



Análisis del posible efecto de las Ceramidas en el control del eje neuroendocrino de la reproducción en ratas hembra

Trabajo Fin de Máster de Investigación Biomédica Traslacional

Autor: Inmaculada Velasco Aguayo

Directores:

Manuel Tena- Sempere

Leonor Pinilla Jurado

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. <i>Constituyentes del eje HHG y relaciones entre los mismos</i>	5
2.2. <i>Desarrollo morfofuncional del eje HHG</i>	7
2.3. <i>Control del eje HHG</i>	9
2.4. <i>Puesta en marcha de la función reproductora: Pubertad</i>	15
2.5. <i>Relación entre la adquisición de la capacidad reproductora y las reservas energéticas del organismo</i>	17
2.6. <i>Nuevas señales en el control del eje HHG: Ceramidas</i>	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. <i>Animales de experimentación</i>	22
3.2. <i>Drogas</i>	22
3.3. <i>Diseños experimentales</i>	23
3.4. <i>Medidas hormonales</i>	24
3.5. <i>Presentación de los resultados y análisis estadístico</i>	25
4. RESULTADOS.....	25
4.1. <i>Efecto agudo sobre la liberación de gonadotropinas de la activación o la inhibición de la síntesis de ceramidas (Experimento 1)</i>	25
4.2. <i>Efecto de las ceramidas sobre la liberación hipotalámica de GnRH (Experimento 2)</i>	26
4.3. <i>Efecto de las ceramidas sobre la liberación hipofisaria de LH (Experimento 3)</i>	27
4.4. <i>Efecto de las ceramidas sobre la llegada de la pubertad en hembras normonutridas (Experimento 4)</i>	28
4.5. <i>Efecto de las ceramidas sobre la llegada de la pubertad en hembras subnutridas (Experimento 5)</i>	30
5. DISCUSIÓN	33
6. CONCLUSIÓN	36
7. BIBLIOGRAFÍA	37

1. RESUMEN

La reproducción es una función imprescindible para la supervivencia de las especies. Dada su importancia, los organismos se han dotado de numerosos sistemas de control que aseguran que esta se lleve a cabo. En mamíferos, la función reproductora requiere del correcto funcionamiento del denominado eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG) o eje neuroendocrino de la reproducción. En este eje es clave el funcionamiento de las denominadas neuronas GnRH, cuya actividad depende de numerosas señales que se originan tanto dentro como fuera del sistema nervioso central. Entre estas señales destacan aquellas que señalizan el estado metabólico del organismo y que adecuan la función reproductora al grado de reservas energéticas. Dado que señales como la leptina, la ghrelina y las kisspeptinas están implicadas en el control metabólico de la puesta en marcha de la función reproductora durante la pubertad y que, datos recientes indican que las ceramidas median, en parte, los efectos de la leptina y la ghrelina, el **OBJETIVO GENERAL** de este TFM ha sido iniciar el análisis del posible papel de las ceramidas en la llegada de la pubertad en hembras y su mediación en el efecto de las kisspeptinas y la leptina en la puesta en marcha de este fenómeno. Para ello se analizó, en ratas hembra, el efecto agudo de la activación o la inhibición de la síntesis de ceramidas sobre la liberación de GnRH y gonadotropinas y el efecto crónico de la activación o la inhibición de la síntesis de ceramidas sobre la llegada de la pubertad en ratas normonutridas y subnutridas. Adicionalmente, se analizó, en ratas subnutridas, el efecto de kisspeptinas y leptina sobre la llegada de la pubertad en presencia y en ausencia de señalización por ceramidas. Nuestros **RESULTADOS** indican que: 1) las ceramidas modifican directamente la liberación hipofisaria de LH, 2) la activación de la señalización por ceramidas adelanta la llegada de la pubertad y su inhibición la retrasa y 3) las ceramidas median, al menos en parte, la acción de las kisspeptinas sobre la llegada de la pubertad. En **CONCLUSIÓN**, los datos de este TFM ponen por primera vez de manifiesto que las ceramidas están implicadas en la puesta en marcha de la función reproductora, entre otros mecanismos, por mediar los efectos de las kisspeptinas.

2. INTRODUCCIÓN

La reproducción es una función imprescindible para la supervivencia de las especies que depende del correcto funcionamiento de un sistema complejo denominado eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal (HHG) o eje neuroendocrino de la reproducción (*Figura 1*). El objetivo final de este eje es asegurar la producción de gametos (gametogénesis) y de hormonas (hormonogénesis) por las gónadas.

2.1. Constituyentes del eje HHG y relaciones entre los mismos

El eje HHG se organiza en torno a tres constituyentes principales: las neuronas GnRH hipotalámicas, que sintetizan la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); las células gonadotropas hipofisarias, que sintetizan y liberan hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) o gonadotropinas; y las gónadas, testículos en el caso de los machos y ovarios en el caso de las hembras.

En mamíferos y otras especies, en las gónadas se encuentran diferentes tipos celulares. En concreto, en los testículos los diferentes tipos celulares se localizan en el interior de los túbulos seminíferos (células de Sertoli y células germinales) o fuera de ellos (células de Leydig) y en los ovarios, los diferentes tipos celulares se encuentran formando parte del cuerpo lúteo (células lúteas), de los folículos (células de la granulosa, de la teca y células germinales) o fuera de ellos (células intersticiales).

A nivel de sistema nervioso central (SNC), GnRH es sintetizado por un número reducido de neuronas que se localizan en el hipotálamo y, dentro de este, el mayor número de las mismas tiene el soma en el área preóptica, proyectando sus terminales axónicos hacia una red de capilares localizada en la eminencia media que recibe el nombre de sistema portal. La importancia de estas neuronas radica en que constituyen la vía final común a través de la cual numerosas redes neuronales participan en el control nervioso de la función reproductora, lo que hace que las neuronas GnRH constituyan el elemento jerárquico clave del eje HHG (1).

La hormona mediadora de la actividad de las neuronas GnRH es un decapeptido procedente del fragmento N-terminal de una prohormona de 69 aminoácidos denominada proGnRH. En el decapeptido, los tres primeros aminoácidos (aa) de la molécula son claves para que la hormona desarrolle su actividad biológica, mientras que el extremo C-terminal interviene en la unión de la hormona a su receptor específico, siendo el aminoácido en posición 6 clave en la metabolización de la molécula.

Una vez sintetizado, el GnRH es liberado a la circulación portal desde donde llega a la adenohipófisis, encontrando su receptor específico (GnRH-R) en las células gonadotropas. El GnRH es un receptor de membrana acoplado a proteínas G que utiliza el incremento intracelular de Ca^{2+} como segundo mensajero en la cascada de señalización intracelular. La interacción de GnRH con su receptor en los gonadotropos estimula en ellos, tanto la síntesis de LH y FSH como la liberación de ambas gonadotropinas a la circulación general.

Tras su llegada a las gónadas, LH y FSH interaccionan con sus receptores específicos denominados LH-R y FSH-R, respectivamente, propiciando tanto la correcta producción de gametos maduros a partir de la pubertad (gametogénesis), como la síntesis de esteroides y otras hormonas gonadales (hormonogénesis). Ambos son receptores de membrana acoplados a proteínas G y utilizan el incremento intracelular de AMPc como segundo mensajero de la cascada de señalización intracelular.

En los ovarios, el LH-R se encuentra en las células intersticiales, en las células de la teca y en las células lúteas y su activación por la LH estimula la síntesis de andrógenos (androstenediona) y progestágenos (progesterona) a partir del colesterol. El FSH-R se localiza en las células de la granulosa donde, tras su activación por la FSH, estimula la aromatización de los andrógenos a estrógenos (17β estradiol) y la síntesis de hormonas de naturaleza proteica (inhibinas, activinas y folistatina).

En los testículos, el LH-R se encuentra en las células de Leydig y su activación por la LH estimula la síntesis de andrógenos (testosterona) a partir del colesterol. El FSH-R se localiza en las células de Sertoli donde, tras su activación por la FSH, estimula la síntesis de hormonas de naturaleza proteica (inhibinas y activinas) y de proteínas, como la proteína que liga andrógenos, que es la que permite que parte de la testosterona sintetizada en el testículo permanezca en este para estimular la formación de espermatozoides tras la pubertad.

Una vez sintetizados, los esteroides gonadales (Progesterona, 17β estradiol y Testosterona) intervienen en el control de su propia síntesis, mediante circuitos de retroalimentación negativa y positiva, modificando la liberación de GnRH y gonadotropinas (**Figura 1**).

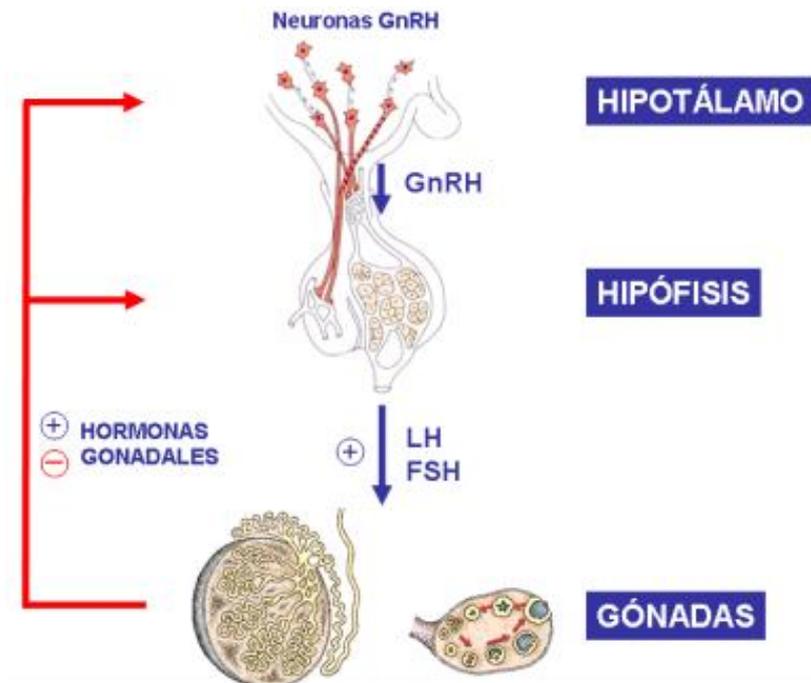


Figura 1: Representación esquemática del eje HHG

2.2. Desarrollo morfofuncional del eje HHG

En mamíferos y en otras especies, el completo desarrollo del eje HHG requiere de la aparición secuencial de toda una serie de eventos que se inician durante el periodo intrauterino y culminan, en la pubertad, con la adquisición de la capacidad reproductora. A continuación se comentan brevemente los principales acontecimientos relacionados con el desarrollo del eje HHG que tienen lugar en la especie humana en diferentes momentos a lo largo del desarrollo (2).

