotropinas y el metabolismo, se realizaron toda una serie de diseños experimentales en un modelo con expresión exclusiva del receptor, *Gpr54*, en células GnRH, el ratón *Gpr54* KI. Para ello procedimos, en primer lugar, a la caracterización de este modelo animal.

4.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y HORMONAL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA DE LOS RATONES *Gpr54*^{-/-T}

Dado que los ratones *Gpr54*^{-/-T} fueron generados en nuestro laboratorio mediante el cruce de ratones macho y hembra *Gpr54*^{+/-T} y *Gpr54*^{+/-} cedidos por el laboratorio del Prof. Günther Schütz (German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania), se realizó en primero lugar una validación genotípica, según lo descrito en el apartado 3.1.3., y, posteriormente, la caracterización fenotípica y hormonal de los mismos.

En hembras, la caracterización fenotípica incluyó análisis de peso corporal y de ovarios y los análisis histológicos de estos últimos. Nuestros resultados indican que las ratonas *Gpr54*^{-/-T} presentan, en la edad adulta, signos externos de llegada de la pubertad (AV) y una longitud del ciclo estral similar al de las ratonas *Gpr54*^{+/+T} (tomadas como controles al presentar un genotipo WT para *Gpr54* además del transgen para *Gpr54* -T-), así como también un peso de ovarios análogo al del grupo control. Por su parte, las ratonas *Gpr54*^{-/-} (que sólo se diferencian de las *Gpr54*^{+/+T} en que carecen del transgen T) no presentan, en la edad adulta, AV y muestran una reducción muy significativa del peso de ovarios con respecto a las ratonas *Gpr54*^{+/+T} (**Tabla 5** y **Fig.65**).

Tabla 5. Peso corporal (g) y de ovarios (mg), y niveles séricos de LH y FSH (ng/mL) en ratonas adultas Gpr54 ^{+/+}T, Gpr54 ^{-/-}T y Gpr54 ^{-/-}. **, p ≤ 0.01 vs correspondientes Gpr54 ^{+/+}T (comparación individual con Gpr54 ^{+/+}T mediante Student t-test).

	Gpr54 ^{+/+} T	Gpr54 ^{-/-} T	Gpr54 ^{-/-}
Peso Corporal (g)	21,49±0,15 (n=10)	20,04±0,12 (n=6)	22,45±0,12 (n=10)
Ovarios(mg)	16,36±1,64 (n=11)	16,5±1,44 (n=6)	ND
LH (ng/mL)	0,18±0,03 (n=11)	0,17±0,3 (n=8)	0,08±0,01** (n=10)
FSH (ng/mL)	2,94±1,04 (n=9)	3,00±1,14 (n=8)	0,20±0,07** (n=10)

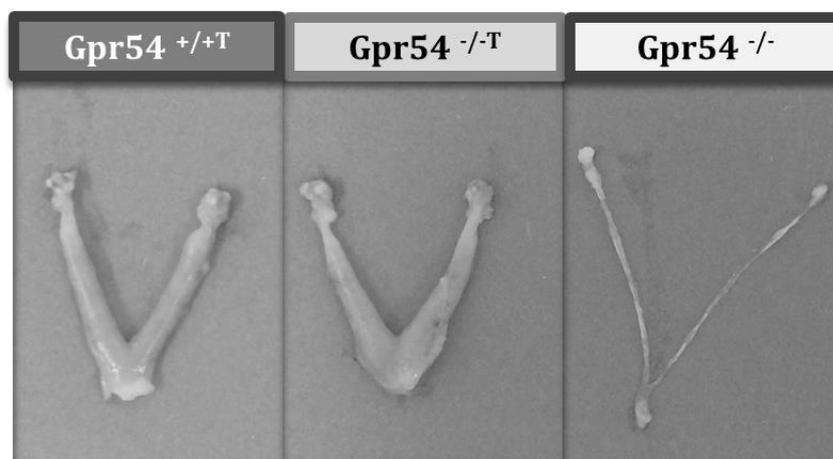


Figura 65. Fotografías representativas de los ovarios y úteros de los genotipos estudiados (Gpr54 ^{+/+}T, Gpr54 ^{-/-}T y Gpr54 ^{-/-}).

En cuanto al análisis endocrino, las ratonas Gpr54 ^{-/-}T mostraban unos niveles circulantes basales de LH y FSH similares a los que presentaban las ratonas Gpr54 ^{+/+}T, mientras que las ratonas Gpr54 ^{-/-} muestran unos niveles circulantes de ambas gonadotropinas significativamente disminuidos (**Tabla 5**).

El análisis de los ovarios en la edad adulta mostró que las ratonas Gpr54 ^{+/+}T presentaban ovarios con morfología normal, cíclicos con abundantes folículos en crecimiento y cuerpos lúteos del ciclo actual, así como cuerpos lúteos en regresión del ciclo previo (**Fig.66 A,B**). Las ratonas Gpr54 ^{-/-}T presentaban ovarios funcionales con folículos en crecimiento y cuerpos lúteos persistentes (**Fig.66 C-E**) y en 2 de ellas se observaba la presencia de quistes epiteliales en la médula ovárica (**Fig.66 F,G**).

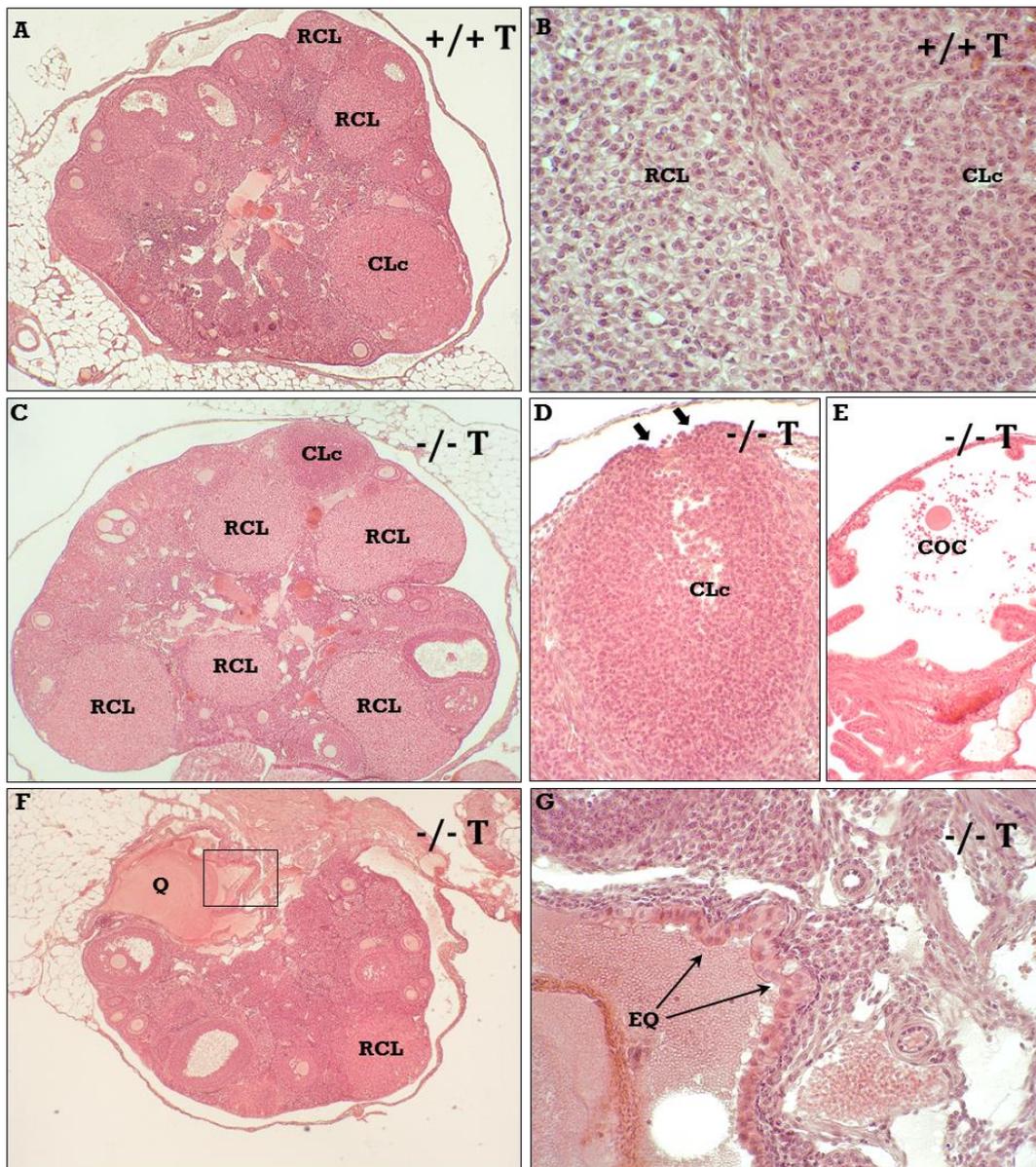


Figura 66. Secciones representativas de los ovarios de ratonas *Gpr54*^{+/+}T y *Gpr54*^{-/-}T. **(A)** Sección del ovario de una ratona *Gpr54*^{+/+}T en la fase de metestro (diestro-1), en la que se aprecia un cuerpo lúteo (CLc) del ciclo actual y cuerpos lúteos en regresión (RCL) de menor tamaño; en el panel **(B)** se aprecian las diferencias entre ambos tipos de cuerpos lúteos. **(C-G)** Secciones de ovario de ratonas *Gpr54*^{-/-}T; **(C)** Ovario en la fase de estró que muestra un cuerpo lúteo del ciclo actual (CLc), y abundantes cuerpos lúteos en regresión (RCL); **(D y E)** Se observa, a mayor aumento, la zona de ruptura (flechas) en la superficie ovárica del cuerpo lúteo del ciclo actual y complejos ovocito-cúmulo (COC) en el oviducto **(E)**. En el panel **(F)** se observa la presencia un quiste epitelial (Q) en la zona medular ovárica. El área señalada se muestra a mayor aumento en el panel **(G)**, donde se aprecia el epitelio (EQ) que bordea el quiste.

En machos, la caracterización fenotípica incluyó el estudio del peso corporal y de testículos y epidídimos y el análisis histológico de los testículos. Nuestros resultados indican que los ratones Gpr54 ^{-/-T} presentan, en la edad adulta, signos externos de llegada de la pubertad (SBP), pero una reducción significativa del peso de testículos y epidídimos con respecto a los ratones control Gpr54 ^{+/+T}. Por su parte, los ratones Gpr54 ^{-/-} no presentan, en la edad adulta, SBP y muestran una reducción muy significativa del peso corporal, de testículos y epidídimos con respecto a los ratones Gpr54 ^{+/+T}. (**Tabla 6** y **Fig.67**).

Tabla 6. Peso corporal (g), de testículos y de epidídimos (mg), y niveles séricos de LH, FSH y T (ng/mL) en ratones macho adultos Gpr54 ^{+/+T}, Gpr54 ^{-/-T} y Gpr54 ^{-/-}. ** p ≤ 0.01 vs valores en Gpr54 ^{+/+T} (ANOVA seguido de test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

	Gpr54 ^{+/+T}	Gpr54 ^{-/-T}	Gpr54 ^{-/-}
Peso Corporal (g)	27,35±0,27 (n=11)	27,04±0,15 (n=11)	22,62±0,16** (n=6)
Testículos(mg)	203,78 ±9,28 (n=9)	160±8,38 ** (n=8)	19±1,57** (n=7)
Epididimos (mg)	70,75±2,14 (n=9)	58,29±2,08** (n=7)	ND
LH (ng/mL)	0,36±0,07 (n=7)	0,81±0,11** (n=13)	0,09±0,02** (n=16)
FSH (ng/mL)	19,52±1,49 (n=17)	16,08±1,09 (n=8)	0,55±0,3** (n=5)
Testosterona (ng/mL)	0,29±0,17 (n=5)	0,22±0,05 (n=9)	ND

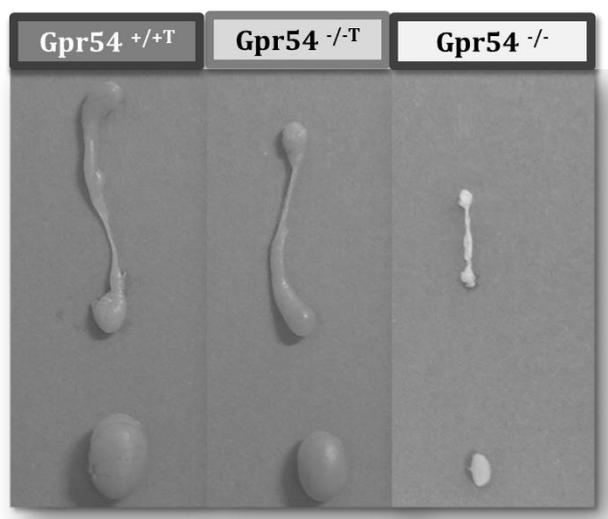


Figura 67. Fotografías representativas de los testículos y epidídimos de los genotipos estudiados (Gpr54 ^{+/+T}, Gpr54 ^{-/-T} y Gpr54 ^{-/-}).

En cuanto al análisis endocrino, los ratones macho Gpr54 ^{-/-T} mostraban unos niveles basales circulantes de LH significativamente más elevados que los ratones Gpr54 ^{+/+T}, mientras que no se observan diferencias en los niveles de FSH, ni de T. Por el contrario, los ratones Gpr54 ^{-/-} muestran unos niveles circulantes de ambas gonadotropinas significativamente disminuidos (**Tabla 6**).

El análisis de los testículos en la edad adulta mostró que en los ratones control Gpr54 ^{+/+T} presentan una morfología normal, con células de Leydig bien diferenciadas y espermatogénesis completa (**Fig.68 C**). Los ratones Gpr54 ^{-/-T} presentan espermatogénesis completa, con los diferentes estadios del epitelio seminífero y células de Leydig bien diferenciadas. Sin embargo, 5 de los 8 animales estudiados (62.5%) presentaban alteraciones de la espermatogénesis, con túbulos seminíferos de menor diámetro y con menos células germinales que los animales control (**Fig.68 D**), particularmente apreciable en el número de espermátides alargadas (**Fig.68 E,F**). Estos animales presentaban, además, frecuentes células multinucleadas, correspondientes a espermátides en degeneración (**Fig.68 G,H**), desorganización de la estructura del epitelio seminífero (**Fig.68 H,I**), y abundantes células germinales apoptóticas (**Fig.68 I**).

Los datos cuantitativos se presentan en la **Fig.69**. Los ratones Gpr54 ^{-/-T} presentan un mayor número de túbulos con células en apoptosis (**Fig.69 A**) y un mayor número de células apoptóticas por sección tubular (**Fig.69 B**), aunque las diferencias no fueron significativas. El conteo de células germinales en el estadio XI demostró que los ratones Gpr54 ^{-/-T} presentan una disminución significativa en el número de espermátocitos I en diacinesis y de espermátides en fase 11 de la espermiogénesis, mientras que las diferencias en el número de espermátocitos I en zigotene no fueron significativas (**Fig.69 C**). Estos datos indican que la mayor parte del aumento en la tasa de muerte de células germinales en los ratones Gpr54 ^{-/-T} se produce en los espermátocitos I durante la fase de paquitene (estadios I-X) y durante la primera división meiótica en el estadio XII, así como durante las primeras fases de la espermiogénesis (espermátides redondas, estadios I-X). Esto coincide con la presencia en estos animales de numerosas células en apoptosis y de espermátides multinucleadas en degeneración.

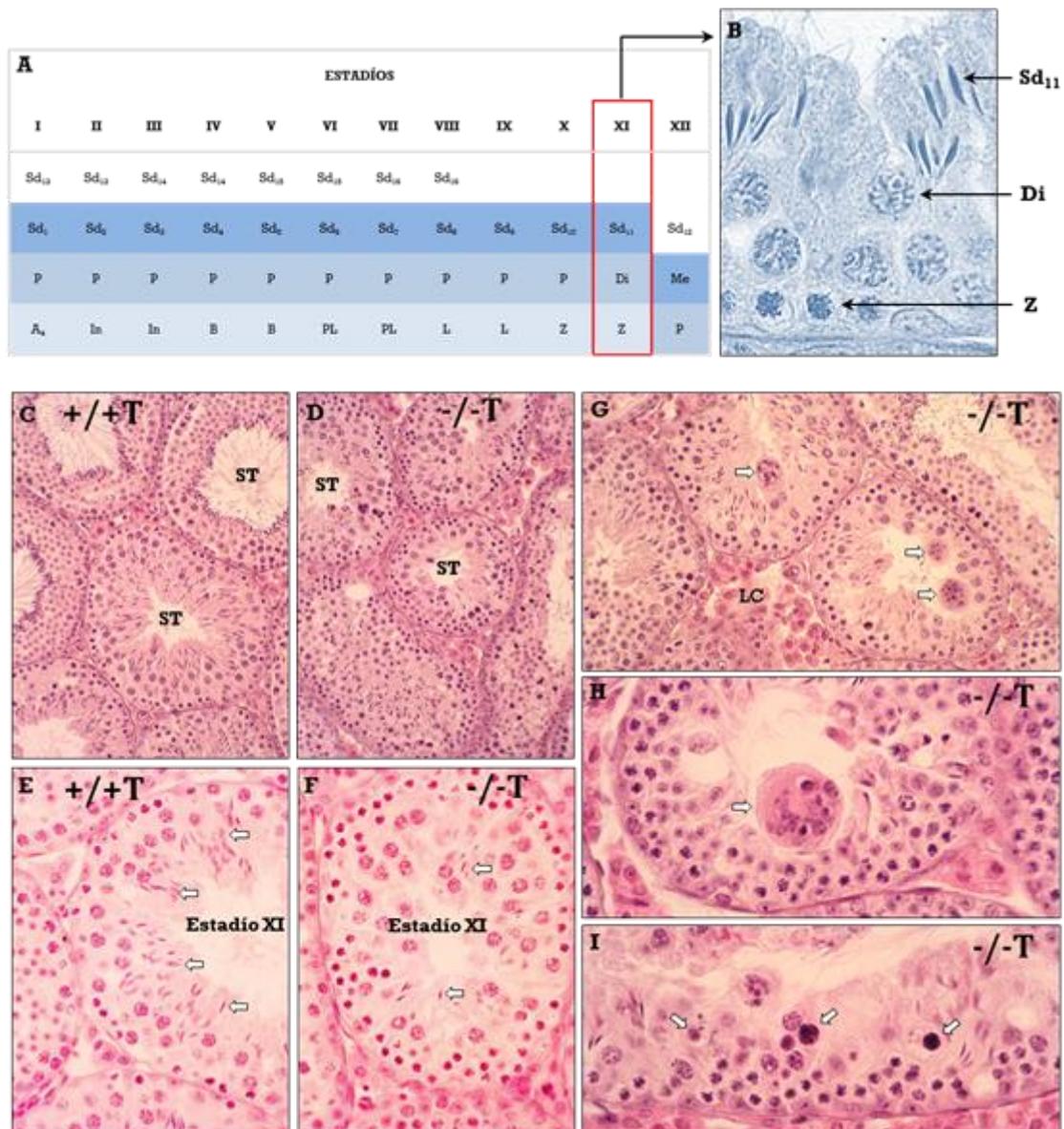


Figura 68. (A). Representación esquemática del ciclo del epitelio seminífero en el ratón. La cuantificación de la espermatogénesis se realizó en el estadio XI (representado en B), mediante el conteo de espermatocitos I en zigotene (Z), espermatocitos I en diacinesis (Di) y espermátides en fase 11 de la espermiogénesis (Sd₁₁) por sección tubular. C-I. Secciones representativas de testículo. Los ratones *Gpr54*^{-/-T} presentan túbulos seminíferos (ST) de menor diámetro (D) y con menos células germinales, como se aprecia en el menor número de espermátides (flechas) en el estadio XI (F), en comparación con los ratones *Gpr54*^{+/+T} (C,E). En el epitelio seminífero de los ratones *Gpr54*^{-/-T} se observan, además, frecuentes células multinucleadas (flechas en G,H), que corresponden a espermátides en degeneración, desorganización del epitelio (H,I) y células en apoptosis (flechas en I).