Periodo embrionario: Durante los 3 primeros meses de desarrollo intrauterino tiene lugar la aparición de las neuronas GnRH en la placoda olfativa y su migración hacia el área preóptica del hipotálamo, la aparición de los gonadotropos en el lóbulo anterior de la hipófisis y la diferenciación sexual, en sentido masculino o femenino, de los precursores indiferenciados de las gónadas y los genitales internos y externos.

Periodo fetal: Durante este periodo se establecen las conexiones anatómicas y funcionales entre los elementos del eje HHG y, por tanto, la capacidad de GnRH de estimular la síntesis y liberación de gonadotropinas y de estas de estimular potentemente la síntesis de hormonas gonadales (hormonogénesis). A su vez, durante este periodo, las hormonas gonadales establecen los mecanismos de retroalimentación negativa que les

permiten controlar la liberación de GnRH y gonadotropinas y, por otra parte, los esteroides gonadales diferencian sexualmente, en sentido masculino o femenino, al SNC. Adicionalmente, tiene lugar la diferenciación sexual de una agrupación de neuronas kisspeptidérgicas en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) del hipotálamo que establecerá, tras la llegada de la pubertad, un patrón pulsátil de liberación de GnRH/gonadotropinas que permitirá ser fértil a los machos de forma tónica y a las hembras solo de forma cíclica.

Periodo neonatal: Durante el primer año que sigue al nacimiento, se produce la pérdida de la retroalimentación negativa que ejercían los estrógenos y la progesterona de origen placentario sobre GnRH/gonadotropinas, dando lugar a un incremento de la síntesis y liberación de estas hormonas y, por tanto, a un incremento de la producción de hormonas gonadales.

Periodo infantil y juvenil: Entre los 2 y los 5-7 años, la actividad del eje HHG permanece muy disminuida por el efecto combinado del incremento de señales inhibitoras procedentes del SNC, que reducen drásticamente la liberación de GnRH y la disminución de la sensibilidad de las células gonadotropas hipofisarias a esta hormona. A ambos efectos se une posteriormente un incremento de la sensibilidad del eje HHG al efecto de retroalimentación negativa de los esteroides gonadales sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas y como resultado, se produce una reducción, hasta niveles prácticamente indetectables, de los niveles circulantes de hormonas gonadales que se mantiene hasta los 10-12 años de edad.

Periodo prepuberal: Hacia los 10 años de edad en las niñas y 11-12 años en los niños, se producen una serie de cambios que anteceden a la activación del eje HHG. Entre estos cambios destaca el incremento de la actividad de la adenohipófisis, lo que se traduce en un aumento de la liberación de hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), hormona estimulante de tiroides (TSH), y hormona estimulante de la corteza adrenal (ACTH). Como consecuencia de estos cambios hormonales se producen, entre otros eventos, el incremento de la tasa de crecimiento corporal, el incremento del tamaño de las mamas en las niñas y la aparición de vello axilar y púbico en ambos sexos. Adicionalmente, durante este periodo se produce la activación progresiva de la actividad del eje HHG como consecuencia de la disminución progresiva de carga inhibitora sobre las neuronas GnRH y la pérdida paulatina de sensibilidad de GnRH y gonadotropinas al efecto inhibitor de los esteroides gonadales.

Pubertad: Durante este periodo se produce la completa activación del eje HHG, y como consecuencia, el individuo adquiere la capacidad de reproducirse. Durante la pubertad también tiene lugar la aparición de los caracteres sexuales secundarios, que refuerzan las diferenciaciones sexuales que ocurren antes del nacimiento.

2.3. Control del eje HHG

El eje neuroendocrino de la reproducción está sometido a sofisticados y redundantes sistemas de control que aseguran su correcto funcionamiento, ya que del mismo depende la puesta en marcha y el mantenimiento de la función reproductora y, con ello, la supervivencia de las especies. A continuación se describirán las principales señales procedentes del SNC (reguladores centrales) o de fuera del mismo (reguladores periféricos) que participan en el control del eje HHG.

Reguladores centrales:

El SNC participa, a través de numerosas redes neuronales, en el control neuroendocrino de la reproducción. En líneas generales, el control que ejercen los neurotransmisores sobre el funcionamiento del eje HHG puede ser directo sobre los gonadotropos hipofisarios o mediado por la modificación de la actividad de las neuronas GnRH.

Señales excitatorias

- Kisspeptinas: Las kisspeptinas son un conjunto de proteínas derivadas de la expresión del gen KISS-1. A través de su interacción con su receptor específico, el GPR54, juegan un papel esencial en la regulación del desarrollo puberal y la reproducción, ya que son las principales estimuladoras directas de la liberación de GnRH y, por tanto, de la liberación de gonadotropinas.

Las kisspeptinas y su receptor se encuentran ampliamente distribuidos por el SNC, pero son solo las neuronas kisspeptidérgicas del hipotálamo las que están directamente implicadas en el control de la función reproductora. En el hipotálamo, estas neuronas se localizan a nivel del núcleo arcuato (ARC) y del núcleo AVPV. Cabe destacar que los niveles de expresión de KiSS-1 en el núcleo ARC son bastante similares en ambos sexos, mientras que en el núcleo AVPV los niveles de KiSS-1 son muy superiores en hembras. Esto se debe a la regulación diferencial que ejercen los esteroides gonadales sobre ambos

núcleos, ya que inhiben la expresión de kisspeptinas en el núcleo ARC y la estimulan en el AVPV. Dado que las neuronas kisspeptidérgicas expresan receptores a estrógenos y andrógenos y sus niveles de expresión están regulados por estos, las neuronas kisspeptidérgicas del núcleo ARC se consideran las mediadoras de la retroalimentación negativa que ejercen los esteroides gonadales sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas y las del núcleo AVPV como mediadoras de la retroalimentación positiva que, de forma exclusiva en las hembras, ejercen los estrógenos sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas y que es responsable del pico preovulatorio de LH y, por ello, de la ovulación (3)(4).

- Aminoácidos excitatorios (EEAA): Los EEAA son los neurotransmisores excitadores más abundantes del SNC. De estos, el glutamato o ácido L- glutámico es el más importante y ejerce sus acciones tras interactuar con dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. A su vez, existen tres clases de receptores ionotrópicos para este neurotransmisor, que se denominan: receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor de Kaniato (KA) y receptor de 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y varios subtipos de receptores metabotrópicos. En conjunto, los ensayos inmunohistoquímicos, moleculares y fisiológicos indican que las neuronas GnRH tienen la capacidad de responder directamente a la estimulación glutamatérgica, ya que presentan tanto receptores ionotrópicos como metabotrópicos. Durante la progresión puberal, la expresión de los receptores de glutamato en el hipotálamo en general y en las neuronas GnRH en particular, se incrementan y, por tanto, la capacidad del glutamato para aumentar la síntesis de GnRH (5).

- Neuroquinina B (NKB): La NKB es un péptido, codificado por el gen *TAC3* en primates superiores y *Tac2* en roedores, perteneciente a la familia de las taquiquininas. Esta familia incluye a: la sustancia P (SP), las neuroquininas A y B, las endoquininas y las hemoquininas. En su conjunto, las taquiquininas son péptidos de 10-11 aa que comparten una secuencia carboxi-terminal (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂) común, donde X corresponde a un grupo alifático (NKA y NKB) o a un residuo aromático (SP). Las taquiquininas ejercen sus efectos a través de su unión a receptores de membrana acoplados a proteínas G. En concreto, para la NKB se han descrito 3 receptores denominados NK1R, NK2R y NK3R.

La NKB muestra una distribución dispersa en el cerebro habiéndose encontrado que, en el hipotálamo, las neuronas que contienen NKB forman una densa red dentro del

núcleo ARC y la eminencia media. En este núcleo se ha descrito recientemente una población neuronal que coexpresa 3 neurotransmisores: kisspeptinas, NKB y dinorfinas (Dyn), por lo que han sido denominadas neuronas KNDy. Se ha demostrado que estas neuronas ejercen un papel clave en la determinación del patrón pulsátil de liberación de GnRH. Las neuronas NKB del hipotálamo pueden detectar directamente los niveles circulantes de estradiol (E2) y testosterona (T), ya que poseen el receptor de estrógenos alfa (ER α) y el receptor de andrógenos (AR). Numerosos estudios en mamíferos adultos han demostrado que, en el núcleo ARC, el E2 y la T inhiben potentemente la expresión de *TAC3/Tac2* y, por tanto, la expresión de NKB, mientras que en el área hipotalámica lateral (LHA), sólo el E2 inhibe la expresión de NKB (6).

- Catecolaminas: Constituyen un grupo de neurotransmisores que incluyen a la dopamina, la adrenalina y la noradrenalina (NA). Las catecolaminas participan, a través de su interacción con receptores de membrana acoplados a proteínas G, en el control de funciones tales como la función motora, la cognición, el procesamiento de las emociones, la memoria y la regulación endocrina de numerosos procesos, entre ellos, la reproducción (7). En este contexto, la implicación de las catecolaminas en el control de la secreción de GnRH se hizo evidente mediante una observación experimental que demostraba que si se eliminaban las neuronas noradrenérgicas del tronco encefálico o se bloqueaban los receptores α -adrenérgicos, se producía una disminución de la secreción pulsátil de LH. Por otra parte, se comprobó que las neuronas noradrenérgicas que se encuentran en el tronco encefálico emiten proyecciones axónicas hacia las neuronas GnRH, de manera que la liberación de NA permitiría controlar, directamente, la liberación del péptido.

- Galanina (GAL): en humanos, es un péptido de 30 aa que se localiza tanto a nivel del SNC como a nivel del sistema nervioso periférico. GAL se sintetiza y se almacena en el hipotálamo y la hipófisis y ejerce sus acciones tras interactuar con diferentes subtipos de receptores de membrana acoplados a proteínas G denominados: GAL-R1, GAL-R2 y GAL-R3. Diversos experimentos en ratas evidencian que, además de su papel estimulador de la función reproductora, GAL tiene un papel fisiológico en la regulación de la secreción hipofisiaria de GH y PRL (8).

- Péptido similar a galanina (GALP): Es un péptido que comparte 13 aa con GAL en su secuencia peptídica e interactúa con los tres subtipos de receptores de GAL. Existen evidencias de que GALP participa en la regulación de la homeostasis energética y la

reproducción y se ha demostrado que su expresión génica está regulada por factores metabólicos como la leptina, la insulina y las hormonas tiroideas (8).

- Óxido nítrico (ON): El ON es una molécula gaseosa altamente lábil, que se expresa en diversas áreas hipotalámicas y en la hipófisis. Se genera como subproducto de la conversión, por el enzima óxido nítrico sintasa, de L-arginina a L-citrulina. Existen varios estudios farmacológicos que sugieren que el ON actúa como modulador clave de la secreción de GnRH y como colaborador en la aparición del pico preovulatorio de GnRH/LH (9).

Señales Inhibidoras

- Ácido γ aminobutírico (GABA): El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor en el SNC, donde se encuentra ampliamente distribuido. Ejerce sus acciones tras su interacción con receptores ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) y metabotrópicos (GABA_B).

En relación a su participación en el control del eje HHG, es considerado uno de los reguladores más importantes de las neuronas GnRH. En este sentido, se ha propuesto que este neurotransmisor juega un papel clave, durante el periodo embrionario, en la migración de las neuronas GnRH desde la placoda olfativa hacia el área preóptica. Así mismo, se ha demostrado en monos que el GABA participa en la activación puberal de las neuronas GnRH y en el establecimiento del patrón pulsátil de liberación de la hormona. Por otra parte, se ha propuesto que las neuronas GABAérgicas pueden ser mediadoras de la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales sobre la liberación de GnRH (10).

- Opioides endógenos (EOPs): Los EOPs incluyen tres grupos de péptidos: la β -endorfina (β -END), las encefalinas y las dinorfinas (Dyn) y ejercen sus acciones tras interactuar con tres receptores acoplados a proteínas G que se denominan: μ , δ y κ . Los EOPs participan en el control de la función reproductora por inhibir la liberación de GnRH y LH. Estudios realizados en varias especies como cerdo, oveja, vaca y rata, demuestran que los EOPs actúan, principalmente, a nivel hipotalámico inhibiendo, de forma directa o mediada por neuronas kisspeptidérgicas (11), la liberación de GnRH y, con ello, modificando la amplitud y/o frecuencia de pulsos de LH. Más en concreto, el sistema Dyn/receptor κ media la retroalimentación negativa de la progesterona sobre los pulsos de liberación de GnRH/LH, mientras que el sistema β -END/receptor μ parece estar implicado en el control del pico preovulatorio de GnRH/LH.

- Neuropéptido Y (NPY): El NPY es el neuropéptido más abundante en el cerebro de mamíferos, estando su expresión controlada, al menos en parte, por los estrógenos. Este neuropéptido es un regulador clave de la reproducción actuando a diferentes niveles del eje HHG. El NPY interacciona con receptores de membrana acoplados a proteínas G de los que se conocen seis subtipos: Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 e Y6. De ellos, el subtipo Y5 se expresa en las neuronas GnRH y está implicado en la inhibición por NPY de la liberación de GnRH/LH. Adicionalmente, estudios en ratas y monos también demuestran que el receptor Y1 está implicado en la inhibición que ejerce NPY sobre el eje HHG. Es destacable que, dependiendo de los niveles de esteroides circulantes, el NPY administrado de forma aguda puede estimular o inhibir la liberación de LH mientras que, administrado de forma crónica, siempre inhibe al eje HHG (12).

- Hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH): Es un péptido de 12 aa que fue identificado inicialmente en aves y, posteriormente, en otras especies de vertebrados, incluyendo a los mamíferos. Perteneció a la superfamilia de péptidos RF-amida, que se caracterizan por tener un motivo común en el extremo C-terminal: Arg-Phe-NH₂. Las neuronas productoras de GnIH se distribuyen en regiones del diencefalo y mesencefalo en aves, además de alcanzar la eminencia media del hipotálamo con sus proyecciones. Diversos estudios en vertebrados demuestran que esta hormona, tras interactuar con su receptor, el GPR147, inhibe la secreción de gonadotropinas por disminuir la actividad de las neuronas GnRH y por inhibir directamente la actividad de los gonadotropos. La liberación de GnIH está controlada, al menos en parte, por la melancortina. Existen datos contradictorios sobre el efecto de esta hormona sobre la GnIH y así, se ha demostrado en codornices que, parte del efecto inhibitor de la liberación de gonadotropinas que ejerce la melatonina lo lleva a cabo la hormona a través de inducir la expresión y liberación de GnIH, mientras que en hámster y oveja la melatonina actúa como inhibidor de la expresión de GnIH (13).

Reguladores periféricos:

El funcionamiento del eje HHG también se encuentra regulado por una serie de señales de origen periférico. En este apartado se detallará el papel que ejercen en este control señales de origen gonadal y señales metabólicas como la leptina, la insulina o la ghrelina.

Esteroides gonadales

Los denominados esteroides gonadales (estrógenos, andrógenos y progesterona), son sintetizados en las gónadas, aunque moléculas semejantes también se sintetizan en otros tejidos como las glándulas adrenales, el cerebro (neuroesteroides) y el hígado. Dada su naturaleza química, estas hormonas ejercen la mayor parte de sus funciones a través de su unión a receptores intracelulares. Los estrógenos interactúan con los receptores de estrógenos (ER), ER α y ER β , los andrógenos interactúan con el receptor de andrógenos (AR) y la progesterona con los receptores de progesterona (PR), PR-A y PR-B. Los ER, AR y PR se encuentran ampliamente distribuidos por todo el SNC, siendo especialmente abundantes en el hipotálamo, particularmente en el núcleo ARC y el AVPV. Además, estos receptores se localizan en la hipófisis y en estructuras periféricas como los genitales internos y externos o las mamas.

Actualmente se acepta que, una parte importante de la retroalimentación negativa que ejercen los esteroides gonadales sobre la liberación de LH y FSH la llevan a cabo actuando sobre sus receptores en las neuronas kisspeptidérgicas del núcleo ARC e inhibiendo la liberación de kisspeptinas. Adicionalmente, la interacción de los estrógenos sobre sus receptores en el AVPV ejerce una retroalimentación positiva sobre la liberación de kisspeptinas y, por ello, de GnRH/gonadotropinas que sería responsable de la ovulación. Los andrógenos, interactuando con los AR y los estrógenos con los ER β en las neuronas GnRH inhiben directamente la liberación de esta hormona, y por tanto, el funcionamiento del eje HHG (14).

Péptidos gonadales

Los péptidos gonadales son hormonas que regulan la secreción de gonadotropinas a nivel de la hipófisis y ejercen una acción paracrina en las gónadas. Entre estos encontramos las inhibinas, las activinas y la folistatina (15).

-Inhibinas A y B: Son proteínas heterodiméricas producidas por las células de Sertoli del testículo y las células de la granulosa del ovario. Producen la inhibición selectiva de la secreción de FSH actuando directamente a nivel hipofisiario.

-Activinas A, B y AB: Son proteínas homo- o heterodiméricas que tienen como función estimular directamente la secreción de FSH por los gonadotropos.

-Folistasinas 288 y 315: Son una familia de péptidos de cadena única que actúan como antagonistas de la activinas y, por este mecanismo, producen la disminución de la liberación de FSH.

Glucocorticoides y hormonas tiroideas

Hay estudios que demuestran que los glucocorticoides afectan a la función gonadal mediante la inhibición directa de la síntesis y liberación de GnRH. En el caso de las hormonas tiroideas, se ha demostrado en ratas que el hipotiroidismo o la tiroidectomía provocan la inhibición de la secreción de GnRH (16).

Señales metabólicas

Dada la importancia de las señales metabólicas en la activación del eje HHG que ocurre durante la pubertad y que permitirá la puesta en marcha de la función reproductora y su posterior mantenimiento durante la edad adulta, el papel de las señales metabólicas en el control del eje neuroendocrino de la reproducción se comentará en más detalle en el apartado 2.5 sobre pubertad y reservas energéticas de este TFM.

2.4. Puesta en marcha de la función reproductora: Pubertad

La pubertad se puede definir como el período de transición entre el estado juvenil y la edad adulta durante el que tienen lugar profundos cambios psicológicos, se estimula el crecimiento corporal, aparecen los caracteres sexuales secundarios y se adquiere la capacidad de reproducirse. Gran parte de los cambios que se observan durante la pubertad derivan de la paulatina activación gonadal que se produce en este periodo y que es consecuencia del aumento progresivo de la liberación pulsátil de GnRH/gonadotropinas. El resultado final de la activación gonadal es el aumento de su capacidad de sintetizar hormonas (hormonogénesis) y la adquisición de la capacidad de generar gametos (gametogénesis: espermatogénesis en los machos y ovogénesis en las hembras) de la que depende la capacidad de reproducirse (2).

Entre los signos externos de maduración sexual se encuentra el crecimiento de las mamas y la redistribución de la grasa corporal (caderas) en las niñas y el crecimiento de los genitales internos y externos y la aparición de vello axilar y púbico en ambos sexos. Además, durante este periodo, aparece la primera menstruación (menarquia) en las adolescentes entre los 11-15 años y las primeras eyaculaciones nocturnas en los

adolescentes entre los 13-14 años. Se considera pubertad precoz cuando el crecimiento de las mamas se observa antes de los 8 años en las jóvenes y el crecimiento de los testículos tiene lugar antes de los 9 años en los jóvenes. La variabilidad individual en la edad de aparición de la pubertad depende de varios factores entre los que destacan los factores genéticos y los ambientales, como las horas de luz solar, la disponibilidad de reservas energéticas o la exposición a disruptores endocrinos.

Junto a los signos externos, durante la pubertad ocurren numerosos cambios endocrinos que afectan, fundamentalmente, al eje HHG que se va activando, de forma paulatina, hasta alcanzar los niveles de actividad propios de la edad adulta. La hipótesis más comúnmente aceptada propone que la activación del eje neuroendocrino de la reproducción se debe al efecto combinado de la disminución de los inputs inhibidores sobre las neuronas GnRH y el aumento de los inputs estimuladores sobre las mismas. El resultado final de estos cambios es la aparición progresiva de picos nocturnos de liberación de GnRH que, poco a poco, van extendiéndose a lo largo del día, produciéndose cada 90 minutos. Este patrón de liberación de GnRH induce el aumento de la liberación pulsátil de gonadotropinas, que se ve potenciado por el incremento de respuesta de las células gonadotropas hipofisarias a GnRH. Como consecuencia del aumento de los niveles circulantes de gonadotropinas, las gónadas incrementan la síntesis de hormonas de naturaleza esteroidea que favorecen la aparición de los caracteres sexuales secundarios y el desarrollo de los genitales y adquieren la capacidad de formar gametos, lo que proporciona al individuo la capacidad de reproducirse (2).

Con la llegada de la pubertad, en las hembras aparece la retroalimentación positiva entre los estrógenos y la LH mediada por la activación de las neuronas kisspeptidérgicas del AVPV. Más en concreto, el incremento progresivo de la síntesis de estrógenos por los folículos en desarrollo induce un pico de liberación de kisspeptinas por las neuronas del AVPV y, en respuesta a este, un pico de liberación de GnRH que ocasionará el pico de liberación de gonadotropinas. El incremento brusco de los niveles circulantes de LH rompe el folículo y desencadena la ovulación. Dado que el pico de liberación de GnRH/gonadotropinas se produce justo antes de la ovulación, este se denomina pico preovulatorio. Como se comentó con anterioridad, la retroalimentación positiva estrógenos/LH es exclusiva de las hembras y la diferenciación sexual de los circuitos implicados en la misma forma parte de la diferenciación sexual del SNC que, mediada

por los esteroides gonadales, tiene lugar antes del nacimiento en numerosas especies (incluida la humana) o poco después del mismo en otras (roedores).