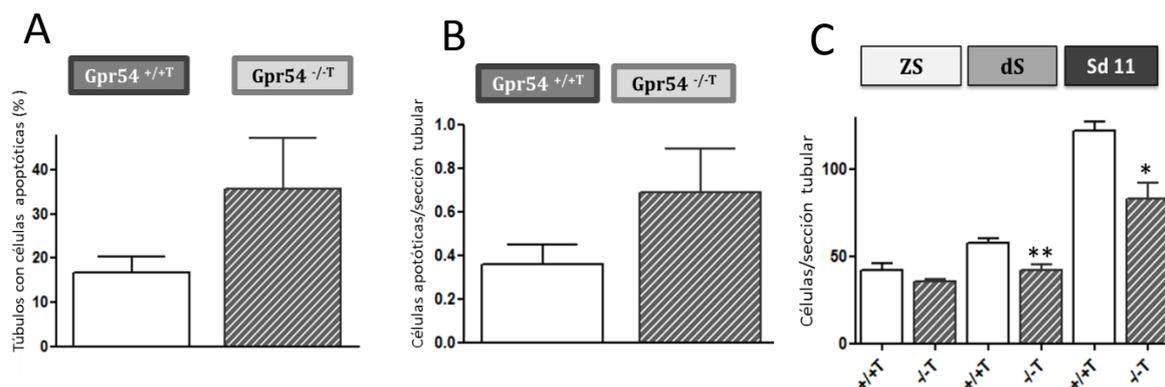


Figura 69. (A) Proporción de túbulos seminíferos que presentan células en apoptosis. **(B)** Número de células apoptóticas por sección tubular. **(C)** Recuento del número por sección tubular de espermátocitos I en zigotene y en diacinesis, y de espermátides en fase 11 de la espermiogénesis. Los cambios en el número de cada uno de estos tipos celulares reflejan la muerte celular acumulativa que ha ocurrido en los estadios previos. Los datos se muestran como la media \pm SEM de, al menos, 5 muestras independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs correspondientes Gpr54^{+/+T} (comparaciones pareadas mediante Student t-test).

4.3.2. ESTUDIO EN MUTANTES Gpr54^{-/-T} DEL PAPEL DIRECTO DE LAS KISSPEPTINAS EN LA FUNCIÓN GONADAL

Por último, en el **experimento 15**, llevamos a cabo el estudio de la función testicular, medida en términos de secreción basal de T *in vitro* en ratones deficientes de receptor de kisspeptinas con carácter general (Gpr54^{-/-}) y con rescate en células GnRH (Gpr54^{-/-T}). Nuestros resultados indican que la liberación basal de T por los testículos procedentes de ratones Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-} es significativamente inferior a la observada en los ratones Gpr54^{+/+T}, siendo esta disminución más acusada en los ratones Gpr54^{-/-} (**Fig. 70**).

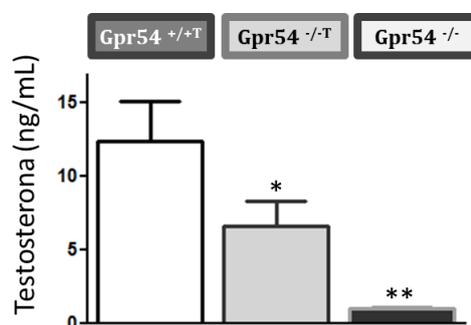


Figura 70. Niveles de T (ng/mL) secretados al medio de incubación por testículos procedentes de ratones Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-}, 90 min después de ser incubados con medio DMEM. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 5 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs valores en ratones Gpr54^{+/+T} (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH Y KP-10 EN RATONES $Gpr54^{-/-T}$

4.3.3.1. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH EN RATONES $Gpr54^{-/-T}$

Como se muestra en la **Fig.71**, la administración i.p. de GnRH a ratones $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$ y $Gpr54^{-/-}$ cursa 30 min después con un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH, en todos los genotipos estudiados. Sin embargo, la magnitud de este incremento fue significativamente superior en ratones $Gpr54^{-/T}$, y menor en ratones $Gpr54^{-/-}$. Nuestros resultados también indican que la dosis de GnRH empleada fue incapaz de modificar significativamente los niveles de FSH, tras 30 min de su administración, en ninguno de los genotipos estudiados (*datos no mostrados*).

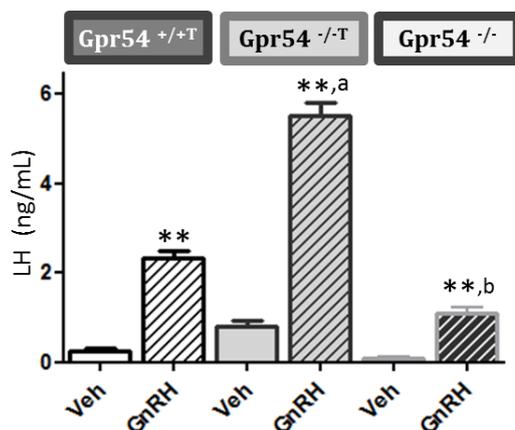


Figura 71. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratones machos adultos $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$ y $Gpr54^{-/-}$, 30 min después de la administración i.p. de GnRH o vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 8 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs valores en los grupos correspondientes inyectados con vehículo; **a**; **b** $p \leq 0.05$ vs valores en $Gpr54^{+/+T}$ (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3.3.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE KP-10 EN RATONES $Gpr54^{-/T}$

Para analizar los efectos directos vs indirectos de Kp-10 en las neuronas GnRH sobre la liberación de gonadotropinas, realizamos el **experimento 17**.

Nuestros resultados indican que la administración central de Kp-10 a ratones macho adultos cursa 15 min después con un aumento significativo y similar de los niveles circulantes de LH en los genotipos $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$, y sin ninguna modificación de los niveles de LH en el genotipo $Gpr54^{-/-}$ (**Fig.72 A**).

Los niveles circulantes de FSH no se vieron modificados 15 min después de la administración Kp-10 en ninguno de los genotipos estudiados (**Fig.72 B**).

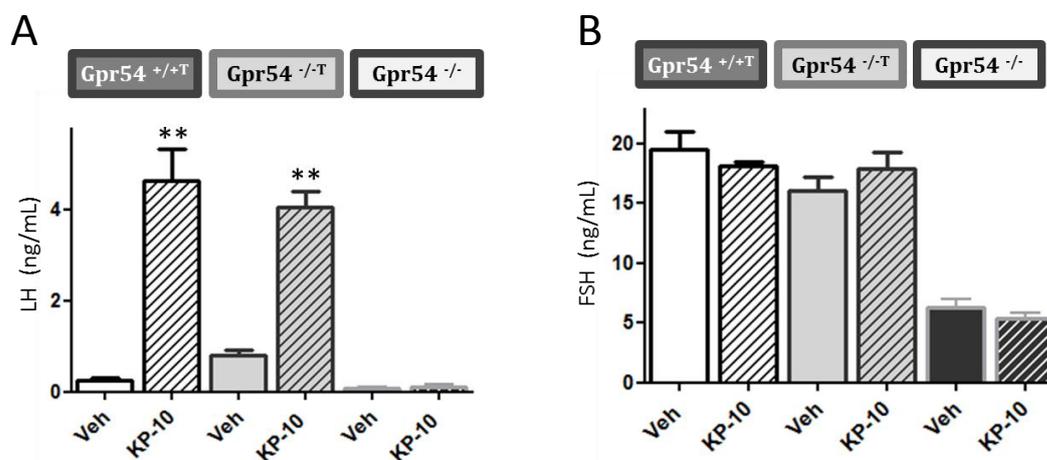


Figura 72. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en ratones machos adultos Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-}, 15 min después de la administración i.c.v. de kp-10 o vehículo. Los datos se representan como la media ± SEM de, al menos, 13 determinaciones independientes por grupo. **, p ≤ 0.01 vs valores en los grupos correspondientes inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3.4. . ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE LAS KISSPEPTINAS Y SEÑALES DE ORIGEN PERIFÉRICO Y CENTRAL EN RATONES MUTANTES Gpr54^{-/-T}

4.3.4.1. . ANÁLISIS DEL FEEDBACK NEGATIVO DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN RATONES MUTANTES Gpr54^{-/-T}

Con este objeto, analizamos los niveles circulantes de gonadotropinas en ratones machos y hembras Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-}, en presencia o ausencia de esteroides gonadales.

Como se muestra en la **Fig.73**, en ratonas adultas Gpr54^{+/+T}, la retirada de los estrógenos circulantes inducida por la OVX induce un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH y FSH, que es evidente a las 48h y que permanece hasta la finalización del estudio, 21 días después. Sin embargo, en las ratonas Gpr54^{-/-T}, el aumento de los niveles circulantes de LH no se aprecia hasta los 21 días tras la OVX y los niveles de FSH, aunque aumentan significativamente desde las 48h hasta la finalización del experimento, lo hacen en una magnitud que es marcadamente inferior a la observada en las ratonas Gpr54^{+/+T}. En ratonas Gpr54^{-/-} la ausencia de estrógenos circulantes no indujo cambios en los niveles circulantes de LH a ninguno de los tiempos estudiados.

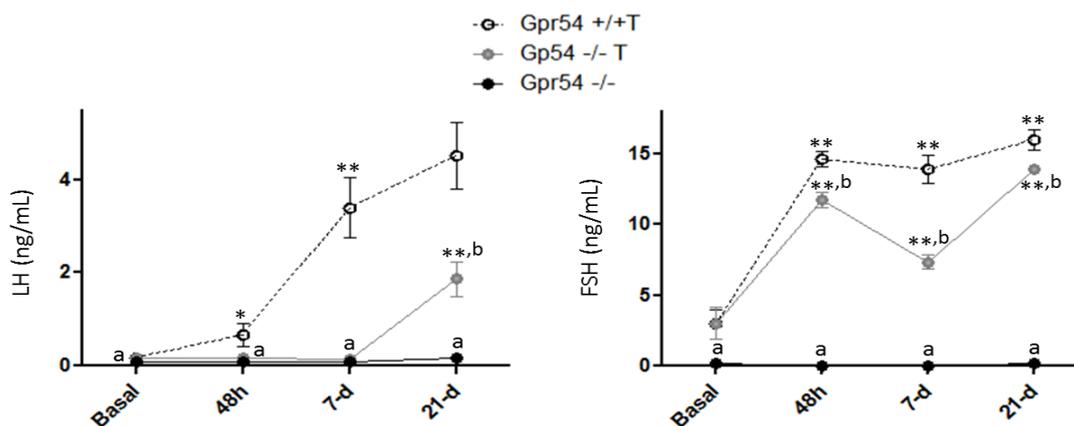


Figura 73. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratonas hembra adultas Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-}, antes (Basal) y 48h, 7 d y 21 d después de la OVX. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 6 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs basal; **a**, **b** $p \leq 0.05$ vs valores Gpr54^{+/+T} en los grupos Gpr54^{-/-} y Gpr54^{-/-T}, respectivamente (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Por su parte, en ratones macho adultos Gpr54^{+/+T}, la retirada de T por ORX produjo un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH (**Fig.74**) y FSH (datos no mostrados), que es evidente a las 48h y permanece hasta la finalización del estudio 21 días después. Sin embargo, en los animales Gpr54^{-/-T} este aumento es significativamente inferior al que se produce en los ratones control Gpr54^{+/+T}. En los ratones macho Gpr54^{-/-} la eliminación de T circulante por ORX no incrementa los niveles de LH y FSH a ninguno de los tiempos estudiados.

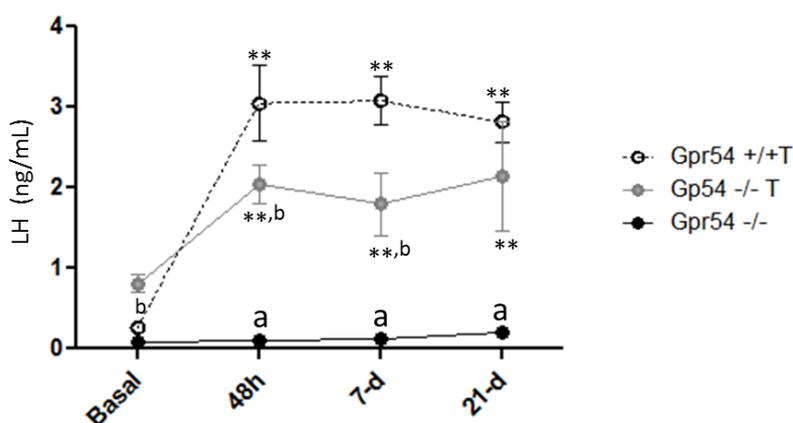


Figura 74. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratonas hembra adultas Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-}, antes (Basal) y 48h, 7 d y 21 d después de la ORX. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 6 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs basal; **a**, **b** $p \leq 0.05$ vs valores Gpr54^{+/+T} en los grupos Gpr54^{-/-} y Gpr54^{-/-T}, respectivamente (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3.4.2. . EFECTOS DEL AGONISTA GLUTAMATÉRGICO, NMDA, EN RATONES MUTANTES *Gpr54*^{-/-T}

Para analizar la mediación kisspeptidérgica de los efectos de vías del glutamato (a través de receptores NMDA) sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas, y sus posibles sitios de acción, realizamos el **experimento 19**.

Nuestros resultados indican que la administración central de NMDA a ratones macho adultos *Gpr54*^{+/+T}, *Gpr54*^{-/-T} y *Gpr54*^{-/-} cursa 15 min después con un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH en todos los genotipos estudiados (**Fig.75 A**). Sin embargo, este incremento fue significativamente mayor en los ratones *Gpr54*^{-/-T}, y marcadamente inferior en los ratones *Gpr54*^{-/-}. Los niveles séricos de FSH solo incrementaron significativamente tras la administración de NMDA en los ratones *Gpr54*^{-/-T} (**Fig.75 B**).

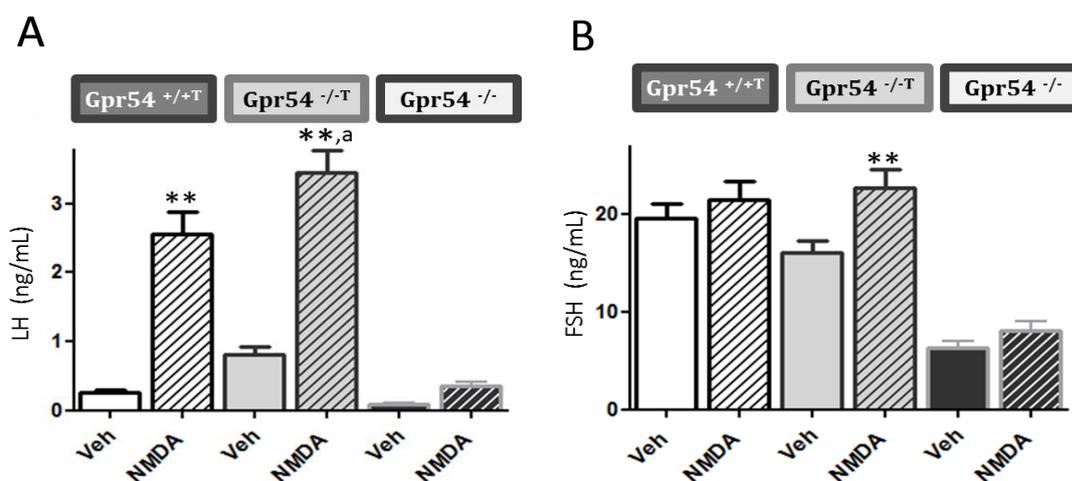


Figura 75. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en ratones machos adultos *Gpr54*^{+/+T}, *Gpr54*^{-/-T} y *Gpr54*^{-/-}, 15 min después de la administración i.c.v. de NMDA o vehículo. Los datos se representan como la media ± SEM de, al menos, 7 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs valores en los grupos correspondientes inyectados con vehículo; a, $p \leq 0.05$ vs valores en *Gpr54*^{+/+T} (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3.4.3. . EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN DEL GABA EN RATONES *Gpr54*^{-/-T}

Para estudiar los efectos de la inactivación de los receptores GABA_A sobre la liberación de gonadotropinas en ratones macho adultos *Gpr54*^{+/+T}, *Gpr54*^{-/-T} y *Gpr54*^{-/-}, realizamos el **experimento 20**.

Nuestros resultados indican que 15 minutos después de la administración central a ratones macho adultos de un antagonista de los receptores GABA_A (PHP₅₀₁) se produjo un aumento muy significativo de los niveles circulantes de LH en ratones *Gpr54^{+/+T}* y *Gpr54^{-/-T}*, mientras que en los ratones *Gpr54^{-/-}* no se observó ninguna modificación de los niveles circulantes de LH (**Fig.76 A**).

Así mismo, nuestros resultados indican que los niveles circulantes de FSH no se vieron alterados tras la administración de PHP₅₀₁ en ninguno de los genotipos estudiados, 15 min tras la administración del antagonista (**Fig.76 B**).

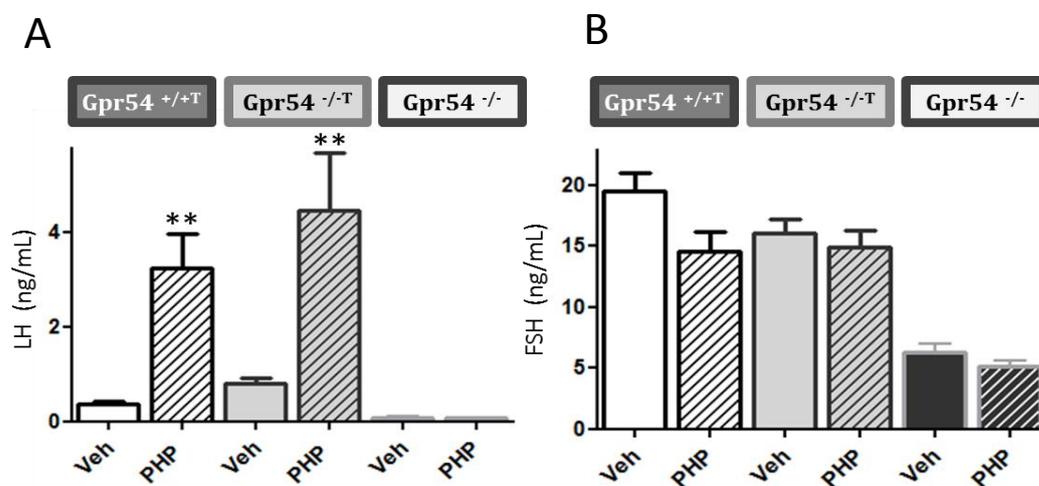


Figura 76. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en ratones machos adultos *Gpr54^{+/+T}*, *Gpr54^{-/-T}* y *Gpr54^{-/-}*, 15 min después de la administración i.c.v. de PHP₅₀₁ o vehículo. Los datos se representan como la media ± SEM de, al menos, 7 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs valores en los grupos correspondientes inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3.4.4. ANÁLISIS EN MUTANTES *Gpr54^{-/-T}* DE LOS EFECTOS DE LAS TAQUIQUININAS SOBRE LA LIBERACIÓN DE GONADOTROPINAS

En el **experimento 21** estudiamos la posible mediación de la señalización de kisspeptinas en el efecto que NKB y otras taquiquininas ejercen en el control de la liberación de gonadotropinas. Para ello, se analizaron los efectos de la activación selectiva de los receptores tipo 1, 2 y 3 de taquiquininas (NK1R, NK2R y NK3R) en ratones macho adultos *Gpr54^{-/-T}*, *Gpr54^{+/+T}* y *Gpr54^{-/-}*.

Nuestros resultados muestran que 15 min después de la administración central del agonista de NK1R (GR_73632) a ratones $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$ y $Gpr54^{-/-}$ se produjo un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH en los animales $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/T}$, siendo este aumento de mayor magnitud en los ratones $Gpr54^{-/T}$. En los ratones $Gpr54^{-/-}$ no se observó ninguna modificación de los niveles circulantes de LH (**Fig.77 A**).

Los niveles circulantes de FSH no se vieron alterados tras la administración GR_73632 en ninguno de los genotipos estudiados (**Fig.77 B**).