2.5. Relación entre la adquisición de la capacidad reproductora y las reservas energéticas del organismo

La reproducción es una función imprescindible para la supervivencia de las especies, pero prescindible para la supervivencia del propio individuo. Este hecho determina que, en numerosas especies incluida la humana, la función reproductora esté completamente supeditada al grado de reservas energéticas y explica por qué, solo en caso de suficiencia energética la función reproductora se pone en marcha durante la pubertad y se mantiene durante la edad adulta y en situaciones de insuficiencia energética los organismos son incapaces de reproducirse (14).

La supeditación de la función reproductora a las reservas energéticas es especialmente evidente en las hembras ya que estas, además de necesitar energía para generar gametos y sintetizar hormonas gonadales, necesitan grandes cantidades de recursos energéticos para mantener el embarazo y, en el caso de los mamíferos, la lactancia de las crías. En ambos sexos, es destacable el hecho de que un exceso patológico de reservas energéticas, como ocurre en la obesidad mórbida, también ocasiona graves alteraciones de la función reproductora, lo que refuerza la idea de que esta función solo se desarrolla correctamente en presencia de una homeostasis energética estrictamente controlada.

De forma general, las señales de suficiencia energética (leptina, insulina o derivados de la proopiomelanocortina como la α -MSH) producen saciedad e inhiben la ingesta y, adicionalmente, facilitan la puesta en marcha y el mantenimiento de la función reproductora. Por el contrario, las señales de insuficiencia energética (ghrelina o NPY) tienen los efectos opuestos. Debido al papel destacado que desempeña la leptina, la insulina y la ghrelina, a continuación se describirán brevemente algunos aspectos de su participación en el control metabólico de la reproducción (17).

- Leptina: Aunque desde épocas remotas la humanidad ha asociado la fertilidad en las mujeres con la posesión de abundantes grasas, no es hasta la década de los 70 del siglo XX cuando se formula la primera hipótesis de la necesidad en mujeres de una “masa crítica” de reservas energéticas para que la capacidad reproductora se adquiera y posteriormente se mantenga. Finalmente, las bases moleculares y neuroendocrinas de nuestro actual conocimiento de la interrelación entre función reproductora y reservas

energéticas del organismo recibieron el impulso definitivo con el descubrimiento de la leptina en 1994 y la clonación de su receptor en 1995.

La leptina es una hormona de naturaleza proteica sintetizada en el tejido adiposo a partir de la expresión del gen *OB*. Aunque en pequeñas cantidades, la leptina también puede ser sintetizada en la placenta, los ovarios, el músculo esquelético, el estómago, las células epiteliales mamarias, la médula ósea, la hipófisis y el hígado. Dado su origen adipocitario, los niveles circulantes de leptina son un reflejo directo del grado de reservas grasas del organismo. La hormona ejerce sus acciones tras interaccionar con receptores de membrana de la clase I de la familia de las citoquinas (OB-R) que, en primates superiores y humanos, han sido identificados en el hipotálamo, los gonadotropos hipofisarios y las gónadas.

Entre las acciones de la leptina, es clave su participación en el control de la ingesta y el metabolismo produciendo, como señal de suficiencia energética, inhibición de la ingesta y estímulo del gasto de energía. Adicionalmente, numerosos trabajos de investigación han puesto de manifiesto que la leptina participa en el control metabólico de la función reproductora, actuando como un factor permisivo para la llegada de la pubertad una vez adquirido un nivel adecuado de reservas energéticas y manteniendo la función reproductora durante la edad adulta si las reservas energéticas permanecen dentro de márgenes adecuados. En consonancia con estos datos, se ha demostrado en roedores que la subnutrición durante el periodo prepuberal provoca un retraso en la edad de llegada de la pubertad que se revierte tras la administración de leptina.

Por otra parte, dado que ha sido demostrado que las neuronas GnRH no presentan receptores para la leptina, el estímulo de la liberación de GnRH/gonadotropinas que induce la hormona debe ir mediado por neuronas interpuestas. En este sentido, datos muy recientes apuntan a las neuronas POMC/AgRP como intermediarias de la acción de la leptina. Esta afirmación se apoya en la observación del OB-R en las mismas y al estímulo de la liberación de GnRH que induce un derivado de POMC como la α -MSH. Así mismo, hay autores que proponen que parte del efecto estimulador de la leptina sobre GnRH lo ejerce la hormona por inhibir la liberación del NPY sintetizado en las neuronas NPY/CART.

Finalmente, una parte del control que lleva a cabo la leptina sobre el funcionamiento del eje HHG, se ejerce directamente a nivel gonadal. Se ha demostrado

la presencia de receptores para la hormona en la superficie de las células foliculares del ovario, en las células de la granulosa y las células de la teca, y en las células de Leydig en el testículo. Concretamente, en el testículo, se ha demostrado que altos niveles de leptina producen una disminución de la síntesis de testosterona, lo que explicaría el fallo de la función reproductora que se observa en situaciones como la obesidad mórbida.

- Insulina: Es una hormona de naturaleza proteica sintetizada en las células β de los islotes pancreáticos y liberada por las mismas en respuesta al aumento en sangre de principios inmediatos, fundamentalmente glucosa, que sigue a la ingesta de alimentos. Como señal de suficiencia energética, la insulina produce sensación de saciedad e inhibe la ingesta de alimentos. El análisis de su posible papel en el control metabólico del eje HHG indica que la hormona estimula la liberación de GnRH/gonadotropinas. Puesto que, como en el caso de la leptina, no se han encontrado receptores para la insulina en las neuronas GnRH, se ha propuesto a las neuronas POMC/AgRP como mediadoras de su acción (18).

- Ghrelina: Es un péptido de 28 aa que fue identificado inicialmente como el ligando endógeno para el receptor de los secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R). Se sintetiza de forma mayoritaria en el estómago y, en pequeñas cantidades, en el hipotálamo. Ejerce sus acciones tras su interacción con GHS-R, del que se han identificado dos subtipos denominados, GHS-R1a y GHS-R1b, siendo el primero de ellos el único funcionalmente activo (19).

Junto a su papel estimulador en la liberación de GH, que fue el primero descrito para la hormona, la ghrelina participa en el control de la ingesta y el metabolismo energético como señal de insuficiencia energética. Está demostrado en numerosas especies que los niveles circulantes de ghrelina se incrementan progresivamente en ausencia de alimentos, produciendo una sensación de hambre que estimula poderosamente la ingesta. En cuanto a su papel en el control del eje HHG, ha sido demostrado que la administración aguda de ghrelina disminuye la liberación de LH y que su administración crónica retrasa, en ratas macho y hembras, la llegada de la pubertad (20).

2.6. Nuevas señales en el control del eje HHG: Ceramidas

Las ceramidas son una familia de esfingolípidos que se sintetizan, entre otras estructuras, a nivel del SNC. Están formadas por una esfingosina unida, mediante un enlace amida, a un ácido graso de longitud variable (C₁₄-C₂₆). Las ceramidas pueden ser sintetizadas de novo o a partir del metabolismo de esfingolípidos más complejos (21). La síntesis de novo tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE), donde se sintetiza la 3-cetoesfingosina por la condensación de L-serina y palmitoil CoA mediada por la serina palmitoil transferasa (SPT). La 3-cetoesfingosina sufre un proceso de reducción, acetilación y de nuevo reducción que da como resultado final la ceramida (**Figura 2**) (22). Las ceramidas son precursores estructurales y metabólicos de esfingolípidos más complejos como la esfingomielina, la Cer-1fosfato y la glucosilceramida, precursor a su vez de los glicolípidos y los gangliósidos. Por otra parte, la isoforma de la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1C (CPT1C), que se expresa en el RE de las neuronas hipotalámicas, parece ser un regulador de los niveles de ceramidas.

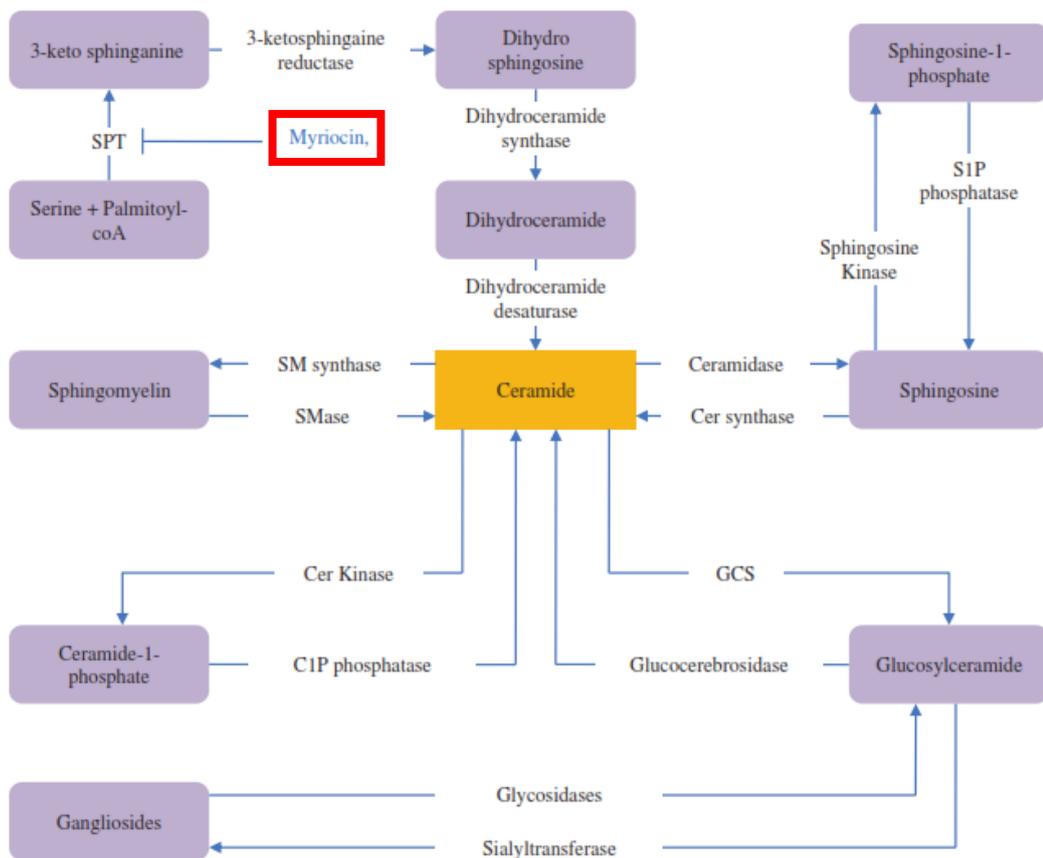


Figura: 2. Síntesis de esfingolípidos y nivel de actuación del myriocin. Tomado de (22) con modificaciones.