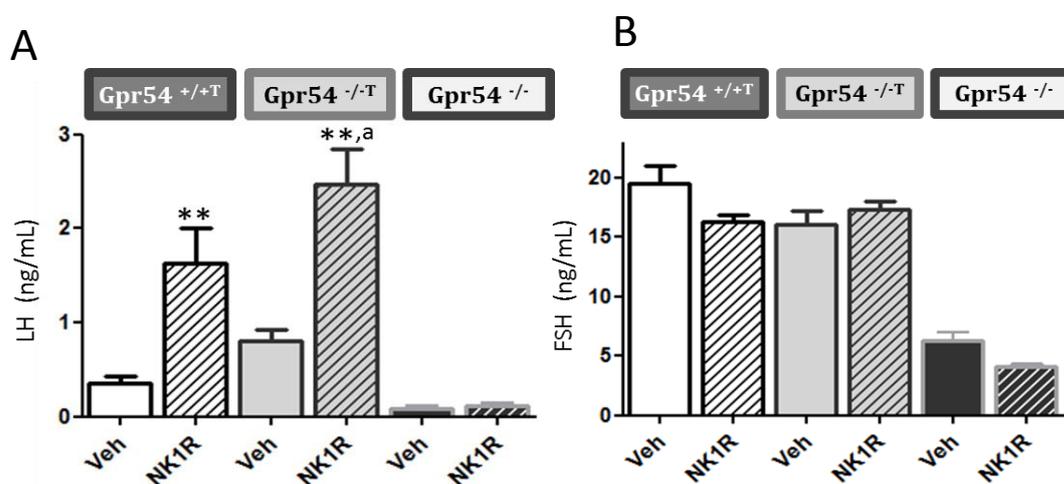


Figura 77. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en ratones machos adultos $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$ y $Gpr54^{-/-}$, 15 min después de la administración i.c.v. de GR_73632 o vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 8 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs valores en los grupos correspondientes inyectados con vehículo; ^a, $p \leq 0.05$ vs valores en $Gpr54^{+/+T}$ (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Por otro lado, la administración central del agonista de NK2R (GR_64349) produjo un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH en los animales $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/T}$, 15 minutos después de la administración del agonista. En los ratones $Gpr54^{-/-}$ no se observó ninguna modificación de los niveles circulantes de LH tras la inyección de GR_64349 (**Fig.78 A**).

A su vez, los niveles circulantes de FSH no se vieron alterados con la administración GR_64349 en ninguno de los genotipos estudiados (**Fig.78 B**).

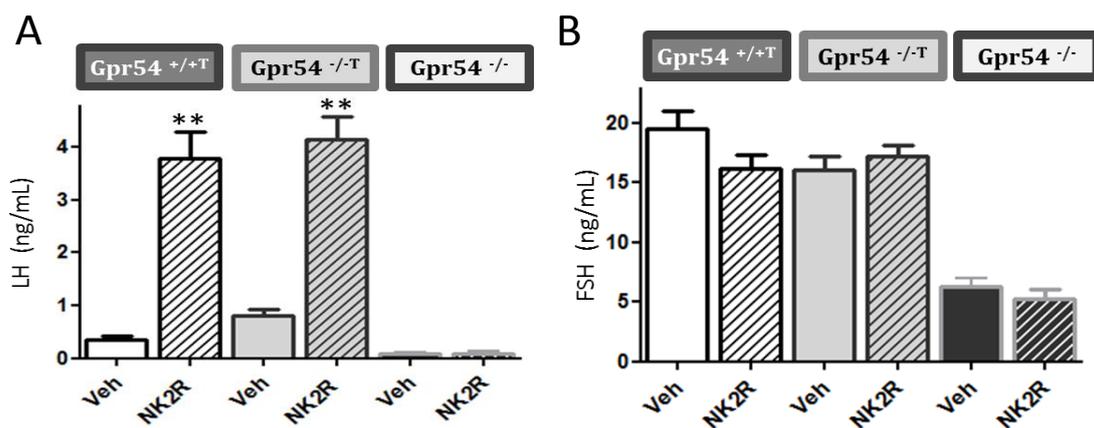


Figura 78. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en ratones machos adultos Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-}, 15 min después de la administración i.c.v. de GR_64349 o vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 7 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs valores en los grupos correspondientes inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Finalmente, nuestros resultados muestran que 15 min tras la administración central del agonista de NK3R (Senktide) se produjo un aumento muy significativo de los niveles circulantes de LH en los animales Gpr54^{+/+T} y Gpr54^{-/-T}; este aumento fue de significativamente mayor en ratones Gpr54^{-/-T}. En los ratones Gpr54^{-/-} no se observó ninguna modificación de los niveles circulantes de LH (Fig. 79 A).

Los niveles circulantes de FSH no se vieron alterados con la administración GR_73632 en ninguno de los genotipos estudiados (Fig. 79 B).

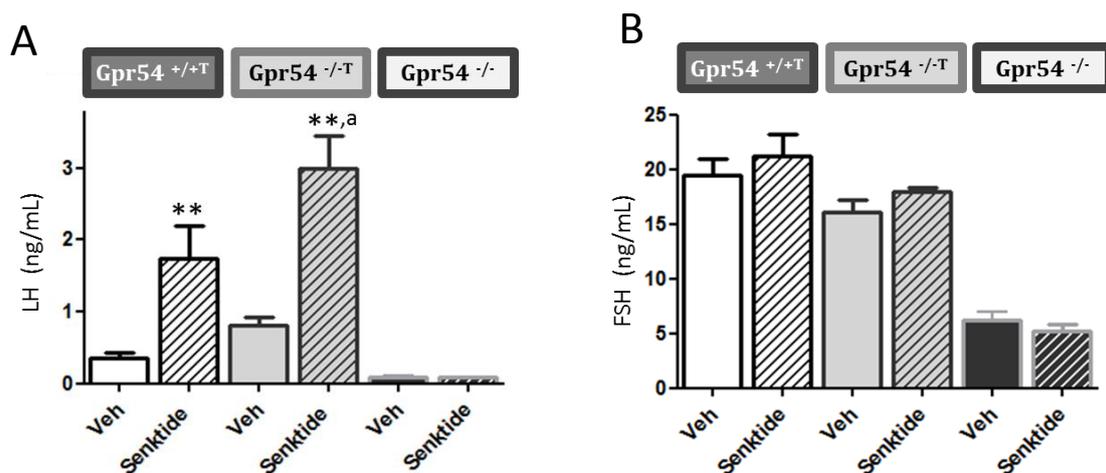


Figura 79. Niveles séricos de LH (A) y FSH (B) (ng/mL) en ratones machos adultos Gpr54^{+/+T}, Gpr54^{-/-T} y Gpr54^{-/-}, 15 min después de la administración i.c.v. de senktide o vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 7 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs valores en los grupos correspondientes inyectados con vehículo; a, $p \leq 0.05$ vs valores en Gpr54^{+/+T} (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

4.3.4.5. ANÁLISIS DE RESPUESTAS RELATIVAS DE SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS A LOS DIFERENTES REGULADORES EN RATONES *Gpr54*^{-/-T}

En epígrafes previos hemos presentado los cambios en niveles absolutos de niveles de gonadotropinas tras la administración de diversos reguladores centrales y periféricos en los tres genotipos estudiados. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los ratones *Gpr54*^{-/-T} y *Gpr54*^{-/-} presentan niveles circulantes de LH significativamente elevados o disminuidos, respectivamente, frente a los ratones control *Gpr54*^{+/+T}. Por ello, a fin de facilitar la visualización de nuestros resultados, hemos llevado a cabo el análisis de las modificaciones circulantes relativas (frente a valores basales) de los niveles de LH obtenidos tras la administración de las diferentes drogas. Los resultados se representan en la **Fig.80** como el incremento obtenido en relación a los niveles observados tras la administración de vehículo en cada genotipo.

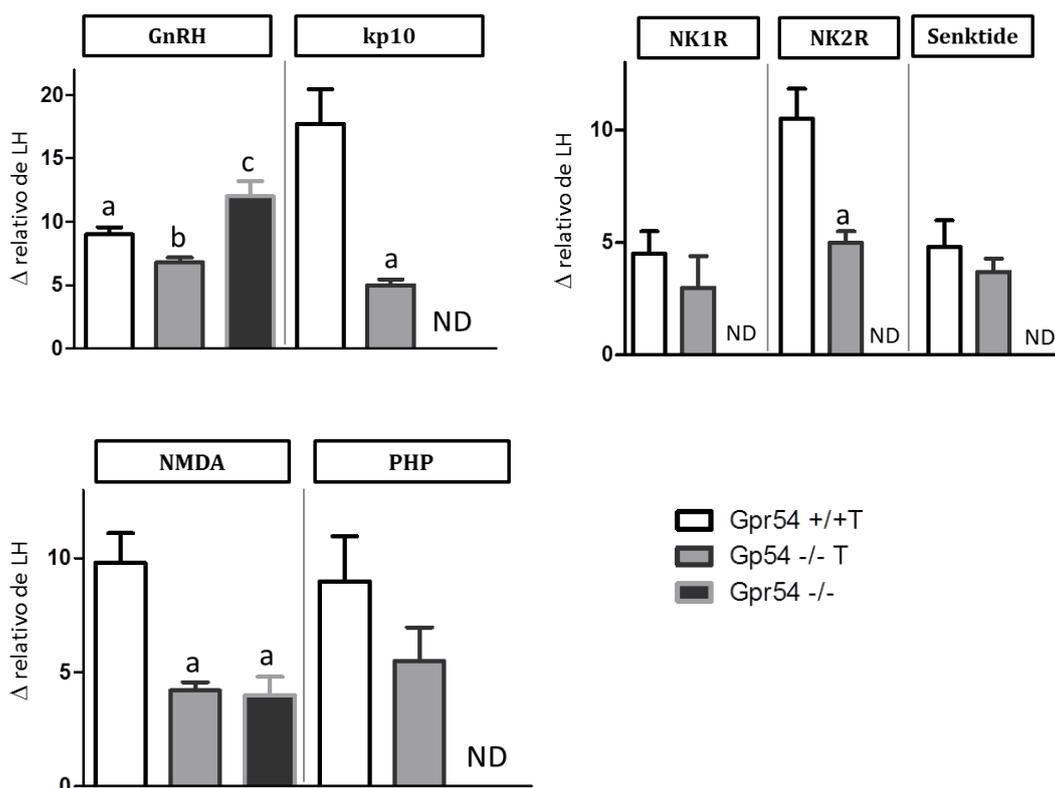


Figura 80. Incremento relativo de LH, 30 min después de la administración de GnRH y 15 min después de la administración de Kp-10, NMDA, NK1R, NK2R, senktide y PHP en ratones *Gpr54*^{+/+T}, *Gpr54*^{-/-T} y *Gpr54*^{-/-}. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 7 determinaciones independientes por grupo. **a**, **b**, **c**, $p \leq 0.05$ vs correspondientes valores basales (asimilados a línea de base 0); ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls. ND: niveles de incremento no detectables.

4.3.5. ANÁLISIS EN RATONES $Gpr54^{-/-T}$ DE LOS EFECTOS DE LEPTINA Y GHRELINA SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTOS

Con objeto de explorar el papel del sistema kisspeptidérgico en el control metabólico, en el **experimento 22**, procedimos a la administración i.c.v. de leptina, ghrelina o vehículo a ratones macho adultos $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/-T}$ y $Gpr54^{-/-}$.

Nuestros datos muestran que durante las 6 primeras horas que siguen a la administración de vehículo, no se observan diferencias en la ingesta acumulada de ninguno de los genotipos estudiados (**Fig.81 A**). Sin embargo, los datos acumulados de 24 horas indican que los ratones $Gpr54^{-/-T}$ y $Gpr54^{-/-}$ ingieren significativamente menos alimentos que los ratones $Gpr54^{+/+T}$ (**Fig.81 B**).

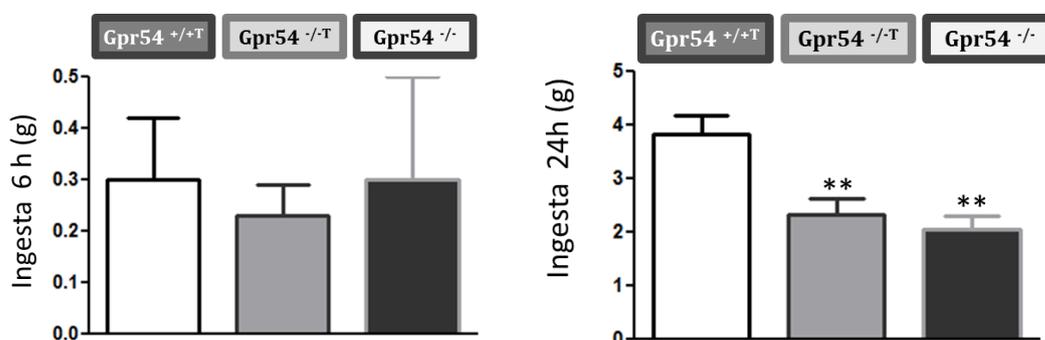


Figura 81. Ingesta acumulada de alimentos (g) en ratones macho $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/-T}$ y $Gpr54^{-/-}$ 6h y 24 h después de la administración i.c.v. de vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. ** $p \leq 0.01$ vs valores en ratones $Gpr54^{+/+T}$ (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Por su parte, nuestros análisis indican que la administración central de leptina disminuye la ingesta de alimentos en todos los genotipos estudiados. En los ratones $Gpr54^{+/+T}$, la disminución de la ingesta acumulada es significativa a partir de las 10h y se mantiene hasta las 24 h. Por el contrario, en los ratones $Gpr54^{-/-T}$ la ingesta disminuye de forma significativa a las 3 horas de la administración de leptina, y a partir de este momento aumenta alcanzando al final del experimento unos niveles similares a los de los ratones inyectados con vehículo. Finalmente, en ratones $Gpr54^{-/-}$ solo se observa una disminución significativa de la ingesta 24 h después de la administración de leptina (**Fig. 82**).

A modo de resumen, en la **Fig. 83** se muestran datos de ingesta acumulada a las 6 y 24 h tras leptina o vehículo. Mientras a las 6h no hay diferencias significativas entre genotipos, a las 24 h, los ratones $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/-}$ muestran el efecto anoréctico de la leptina, que no se detecta (significativamente) en los ratones $Gpr54^{-/T}$, que muestran valores ingesta similares al grupo de vehículo.

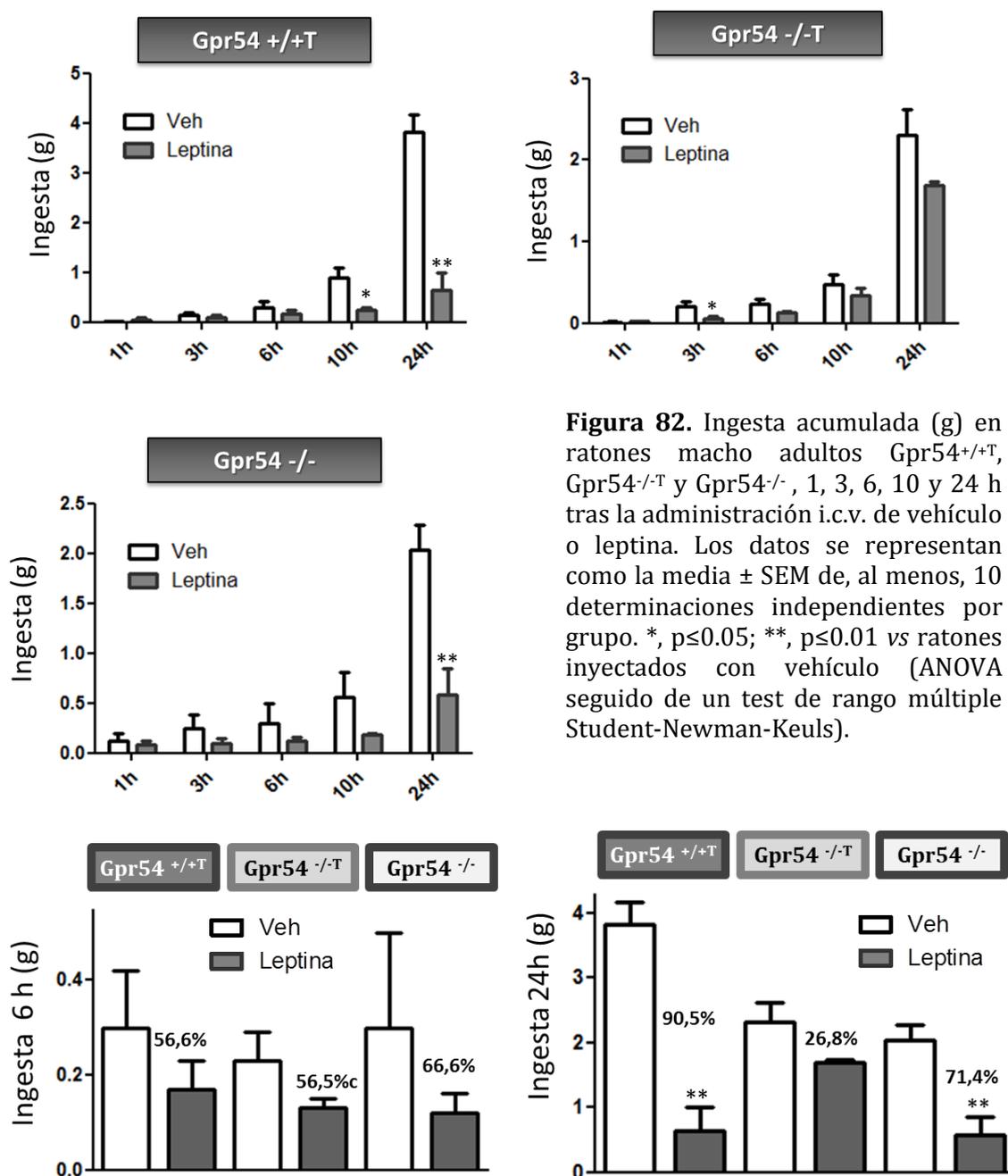


Figura 83. Ingesta acumulada (g) en ratones macho adultos $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$ y $Gpr54^{-/-}$, 6 y 24 h después de la administración i.c.v. de vehículo o leptina. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. **, $p \leq 0.01$ vs ratones inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Por otro lado, en los ratones $Gpr54^{+/+T}$ y $Gpr54^{-/T}$ la administración central de ghrelina incrementa significativamente la ingesta durante las 6 o 10 primeras horas que siguen al tratamiento, respectivamente, mientras que en los ratones $Gpr54^{-/-}$, este incremento solo se observa 24 h después del tratamiento con ghrelina (**Fig. 84 y 85**).

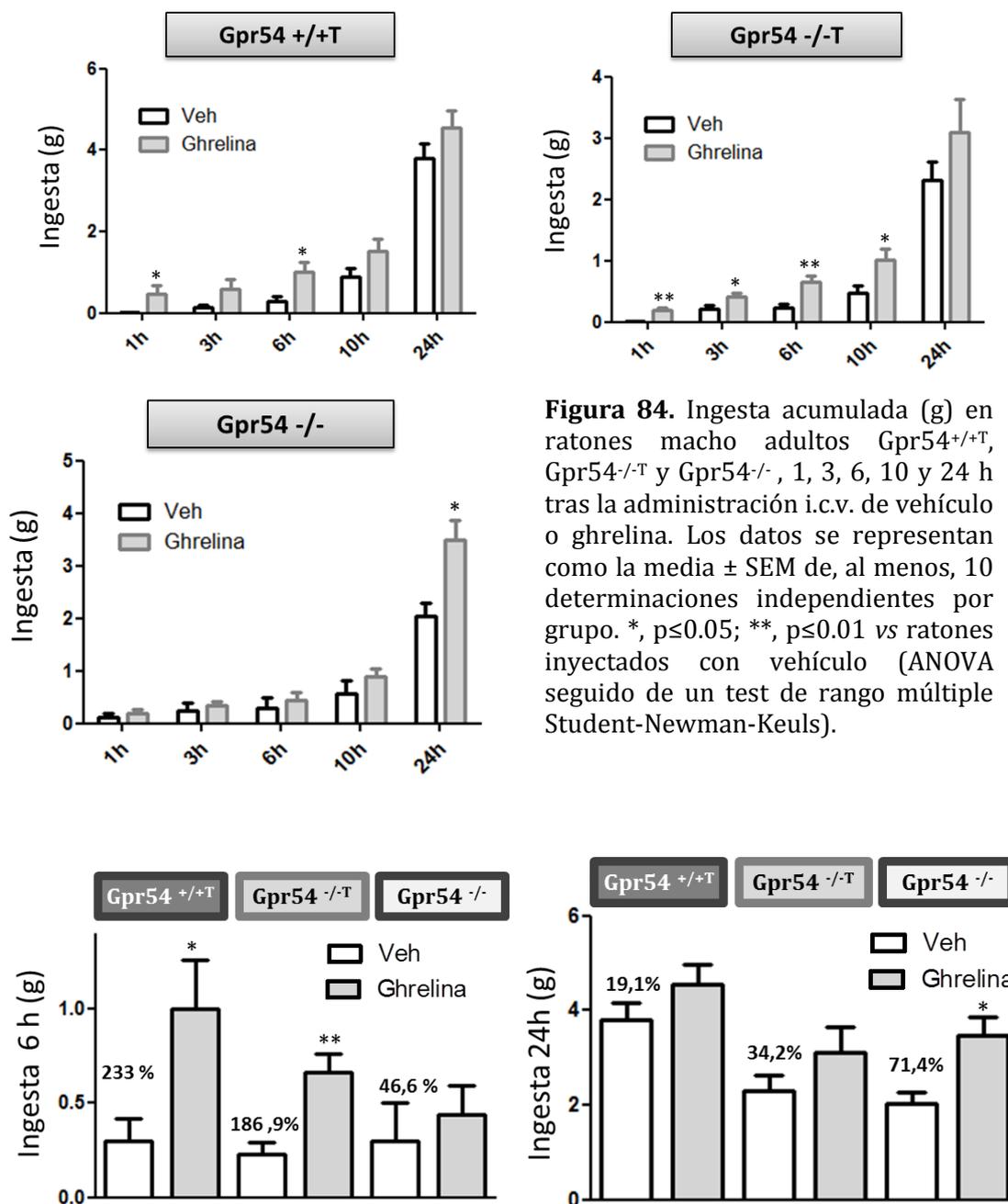


Figura 84. Ingesta acumulada (g) en ratones macho adultos $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$ y $Gpr54^{-/-}$, 1, 3, 6, 10 y 24 h tras la administración i.c.v. de vehículo o ghrelina. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs ratones inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

Figura 85. Ingesta acumulada (g) en ratones macho adultos $Gpr54^{+/+T}$, $Gpr54^{-/T}$ y $Gpr54^{-/-}$, 6 y 24 h después de la administración i.c.v. de vehículo o ghrelina. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ vs ratones inyectados con vehículo (ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls).

DISCUSIÓN

5. Discusión

El presente trabajo de Tesis Doctoral tuvo como objetivos fundamentales: (I) Caracterizar la participación del sistema RFRP/NPFF1R en el control del eje gonadotrópico y de sus posibles interacciones con otras señales centrales y periféricas en este control; (II) Evaluar la posible implicación del sistema RFRP/NPFF1R en la homeostasis metabólica y del peso corporal; y (III) Caracterizar, de forma diferenciada, la participación del sistema Kiss1/Gpr54 en el control del eje gonadotrópico y la homeostasis metabólica mediada por las neuronas GnRH o del resto de localizaciones donde se expresa este sistema.

Nuestros conocimientos sobre el control del eje HHG en mamíferos y su regulación por diferentes factores, desde señales ambientales a señales metabólicas, han sido ampliados considerablemente en los últimos años [169, 301]. En este sentido, se ha demostrado la participación de un gran número de transmisores y péptidos de origen central como reguladores del eje HHG. Entre estos neuropéptidos, la familia de los péptidos RFa se ha propuesto que podría dirigir la maduración y función reproductora mediante el establecimiento de un equilibrio entre señales estimuladoras (kisspeptinas) e inhibitoras (RFRP/GnIH) que actuarían predominantemente a nivel central sobre el eje HHG [302].

Sin embargo, mientras que está claramente documentado en numerosas especies, incluyendo la humana, el papel indispensable del sistema Kiss1/Gpr54 en el control de la pubertad y la fertilidad [169], aún sigue siendo discutida la relevancia fisiológica real de los RFRPs en la regulación de varios aspectos de la reproducción, debido en parte a la falta de herramientas de investigación y modelos experimentales plenamente adecuados.

En este contexto, y con el fin de avanzar en los conocimientos actuales sobre el control del eje HHG, en el presente trabajo de Tesis llevamos a cabo la caracterización de la primera línea de ratones NPFF1R KO (generados por Lexicon Pharmaceuticals) y profundizamos en el análisis de una nueva línea de ratones Gpr54 KI, con expresión exclusiva de Gpr54 en células GnRH (cedidos por el laboratorio del Dr. Günther Schütz). Con objeto de facilitar la discusión de los resultados obtenidos, esta sección ha sido dividida en bloques temáticos relacionados.

Validación y caracterización reproductora del modelo de ratón NPFF1R KO

Como se ha indicado anteriormente, todavía existe una fuerte discusión sobre la relevancia fisiológica de los RFRPs en el control de la liberación de las gonadotropinas hipofisarias debido, en parte, a que las aproximaciones experimentales empleadas hasta la fecha se han basado, fundamentalmente, en el análisis de los efectos de la administración central o periférica de dosis elevadas de RFRP-3 y en el análisis de la respuesta hormonal y/o de marcadores de activación neuronal. En este sentido, sólo un estudio ha analizado las consecuencias de la inhibición de la síntesis de los RFRPs, por medio de la administración central crónica de oligonucleótidos antisentido, en ratas macho pre-puberales [237].

En nuestro modelo de ratón NPFF1R KO, la combinación de análisis de expresión y de pruebas funcionales nos han permitido proponer hipótesis plausibles sobre el papel de la señalización mediada por el sistema RFRP/NPFF1R en el control central y periférico del eje HHG. Nuestros análisis pusieron de manifiesto, en los ratones WT, el efecto inhibitorio de RFRP-3 sobre la liberación de LH tanto a nivel central como a nivel hipofisario. Además, la ausencia de respuesta de LH a la administración de RFRP-3 en los ratones carentes del receptor NPFF1R no sólo valida funcionalmente el modelo, sino que proporciona una evidencia concluyente de que la vía de acción del RFRP-3 es el receptor NPFF1R y no el NPFF2R, cuya expresión se encuentra conservada en nuestros ratones mutantes.

Los datos obtenidos en el ratón NPFF1R KO indican que la señalización mediada por este receptor no es imprescindible para una correcta edad de llegada de la pubertad en ninguno de los dos sexos, ni parece determinante en hembras en la definición de los niveles de gonadotropinas circulantes con los que se alcanza la pubertad, ya que en las ratonas NPFF1R KO la edad de aparición de la AV coincide con niveles de LH y FSH semejantes a los presentados por las ratonas WT. Además, en estas ratonas mutantes, el análisis histológico de los ovarios fue normal, mostrando un número similar de ovulaciones al presentado por las ratonas WT, lo que refuerza la idea de que los niveles circulantes de gonadotropinas y su patrón pulsátil de liberación no requiere, en hembras, de la integridad funcional de la señalización de los RFRPs mediada por el receptor NPFF1R.

Al igual que en hembras, los ratones NPFF1R KO presentan el signo externo de pubertad, la SPB, a la misma edad que los WT; sin embargo, durante el periodo peri-puberal los machos NPFF1R KO mostraron niveles circulantes de LH elevados, lo que sugiere que la integridad del sistema RFRP/NPFF1R inhibitorio es necesaria, en machos, para el mantenimiento de niveles fisiológicos de LH durante la pubertad. No obstante, a nivel histológico, los ratones macho pre-puberales NPFF1R KO mostraron un desarrollo testicular aparentemente normal y en el día 35 postnatal, la mayoría de ellos habían completado la primera ola espermatogénica, como lo demuestra la presencia de túbulos seminíferos en fase VIII, así como células de Leydig bien diferenciadas en el intersticio. Estos datos son compatibles con los niveles normales de FSH que presentan los ratones NPFF1R KO el día de aparición de la SBP y sugiere que en ellos la síntesis de testosterona está preservada.

En la misma línea, nuestros datos demuestran que, en consonancia con el papel inhibitorio que se ha propuesto para a GnIH/RFRP, la ausencia de NPFF1R no condiciona la fertilidad de los ratones. Así, las hembras NPFF1R KO mantienen conservada tanto la ciclicidad estral como la amplitud del pico pre-ovulatorio de LH; este último aspecto es relevante ya que sugiere que la eliminación de una señal inhibitoria no induce un aumento de la magnitud de la liberación pre-ovulatoria de LH desencadenante de la ovulación. Por otro lado, la eliminación congénita de la señalización por RFRPs resultó en un moderado aumento del número de crías por parto. Sin embargo, la modesta magnitud de la mayor parte de estas respuestas sugiere la existencia de otros mecanismos de autoregulación en respuesta a la eliminación de la señalización por RFRP para evitar la desregulación del eje HHG.

En este sentido, el hecho de que la eliminación de una señal inhibitoria no provoque una disminución de la función reproductora, como se pone de manifiesto en nuestro modelo NPFF1R KO, sugiere que la ausencia de efectos de RFRP no genera, siquiera en etapas más tempranas, una sobre-estimulación persistente del eje HHG que podría conducir a desensibilización del mismo y por lo tanto una supresión de la función reproductora. No obstante, sí observamos un cierto grado de hiper-actividad constitutiva del eje gonadotrópico en los ratones NPFF1R KO, ya que además de los altos niveles de LH que presentaban los ratones machos durante

la pubertad, también se detectaron niveles elevados de FSH durante la edad adulta y una tendencia a un mayor peso de las gónadas en ambos sexos en este modelo.

Dado el propuesto papel recíproco de la señalización por RFRP y kisspeptinas en el control central del eje HHG, generamos una línea doble mutante NPFF1R/Gpr54 KO, con inactivación congénita de los receptores para RFRP y kisspeptinas. Esta nueva línea nos permitiría desvelar si la eliminación congénita de las acciones de una señal inhibidora como el RFRP podría revertir, al menos en parte, la insuficiencia reproductiva causada por la ausencia de señalización kisspeptidérgica. De hecho, una estrategia similar se ha utilizado anteriormente para evaluar la interacción dinámica de factores reguladores recíprocos, como la leptina y la ghrelina [303]. En nuestro estudio, la alta mortalidad prenatal (de origen aún desconocido), ha impedido alcanzar un número elevado de ratones dobles mutantes. Sin embargo, el análisis fenotípico y hormonal de las ratonas NPFF1R/Gpr54 KO generadas nos permite afirmar claramente que la eliminación de la señalización por RFRP no rescata el profundo hipogonadismo hipogonadotropo característico de los ratones Gpr54 KO. Esta observación implica que el papel inhibitorio de RFRP no parece tener una importante participación en el fenotipo reproductivo de los individuos con deficiencia en el sistema Kiss1/Gpr54, y sugiere que la función reguladora de GnIH/RFRP es menos relevante y probablemente esté subordinada a la función esencial de las kisspeptinas en el control de eje HHG.

Interacciones de RFRP y otros reguladores: Estudios en el modelo NPFF1R KO

Además de la caracterización fenotípica y hormonal antes descrita, los estudios funcionales aplicados en el modelo NPFF1R KO nos han permitido avanzar en la caracterización del papel fisiológico del sistema RFRP/NPFF1R en la mediación de las acciones reguladoras sobre el eje HHG de diversos reguladores clave, tanto centrales como periféricos.

Así, a pesar de la evidencia farmacológica previa acerca del efecto de RFRP-3 sobre la secreción de gonadotropinas en mamíferos, la posible participación de esta señal en la mediación del feedback negativo que los esteroides gonadales ejercen sobre la liberación de gonadotropinas era en gran medida desconocida. No obstante, recientemente se ha documentado que el 25% de las neuronas RFRP expresan receptores de estrógenos ER α , así como el efecto inhibitorio de los

estrógenos y testosterona sobre la expresión hipotalámica de RFRP en ratones [304]. Sin embargo, este efecto no se ha observado en ratas [238], donde además no se ha estudiado de forma directa la relevancia funcional de la señalización por RFRP en el control del feedback negativo de los esteroides gonadales.

Nuestros datos son los primeros en documentar la alteración de los perfiles de liberación de LH que se producen en respuesta a la retirada de los esteroides gonadales en ausencia de NPF1R. En concreto, nuestros resultados muestran que, a corto plazo, hay retraso en la respuesta de LH a la retirada de los esteroides gonadales en los ratones mutantes de ambos sexos, hasta el punto de que en hembras la respuesta de LH a la OVX no se detecta hasta pasadas las 48h y en los machos la elevación de LH post-ORX está significativamente disminuida a este tiempo en los ratones NPF1R KO. A más largo plazo, la ausencia del NPF1R produce una respuesta sexualmente dimórfica ya que 7d después de la OVX en las ratonas mutantes se observan niveles de LH significativamente mayores que en ratonas WT OVX, mientras que en los machos la respuesta de LH se normaliza 7d después de la ORX y se mantiene en los mismos niveles que en los ratones WT ORX hasta la finalización del periodo de estudio. En todo caso, los datos obtenidos en hembras son compatibles con un moderado papel del sistema RFRP/NPF1R, como freno del aumento de los niveles circulantes de LH que produce la OVX.

Adicionalmente, nuestros datos también indican que la respuesta de FSH a la retirada de las gónadas aparece en hembras WT a las 48h, mientras que en hembras NPF1R KO no aparece hasta los 7d; fenómeno similar al que se observa en los niveles circulantes de LH. En el caso de los machos, la respuesta es similar en los animales WT y NPF1R KO durante todo el periodo de estudio. Todo ello sugiere un modesto papel del sistema RFRP/NPF1R en el control feedback negativo de la secreción de FSH en ambos sexos.

Además de por los esteroides gonadales, la función reproductora se encuentra regulada por numerosas señales de naturaleza aminoacídica y peptídica de origen central, que modifican la liberación de GnRH. [52, 97, 305, 306]. Esta modificación pueden ejercerla actuando directamente sobre las neuronas GnRH o bien, indirectamente, a través de neuronas interpuestas. En el caso de las neuronas RFRP, diferentes estudios han demostrado que, en mamíferos, un porcentaje apreciable de las neuronas GnRH se encuentran en estrecho contacto con las

terminaciones de las neuronas RFRP [204, 209, 210, 212]. Por ello, llevamos a cabo estudios neuroendocrinos dirigidos a valorar posibles interacciones del sistema RFRP/ NPF1R con otros reguladores centrales muy relevantes del eje HHG, tales como GnRH, kisspeptinas y NKB, empleando nuestro modelo mutante desprovisto de receptor NPF1R. Los análisis realizados en el ratón NPF1R KO muestran una clara alteración en la respuesta neuroendocrina, medida principalmente en términos de secreción de LH, frente a importantes estimuladores del eje HHG, como son GnRH y NKB, así como una alteración en los niveles de expresión de *Kiss1* en algunas áreas concretas del hipotálamo.

En concreto, nuestros resultados indican que la falta de señalización mediada por NPF1R induce una respuesta secretora de LH aumentada tras la administración de GnRH, y una respuesta de LH disminuida tras la administración al agonista del receptor de NKB, senktide, sin que se observen diferencias en la respuesta a Kp-10. Estos datos sugieren que la deficiencia en NPF1R incrementa la capacidad de respuesta hipofisaria a GnRH, mientras que disminuye la respuesta de las neuronas *Kiss1* a NKB. De hecho, algunos estudios señalan a la hipófisis como uno de los principales lugares de acción a través de los cuales GnRH/RFRP ejerce su acción inhibitoria de la liberación de gonadotropinas [217, 307]; este sitio de acción predominante sería compatible con la elevación exagerada de los niveles de LH que hemos observado en nuestros ratones NPF1R KO en respuesta a la administración *in vivo* de GnRH.

Por el contrario, no tenemos constancia de ningún estudio que haya abordado el estudio de la posible interacción entre la señalización por GnRH/RFRP y el sistema *Kiss1*/NKB. Nuestros datos sugieren que la eliminación congénita de la señalización por NPF1R perjudica, en parte, la respuesta de las neuronas kisspeptidérgicas a NKB a través de un(os) mecanismo(s) aún desconocido(s). Sin embargo, esta deficiencia en la respuesta a NKB detectada en el ratón NPF1R KO no parece implicar una disminución de la expresión del ARNm de *Kiss1* en el ARC, ya que los ratones KO presentan de hecho una mayor expresión del gen *Kiss1* y un mayor número de neuronas *Kiss1* en comparación con los ratones WT, especialmente en el núcleo ARC. Estas observaciones serían compatibles con un control inhibitorio de la expresión de *Kiss1* por el sistema RFRP/NPF1R. De hecho, datos recientes indican que el 25% de las neuronas kisspeptidérgicas del

núcleo ARC expresan receptores NPFF1R y que el 35% de esta población recibe terminales axónicos de las neuronas RFRP [308]. Nuestros resultados son la primera evidencia funcional de la actividad reguladora de dichas vías RFRP en el control de las neuronas Kiss1 en un modelo fisiológico.

Sistema RFRP en la regulación integrada de metabolismo y reproducción

La existencia de una estrecha relación entre el balance energético y la reproducción es un hecho bien establecido que se evidencia por la inhibición de la reproducción en condiciones de balance energético negativo. A pesar de ello, aún se desconocen algunos de los mecanismos fundamentales por los cuales se produce este control recíproco. Dado que, en base a evidencias fundamentalmente farmacológicas, el sistema RFRP ha sido propuesto recientemente como un posible mediador entre la homeostasis metabólica y la función reproductora [289], en la presente Tesis nos propusimos profundizar en este aspecto.

Así, en una primera aproximación analizamos la posible conexión entre la señalización por RFRP y la modificación de la liberación de gonadotropinas que se produce en respuesta al estrés metabólico. Para ello, sometimos a ratones macho NPFF1R KO a condiciones de insuficiencia energética mediante ayuno a corto plazo, o bien a sobrealimentación mediante la exposición a largo plazo a una alimentación con HFD; situaciones ambas que se asocian a niveles variables de supresión de la secreción de gonadotropinas en animales control.

Llamativamente, a pesar de no detectarse cambios en la evolución del peso corporal a lo largo de la edad en condiciones de ingesta *ad libitum*, los ratones NPFF1R KO mostraron una disminución de peso exagerada en respuesta al ayuno, lo que estaría en concordancia con la función descrita de este neuropéptido como factor orexigénico [289]. Sin embargo, a pesar de la drástica disminución de peso tras 12 h de ayuno, no se observó en nuestros ratones mutantes la rápida caída de los niveles circulantes de LH que sí presentaban los ratones WT. Por otra parte, la alimentación con una HFD durante 9 semanas provocó en los ratones WT un aumento de peso del 40%, en relación a los ratones alimentados con una dieta control, asociado a una disminución de los niveles circulantes de LH. Sin embargo, en los ratones NPFF1R KO, a pesar de producirse un aumento de peso similar al observado en los ratones WT, la alimentación con una HFD no produjo modifica-

ciones significativas de los niveles circulantes de LH. En conjunto, estas observaciones sugieren que los mecanismos por los cuales las condiciones metabólicas extremas inhiben el eje gonadotrópico probablemente impliquen cambios en la señalización por GnIH/RFRP, tales como un aumento del tono inhibitorio por RFRP. En este sentido, estudios previos han demostrado un aumento de la actividad de las neuronas RFRP-ir durante períodos de subnutrición en hámster [309].

De otra parte, los estudios metabólicos en nuestro modelo NPFF1R KO han permitido poner de manifiesto ciertas alteraciones fenotípicas que son compatibles con un papel de este sistema en el control de la homeostasis energética y metabólica. Así, además de la mencionada mayor caída del peso corporal tras el ayuno, los estudios de evolución y respuestas a dietas en nuestro modelo NPFF1R KO advierten de un claro dimorfismo sexual, ya que mientras que en los ratones macho NPFF1R KO el incremento de peso tras exposición a una HFD no muestra diferencias con respecto a los ratones WT, en las hembras la ausencia de NPFF1R parece ser un factor condicionante de una rápida elevación de masa corporal tras HFD, que alcanza valores de peso superiores a los de ratonas control. En la misma línea, nuestros estudios en ratonas expuestas a HFD y OVX evidencian una ganancia de peso acelerada en las mutantes NPFF1R KO tras la eliminación de secreciones gonadales. Todo ello sugiere que, en las hembras, la ausencia congénita de señalización por NPFF1R predispone al desarrollo de un fenotipo obeso, si concurren otros factores predisponentes, como HFD y ovariectomía.

Sobre este último, es conocido que la ausencia de estrógenos no solo tiene un claro efecto sobre la liberación de gonadotropinas por la eliminación del feedback negativo, que éstos ejercen sobre la liberación de kisspeptinas/GnRH, sino que también influye sobre la homeostasis metabólica, causando un marcado aumento del peso corporal. Dada la existencia de ER α en las neuronas RFRP y la posible implicación de este sistema en el control de la ingesta, es plausible que el sistema RFRP/NPFF1R pudiera jugar un papel como mediador de los efectos de los estrógenos en el control del peso corporal; aspecto éste que no había sido analizado hasta la fecha. Nuestros estudios muestran cómo el déficit de estrógenos, que operan como señal de saciedad, produce el esperado aumento de peso en las ratonas WT. Del mismo modo, las ratonas NPFF1R KO responden a la retirada de

los estrógenos circulantes con un aumento de peso; no obstante, este aumento es mayor y se produce antes, siendo significativo ya tras 6 semanas de OVX. Este efecto potenciador inducido por la ausencia congénita de NPF1R en ratonas hembra es, de alguna forma, opuesto al esperable para una señal orexigénica y no casa con el mayor descenso de peso corporal observado en machos sometidos a ayuno (ver **Fig. 58A**), lo que reforzaría el posible dimorfismo sexual, ya apuntado, del papel del sistema RFRP/NPF1R en el control de la homeostasis energética del organismo.