A pesar de que en un principio las ceramidas se consideraban un componente meramente estructural de las membranas celulares, el estudio de estas moléculas ha revelado su participación en numerosos procesos como son la proliferación y la diferenciación celular, el metabolismo energético, la muerte celular y los procesos de autofagia. En relación a la participación de estas moléculas en el control del metabolismo energético y la ingesta, estudios recientes muestran que, a nivel hipotalámico, las ceramidas median, al menos en parte, el efecto orexigénico de la ghrelina (23) y que elevados niveles de leptina, disminuyen los niveles hipotalámicos de ceramidas y provocan saciedad (24). Adicionalmente, se ha demostrado que las ceramidas inducen lipotoxicidad y estrés del RE en el hipotálamo, lo que provoca una reducción de la termogénesis y ganancia de peso corporal (25).

Considerando que ha sido ampliamente demostrada la participación de numerosas señales metabólicas en el control del funcionamiento del eje HHG y el recién descubierto papel de las ceramidas como mediadoras de la señalización metabólica de hormonas como la leptina o la ghrelina, no parece descabellado presuponer que estas moléculas pudieran participar en el control metabólico del eje neuroendocrino de la reproducción.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, este TFM ha tenido como **OBJETIVO GENERAL** analizar la posible participación de la señalización por ceramidas en el control del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y la pubertad en ratas hembras.

Como **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** derivados del objetivo general, nos propusimos:

- Analizar el posible efecto agudo de las ceramidas sobre los niveles circulantes de gonadotropinas.
- Analizar el posible efecto de las ceramidas sobre la liberación hipotalámica de GnRH e hipofisaria de LH y FSH.
- Analizar el posible efecto de las ceramidas sobre la llegada de la pubertad en condiciones de suficiencia e insuficiencia energética.
- Analizar la posible mediación de las ceramidas en los efectos de las kisspeptinas y de la leptina en la llegada de la pubertad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Para la realización de los experimentos de este TFM se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar nacidas y criadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba (UCO). Los animales se mantuvieron, desde el momento del nacimiento, en un régimen luminoso controlado de 14 horas luz/10 horas oscuridad (con encendido a las 05.00 horas) y temperatura constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). El día del nacimiento se consideró el día 1 de vida. Los animales se mantuvieron con sus madres, en un número de 10-12 crías/madre, hasta el día 21 de vida, en que fueron destetadas. A partir de ese momento, los animales recibieron una dieta estándar para roedores (A04: SAFE, Augy, Francia) y, a excepción de cuando se indique lo contrario, tuvieron acceso *ad libitum* a la misma.

Todos los procedimientos experimentales desarrollados fueron aprobados por el Comité de Ética de la UCO conforme al Real Decreto 52/2013 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 los presentes estudios, se llevaron a cabo todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales empleados.

3.2. Drogas

Para la realización de los diferentes diseños experimentales se utilizaron: un precursor de ceramidas (CER C6) y un inhibidor de la síntesis de ceramidas, myriocin, que fueron obtenidos de Sigma-Aldrich; kisspeptina₁₁₀₋₁₁₉-NH₂ (Kp-10) y GnRH que fueron obtenidos de Phoenix-Pharmaceutical; leptina, adquirida de ProSpec y DMEM libre de rojo fenol que fue suministrado por Gibco. En los experimentos *in vivo*, CER C6 y myriocin se disolvieron en DMSO al 70% y Kp-10 y leptina en solución salina al 0.9%. En los experimentos *in vitro*, Kp-10, CER C6 y GnRH fueron disueltos en DMEM libre de rojo fenol.

3.3. Diseños experimentales

Para analizar el posible efecto agudo sobre la liberación de gonadotropinas de la activación o la inhibición de la síntesis de las ceramidas, en el *experimento 1*, ratas hembras de 27 días recibieron una única inyección intracerebroventricular (icv) de CER C6 (2,5 µg/rata/5 µl), myriocin (2 µg/rata/5 µl) o vehículo (5 µl/rata de DMSO al 70%). 30 min después de la administración de las drogas, se procedió a una toma de sangre por punción yugular para la posterior determinación de los niveles circulantes de LH y FSH. Para la administración icv de las drogas, el día 25 de vida y siguiendo indicaciones ya publicadas (26), se colocó en los animales una cánula de xilastic que se situó 1 mm posterior y 1,2 mm lateral a bregma y a 2 mm de profundidad debajo de la superficie del cráneo. Una vez canuladas, las ratas se mantienen en jaulas individuales.

Para analizar el posible efecto de las ceramidas sobre la liberación de GnRH, en el *experimento 2*, hipotálamos procedentes de ratas hembras de 35 días fueron preincubados durante 30 min a 37 °C, en una atmósfera con un 95% de O₂ y un 5% de CO₂, con 250 µl de DMEM libre de rojo fenol. Una vez retirado el medio de incubación, los hipotálamos fueron incubados durante 45 min con 250 µl de DMEM solo o conteniendo Kp-10 (10⁻⁷ M) o CER C6 (10⁻⁷ y 10⁻⁶ M). Una vez hervido durante 30 min, el medio fue almacenado a -80°C para la posterior determinación de GnRH en el mismo. Para la obtención de los hipotálamos, los animales fueron sacrificados por decapitación procediéndose a seguir indicaciones ya publicadas (26) que indican que la disección debe hacerse a 2 mm de profundidad y tomando como límites: 1mm anterior al quiasma óptico, el borde posterior de los cuerpos mamilares y las fisuras hipotalámicas.

Para analizar el posible efecto directo de las ceramidas sobre la liberación de LH, en el *experimento 3*, hipófisis procedentes de ratas hembras de 35 días fueron preincubados durante 60 min a 37 °C, en una atmósfera con un 95% de O₂ y un 5% de CO₂, con 1 ml de DMEM libre de rojo fenol. Una vez retirado el medio de incubación, las hipófisis fueron incubadas durante 120 min con 1 ml de DMEM solo o conteniendo GnRH (10⁻⁸ M) o CER C6 (10⁻⁷ y 10⁻⁶ M). A los 60 min de incubación se procedió a la recogida de 250 µl del medio de incubación y a los 120 min se recogieron los 750 µl restantes. El medio se almacenó a -20°C hasta el análisis de los niveles de LH en el mismo.

Para analizar el posible efecto de las ceramidas en la llegada de la pubertad, en el *experimento 4*, ratas hembras de 24 días fueron canuladas icv, siguiendo el protocolo

descrito en el experimento 1, e inyectadas icv entre los días 26 a 35 de vida con CER C6 (2,5 µg/rata/12h), myriocin (2 µg/rata/12h) o vehículo (5 µl de DMSO al 70%/rata/12h). Desde el inicio del tratamiento, se monitorizó diariamente en los animales, el peso corporal, la ingesta de alimentos y la aparición de apertura vaginal (AV), tomada, convencionalmente, como un signo externo de llegada de la pubertad en ratas hembras. Una vez que la AV aparece, se procede a la recogida diaria del frotis vaginal para el análisis de la aparición del primer estro, como signo de que la primera ovulación ha tenido lugar. El sacrificio de los animales se realizó por decapitación el día 35 de vida, 60 min después de la última inyección, procediéndose a la recogida de sangre, para el análisis de los niveles circulantes de LH y FSH, y de ovarios y útero para el análisis de su peso.

Dado los resultados obtenidos en el experimento 4 y el conocimiento previo de que el déficit de recursos energéticos retrasa la puesta en marcha de la función reproductora, en el **experimento 5** analizamos el papel de las ceramidas en la llegada de la pubertad en una situación de déficit energético moderado y su posible participación como mediadora de los efectos de kisspeptinas y leptina sobre pubertad. Para ello, ratas hembras de 23 días fueron sometidas a una restricción calórica del 25% hasta el momento del sacrificio (ratas subnutridas: SN). El día 27 de vida, las ratas SN son canuladas icv, siguiendo el protocolo descrito en el experimento 1 y, entre los días 29 al 36 de vida, tratadas icv con: 1) vehículo (5 µl/rata/12h); 2) CER C6 (2,5 µg/rata/12h); 3) Kp-10 (1 nmol/rata/12 h); 4) Kp-10 + myriocin (2 µg/rata/12h); 5) leptina (3,1 µg/rata/12h) ó 6) leptina + myriocin (2 µg/rata/12h). Un grupo de ratas que fueron alimentadas *ad libitum* (ratas normonutridas: NN), canuladas el día 27 de vida y que recibieron icv vehículo (5 µl/rata/12h) entre los días 29 al 36 sirven de control. Desde el inicio del tratamiento y hasta la finalización del mismo el día 36, se monitorizó diariamente en todos los animales el peso corporal y la aparición de AV.

3.4. Medidas hormonales

Los niveles séricos y en el medio de incubación de LH y FSH fueron analizados usando kits de radioinmunoensayo (RIA) suministrados por el National Institutes of Health (National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA). Rat LH-I-10 y FSH-I-9 fueron marcados con I¹²⁵ usando la metodología del Yodo-gen[®] (Pierce, Rockford, IL). Las concentraciones de hormonas se expresan usando como standarts las preparaciones de referencia LH-RP-3 y FSH-RP-2. La sensibilidad del ensayo fue de 0.075 ng/ml para LH y de 0.4 ng/mL para FSH. Los coeficientes de variación (CVs) intra- e inter-ensayo

para ambas hormonas fueron <8 y $<10\%$, respectivamente. Los niveles de GnRH en el medio de incubación fueron medidos usando un kit comercial suministrado por Phoenix-Pharmaceutical y siguiendo las indicaciones del suministrador. La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg/ml y los CVs intra- e inter-ensayo fueron $<10\%$.

Dado que el crecimiento y desarrollo de los genitales internos depende de los niveles circulantes de esteroides gonadales en sangre, se utilizó el peso de ovario y útero como medida indirecta de los niveles circulantes de estrógenos.

3.5. Presentación de los resultados y análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm EEM (error standart de la media). Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron el análisis de la varianza de una vía (One-way ANOVA) seguido del test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls (GraphPad Prism 4.0 Software Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas para un nivel de confianza igual o superior al 95% ($p \leq 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Efecto agudo sobre la liberación de gonadotropinas de la activación o la inhibición de la síntesis de ceramidas (Experimento 1)

Los datos obtenidos tras la realización del experimento 1 indican que, a los 30 minutos de la administración de CER C6 o myriocin, no se encuentran modificaciones significativas de los niveles circulantes de LH (**Figura 3** panel superior) ni de FSH (**Figura 3** panel inferior) en relación a los niveles presentados por los animales del grupo control.