En el ámbito metabólico, nuestro estudio también abordó el análisis de la posible función del sistema RFRP/NPF1R en la mediación de los efectos sobre la ingesta de señales hormonales relevantes, como la leptina y la ghrelina. En este sentido, se ha sugerido que las neuronas RFRP interactúan con neuronas NPY/AgRP y POMC/CART del ARC, que son capaces de responder a factores metabólicos tanto de origen central como periférico, que incluyen la leptina y la ghrelina. Así, en condiciones de balance energético negativo, como el ayuno, con niveles circulantes de leptina muy bajos o incluso indetectables, se estimula la actividad neuronal NPY/AgRP, lo que produce un aumento en la ingesta de alimentos. Por el contrario, en situaciones de balance energético positivo con suficientes reservas energéticas y niveles fisiológicos o incrementados de leptina, se activan las rutas neuronales anorexigénicas POMC/CART. Por su parte, la ghrelina es la señal orexigénica periférica más potente descrita hasta la fecha. Su administración, ya sea central o periférica, produce un incremento, dosis-dependiente, de la ingesta en roedores [310], mediado, en parte, por el aumento en el núcleo ARC de la expresión de NPY/AgRP y la inhibición de las neuronas POMC/CART [311].

Como se ha apuntado, la presencia de proyecciones de las neuronas RFRP hacia las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART en el núcleo ARC [290], junto con datos recientes que muestran un efecto inhibitorio directo de GnIH sobre las neuronas POMC [285] y atenuador del efecto de las kisspeptinas sobre estas neuronas [285], sugieren que la posible participación del sistema RFRP/NPF1R en el control metabólico podría estar mediada por ambas poblaciones neuronales.

Nuestros resultados confirman el efecto inhibitorio de la leptina sobre la ingesta, independientemente de la exposición previa a dietas de alto o bajo

contenido en grasa. No obstante, nuestros estudios son los primeros en poner de manifiesto diferencias en cuanto al tiempo de aparición del efecto anorexigénico de la leptina dependiendo de la presencia o no de señalización mediada por NPF1R y de la exposición previa a HFD. En concreto, en los ratones WT, la leptina tuvo un efecto rápido (1 h) sobre la ingesta en los ratones con sobrepeso por exposición a HFD, mientras que en los animales alimentados con LFD fueron necesarias 10 h para observar efectos significativos de la leptina. Por el contrario, en los ratones NPF1R KO, se detectó un rápido efecto de la leptina independientemente del tipo de dieta consumida antes de la administración de esta hormona.

En el caso de la ghrelina, los animales alimentados con una LFD presentaron el mismo patrón de respuesta independientemente del genotipo, mostrando un rápido aumento de la ingesta tras la administración de ghrelina, que se atenúa con el tiempo. Por el contrario, los ratones con sobrepeso por estar alimentados con una HFD mostraron patrones de respuesta a ghrelina diferenciados según su genotipo. Así, en los ratones WT alimentados con HFD, la ingesta aumentó a las 3 h de la administración de ghrelina y el efecto de la hormona se mantuvo durante 24 h, mientras que en ausencia de señalización por NPF1R, la ingesta no se modificó de forma significativa tras la inyección de ghrelina, a ninguno de los tiempos estudiados.

En su conjunto, los datos obtenidos sugerirían una participación, presumiblemente moderada pero detectable, del sistema RFRP/NPF1R en la mediación de los efectos de leptina y ghrelina en el control de la ingesta. En términos generales, los ratones NPF1R KO muestran una mayor sensibilidad a las acciones anorécticas de la leptina y una resistencia a las acciones orexigénicas de la ghrelina, lo que sería globalmente compatible con un papel predominantemente orexigénico del sistema RFRP, en línea con datos previos [216, 217, 237, 288, 289]. En todo caso, es destacable que algunas de las alteraciones en las respuestas a leptina y ghrelina en el modelo NPF1R KO son de magnitud modesta y sólo se detectan en condiciones de estrés metabólico por exposición previa a HFD, lo que podría sugerir la presencia de mecanismos compensadores. Del mismo, está por determinar si los cambios en las respuestas a leptina y ghrelina en ratones macho NPF1R KO descritos en este trabajo se producen igualmente en hembras, toda vez

algunos de nuestros datos apuntan a un posible dimorfismo sexual en el papel metabólico del sistema RFRP/NPFF1R.

Finalmente, en el ámbito de la caracterización del papel del sistema RFRP/NPFF1R en la homeostasis metabólica, analizamos en nuestro modelo mutante con ausencia de NPFF1R los niveles basales circulantes de glucosa e insulina. En los animales alimentados con HFD, observamos una hiperglucemia con respecto a los animales alimentados con una LFD, siendo ésta independiente del genotipo. Sin embargo, este aumento no se acompañó de variaciones significativas de los niveles de insulina. En todo caso, debido a que en experimentos *metabólicos* previos observamos que el papel del sistema RFRP/NPFF1R se pone especialmente de manifiesto en situaciones “extremas”, llevamos a cabo un test de tolerancia a la sobrecarga de glucosa en nuestros ratones, como parámetro que determina, de manera indirecta, la resistencia a insulina. Los resultados obtenidos mostraron que, tras la administración i.p. de un bolo de glucosa, los niveles circulantes de ésta aumentaron de forma significativa a los 20 min, normalizándose a las 2 horas en todos los modelos estudiados, excepto en los ratones NPFF1R KO alimentados con una HFD, que mostraron una hiperglucemia persistente. Estos datos, conjuntamente con otros hallazgos sobre cambios del peso corporal en respuesta a HFD, sugieren que la ausencia de señalización por NPFF1R magnifica el deterioro metabólico inducido por factores obesogénicos, con la HFD.

Caracterización fenotípica y hormonal del eje reproductor en ratones Gpr54 KI

La asociación en humanos y roedores de un cuadro de hipogonadismo hipogonadotrofo con mutaciones inactivantes del gen GPR54/Gpr54 puso de manifiesto el importante papel del sistema Kiss1/Gpr54 en la puesta en marcha y mantenimiento de la función reproductora [129, 130]. Estas observaciones iniciales impulsaron una intensa actividad investigadora dirigida a elucidar diferentes aspectos del papel fisiológico de este sistema en el control neuroendocrino de la reproducción, y más recientemente su posible papel en la regulación de la homeostasis metabólica. Para ello, se han utilizado hasta la fecha, junto con diversas aproximaciones farmacológicas, modelos de ratones mutantes para Kiss1 y Gpr54. En la actualidad, además de los mutantes globales para Kiss1 y Gpr54, se han desarrollado dos nuevos modelos de ratones para el estudio del sistema Kiss1/Gpr54 [297]. En uno de estos modelos, se eliminó de forma selectiva *Gpr54* en las neuronas GnRH; en el otro, se llevó a cabo una re-expresión selectiva de *Gpr54* en las neuronas GnRH, sobre la base de ratones Gpr54 KO globales (el ratón Gpr54 KI o Gpr54^{-/-T}).

Con el propósito de evaluar la importancia de la señalización kisspeptidérgica directa sobre neuronas GnRH en el control de la regulación del eje HHG y su posible participación en la homeostasis metabólica, incorporamos a nuestro laboratorio la nueva línea Gpr54 KI, cedida por el laboratorio del Prof. Günther Schütz, en la que en un background deficiente de Gpr54, se consigue la re-expresión de este receptor selectivamente en células GnRH [297]. La caracterización fenotípica y neuroendocrina detallada de este modelo ha formado parte del trabajo de la presente Tesis Doctoral. Es destacable que, si bien la validación y un estudio fenotípico muy general del modelo Gpr54 KI ha sido publicada muy recientemente [297], nuestros análisis son los primeros en valorar de forma sistemática aspectos muy relevantes del funcionamiento de los sistemas HHG y metabólico en el ratón con expresión selectiva de Gpr54 en células GnRH.

Los datos relativos a la caracterización de la función gonadal obtenidos en este trabajo indican que, a nivel ovárico, las ratonas Gpr54^{-/-T} adultas muestran un ovario funcional con folículos en crecimiento, aunque también se observan numerosos cuerpos lúteos en regresión, además de la presencia de quistes epiteliales en la médula ovárica. En la literatura, estudios realizados en modelos de

ratones con envejecimiento acelerado han demostrado que las alteraciones de la regresión de los cuerpos lúteos dan lugar a cuerpos lúteos persistentes, que son característicos del envejecimiento ovárico en las ratonas [312]. La presencia de los cuerpos lúteos en regresión y los quistes ováricos, que podrían ser índice de una senescencia ovárica prematura en las ratonas $Gpr54^{-/-T}$, explicarían que, a pesar de las alteraciones que se observan en los cortes histológicos, el peso de ovario en este genotipo es similar al de las hembras control. En todo caso, es reseñable que los cambios ultra-estructurales del ovario no se asocian a alteraciones notables del ciclo estral o la fertilidad, al menos a las edades estudiadas. Igualmente, es destacable que las alteraciones ováricas apuntadas tienen lugar en ausencia de diferencias detectables en los niveles de gonadotropinas circulantes entre ratones controles y $Gpr54^{-/-T}$. Considerando que en roedores se ha descrito la expresión de $Gpr54$ en ovario, nuestros datos en el modelo $Gpr54$ KI, que mantiene los efectos de kisspeptinas en neuronas GnRH pero no en otros tejidos, serían compatibles con un impacto directo del déficit de señalización de kisspeptinas en el ovario. En todo caso, el fenotipo ovárico moderado del ratón $Gpr54$ KI contrasta con el marcado hipogonadismo de nuestros mutantes deficientes globales $Gpr54^{-/-}$, que presentan niveles muy bajos de gonadotropinas circulantes, atrofia ovárica y ausencia de ovulación, lo que coincide con otros modelos de ratonas $Gpr54^{-/-}$ [130, 192, 313] y confirma el papel claramente predominante de la señalización central (vs. periférica) de kisspeptinas en el control del eje HHG.

Por otra parte, en los ratones macho $Gpr54^{-/-T}$, los resultados de caracterización gonadal indican que, a pesar de presentar una espermatogénesis completa, éstos exhiben numerosas alteraciones ultra-estructurales, tales como túbulos seminíferos de menor diámetro y un menor número de células germinales, lo que coincide con la presencia en estos ratones de numerosas células en apoptosis y de espermátides multinucleadas en degeneración, además de una disminución del peso de sus testículos y epidídimos. A pesar de estos índices de disfunción testicular, los ratones macho no ven comprometida su fertilidad y presentan SBP, como signo externo de la pubertad. Por otro lado, el análisis hormonal mostró un aumento de los niveles circulantes de LH en los machos $Gpr54^{-/-T}$, aunque no se observan diferencias en los niveles circulantes de FSH. A su vez, los niveles circulantes de T no estaban alterados en este genotipo, a pesar de la elevación de la

LH (principal estímulo de la esteroidogénesis testicular), mientras que la secreción basal de T *in vitro* por testículos de ratones Gpr54^{-/-T} fue significativamente menor que la de los controles Gpr54^{+/+T}. De nuevo, todo ello es compatible con un impacto del déficit de señalización de kisspeptinas directamente a nivel testicular, en línea con estudios previos de expresión que han constatado la presencia de Gpr54 en testículo [114, 136-139, 145]. En cualquier caso, y al igual que en las hembras, el fenotipo testicular en el ratón Gpr54 KI es mucho más moderado que el que presentan los ratones macho Gpr54^{-/-}, caracterizado por ausencia total de espermatogénesis, así como una disminución de la secreción de T y del peso testicular, y atrofia de epidídimos, con ausencia de SBP e infertilidad. De nuevo, estos datos coinciden con los datos obtenidos en diferentes modelos de ratón Gpr54 KO [130, 132, 178, 190] y refuerzan el papel dominante de los efectos centrales de las kisspeptinas en el control estimulador del eje reproductor, también en el macho.

Interacciones de kisspeptinas y otros reguladores del eje HHG: Estudio de acciones directas vs indirectas sobre neuronas GnRH en el ratón Gpr54^{-/-T}

Aunque existe el consenso que Gpr54 se expresa de manera prominente en neuronas GnRH para mediar una parte sustancial de las acciones de kisspeptinas sobre el sistema reproductor, datos previos en la literatura han documentado la expresión de Gpr54 en diversos tejidos, incluyendo elementos del eje HHG distintos de las neurona GnRH hipotalámicas, tales como las neuronas POMC del ARC, la hipófisis y las gónadas [114, 136-139, 145]. Sin embargo, el papel de las supuestas acciones extra-GnRH de las kisspeptinas ha sido objeto de considerable debate, sin que su relevancia fisiológica haya sido suficientemente aclarada hasta la fecha. La disponibilidad del modelo Gpr54^{-/-T} con ausencia de expresión del receptor Gpr54 (y por tanto de acciones de kisspeptinas) salvo en células GnRH ofrece una herramienta poderosa para valorar de forma comparativa la importancia fisiológica de las acciones directas vs. indirectas (o independientes) de kisspeptinas sobre este elemento clave del eje reproductor. Por este motivo, en la presente Tesis implementamos una serie de test neuroendocrinos en este modelo, en los que valoramos la magnitud de respuestas gonadotrópicas a la manipulación de diversas señales centrales y periféricas clave en el control del sistema HHG;

respuestas que comparamos con las obtenidas en ratones control $Gpr54^{+/+T}$ y ratones con deficiencia completa de $Gpr54$ ($Gpr54^{-/-}$).

Con carácter general, nuestros estudios de respuesta a GnRH y Kp-10 demostraron que el ratón $Gpr54^{-/-T}$ no sólo tiene preservada la capacidad hipofisaria de respuesta a GnRH (aspecto que comparte con el $Gpr54$ KO global), sino que muestra respuestas conservadas a la administración central de Kp-10; respuestas que están obviamente ausentes en el ratón $Gpr54^{-/-}$. Aunque esta observación no excluye la posibilidad de efectos de las kisspeptinas en otras poblaciones celulares del SNC, nuestros datos avalan un efecto claramente prominente de las kisspeptinas en neuronas GnRH, que podría compensar, al menos a las dosis testadas, la ausencia de efectos extra-GnRH de las kisspeptinas en el modelo $Gpr54^{-/-T}$. En todo caso, es destacable que las respuestas relativas de LH a la estimulación con Kp-10 fueron ostensiblemente menores en los ratones $Gpr54^{-/-T}$ frente a los controles, lo que sugeriría la existencia de acciones centrales de kisspeptinas independientes de efectos directos sobre neuronas GnRH. Por otra parte, la conservación de las respuestas a GnRH en los modelos $Gpr54^{-/-T}$ y $Gpr54^{-/-}$ sugiere que el papel de la señalización de kisspeptinas en el control de la secreción de gonadotropinas directamente a nivel hipofisario es, en el mejor de los casos, modesto, y claramente supeditado al de sus acciones reguladoras del GnRH hipotalámico.

Estudios previos en modelos con inactivación congénita tanto de $Kiss1$ como de $Gpr54$ habían sugerido que la señalización por kisspeptinas desempeña un papel indispensable en la mediación del efecto inhibitor de los esteroides gonadales sobre la secreción de GnRH/LH [151, 190, 192]; aspecto éste confirmado por los resultados de esta Tesis en ratones $Gpr54^{-/-}$. Sin embargo, no ha sido aclarado hasta la fecha si esta acción es llevada a cabo de forma directa sobre neuronas GnRH o a través de mecanismos indirectos. Con objeto de evaluar este fenómeno analizamos en nuestro modelo $Gpr54^{-/-T}$ las respuestas de secreción de LH y FSH tras la gonadectomía, tanto en machos como en hembras. Nuestros datos evidencian que los ratones $Gpr54^{-/-T}$ de ambos sexos, a pesar de responder a la GNX con un aumento de los niveles circulantes de LH, lo hacen en una menor magnitud que los ratones control, y en el caso de las hembras, esta respuesta sólo se observa de forma muy diferida. Estas observaciones sugieren que si bien la

acción directa de kisspeptinas en neuronas GnRH juega un papel destacable en la mediación de los efectos feedback negativos de los esteroides gonadales sobre la secreción de gonadotropinas, la señalización de Gpr54 en otras poblaciones celulares, ausente en el modelo Gpr54^{-/-T}, contribuye igualmente a este fenómeno, de manera especialmente destacada en hembras.

De modo análogo, empleamos el modelo Gpr54^{-/-T} para evaluar las interacciones de kisspeptinas con otros reguladores centrales de la secreción de GnRH, y los presumibles sitios de acción donde éstas pudieran producirse. En este sentido, y como ha sido apuntado previamente en esta Memoria, el GnRH es el efector final común a través del cual numerosas señales de origen central y naturaleza aminoacídica o peptídica participan en el control de la función reproductora [52, 97, 305, 306]. Estas señales pudieran modular la secreción de GnRH, ya sea actuando directamente sobre las neuronas GnRH y/o, indirectamente, a través de neurona(s) interpuesta(s).

En el caso del sistema Kiss1/Gpr54, diferentes estudios han demostrado la presencia de Gpr54 en el soma y terminales axónicos de las neuronas GnRH [262, 264], así como numerosas proyecciones directas de las neuronas Kiss1 hacia estas localizaciones. Esto sugiere que, al menos una parte sustancial del efecto estimulador que las kisspeptinas ejercen sobre la liberación de GnRH es llevado a cabo de forma directa actuando sobre los receptores presentes en las neuronas GnRH. En todo caso, dadas las características de las kisspeptinas como potentes activadores de las neuronas GnRH, una posible actuación complementaria de las kisspeptinas a nivel post-sináptico, modificando la respuesta de GnRH a otros neurotransmisores es igualmente factible. De hecho, las neuronas GnRH reciben aferencias y presentan receptores específicos para un gran número de neurotransmisores tales como glutamato, GABA, GnIH o NKB [305]. Dado que, además, han sido descritas proyecciones de neuronas kisspeptidérgicas hacia otras zonas del SNC desde donde parten terminales axónicos que contactan con las neuronas GnRH, es igualmente posible parte del efecto estimulador de la liberación de GnRH que ejercen las kisspeptinas pudiera estar mediado a través de neurona(s) interpuesta(s). Esta posibilidad, sin embargo, ha sido escasamente analizada hasta la fecha.

Datos previos indican que la neurotransmisión glutamatérgica, ejercida a través de receptores ionotrópicos (iGlu-R: NMDA, AMPA y KA) y, en menor medida, metabotrópicos (mGluR), juega un papel esencial en la puesta en marcha de la función reproductora durante la pubertad y en el mantenimiento de la misma durante la edad adulta, debido a su efecto estimulador de la liberación de gonadotropinas [52, 314, 315]; efecto éste que se confirma por nuestros estudios en ratones macho adultos inyectados con NMDA (agonista de los receptores iGlu-R tipo NMDA). De hecho, las neuronas GnRH presentan, en su soma y terminales axónicos, un gran número de receptores AMPA [316-318]; sin embargo el número de receptores tipo NMDA son escasos [52]. Esta distribución podría ser compatible con la hipótesis de que una parte importante de las acciones que el glutamato ejerce a través de NMDA, sobre el control de GnRH, podría llevarse a cabo a través de neuronas intermediarias [52], mientras que las mediadas por AMPA podrían llevarse a cabo de forma directa (*Fig. 86*).

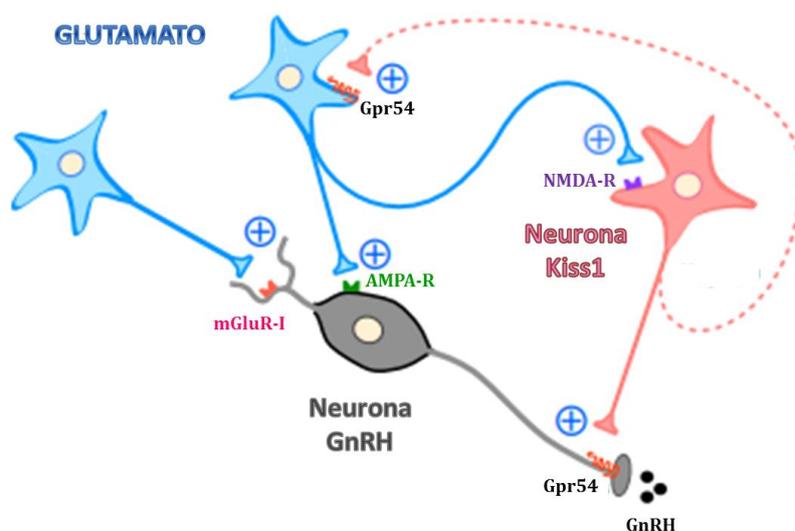


Figura 86. Representación esquemática del modelo propuesto para las posibles interacciones entre la señalización por glutamato y kisspeptinas en el control de la liberación de GnRH.

En relación a la posible mediación de las kisspeptinas en el efecto estimulador que el glutamato ejerce sobre la liberación de gonadotropinas, datos previos, incluidos propios de nuestro grupo, indican que en ratones con déficit congénito global de Gpr54 o Kiss1, la administración de NMDA induce un aumento moderado pero detectable de los niveles de LH, lo que sugiere que una parte de la

señalización por NMDA es independiente de las vías Kiss1. En todo caso, la magnitud de estas respuestas a NMDA es inferior en los ratones con inactivación global del sistema Kiss1/Gpr54 [313, 319]. Nuestros datos en ratones Gpr54^{-/-T}, con señalización kisspeptidérgica exclusiva en neuronas GnRH, indican que la respuesta de LH a la administración central de NMDA es, en valores absolutos, de una magnitud ligeramente mayor a la de los ratones control, lo que podría estar relacionado con un menor *freno* gonadal de la secreción de gonadotropinas, que se manifiesta en unos valores basales incrementados de LH en el ratón Gpr54^{-/-T}. No obstante, en términos de aumento relativo, las respuestas de LH a estimulación central con NMDA en el modelo Gpr54^{-/-T} fueron de una magnitud inferior a la de los controles, y similar a la detectada en los ratones Gpr54^{-/-}, lo que sugiere que es necesaria la señalización extra-GnRH de kisspeptinas para alcanzar respuestas gonadotrópicas completas a NMDA en condiciones fisiológicas (i.e., con input gonadal y niveles basales de LH normales).

Al igual que el glutamato, la señalización GABAérgica, mediada por los receptores GABA_A (ionotrópicos) y GABA_B (metabotrópicos), juega un papel esencial en el control de la secreción de gonadotropinas mediante la regulación de la actividad de las neuronas GnRH [97, 320-322]. Sin embargo, los estudios *in vivo* e *in vitro* muestran diferencias en cuanto a los efectos de la señalización por GABA en el control de la actividad neuronal de GnRH. Así, mientras que la administración *in vivo* de agonistas de los receptores GABA_A produce un efecto inhibitor de la secreción de LH [97], los estudios electrofisiológicos muestran tanto respuestas inhibitoras (hiperpolarizantes) como estimuladoras (despolarizantes) sobre las neuronas GnRH [97].

Nuestros estudios *in vivo* apoyan hallazgos previos que muestran un efecto neto predominantemente inhibitor de GABA sobre la liberación de gonadotropinas, a través de los receptores ionotrópicos GABA_A, como se pone de manifiesto por el hecho de que el bloqueo de estos receptores con un antagonista específico (PHP₅₀₁) indujo un aumento muy significativo de los niveles circulantes de LH. En todo caso, datos previos en la literatura han sugerido la posible interacción entre la señalización kisspeptidérgica y GABAérgica. Así, se ha descrito que la mayoría de las neuronas Kiss1 del AVPV parecen ser GABAérgicas, en contraste con las del núcleo ARC, que muestran mayoritariamente marcadores glutamatérgicos y en

menor medida GABAérgicos [322]. Igualmente, se ha documentado que las kisspeptinas pueden contrarrestar los efectos inhibitorios de la señalización por GABA_B en las neuronas GnRH [323]. Además, estudios electrofisiológicos en las neuronas GnRH, donde se describe un efecto estimulador (despolarizante) de GABA sobre la actividad de dichas neuronas, han mostrado que la Kp-10 es capaz de incrementar la respuesta de las neuronas GnRH a GABA, mientras que el bloqueo de la señalización GABAérgica reduce la respuesta de las neuronas GnRH a Kp-10 [321].

Nuestros datos demuestran que la integridad de la señalización de kisspeptinas es indispensable para la expresión del efecto estimulador *in vivo* del bloqueo de los receptores GABA_A, habida cuenta la administración del antagonista PHP₅₀₁ no provocó la esperable elevación de los niveles de LH en ratones con déficit global de Gpr54. Por el contrario, en ratones Gpr54^{-/-T} las respuestas de LH a la inyección de PHP₅₀₁, tanto absolutas como relativas, fueron similares a las obtenidas en ratones control. Esta observación sugiere que la interacción arriba indicada requiere de una función Gpr54 preservada las células GnRH, ya sea por un efecto pre-sináptico de GABA sobre neuronas Kiss1 (que resultaría en un aumento del tono kisspeptidérgico tras el bloqueo con PHP₅₀₁) y/o a través de un efecto post-sináptico, por el cual la ausencia de acciones de kisspeptinas en neuronas GnRH impidiera la activación de estas neuronas tras el bloqueo de receptores PHP₅₀₁. Ambas hipótesis son plausibles, si bien hasta el momento no ha sido analizada la presencia de receptores GABA en las neuronas Kiss1.

Entre los diversos neuropéptidos implicados en el control del sistema reproductor, la NKB ha sido identificada en los últimos años como un regulador esencial del eje HHG en diversas especies de mamíferos, con un papel predominantemente estimulador en la liberación de GnRH/gonadotropinas [69, 140, 141, 324, 325]. No obstante, persiste cierto debate acerca de si los efectos de la NKB sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas pudieran llevarse a cabo de forma directa sobre las neuronas GnRH o indirecta, a través de otros sistemas neuronales interpuestos. La observación de que las neuronas GnRH parecen expresar el receptor NK3R en los axones que proyectan hacia la eminencia media avalaría un efecto directo de NKB [64]. Sin embargo, los datos de expresión y funcionales, obtenidos en diversas especies en los últimos años, sugieren que, integrándose en

la red neuronal KNDy, donde se co-expresa con kisspeptinas y dinorfina [63, 140], la NKB estimularía la liberación de GnRH de forma indirecta, gracias a su capacidad de incrementar, a través de circuitos de (auto-)regulación local, la secreción de kisspeptinas. Estas últimas, actuando sobre Gpr54 presentes en las neuronas GnRH, operarían como efectores de las acciones de NKB. De hecho, la identificación de las neuronas KNDy ha suscitado un enorme interés ya que su estudio está permitiendo poner de manifiesto las precisas interacciones entre kisspeptinas y NKB en el control de la excitabilidad de las neuronas GnRH [305].

En concordancia con la hipótesis arriba indicada, mientras que la administración del agonista de NKB, senktide, en ratones control Gpr54^{+/+T} indujo una potente respuesta en términos de liberación de LH, este efecto no se observó en ratones con deficiencia global para el receptor de kisspeptinas (Gpr54^{-/-}), lo que avala la idea de que los efectos de NKB requieren indispensablemente de la integridad de la señalización de kisspeptinas. Por otro lado, el hecho que las respuestas absolutas y relativas de LH a senktide estén plenamente conservadas en el ratón Gpr54^{-/-T} confirma que un elemento esencial de esta interacción NKB/Kiss1 es la acción final de kisspeptinas, presumiblemente estimuladas por NKB, sobre Gpr54 en neuronas GnRH, en línea con lo planteado por el modelo KNDy.

Por otra parte, datos electrofisiológicos recientes sugieren que no sólo NKB actuando sobre NK3R, sino también otras taquiquininas con acción selectiva sobre receptores NK1R (como la sustancia-P) y NK2R (como NKA), pudieran estimular la actividad de neuronas GnRH [326]. Sin embargo, los efectos gonadotrópicos *in vivo* de estas taquiquininas y sus posibles interacciones con la señalización de kisspeptinas no han sido estudiadas hasta la fecha. Nuestros datos son los primeros en mostrar que, al igual que para el sistema NKB/NK3R, otras taquiquininas, actuando sobre receptores NK1R y NK2R, serían capaces de inducir potentes respuestas de secreción de LH, como marcador subrogado de activación de neuronas GnRH. Destacablemente, y de forma similar a los efectos de NKB, la activación de la liberación de GnRH/LH mediada por los receptores NK1R y NK2R requiere de la integridad funcional del sistema Kiss1/Gpr54, lo que sugeriría la posible participación de otras taquiquininas (además de NKB) en el sistema KNDy. En todo caso, es interesante apuntar las diferencias observadas en términos de respuestas secretoras relativas tras la activación de los diferentes receptores de

taquiquininas; así, mientras las respuestas relativas de LH a los agonistas de NK1R y NK3R fueron similares entre los ratones Gpr54^{-/-T} y los controles Gpr54^{+/+}, las inducidas por la activación de NK2R fueron claramente de menor magnitud en el ratón Gpr54^{-/-T}, lo que sugiere diferencias en las rutas implicadas en la señalización de los efectos de las distintas taquiquininas, y en su dependencia total o parcial de los efectos de las kisspeptinas.

Papel metabólico del sistema Kiss1: Acciones de leptina y ghrelina sobre la ingesta en el ratón Gpr54^{-/-T}

Como se ha apuntado en epígrafes previos, la señalización kisspeptidérgica se ha postulado como una vía esencial para el desencadenamiento de la pubertad y el mantenimiento de la fertilidad en la edad adulta. Adicionalmente, en los últimos años se ha estudiado la posible implicación del sistema Kiss1/Gpr54 en la interacción dinámica entre el estado energético del organismo y el eje HGG [282, 327, 328] y su papel como mediador de las acciones de diversos reguladores metabólicos de la reproducción. Así, la administración icv de leptina en modelos animales incrementa la expresión hipotalámica de *Kiss1* en el núcleo ARC [283], mientras que la administración de ghrelina la inhibe [329]. Estas observaciones, unidas a datos de expresión que sugieren una disminución del tono kisspeptidérgico en condiciones de stress metabólico, han llevado a postular que, de forma directa y/o indirecta, las neuronas Kiss1 participan en la transmisión de los efectos reproductivos de diversas señales de gran importancia en el control metabólico, tales como la leptina y la ghrelina.

Por otra parte, recientemente se ha descrito un efecto estimulador de las kisspeptinas sobre las neuronas POMC/CART, así como una inhibición de las neuronas NPY/AgRP mediante mecanismos indirectos, activando la señalización mediada por vías GABAérgicas [330]. Estas acciones de las kisspeptinas serían compatibles con un papel directo de este sistema en el control metabólico y de la ingesta (con un posible efecto anoréctico), máxime por ser las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP nodos clave en la transmisión de los efectos reguladores de leptina y ghrelina, entre otras señales periféricas. Sin embargo, la posible relevancia fisiológica del sistema Kiss1/Gpr54 en este ámbito ha sido escasamente estudiada hasta la fecha.

En este contexto, en la presente Tesis analizamos los efectos de leptina y ghrelina sobre la ingesta de alimentos en nuestro modelo $Gpr54^{-/-T}$, que mantiene niveles globalmente conservados de función gonadal gracias a la expresión selectiva de $Gpr54$ en células GnRH pero que carece de señalización kisspeptidérgica en otras localizaciones celulares, presumiblemente relevantes en la mediación de posibles efectos de kisspeptinas en el control de la ingesta. A modo comparativo, analizamos igualmente las acciones sobre la ingesta de leptina y ghrelina en ratones control $Gpr54^{+/+T}$, así como en ratones con deficiencia global de $Gpr54$ ($Gpr54^{-/-}$). El severo hipogonadismo de este último genotipo, sin embargo, es un posible factor de confusión, toda vez es bien conocido que los esteroides gonadales tienen *per se* un papel destacado en el control metabólico.

Nuestros resultados demuestran que la eliminación global de señalización kisspeptidérgica o su ausencia en todas las localizaciones salvo en células GnRH produce una disminución significativa de la ingesta de alimentos, toda vez que la ingesta acumulada de 24 h en los ratones $Gpr54^{-/-}$ y $Gpr54^{-/-T}$ fue inferior a la detectada en ratones control. Esta observación sugeriría un efecto extra-GnRH de las kisspeptinas en el control de la ingesta; curiosamente, el descenso de ingesta observado en nuestros modelos KO sería opuesto al esperado para una señal anorexigénica, como ha sido sugerido para las kisspeptinas, aun en base a un único estudio en ratones [287].

Por otro lado, la administración central de leptina o ghrelina indujeron globalmente los esperados efectos anorexigénicos y orexigénicos, respectivamente, en todos los genotipos analizados. Sin embargo, los perfiles temporales de respuesta de ingesta presentaron ciertas diferencias dependiendo de la hormona (leptina vs. ghrelina) y el modelo. Así, considerando las respuestas de ingesta acumulada a 24 h, el efecto anoréctico de la leptina, que se observa en ratones control, no se detectó en ratones $Gpr54^{-/-T}$, lo que sugeriría que la señalización de kisspeptinas en células distintas de neuronas GnRH es necesaria para transmitir los efectos saciantes de esta hormona. Curiosamente, sin embargo, los efectos de leptina sí se detectaron en ratones $Gpr54^{-/-}$ con ausencia global de señalización kisspeptidérgica. Los mecanismos subyacentes a este fenómeno permanecen desconocidos, pero podrían implicar la puesta en marcha de eventos compensatorios o la interferencia del estado de hipogonadismo, selectivamente en los ratones

Gpr54^{-/-}. Por otra parte, el efecto orexigénico de la ghrelina, detectado en ratones control en términos de ingesta acumulada a las 6 h, se observó igualmente en el modelo Gpr54^{-/-T}, pero no en el ratón Gpr54^{-/-}, donde el aumento de ingesta inducido por ghrelina solo se detectó atenuadamente en términos de ingesta acumulada a 24 h. Estos datos sugerirían que la expresión completa del efecto orexigénico de la ghrelina requeriría la integridad de la señalización de kisspeptinas en neuronas GnRH y, por extensión, de la funcionalidad del eje gonadotrópico. El papel que pudieran jugar los esteroides gonadales en este proceso debe ser investigado en el futuro.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral nos propusimos avanzar en la caracterización del papel fisiológico de los sistemas RFRP/NPFF1R y Kiss1/Gp54 en la regulación del eje reproductor, y su relación con otros sistemas homeostáticos relevantes, como los de control metabólico. Las principales conclusiones obtenidas de nuestros estudios son las siguientes:

❖ Sistema RFRP/NPFF1R:

- La eliminación de la señalización por el sistema RFRP/NPFF1R no provoca una sobre-estimulación marcada y persistente del eje HHG, si bien son detectables alteraciones compatibles con su papel inhibitorio, tales como la elevación de los niveles de LH y FSH y el aumento de la expresión hipotalámica de *Kiss1*; en todo caso, la función reguladora del sistema RFRP/NPFF1R es más modesta y probablemente esté subordinada a la función esencial del sistema Kiss1/Gpr54.
- El sistema RFRP/NPFF1R actúa a nivel hipofisario incrementando la capacidad de respuesta de los gonadotropos a GnRH y a nivel central mediante un control inhibitorio de la expresión de *Kiss1*. Además, la falta de señalización NPFF1R disminuye la respuesta de las neuronas Kiss1 a NKB y altera de forma sexualmente dimórfica el control feedback de secreción de LH por esteroides gonadales.
- El sistema RFRP/NPFF1R participa en la inhibición del eje gonadotrópico en condiciones metabólicas extremas como el ayuno y el sobrepeso inducido por HFD, y parece estar implicado en la mediación de los efectos de leptina y ghrelina en el control de la ingesta. Además, la ausencia de señalización por NPFF1R altera la homeostasis energética de manera sexualmente dimórfica y tiende a magnificar el deterioro metabólico inducido por factores obesogénicos, como la HFD.

❖ Sistema Kiss1/Gpr54:

- Los efectos centrales de las kisspeptinas, especialmente sobre neuronas GnRH, juegan un papel dominante en el control estimulador del eje reproductor, en ambos sexos.

- La señalización de Gpr54 en poblaciones celulares diferentes a las neuronas GnRH contribuye a la mediación de los efectos feedback negativos de los esteroides gonadales sobre la secreción de gonadotropinas, especialmente en hembras.
- El efecto inhibitor sobre la secreción de LH de la señalización GABA_A requiere de la integridad de la señalización kisspeptidérgica, mientras que los efectos extra-GnRH de las kisspeptinas parecen necesarios para alcanzar respuestas gonadotrópicas completas a NMDA en condiciones fisiológicas.
- Diversas taquiquininas, actuando sobre los receptores NK1R, NK2R y NK3R, pueden inducir potentes respuestas estimuladoras de LH mediante diferentes rutas de acción, con dependencia total o parcial de la señalización kisspeptidérgica, en consonancia con el modelo de regulación de las neuronas KNDy.
- La eliminación de la señalización de Gpr54 global o en sitios extra-GnRH produce alteraciones variables de las respuestas de ingesta a leptina y ghrelina: los efectos de la ghrelina requieren de la integridad de la señalización kisspeptidérgica en neuronas GnRH (y de la función del eje HHG), mientras que los efectos de la leptina requieren además de efectos extra-GnRH de kisspeptinas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Herbison, A.E., *Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: The Physiology of Reproduction, edited by Neil JD: Elsevier, p. 1415-1482. 2006.*
2. Flnk, G., *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Humana Press, Totowa, New Jersey: p. 107-134.*
3. Tena-Sempere, M., E. Aguilar, and L. Pinilla, *Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En: Actualizaciones en Endocrinología. Gónadas. Diéguez C, Yturriaga R (eds) Madrid. McGraw-Hill/Interamericana, 2001: p. 21-42.*
4. Amat-Munóz, P., *Anatomía Humana Funcional y Aplicativa. 1991, Espaxs S.A.: Barcelona. p. 1448-1474.*
5. Witkin, J.W., C.M. Paden, and A.J. Silverman, *The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. Neuroendocrinology, 1982. 35(6): p. 429-38.*
6. Liposits, Z., et al., *Synaptic communication between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor (GRF) synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. Histochemistry, 1988. 89(3): p. 247-52.*
7. Schally, A.V., et al., *Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. Science, 1971. 173(4001): p. 1036-8.*
8. Burgus, R., et al., *Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. 69(1): p. 278-82.*
9. Okubo, K. and Y. Nagahama, *Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. Acta Physiol (Oxf), 2008. 193(1): p. 3-15.*
10. Temple, J.L., R.P. Millar, and E.F. Rissman, *An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. Endocrinology, 2003. 144(1): p. 13-9.*
11. Kauffman, A.S. and E.F. Rissman, *A critical role for the evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II: mediation of energy status and female sexual behavior. Endocrinology, 2004. 145(8): p. 3639-46.*
12. Gonzalez-Martinez, D., et al., *Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (Dicentrarchus labrax) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. J Comp Neurol, 2002. 446(2): p. 95-113.*
13. Sherwood, N., et al., *Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(9): p. 2794-8.*
14. Dudas, B. and I. Merchenthaler, *Topography and associations of leu-enkephalin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon. J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(4): p. 1842-8.*
15. Song, T., et al., *GnRH-prohormone-containing neurons in the primate brain: immunostaining for the GnRH-associated peptide. Peptides, 1987. 8(2): p. 335-46.*
16. Witkin, J.W., *Access of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the vasculature in the rat. Neuroscience, 1990. 37(2): p. 501-6.*
17. Seeburg, P.H., et al., *The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. Recent Prog Horm Res, 1987. 43: p. 69-98.*
18. Karten, M.J. and J.E. Rivier, *Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. Endocr Rev, 1986. 7(1): p. 44-66.*
19. Dutlow, C.M., et al., *Prepubertal increases in gonadotropin-releasing hormone mRNA, gonadotropin-releasing hormone precursor, and subsequent maturation of precursor processing in male rats. J Clin Invest, 1992. 90(6): p. 2496-501.*

20. Millar, R.P., et al., *Gonadotropin-releasing hormone receptors*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 235-75.
21. Millar, R.P., *GnRHs and GnRH receptors*. *Anim Reprod Sci*, 2005. **88**(1-2): p. 5-28.
22. Millar, R.P., et al., *Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling*. *Front Neuroendocrinol*, 2008. **29**(1): p. 17-35.
23. Childs, G., *Functional ultrastructure of gonadotropes: a review*. *Morphology of hypothalamus and its connections*, 1981: p. 47-97.
24. Themmen, A.P.N. and I.T. Huhtaniemi, *Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(5): p. 551-83.
25. Bousfield, G.R., W.M. Perry, and D.N. Ward, *Gonadotropins. Chemistry and biosynthesis*. En: Knobil E, Neil JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York, 1994: p. 1749-1792.
26. Bo, M. and I. Boime, *Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(5): p. 3179-84.
27. Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff, *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. *Endocr Rev*, 2002. **23**(2): p. 141-74.
28. Herrlich, A., et al., *Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(28): p. 16764-72.
29. Gudermann, T., M. Birnbaumer, and L. Birnbaumer, *Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(7): p. 4479-88.
30. Gudermann, T., et al., *Ca²⁺ mobilization by the LH receptor expressed in Xenopus oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**(2): p. 272-8.
31. Hsueh, A.J., M.L. Dufau, and K.J. Catt, *Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3':5'-cyclic AMP and testosterone responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(2): p. 592-5.
32. Dufau, M.L., *The luteinizing hormone receptor*. *Annu Rev Physiol*, 1998. **60**: p. 461-96.
33. Simoni, M., J. Gromoll, and E. Nieschlag, *The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(6): p. 739-73.
34. Asatiani, K., et al., *Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men*. *Andrologia*, 2002. **34**(3): p. 172-6.
35. Kerr, J.B., *Functional cytology of the human testis*. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1992. **6**(2): p. 235-50.
36. de Kretser, D.M. and J.B. Kerr, *The cytology of the testis*. In: Knobil E, Neil J editors. *The Physiology of Reproduction*. New York. p. p. 837-932.
37. Morse, H.C., et al., *Testosterone concentrations in testes of normal men: effects of testosterone propionate administration*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1973. **37**(6): p. 882-6.
38. Hafez, E.S.E. and B. Hafez, *Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Séptima Edición*. McGraw-Hill. 2000(Séptima Edición): p. p.40-44.
39. Bardin, C.W., et al., *The Sertoli cell*. In: *The Physiology of Reproduction*. (E. Knobil, J. Neill et al., eds) Raven Press. New York. 1988: p. 933-974.
40. Hansson, V., et al., *Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgen*. *J Reprod Fertil*, 1975. **44**(2): p. 363-75.
41. Fritz, I.B., *Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule*. En: Litwack G (ed) *Biochemical Actions of Hormones*. New York Academic Press, 1978: p. 249-271.