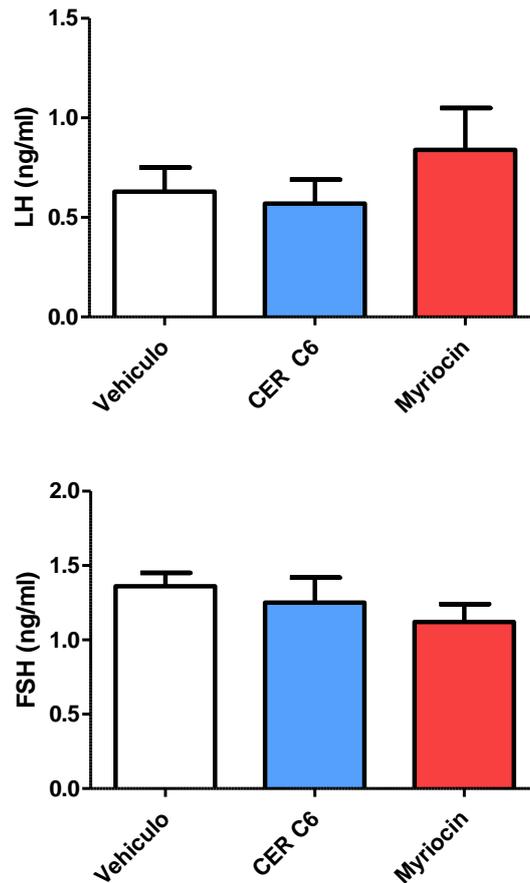


Figura 3: Niveles séricos (ng/ml) de LH (panel superior) y FSH (panel inferior) en ratas hembras de 27 días, 30 min después de la administración icv de vehículo, CER C6 o myriocin. Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=8-10$ animales/grupo).

4.2. Efecto de las ceramidas sobre la liberación hipotalámica de GnRH (Experimento 2)

Los resultados obtenidos tras la realización del experimento 2 indican que la incubación de hipotálamos con Kp-10 (10^{-7} M) induce un incremento muy significativo ($p \leq 0.01$) de la liberación de GnRH al medio de incubación (**Figura 4**), mientras que la administración de CER C6 (10^{-7} y 10^{-6} M) no cambia significativamente la liberación del neuropéptido (**Figura 4**).

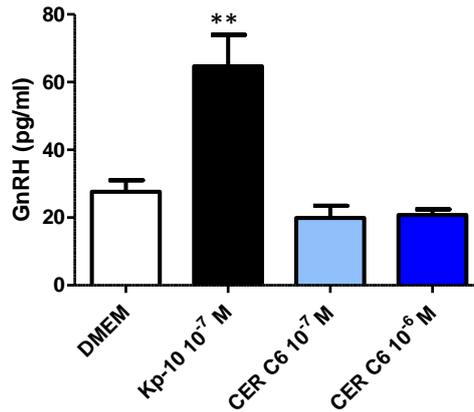


Figura 4: GnRH (pg/ml) liberado al medio de incubación por hipotálamos completos procedentes de ratas hembras de 35 días, 45 min después de ser incubados con DMEM, Kp-10 (10^{-7} M) o CER C6 (10^{-7} y 10^{-6} M). Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=11$ hipotálamos/grupo). ****** $p \leq 0.001$ vs DMEM (ANOVA de una vía seguido del test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls).

4.3. Efecto de las ceramidas sobre la liberación hipofisaria de LH (Experimento 3)

Los resultados obtenidos tras la realización del experimento 3 indican que, la incubación de hipófisis con GnRH (10^{-8} M) induce, a los 60 y 120 min, un incremento muy significativo ($p \leq 0.001$) de la liberación de LH al medio (**Figura 5**), mientras que la administración de CER C6 (10^{-7} y 10^{-6} M) disminuye, a los dos tiempos estudiados, la liberación de la hormona. Esta disminución alcanza significación estadística, a los 60 y 120 min, cuando CER C6 se encuentra a una concentración de 10^{-7} M (**Figura 5**).

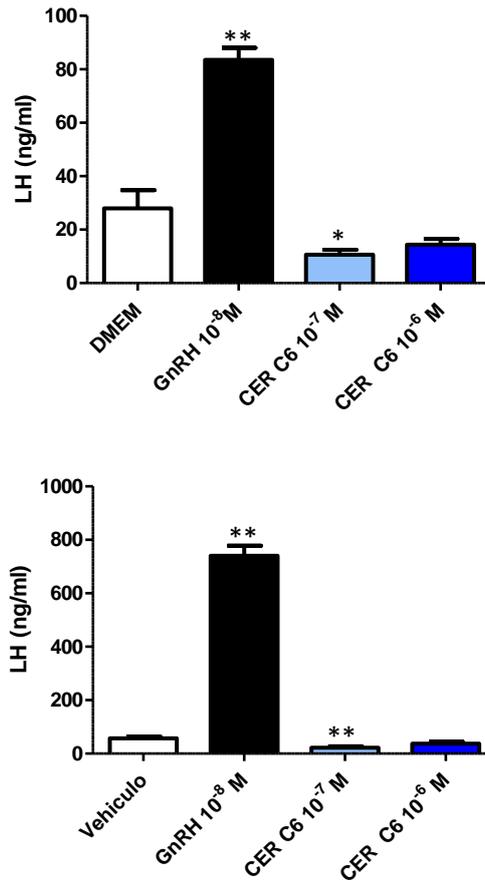


Figura 5: LH (ng/ml) liberada al medio de incubación por hipófisis procedentes de ratas hembras de 35 días, 60 (panel superior) y 120 min (panel inferior) después de ser incubadas con DMEM, GnRH (10^{-8} M) o CER C6 (10^{-7} y 10^{-6} M). Los datos se expresan como media \pm EEM ($n=11$ hipófisis/grupo). * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$ vs DMEM (ANOVA de una vía seguido del test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls).

4.4. Efecto de las ceramidas sobre la llegada de la pubertad en hembras normonutridas (Experimento 4)

Los resultados obtenidos tras la realización del experimento 4 indican que, la administración crónica discontinua de CER C6 o myriocin entre los días 26 al 35 de vida no produce modificaciones significativas del peso corporal ni de la ingesta de alimentos (**Figuras 6 A y B**). Nuestros datos también indican que la administración crónica de CER C6 entre los días 26 al 35 induce un adelanto en la edad de aparición de la AV y del primer estro (**Figuras 6 C y D**), mientras que la administración de myriocin retrasa significativamente la aparición de este parámetro y la aparición del primer estro (**Figuras 6 C y D**). Adicionalmente, nuestros resultados muestran que, al finalizar el tratamiento crónico con CER C6, los animales presentan un ligero incremento, que no llega a ser

significativo, del peso de ovarios y de útero (**Figuras 7 A y B**), sin modificaciones de los niveles circulantes de LH ni de FSH (**Figuras 7 C y D**). Los datos obtenidos tras la realización de este diseño experimental también muestran que, al finalizar el tratamiento crónico con myriocin, los animales presentan una disminución del peso de ovarios y de útero (**Figuras 7 A y B**) y un incremento muy significativo de los niveles circulantes de LH (**Figura 7 D**).

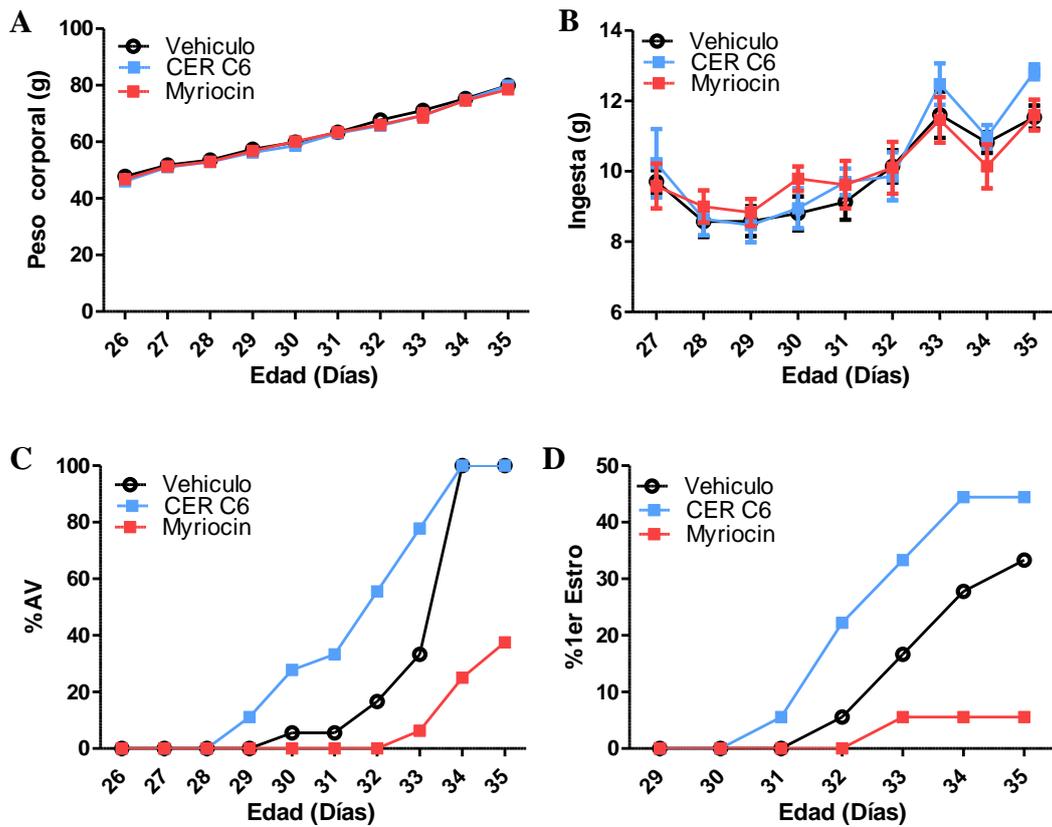


Figura 6: Efectos en ratas hembras de la administración icv de vehículo, CER C6 o myriocin entre los días 26 al 35 de vida. Panel A, Peso corporal (g) entre los días 26 al 35. Panel B, Ingesta de alimentos (g) entre los días 27 al 35. Panel C, Datos de apertura vaginal (AV), expresados como porcentaje sobre el número total de animales de cada grupo, entre los días 26 al 35 y Panel D, Datos de primer estro, expresados como porcentaje sobre el número total de animales de cada grupo, entre los días 29 al 35. Los datos de peso corporal e ingesta se expresan como media \pm EEM (n=17-18 animales/grupo).