42. Channing, C.P., T. Hillensjo, and F.W. Schaerf, *Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals*. Clin Endocrinol Metab, 1978. **7**(3): p. 601-24.
43. McKinley and O'Loughlin, *Human Anatomy, First Edition ed. McGraw-Hill Chapter 28: The Reproductive System*. 2006.
44. Sánchez-Criado, J.E., *Fisiología del ovario*. En: Fisiología Humana. Tresguerres JAF. (ed) Madrid, McGraw-Hilla/Interamericana, 1999: p. 1020-1032.
45. Van Voorhis, B.J., *Follicular development*. En: Encyclopedia of Reproduction. Knobil E, Neil JD (eds) San Diego. Academic Press, 1998: p. 2:376-388.
46. Everett, J.W., C.H. Sawyer, and J.E. Markee, *A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat*. Endocrinology, 1949. **44**(3): p. 234-50.
47. Everett, J.W., *Central Neural Control of Reproductive Functions of the Adenohypophysis*. Physiol Rev, 1964. **44**: p. 373-431.
48. Curtis, H. and S.N. Barnes, *Biología (6ª edición) Edit. Médica Panamericana*. 2000.
49. Goldsmith, P.C. and K.K. Thind, *Morphological basis for neuronal control of GnRH secretion in the monkey*. En: Plant TM, Lee PA (eds) The Neurobiology of Puberty. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol,UK, 1995: p. 73-85.
50. Barnes, G.N. and J.T. Slevin, *Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease*. Curr Med Chem, 2003. **10**(20): p. 2059-72.
51. Oswald, R.E., *Ionotropic glutamate receptor recognition and activation*. Adv Protein Chem, 2004. **68**: p. 313-49.
52. Iremonger, K.J., et al., *Glutamate regulation of GnRH neuron excitability*. Brain Res, 2010. **1364**: p. 35-43.
53. Kew, J.N. and J.A. Kemp, *Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology*. Psychopharmacology (Berl), 2005. **179**(1): p. 4-29.
54. Schoepp, D.D. and P.J. Conn, *Metabotropic glutamate receptors*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **74**(1): p. 255-6.
55. Brann, D.W. and V.B. Mahesh, *Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion*. Endocr Rev, 1997. **18**(5): p. 678-700.
56. Gore, A.C., *Gonadotropin-releasing hormone neurons, NMDA receptors, and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle*. Brain Res Brain Res Rev, 2001. **37**(1-3): p. 235-48.
57. Ondo, J.G., K.A. Pass, and R. Baldwin, *The effects of neurally active amino acids on pituitary gonadotropin secretion*. Neuroendocrinology, 1976. **21**(1): p. 79-87.
58. Brann, D.W. and V.B. Mahesh, *Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation*. Front Neuroendocrinol, 1994. **15**(1): p. 3-49.
59. Chakraborty, T.R., L. Ng, and A.C. Gore, *Colocalization and hormone regulation of estrogen receptor alpha and N-methyl-D-aspartate receptor in the hypothalamus of female rats*. Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 299-305.
60. Page, N.M., *New challenges in the study of the mammalian tachykinins*. Peptides, 2005. **26**(8): p. 1356-68.
61. Sandoval-Guzman, T. and N.E. Rance, *Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus*. Brain Res, 2004. **1026**(2): p. 307-12.
62. Goodman, R.L., et al., *Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B*. Endocrinology, 2007. **148**(12): p. 5752-60.
63. Navarro, V.M., et al., *Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse*. J Neurosci, 2009. **29**(38): p. 11859-66.

64. Krajewski, S.J., et al., *Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence*. J Comp Neurol, 2005. **489**(3): p. 372-86.
65. Amstalden, M., et al., *Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones*. J Neuroendocrinol, 2010. **22**(1): p. 1-12.
66. Corander, M.P., et al., *The effects of neurokinin B upon gonadotrophin release in male rodents*. J Neuroendocrinol, 2010. **22**(3): p. 181-7.
67. Siuciak, J.A., et al., *Disruption of the neurokinin-3 receptor (NK3) in mice leads to cognitive deficits*. Psychopharmacology (Berl), 2007. **194**(2): p. 185-95.
68. Topaloglu, A.K., *Neurokinin B signaling in puberty: human and animal studies*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **324**(1-2): p. 64-9.
69. Billings, H.J., et al., *Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep*. Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 3836-46.
70. Navarro, V.M., et al., *Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(1): p. E202-10.
71. Ramaswamy, S., et al., *Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (Macaca mulatta) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4494-503.
72. Topaloglu, A.K., et al., *TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction*. Nat Genet, 2009. **41**(3): p. 354-8.
73. Yang, J.J., et al., *Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: closing the gap between mice and men*. Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1498-508.
74. Kalra, S.P., *Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: a model for preovulatory LH release*. Frontiers in neuroendocrinology 1986. **9**: p. 31-75.
75. Gearing, M. and E. Terasawa, *The alpha-1-adrenergic neuronal system is involved in the pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone in the ovariectomized female rhesus monkey*. Neuroendocrinology, 1991. **53**(4): p. 373-81.
76. Smith, M.J. and L. Jennes, *Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle*. Reproduction, 2001. **122**(1): p. 1-10.
77. Lee, A., et al., *Characterization of alpha 2A-adrenergic receptors in GT1 neurosecretory cells*. Neuroendocrinology, 1995. **62**(3): p. 215-25.
78. Gallo, R.V., A. Bona-Gallo, and D. O'Sullivan, *Adrenergic and noradrenergic regulation of pulsatile luteinizing hormone release*. J Neuroendocrinol, 1989. **1**(3): p. 157-62.
79. Wynick, D., et al., *Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12671-6.
80. Branchek, T.A., et al., *Galanin receptor subtypes*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(3): p. 109-17.
81. McDonald, J.K., M.D. Lumpkin, and L.V. DePaolo, *Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized rats: possible site of action*. Endocrinology, 1989. **125**(1): p. 186-91.
82. Khorram, O., K.Y. Pau, and H.G. Spies, *Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits*. Neuroendocrinology, 1987. **45**(4): p. 290-7.
83. Khorram, O., K.Y. Pau, and H.G. Spies, *Release of hypothalamic neuropeptide Y and effects of exogenous NPY on the release of hypothalamic GnRH and pituitary*

- gonadotropins in intact and ovariectomized does in vitro*. Peptides, 1988. **9**(2): p. 411-7.
84. Mitchell, V., et al., *Evidence for expression of galanin receptor Gal-R1 mRNA in certain gonadotropin releasing hormone neurones of the rostral preoptic area*. J Neuroendocrinol, 1999. **11**(10): p. 805-12.
85. Gundlach, A.L., *Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction?* Eur J Pharmacol, 2002. **440**(2-3): p. 255-68.
86. Aguan, K., et al., *Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase*. Neuroendocrinology, 1996. **64**(6): p. 449-55.
87. d'Anglemont de Tassigny, X., et al., *Coupling of neuronal nitric oxide synthase to NMDA receptors via postsynaptic density-95 depends on estrogen and contributes to the central control of adult female reproduction*. J Neurosci, 2007. **27**(23): p. 6103-14.
88. Kohsaka, A., et al., *A comparative study of the effects of nitric oxide and carbon monoxide on the in vivo release of gonadotropin-releasing hormone and neuropeptide Y from rat hypothalamus during the estradiol-induced luteinizing hormone surge: estimation by push-pull perfusion*. Neuroendocrinology, 1999. **69**(4): p. 245-53.
89. Moretto, M., F.J. Lopez, and A. Negro-Vilar, *Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion*. Endocrinology, 1993. **133**(5): p. 2399-402.
90. Mahachoklertwattana, P., et al., *Nitric oxide synthesized by gonadotropin-releasing hormone neurons is a mediator of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced GnRH secretion*. Endocrinology, 1994. **135**(4): p. 1709-12.
91. Decavel, C. and A.N. Van den Pol, *GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus*. J Comp Neurol, 1990. **302**(4): p. 1019-37.
92. Flugge, G., W. Wuttke, and E. Fuchs, *Postnatal development of transmitter systems: sexual differentiation of the GABAergic system and effects of muscimol*. Int J Dev Neurosci, 1986. **4**(4): p. 319-26.
93. Hales, T.G., M.J. Sanderson, and A.C. Charles, *GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1-7) neurons*. Neuroendocrinology, 1994. **59**(3): p. 297-308.
94. Kusano, K., et al., *Electrical and synaptic properties of embryonic luteinizing hormone-releasing hormone neurons in explant cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3918-22.
95. Han, S.K., I.M. Abraham, and A.E. Herbison, *Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse*. Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1459-66.
96. Martinez de la Escalera, G., A.L. Choi, and R.I. Weiner, *Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines*. Neuroendocrinology, 1994. **59**(5): p. 420-5.
97. Herbison, A.E. and S.M. Moenter, *Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus*. J Neuroendocrinol, 2011. **23**(7): p. 557-69.
98. Leadem, C.A. and S.V. Yagenova, *Effects of specific activation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat*. Neuroendocrinology, 1987. **45**(2): p. 109-17.
99. Gallo, R.V., *Kappa-opioid receptor involvement in the regulation of pulsatile luteinizing hormone release during early pregnancy in the rat*. J Neuroendocrinol, 1990. **2**(5): p. 685-91.
100. Kalra, S.P., *Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge*. Endocr Rev, 1993. **14**(5): p. 507-38.
101. Panerai, A.E., et al., *Mainly mu-opiate receptors are involved in luteinizing hormone and prolactin secretion*. Endocrinology, 1985. **117**(3): p. 1096-9.

102. Goodman, R.L., et al., *Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep*. *Endocrinology*, 2004. **145**(6): p. 2959-67.
103. Mitchell, V., et al., *Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat*. *Neuroreport*, 1997. **8**(14): p. 3167-72.
104. Sannella, M.I. and S.L. Petersen, *Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for mu, kappa, or delta opiate receptors*. *Endocrinology*, 1997. **138**(4): p. 1667-72.
105. Adrian, T.E., et al., *Neuropeptide Y distribution in human brain*. *Nature*, 1983. **306**(5943): p. 584-6.
106. Campbell, R.E., et al., *Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype*. *Neuroendocrinology*, 2001. **74**(2): p. 106-19.
107. Raposinho, P.D., et al., *Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y (NPY) in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype*. *Endocrinology*, 1999. **140**(9): p. 4046-55.
108. Kaynard, A.H., et al., *Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques*. *Endocrinology*, 1990. **127**(5): p. 2437-44.
109. Pierroz, D.D., et al., *Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats*. *Endocrinology*, 1996. **137**(1): p. 3-12.
110. McEwen, B., *Estrogen actions throughout the brain*. *Recent Prog Horm Res*, 2002. **57**: p. 357-84.
111. Mitra, S.W., et al., *Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha*. *Endocrinology*, 2003. **144**(5): p. 2055-67.
112. Smith, S.S., C. Aoki, and H. Shen, *Puberty, steroids and GABA(A) receptor plasticity*. *Psychoneuroendocrinology*, 2009. **34 Suppl 1**: p. S91-S103.
113. Adachi, S., et al., *Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats*. *J Reprod Dev*, 2007. **53**(2): p. 367-78.
114. Smith, J.T., et al., *Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse*. *Endocrinology*, 2005. **146**(7): p. 2976-84.
115. Christian, C.A., et al., *Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing*. *Endocrinology*, 2008. **149**(11): p. 5328-34.
116. Robertson, D.M., et al., *Isolation of inhibin from bovine follicular fluid*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985. **126**(1): p. 220-6.
117. Tilbrook, A.J., D.M. de Kretser, and I.J. Clarke, *Influence of the degree of stimulation of the pituitary by gonadotropin-releasing hormone on the action of inhibin and testosterone to suppress the secretion of the gonadotropins in rams*. *Biol Reprod*, 2001. **64**(2): p. 473-81.
118. Ling, N., et al., *Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin*. *Nature*, 1986. **321**(6072): p. 779-82.
119. Vale, W., et al., *Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid*. *Nature*, 1986. **321**(6072): p. 776-9.
120. Meunier, H., et al., *Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(1): p. 247-51.
121. Corrigan, A.Z., et al., *Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures*. *Endocrinology*, 1991. **128**(3): p. 1682-4.

122. Gospodarowicz, D. and K. Lau, *Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **165**(1): p. 292-8.
123. Nakamura, T., et al., *Activin-binding protein from rat ovary is follistatin*. *Science*, 1990. **247**(4944): p. 836-8.
124. Lee, J.H., et al., *KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. **88**(23): p. 1731-7.
125. Lee, D.K., et al., *Discovery of a receptor related to the galanin receptors*. *FEBS Lett*, 1999. **446**(1): p. 103-7.
126. Ohtaki, T., et al., *Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor*. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 613-7.
127. Muir, A.I., et al., *AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 28969-75.
128. Kotani, M., et al., *The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(37): p. 34631-6.
129. de Roux, N., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(19): p. 10972-6.
130. Seminara, S.B., et al., *The GPR54 gene as a regulator of puberty*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(17): p. 1614-27.
131. West, A., et al., *Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1)*. *Genomics*, 1998. **54**(1): p. 145-8.
132. Lapatto, R., et al., *Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice*. *Endocrinology*, 2007. **148**(10): p. 4927-36.
133. d'Anglemont de Tassigny, X. and W.H. Colledge, *The role of kisspeptin signaling in reproduction*. *Physiology (Bethesda)*, 2010. **25**(4): p. 207-17.
134. Bilban, M., et al., *Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1319-28.
135. Gutierrez-Pascual, E., et al., *In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides*. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(1): p. 58-67.
136. Oakley, A.E., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Kisspeptin signaling in the brain*. *Endocr Rev*, 2009. **30**(6): p. 713-43.
137. Clarkson, J., et al., *Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain*. *J Neuroendocrinol*, 2009. **21**(8): p. 673-82.
138. Smith, J.T., et al., *Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse*. *Endocrinology*, 2005. **146**(9): p. 3686-92.
139. Rometo, A.M., et al., *Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(7): p. 2744-50.
140. Wakabayashi, Y., et al., *Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat*. *J Neurosci*, 2010. **30**(8): p. 3124-32.
141. Lehman, M.N., L.M. Coolen, and R.L. Goodman, *Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion*. *Endocrinology*, 2010. **151**(8): p. 3479-89.
142. Kauffman, A.S., et al., *Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat*. *Endocrinology*, 2007. **148**(4): p. 1774-83.

143. Clarkson, J. and A.E. Herbison, *Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons*. *Endocrinology*, 2006. **147**(12): p. 5817-25.
144. Yeo, S.H. and A.E. Herbison, *Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain*. *Endocrinology*, 2011. **152**(6): p. 2387-99.
145. Richard, N., et al., *KISS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone*. *J Neuroendocrinol*, 2008. **20**(3): p. 381-93.
146. Herbison, A.E., et al., *Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons*. *Endocrinology*, 2010. **151**(1): p. 312-21.
147. Castellano, J.M., et al., *Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat*. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **257-258**: p. 75-83.
148. Thompson, E.L., et al., *Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis*. *J Neuroendocrinol*, 2004. **16**(10): p. 850-8.
149. Gottsch, M.L., et al., *A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse*. *Endocrinology*, 2004. **145**(9): p. 4073-7.
150. Matsui, H., et al., *Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **320**(2): p. 383-8.
151. Navarro, V.M., et al., *Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide*. *Endocrinology*, 2004. **145**(10): p. 4565-74.
152. Han, S.K., et al., *Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty*. *J Neurosci*, 2005. **25**(49): p. 11349-56.
153. Navarro, V.M., et al., *Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat*. *Endocrinology*, 2005. **146**(4): p. 1689-97.
154. Navarro, V.M., et al., *Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54*. *Endocrinology*, 2005. **146**(1): p. 156-63.
155. Dhillon, W.S., et al., *Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(10): p. 3958-66.
156. Plant, T.M., S. Ramaswamy, and M.J. Dipietro, *Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (Macaca mulatta) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges*. *Endocrinology*, 2006. **147**(2): p. 1007-13.
157. Irwig, M.S., et al., *Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat*. *Neuroendocrinology*, 2004. **80**(4): p. 264-72.
158. Patterson, M., et al., *Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinizing hormone and testosterone in male adult rats*. *J Neuroendocrinol*, 2006. **18**(5): p. 349-54.
159. McCann, S.M., et al., *Hypothalamic control of gonadotropin secretion*. *Prog Brain Res*, 2002. **141**: p. 151-64.
160. de Kretser, D.M., et al., *Inhibins, activins and follistatin in reproduction*. *Hum Reprod Update*, 2002. **8**(6): p. 529-41.

161. Seminara, S.B., et al., *Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (Macaca mulatta): a finding with therapeutic implications*. *Endocrinology*, 2006. **147**(5): p. 2122-6.
162. Roa, J., et al., *Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **294**(6): p. E1088-96.
163. Thompson, E.L., et al., *Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **291**(5): p. E1074-82.
164. Pielecka-Fortuna, J., Z. Chu, and S.M. Moenter, *Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol*. *Endocrinology*, 2008. **149**(4): p. 1979-86.
165. Novaira, H.J., et al., *Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines*. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **311**(1-2): p. 126-34.
166. Jacobi, J.S., et al., *17-Beta-estradiol directly regulates the expression of adrenergic receptors and kisspeptin/GPR54 system in GT1-7 GnRH neurons*. *Neuroendocrinology*, 2007. **86**(4): p. 260-9.
167. Li, X.F., et al., *Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8334.
168. Takase, K., et al., *Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats*. *J Neuroendocrinol*, 2009. **21**(6): p. 527-37.
169. Pinilla, L., et al., *Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(3): p. 1235-316.
170. Kim, W., et al., *Postmenopausal increase in KiSS-1, GPR54, and luteinizing hormone releasing hormone (LHRH-1) mRNA in the basal hypothalamus of female rhesus monkeys*. *Peptides*, 2009. **30**(1): p. 103-10.
171. Smith, J.T., et al., *KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season*. *Endocrinology*, 2007. **148**(3): p. 1150-7.
172. Tomikawa, J., et al., *Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KISS1 gene in the pig*. *Biol Reprod*, 2010. **82**(2): p. 313-9.
173. Burke, M.C., et al., *Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus*. *J Comp Neurol*, 2006. **498**(5): p. 712-26.
174. Mayer, C., et al., *Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(52): p. 22693-8.
175. Ojeda, S.R., et al., *Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?* *Endocrinology*, 2006. **147**(3): p. 1166-74.
176. Parent, A.S., et al., *The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(5): p. 668-93.
177. Ojeda, S.R., A. Lomniczi, and U.S. Sandau, *Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion*. *J Neuroendocrinol*, 2008. **20**(6): p. 732-42.
178. Funes, S., et al., *The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **312**(4): p. 1357-63.
179. Shahab, M., et al., *Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(6): p. 2129-34.