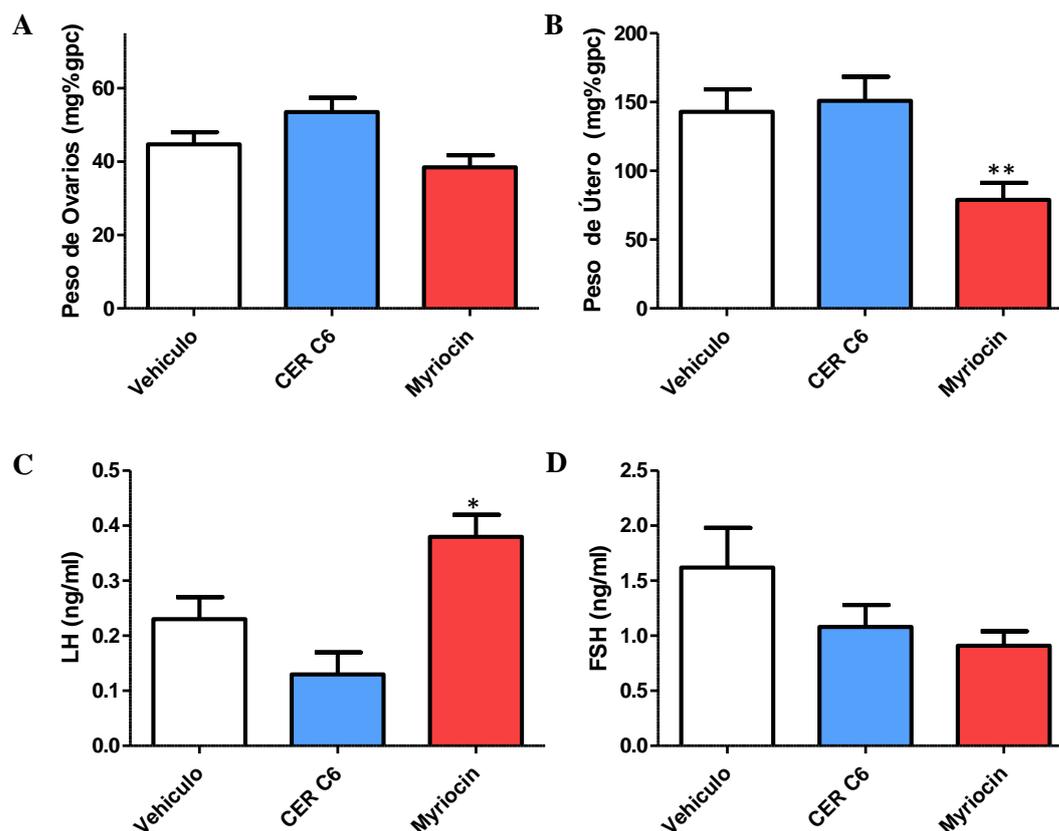


Figura 7: Efectos en ratas hembras de 35 días de la administración icv de vehículo, CER C6 o myriocin entre los días 26 al 35 de vida. Panel A, Peso de ovarios (mg%g de peso corporal) 60 min después de la última inyección. Panel B, Peso de útero (mg%g de peso corporal) 60 min después de la última inyección. Panel C, Niveles séricos de LH (ng/ml) 60 min después de la última inyección y Panel D, Niveles séricos de FSH (ng/ml) 60 min después de la última inyección. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=17-18 animales/grupo). * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$ vs vehículo (ANOVA de una vía seguido del test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls).

4.5. Efecto de las ceramidas sobre la llegada de la pubertad en hembras subnutridas (Experimento 5)

La restricción calórica del 25% desde el día 23 de vida induce una reducción muy significativa del peso corporal, que llega a ser del 30,9% en todos los grupos experimentales al iniciarse el tratamiento el día 29 ($66,66 \pm 3,5g$ vs $46,01 \pm 0,4g$) y del 30,5% en los animales SN tratados con vehículo o Kp-10 con o sin myriocin a la finalización del mismo el día 36 ($91,55 \pm 2,2g$ vs $63,60 \pm 1,2g$) (**Figura 8**). En los animales tratados con leptina, tanto en presencia como en ausencia de myriocin, hay una reducción

adicional del peso corporal en relación al resto de animales SN que es significativa desde el día 34 y que se mantiene hasta la finalización del experimento (**Figura 8**).

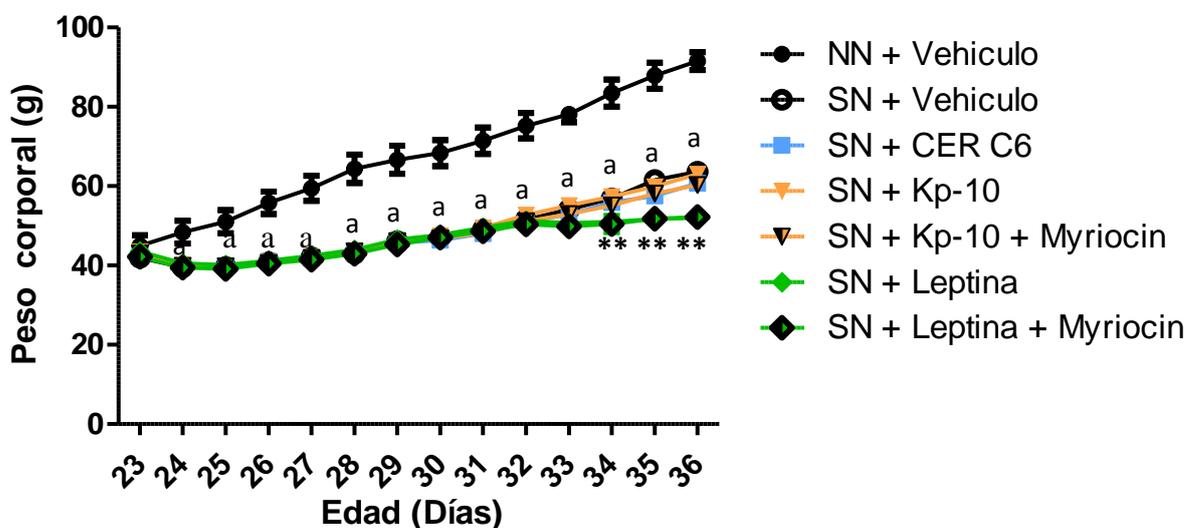


Figura 8: Efecto sobre la evolución del peso corporal (g), en ratas hembras sometidas a una reducción del 25% de la ingesta desde el día 23 (SN), de la administración icv entre los días 29 al 36 de vehículo, CER C6, Kp-10, Kp-10 +myriocin, leptina o leptina +myriocin. También se observa la evolución del peso corporal (g) en ratas normonutridas (NN) e inyectadas icv con vehículo entre los días 29 al 36. Los datos de peso corporal se expresan como media \pm EEM ($n=8-11$ animales/grupo). $a p \leq 0.001$ vs NN y $**p \leq 0.001$ vs SN tratadas con vehículo (ANOVA de una vía seguido del test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls).

Nuestros datos indican que la subnutrición produce un retraso muy significativo en la edad de presentación de la AV ya que, a la finalización del tratamiento, el 100% de los animales NN tratados con vehículo presentan AV y solo la presentan el 12,5% de los animales SN tratados con vehículo (**Figuras 9 A, B y C**). El tratamiento con CER C6 entre los días 29 al 36 en los animales SN no modifica significativamente la edad de AV, ya que al finalizar el tratamiento solo la presentan el 25% de los animales (**Figura 9 A**), mientras que el tratamiento con Kp-10 mejora significativamente el retraso (55,5% de animales con AV al finalizar el tratamiento) y el tratamiento con leptina lo revierte por completo (100% de animales con AV al finalizar el tratamiento) (**Figura 9 B y C**). La administración de myriocin a los animales SN tratados con Kp-10 revierte por completo los efectos del péptido sobre la AV (11,1% de animales con AV al finalizar el tratamiento) (**Figura 9 B**), mientras que solo reduce muy ligeramente los efectos de la leptina (88,8% de animales con AV al finalizar el tratamiento) (**Figura 9 C**).

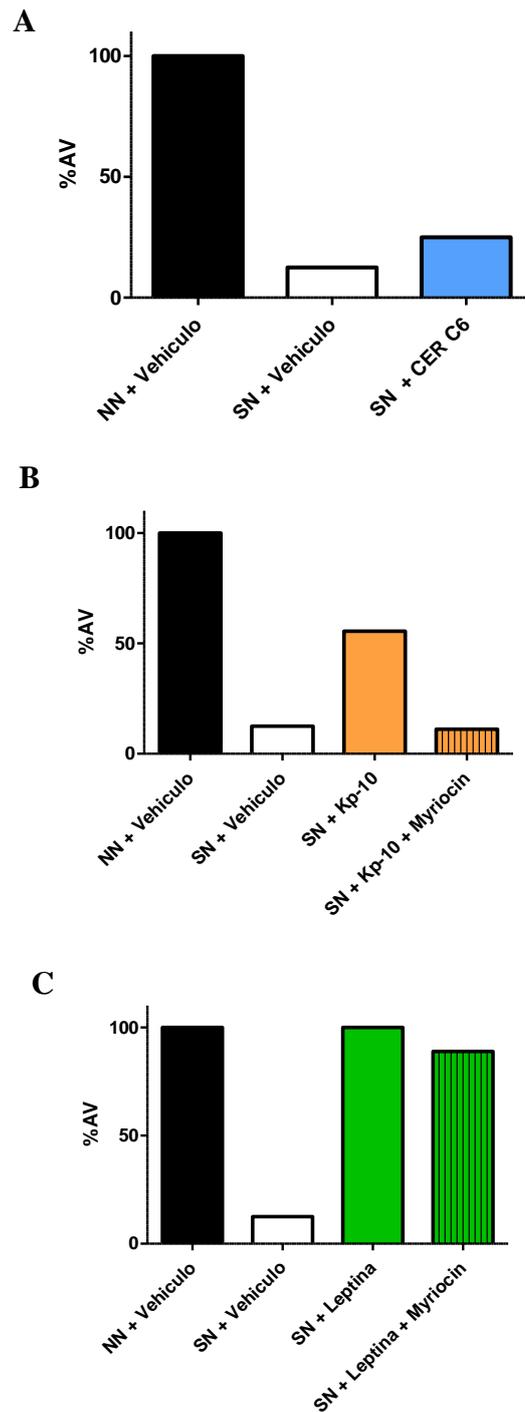


Figura 9: Efecto, en ratas hembras sometidas a una reducción del 25% de la ingesta desde el día 23 (SN), de la administración icv entre los días 29 al 36 de vehículo, CER C6, Kp-10, Kp-10 +myriocin, leptina o leptina +myriocin sobre el % de apertura vaginal (AV) el día 36 de vida. También se recoge el % de AV el día 36 en ratas normonutridas (NN) e inyectadas icv con vehículo entre los días 29 al 36. Los datos se expresan como media \pm EEM (n=8-11 animales/grupo).