180. Clarkson, J., et al., *Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset*. *Endocrinology*, 2009. **150**(7): p. 3214-20.
181. Iijima, N., et al., *An immunohistochemical study on the expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly developed anti-kisspeptin antibody*. *J Mol Neurosci*, 2011. **43**(2): p. 146-54.
182. Takumi, K., N. Iijima, and H. Ozawa, *Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus*. *J Mol Neurosci*, 2011. **43**(2): p. 138-45.
183. Keen, K.L., et al., *An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo*. *Endocrinology*, 2008. **149**(8): p. 4151-7.
184. Navarro, V.M., et al., *Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54*. *J Physiol*, 2004. **561**(Pt 2): p. 379-86.
185. Pineda, R., et al., *Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist*. *Endocrinology*, 2010. **151**(2): p. 722-30.
186. Mayer, C. and U. Boehm, *Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling*. *Nat Neurosci*, 2011. **14**(6): p. 704-10.
187. Smith, J.T., et al., *Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge*. *J Neurosci*, 2006. **26**(25): p. 6687-94.
188. Roa, J., et al., *Opposite roles of estrogen receptor (ER)-alpha and ERbeta in the modulation of luteinizing hormone responses to kisspeptin in the female rat: implications for the generation of the preovulatory surge*. *Endocrinology*, 2008. **149**(4): p. 1627-37.
189. Colledge, W.H., *Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology*. *Peptides*, 2009. **30**(1): p. 34-41.
190. Dungan, H.M., et al., *The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone*. *J Neurosci*, 2007. **27**(44): p. 12088-95.
191. d'Anglemont de Tassigny, X., et al., *Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(25): p. 10714-9.
192. Chan, Y.M., et al., *Kisspeptin/Gpr54-independent gonadotrophin-releasing hormone activity in Kiss1 and Gpr54 mutant mice*. *J Neuroendocrinol*, 2009. **21**(12): p. 1015-23.
193. Tsutsui, K., *A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance*. *Prog Neurobiol*, 2009. **88**(1): p. 76-88.
194. Price, D.A. and M.J. Greenberg, *Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide*. *Science*, 1977. **197**(4304): p. 670-1.
195. Raffa, R.B., *The action of FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) and related peptides on mammals*. *Peptides*, 1988. **9**(4): p. 915-22.
196. Rastogi, R.K., et al., *FMRFamide in the amphibian brain: a comprehensive survey*. *Microsc Res Tech*, 2001. **54**(3): p. 158-72.
197. Yang, H.Y., et al., *Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(22): p. 7757-61.
198. Bonnard, E., et al., *Identification of neuropeptide FF-related peptides in rodent spinal cord*. *Peptides*, 2001. **22**(7): p. 1085-92.
199. Burlet-Schiltz, O., et al., *Identification of neuropeptide FF-related peptides in human cerebrospinal fluid by mass spectrometry*. *FEBS Lett*, 2002. **532**(3): p. 313-8.
200. Hinuma, S., et al., *New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(10): p. 703-8.

201. Ukena, K., et al., *A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 255-8.
202. Tsutsui, K., et al., *A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(2): p. 661-7.
203. Satake, H., et al., *Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 2): p. 379-85.
204. Kriegsfeld, L.J., et al., *Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2410-5.
205. Osugi, T., et al., *Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments*. J Endocrinol, 2004. **182**(1): p. 33-42.
206. Fukusumi, S., R. Fujii, and S. Hinuma, *Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP*. Peptides, 2006. **27**(5): p. 1073-86.
207. Ukena, K. and K. Tsutsui, *Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system*. Neurosci Lett, 2001. **300**(3): p. 153-6.
208. Rizwan, M.Z., et al., *Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat*. Endocrinology, 2009. **150**(3): p. 1413-20.
209. Clarke, I.J., et al., *Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion*. Endocrinology, 2008. **149**(11): p. 5811-21.
210. Dardente, H., et al., *RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(11): p. 1252-9.
211. Smith, J.T., et al., *Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep*. Endocrinology, 2008. **149**(11): p. 5770-82.
212. Ubuka, T., et al., *Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8400.
213. Ubuka, T., et al., *The control of reproductive physiology and behavior by gonadotropin-inhibitory hormone*. Integr Comp Biol, 2008. **48**(5): p. 560-9.
214. Ukena, K., T. Ubuka, and K. Tsutsui, *Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain*. Cell Tissue Res, 2003. **312**(1): p. 73-9.
215. Ubuka, T., et al., *Developmental changes in gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*) hypothalamo-hypophysial system*. J Endocrinol, 2003. **178**(2): p. 311-8.
216. Johnson, M.A., K. Tsutsui, and G.S. Fraley, *Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat*. Horm Behav, 2007. **51**(1): p. 171-80.
217. Murakami, M., et al., *Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats*. J Endocrinol, 2008. **199**(1): p. 105-12.
218. Ubuka, T., et al., *Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain*. J Comp Neurol, 2009. **517**(6): p. 841-55.

219. Zhao, S., et al., *RFamide-related peptide and messenger ribonucleic acid expression in mammalian testis: association with the spermatogenic cycle*. *Endocrinology*, 2010. **151**(2): p. 617-27.
220. McGuire, N.L. and G.E. Bentley, *Neuropeptides in the gonads: from evolution to pharmacology*. *Front Pharmacol*, 2010. **1**: p. 114.
221. Ubuka, T., et al., *Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(8): p. 3052-7.
222. Cockrem, J.F. and B.K. Follett, *Circadian rhythm of melatonin in the pineal gland of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)*. *J Endocrinol*, 1985. **107**(3): p. 317-24.
223. Molnar, C.S., et al., *Estradiol down-regulates RF-amide-related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus*. *Endocrinology*, 2011. **152**(4): p. 1684-90.
224. Revel, F.G., et al., *RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene*. *Endocrinology*, 2008. **149**(3): p. 902-12.
225. Gingerich, S., et al., *The generation of an array of clonal, immortalized cell models from the rat hypothalamus: analysis of melatonin effects on kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone neurons*. *Neuroscience*, 2009. **162**(4): p. 1134-40.
226. Ubuka, T., et al., *Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone*. *Endocrinology*, 2012. **153**(1): p. 373-85.
227. Kirby, E.D., et al., *Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(27): p. 11324-9.
228. Bonini, J.A., et al., *Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(50): p. 39324-31.
229. Yoshida, H., et al., *Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1593**(2-3): p. 151-7.
230. Liu, Q., et al., *Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(40): p. 36961-9.
231. Ikemoto, T. and M.K. Park, *Chicken RFamide-related peptide (GnIH) and two distinct receptor subtypes: identification, molecular characterization, and evolutionary considerations*. *J Reprod Dev*, 2005. **51**(3): p. 359-77.
232. Yin, H., et al., *A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity*. *J Endocrinol*, 2005. **184**(1): p. 257-66.
233. Smith, J.T., et al., *Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence*. *Endocrinology*, 2011. **152**(3): p. 1001-12.
234. Gibson, E.M., et al., *Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge*. *Endocrinology*, 2008. **149**(10): p. 4958-69.
235. Paul, M.J., et al., *Photic and nonphotic seasonal cues differentially engage hypothalamic kisspeptin and RFamide-related peptide mRNA expression in Siberian hamsters*. *J Neuroendocrinol*, 2009. **21**(12): p. 1007-14.
236. Calisi, R.M., N.O. Rizzo, and G.E. Bentley, *Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer domesticus*)*. *Gen Comp Endocrinol*, 2008. **157**(3): p. 283-7.
237. Johnson, M.A. and G.S. Fraley, *Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect KiSS-1 gene expression or the onset of puberty in male rats*. *Neuroendocrinology*, 2008. **88**(4): p. 305-15.
238. Quennell, J.H., et al., *Developmental and steroidogenic effects on the gene expression of RFamide related peptides and their receptor in the rat brain and pituitary gland*. *J Neuroendocrinol*, 2010. **22**(4): p. 309-16.

239. Pineda, R., et al., *Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **299**(1): p. E39-46.
240. Anderson, G.M., et al., *Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats*. *Endocrinology*, 2009. **150**(4): p. 1834-40.
241. Ducret, E., G.M. Anderson, and A.E. Herbison, *RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse*. *Endocrinology*, 2009. **150**(6): p. 2799-804.
242. Sari, I.P., et al., *Effect of RF-Amide-Related Peptide-3 on Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Synthesis and Secretion in Ovine Pituitary Gonadotropes*. *Endocrinology*, 2009.
243. Kadokawa, H., et al., *Bovine C-terminal octapeptide of RFamide-related peptide-3 suppresses luteinizing hormone (LH) secretion from the pituitary as well as pulsatile LH secretion in bovines*. *Domest Anim Endocrinol*, 2009. **36**(4): p. 219-24.
244. Oishi, H., et al., *The human gonadotropin-inhibitory hormone ortholog RFamide-related peptide-3 suppresses gonadotropin-induced progesterone production in human granulosa cells*. *Endocrinology*, 2012. **153**(7): p. 3435-45.
245. Frisch, R.E., *Menarche and Fatness: Reexamination of the Critical Body Composition Hypothesis*. *Science*, 1978. **200**(4349): p. 1509-1513.
246. Frisch, R.E. and J.W. McArthur, *Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset*. *Science*, 1974. **185**(4155): p. 949-51.
247. Kennedy, G.C. and J. Mitra, *Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat*. *J Physiol*, 1963. **166**: p. 408-18.
248. Sexton, W.J. and J.P. Jarow, *Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function*. *Urology*, 1997. **49**(4): p. 508-13.
249. Bray, G.A., *Obesity and reproduction*. *Hum Reprod*, 1997. **12 Suppl 1**: p. 26-32.
250. Chehab, F.F., M.E. Lim, and R. Lu, *Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin*. *Nat Genet*, 1996. **12**(3): p. 318-20.
251. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
252. Coleman, D.L., *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice*. *Diabetologia*, 1978. **14**(3): p. 141-8.
253. Casanueva, F.F. and C. Dieguez, *Neuroendocrine regulation and actions of leptin*. *Front Neuroendocrinol*, 1999. **20**(4): p. 317-63.
254. Chehab, F.F., et al., *Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin*. *Science*, 1997. **275**(5296): p. 88-90.
255. Zeinoaldini, S., J.J. Swarts, and B.J. Van de Heijning, *Chronic leptin infusion advances, and immunoneutralization of leptin postpones puberty onset in normally fed and feed restricted female rats*. *Peptides*, 2006. **27**(7): p. 1652-8.
256. Stephens, T.W., et al., *The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product*. *Nature*, 1995. **377**(6549): p. 530-2.
257. Schwartz, M.W., et al., *Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(5): p. 1101-6.
258. Sahu, A., *Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat*. *Endocrinology*, 1998. **139**(11): p. 4739-42.

259. Sahu, A., *Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus.* Endocrinology, 1998. **139**(2): p. 795-8.
260. Leranath, C., et al., *Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro-opiomelanocortin-immunoreactive axons and LH-RH neurons in the preoptic area of the rat.* Brain Res, 1988. **449**(1-2): p. 167-76.
261. Jureus, A., et al., *Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat.* Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2703-6.
262. Smith, J.T., et al., *KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse.* J Neuroendocrinol, 2006. **18**(4): p. 298-303.
263. Backholer, K., et al., *Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells.* Endocrinology, 2010. **151**(5): p. 2233-43.
264. van Houten, M., et al., *Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus.* Science, 1980. **207**(4435): p. 1081-3.
265. Olson, B.R., et al., *Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic GTI-7 cell line.* Neuroendocrinology, 1995. **62**(2): p. 155-65.
266. Bruning, J.C., et al., *Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction.* Science, 2000. **289**(5487): p. 2122-5.
267. Crown, A., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction.* Neuroendocrinology, 2007. **86**(3): p. 175-82.
268. Howard, A.D., et al., *A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release.* Science, 1996. **273**(5277): p. 974-7.
269. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.* Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
270. Kojima, M., et al., *Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor.* Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(3): p. 118-22.
271. Fernandez-Fernandez, R., et al., *Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies.* Neuroendocrinology, 2005. **82**(5-6): p. 245-55.
272. Tena-Sempere, M., et al., *Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis.* Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 717-25.
273. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents.* Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
274. Shuto, Y., et al., *Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity.* J Clin Invest, 2002. **109**(11): p. 1429-36.
275. Martini, A.C., et al., *Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats.* Endocrinology, 2006. **147**(5): p. 2374-82.
276. Fernandez-Fernandez, R., et al., *Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat.* Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 3018-25.
277. Ekblad, E. and F. Sundler, *Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY.* Peptides, 2002. **23**(2): p. 251-61.
278. Grandt, D., et al., *Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36.* Regul Pept, 1994. **51**(2): p. 151-9.
279. Pinilla, L., et al., *Stimulatory effect of PYY-(3-36) on gonadotropin secretion is potentiated in fasted rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(6): p. E1162-71.
280. Brown, R.E., et al., *KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake.* Mol Cell Endocrinol, 2008. **281**(1-2): p. 64-72.

281. Luque, R.M., R.D. Kineman, and M. Tena-Sempere, *Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line*. *Endocrinology*, 2007. **148**(10): p. 4601-11.
282. Castellano, J.M., et al., *Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition*. *Endocrinology*, 2005. **146**(9): p. 3917-25.
283. Castellano, J.M., et al., *Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system*. *Endocrinology*, 2011. **152**(9): p. 3396-408.
284. Donato, J., Jr., et al., *Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(1): p. 355-68.
285. Fu, L.Y. and A.N. van den Pol, *Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism*. *J Neurosci*, 2010. **30**(30): p. 10205-19.
286. Jacobi, J.S., et al., *Paradoxical effect of gonadotropin-inhibiting hormone (GnIH) to negatively regulate neuropeptide Y neurons in mouse arcuate nucleus*. *J Neuroendocrinol*, 2013.
287. Stengel, A., et al., *Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice*. *Neuroreport*, 2011. **22**(5): p. 253-7.
288. Tachibana, T., et al., *Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks*. *Brain Res*, 2005. **1050**(1-2): p. 94-100.
289. Clarke, I.J., et al., *Gonadotropin-inhibitory hormone is a hypothalamic peptide that provides a molecular switch between reproduction and feeding*. *Neuroendocrinology*, 2012. **95**(4): p. 305-16.
290. Qi, Y., B.J. Oldfield, and I.J. Clarke, *Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction*. *J Neuroendocrinol*, 2009. **21**(8): p. 690-7.
291. Sakurai, T., et al., *Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior*. *Cell*, 1998. **92**(5): p. 1 page following 696.
292. Porkka-Heiskanen, T., et al., *Orexin A and B levels in the hypothalamus of female rats: the effects of the estrous cycle and age*. *Eur J Endocrinol*, 2004. **150**(5): p. 737-42.
293. Pu, S., et al., *Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner*. *Regul Pept*, 1998. **78**(1-3): p. 133-6.
294. Furuta, M., T. Funabashi, and F. Kimura, *Suppressive action of orexin A on pulsatile luteinizing hormone secretion is potentiated by a low dose of estrogen in ovariectomized rats*. *Neuroendocrinology*, 2002. **75**(3): p. 151-7.
295. Tamura, T., et al., *Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **264**(3): p. 759-62.
296. Kohsaka, A., et al., *A significant participation of orexin-A, a potent orexigenic peptide, in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat*. *Brain Res*, 2001. **898**(1): p. 166-70.
297. Kirilov, M., et al., *Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2492.
298. Tena-Sempere, M., et al., *Molecular mechanisms of reappearance of luteinizing hormone receptor expression and function in rat testis after selective Leydig cell destruction by ethylene dimethane sulfonate*. *Endocrinology*, 1997. **138**(8): p. 3340-8.

299. Barreiro, M.L., et al., *Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis*. Biol Reprod, 2002. **67**(6): p. 1768-76.
300. Wintermantel, T.M., et al., *Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility*. Neuron, 2006. **52**(2): p. 271-80.
301. Elias, C.F. and D. Purohit, *Leptin signaling and circuits in puberty and fertility*. Cell Mol Life Sci, 2012. **70**: p. 841-862.
302. Kriegsfeld, L.J., *Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel*. Horm Behav, 2006. **50**(5): p. 655-66.
303. Sun, Y., et al., *Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice*. Cell Metab, 2006. **3**(5): p. 379-86.
304. Poling, M.C., et al., *Development, sex steroid regulation, and phenotypic characterization of RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus*. Endocrinology, 2012. **153**(4): p. 1827-40.
305. Navarro, V.M. and M. Tena-Sempere, *Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(1): p. 40-53.
306. Christian, C.A. and S.M. Moenter, *The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges*. Endocr Rev, 2010. **31**(4): p. 544-77.
307. Sari, I.P., et al., *Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5549-56.
308. Poling, M.C., et al., *Kisspeptin Neurons do not Directly Signal to RFRP-3 Neurons but RFRP-3 may Directly Modulate a Subset of Hypothalamic Kisspeptin Cells in Mice*. J Neuroendocrinol, 2013. **25**(10): p. 876-86.
309. Klingerman, C.M., et al., *Food Restriction-Induced Changes in Gonadotropin-Inhibiting Hormone Cells are Associated with Changes in Sexual Motivation and Food Hoarding, but not Sexual Performance and Food Intake*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 101.
310. Nakazato, M., et al., *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 194-8.
311. Asakawa, A., et al., *Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice*. Gut, 2003. **52**(7): p. 947-52.
312. Kiso, M., et al., *Abnormal structural luteolysis in ovaries of the senescence accelerated mouse (SAM): expression of Fas ligand/Fas-mediated apoptosis signaling molecules in luteal cells*. J Reprod Dev, 2003. **49**(6): p. 457-63.
313. Garcia-Galiano, D., et al., *Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice*. Endocrinology, 2012. **153**(1): p. 316-28.
314. Aguilar, E., M. Tena-Sempere, and L. Pinilla, *Role of excitatory amino acids in the control of growth hormone secretion*. Endocrine, 2005. **28**(3): p. 295-302.
315. Chu, Z. and S.M. Moenter, *Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors modulates GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons and alters their firing rate: a possible local feedback circuit*. J Neurosci, 2005. **25**(24): p. 5740-9.
316. Kawakami, S.I., et al., *Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: a dual immunoelectron microscopic study*. Endocrinology, 1998. **139**(3): p. 1458-61.
317. Miller, B.H. and A.C. Gore, *N-Methyl-D-aspartate receptor subunit expression in GnRH neurons changes during reproductive senescence in the female rat*. Endocrinology, 2002. **143**(9): p. 3568-74.
318. Eyigor, O. and L. Jennes, *Identification of glutamate receptor subtype mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons in rat brain*. Endocrine, 1996. **4**(2): p. 133-9.

319. d'Anglemont de Tassigny, X., et al., *Kisspeptin signaling is required for peripheral but not central stimulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by NMDA*. J Neurosci, 2010. **30**(25): p. 8581-90.
320. Moenter, S.M., *Identified GnRH neuron electrophysiology: a decade of study*. Brain Res, 2010. **1364**: p. 10-24.
321. Pielecka-Fortuna, J. and S.M. Moenter, *Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner*. Endocrinology, 2010. **151**(1): p. 291-300.
322. Cravo, R.M., et al., *Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models*. Neuroscience, 2011. **173**: p. 37-56.
323. Zhang, C., et al., *Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling*. Endocrinology, 2009. **150**(5): p. 2388-94.
324. Navarro, V.M. and M. Tena-Sempere, *Kisspeptins and the neuroendocrine control of reproduction*. Front Biosci (Schol Ed), 2011. **3**: p. 267-75.
325. Navarro, V.M., et al., *Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse*. Endocrinology, 2011. **152**(11): p. 4265-75.
326. de Croft, S., U. Boehm, and A.E. Herbison, *Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse*. Endocrinology, 2013. **154**(8): p. 2750-60.
327. Castellano, J.M., et al., *Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2602-10.
328. Castellano, J.M., et al., *Alterations in hypothalamic KiSS-1 system in experimental diabetes: early changes and functional consequences*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 784-94.
329. Forbes, S., et al., *Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat*. Neurosci Lett, 2009. **460**(2): p. 143-7.
330. Lauzurica, N., et al., *Changes in NPY and POMC, but not serotonin transporter, following a restricted feeding/repletion protocol in rats*. Brain Res, 2010. **1313**: p. 103-12.