5. DISCUSIÓN

La reproducción es una función imprescindible para la supervivencia de las especies y por tanto, el conocimiento de los mecanismos que participan en el control de la puesta en marcha y el mantenimiento de la capacidad de reproducirse han suscitado siempre un gran interés en el contexto de la Fisiología. En este sentido, en la última década se ha identificado al sistema KISS1/GPR54 como uno de los principales estimuladores directos de la liberación de GnRH, lo que lo posiciona como un elemento crucial en la regulación central del eje HHG (4). Esto explica su importancia en la puesta en marcha de la función reproductora durante la pubertad y su papel clave en el control de la secreción de gonadotropinas desde etapas muy tempranas del desarrollo y, por ello, del funcionamiento gonadal a lo largo de la vida del individuo. Adicionalmente, numerosos estudios evidencian que la reproducción se encuentra altamente comprometida si el nivel de reservas energéticas del individuo no es el adecuado (14). En relación con el metabolismo energético, la leptina, sintetizada principalmente en el tejido adiposo, es un importante regulador periférico del eje HHG, habiéndose demostrado que si los niveles de leptina son muy elevados, como ocurre en obesidad, o muy bajos, como es el caso de trastornos alimenticios tales como la anorexia nerviosa, la función reproductora no se pone en marcha o se altera gravemente una vez establecida.

Recientemente, en el contexto de estudios metabólicos tendentes a identificar moléculas que pudieran actuar como mediadoras de los efectos de leptina, ghrelina e insulina en el control de la ingesta y el metabolismo energético, las ceramidas han emergido como candidatas plausibles para ejercer este papel de mediadoras. Los datos que avalan esta hipótesis demuestran que la leptina disminuye los niveles de ceramidas en el hipotálamo y que esta disminución es clave para producir el descenso de NPY que media el efecto anorexigénico de la leptina (24). En el mismo sentido, datos recientes muestran que el bloqueo de la síntesis de ceramidas con myriocin impiden a la ghrelina incrementar los niveles de NPY/AgRP y, por ello, ejercer su efecto orexigénico (23).

El control metabólico de la reproducción que ejercen la leptina y la ghrelina se conoce desde hace tiempo, sin embargo, como solo muy recientemente se ha propuesto a las ceramidas como mediadoras de la señalización por estas hormonas, el posible papel de las ceramidas en el control del eje HHG permanece hasta el momento completamente

inexplorado. Los experimentos realizados en este TFM tienden a comenzar a paliar este desconocimiento.

Los principales resultados obtenidos en este TFM indican que, en hembras normonutridas, la administración central de un precursor de la síntesis de ceramidas acelera la llegada de la pubertad. En concreto, nuestros animales presentan un adelanto en la edad de aparición de la apertura vaginal, que se considera una medida indirecta de los niveles de estrógenos circulantes y, por tanto, un indicador de la activación gonadal característica de la llegada de la pubertad (**Figura 6 C**). En consonancia con esta observación, las ratas tratadas con el precursor de las ceramidas muestran un adelanto en la edad de aparición del primer estro, que se considera una medida indirecta de que la primera ovulación ha tenido lugar y, por tanto, implica que los animales han adquirido la capacidad de reproducirse, esto es, han alcanzado la pubertad (**Figura 6 D**). A pesar del adelanto en la edad de llegada de la pubertad, el día del sacrificio estos animales presentan un peso de ovarios y útero solo ligeramente superior al presentado por los animales del grupo control (**Figuras 7 A y B**). Este hecho pudiera ser debido a que, en ese momento, el 100% de los animales controles presentaban AV y por ello, niveles circulantes de estrógenos en el rango de los presentados por los animales tratados con el precursor de ceramidas. En este sentido, la presencia de niveles de LH y FSH no significativamente diferentes en ambos grupos de animales parece avalar esta hipótesis (**Figuras 7 C y D**).

La participación de las ceramidas en la puesta en marcha de la función reproductora y, en concreto, su papel facilitador de la misma, se ve reforzado por los resultados obtenidos tras la inhibición de la síntesis de ceramidas. En nuestro experimento, la administración de myriocin entre los días 26 al 35 de vida se sigue de un claro retraso en la edad de aparición de la AV y el primer estro, lo que es indicativo del retraso en la activación ovárica que se produce durante la pubertad (**Figuras 6 C y D**). Dado que los animales tratados con myriocin presentan un peso corporal y una ingesta de alimentos similar a la de los animales del grupo control (**Figuras 6 A y B**), este retraso no puede ser debido a un déficit de recursos energéticos o de leptina en estos animales. Puede parecer sorprendente que, a pesar del retraso en la llegada de la pubertad, los animales tratados con el inhibidor de la síntesis de ceramidas presenten, al finalizar el tratamiento, niveles circulantes de LH significativamente superiores a los presentados por los animales del grupo control (**Figura 7 C**). El hecho de que en estos animales el peso de útero, que depende de los niveles de estrógenos circulantes, sea significativamente inferior al de los

animales controles (**Figura 7 B**) parece sugerir que los niveles circulantes de estrógenos están disminuidos tras el tratamiento con myriocin. Si esta hipótesis es correcta, podría explicar el incremento compensador de los niveles de LH en estos animales como consecuencia de la reducción del feedback negativo estrógenos/LH.

En relación al mecanismo a través del cual las ceramidas facilitan la puesta en marcha de la función reproductora, los resultados obtenidos en ratas subnutridas tratadas con Kp-10 sola o coadministrada con myriocin pueden ser esclarecedores. Como es bien conocido, el déficit de recursos energéticos dificulta la llegada de la pubertad (26)(27), lo que confirman nuestros resultados de retraso en la edad de aparición de la AV en los animales subnutridos y tratados con vehículo (**Figuras 9 A, B y C**). Este retraso se debe al efecto combinado del déficit de leptina y kisspeptinas que produce la subnutrición. Por ello en nuestro experimento, el tratamiento con Kp-10 en los animales subnutridos rescata, en parte, este retraso y el tratamiento con leptina lo revierte por completo (**Figuras 9 B y C**). Estos datos avalan resultados de nuestro grupo publicados previamente (28)(29). Sin embargo, nuestros resultados también indican que, si la síntesis de ceramidas ha sido inhibida por la administración de myriocin, la administración de Kp-10 en los animales subnutridos es completamente inefectiva para normalizar la edad de aparición de la AV (**Figura 9 B**). Este resultado nos permite sugerir que las ceramidas facilitan la puesta en marcha de la función reproductora por mediar parte del efecto estimulador de GnRH/gonadotropinas que ejercen las kisspeptinas.

Los datos obtenidos en ratas subnutridas tratadas con leptina indican que la administración de la hormona es capaz de revertir por completo el retraso puberal debido a la subnutrición (**Figura 9 C**). Es destacable que la normalización de la edad de llegada de la pubertad en estos animales se produzca con un peso corporal significativamente inferior al presentado por los animales subnutridos y tratados con vehículo (**Figura 8**). Adicionalmente, nuestros resultados también indican que el efecto de la leptina en ratas subnutridas se mantiene en presencia de bajos niveles de síntesis de ceramidas por la administración del myriocin (**Figura 9 C**) por lo que, en su conjunto, estos datos parecen indicar que el efecto permisivo de la leptina sobre la llegada de la pubertad es independiente de la señalización por ceramidas. En este sentido, nuestros resultados indican que, en ratas subnutridas, la administración del precursor de la síntesis de ceramidas no produce el adelanto en la edad de llegada de la pubertad que producía su administración en ratas normonutridas (**Figuras 9 A y 6 C y D**). Una posible explicación

para este hecho es que, dado que el cuadro de subnutrición produce un déficit de los niveles de leptina circulantes y que el efecto de la leptina parecer ser independiente de la señalización por ceramidas, el estímulo de la síntesis de estas por la administración de CER C6 no lograría paliar los efectos derivados de los bajos niveles circulantes de leptina que presentan estos animales.

Los datos obtenidos tras la realización del experimento 1 indican que, a corto plazo, la administración central de CER C6 no produce modificaciones significativas de los niveles circulantes de LH ni de FSH (*Figura 3*). La aparente contradicción entre los efectos de la administración central crónica y la aguda quizás puedan explicarse porque, en el experimento agudo, la medida de los niveles circulantes de gonadotropinas se realizó 30 min después de la administración del precursor de la síntesis de ceramidas y, es posible, que sea un tiempo inadecuado para que el incremento de la señalización por ceramidas tenga lugar y, por tanto, que sus efectos sobre la liberación de gonadotropinas puedan evidenciarse.

Los datos obtenidos tras la manipulación crónica de la señalización por ceramidas ponen de manifiesto la participación de estas señales en el control del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico durante el periodo puberal y se ven reforzados por la observación de que la administración del precursor de la síntesis de ceramidas modifica, directamente, la liberación hipofisaria de LH (*Figura 5*). La discordancia entre el efecto estimulador de las ceramidas sobre la actividad del eje HHG actuando a nivel central y su efecto inhibidor actuando a nivel periférico pone de manifiesto la complejidad del papel de las ceramidas en el control del eje neuroendocrino de la reproducción y la necesidad de realizar más experimentos aclaratorios.

6. CONCLUSIÓN

Los datos de este TFM ponen por primera vez de manifiesto que las ceramidas están implicadas en la puesta en marcha de la función reproductora, entre otros mecanismos, por mediar los efectos de las kisspeptinas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar Benítez de Lugo, E. Integración Neuroendocrina. Tresguerres JAF et al. Fisiología Humana. 2ª ed. s.I.:McGraw-Hill/Interamericana, pp. 862-870. 1999.
2. Pinilla, L. Determinación y diferenciación sexual. Pubertad. Tresguerres JAF et al. Fisiología Humana. 2ª ed. s.I.: McGraw-Hill/Interamericana, pp 1021-1035. 1999.
3. Novaira, H., Fadoju, D., Diaczok, D. & Radovick, S. Genetic mechanisms mediating kisspeptin regulation of GnRH Gene expression. The Journal of Neuroscience, Volumen 32, pp. 17391-17400. 2012.
4. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. Physiological Reviews, Volumen 92, pp. 1235–1316.2010.
5. Maffucci, J. & Gore, A. Chapter 2. Hypothalamic neural system controlling the female reproductive life cycle gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. International review of cell and molecular biology, Volumen 274, pp. 69-127. 2009.
6. Navarro, V. Interactions Between Kisspeptins and Neurokinin B. Advances in experimental medicine and biology, Volumen 784, pp. 325-347. 2013.
7. Nomura, S. et al. Noradrenalin and dopamine receptors both control cAMP-PKA signaling throughout the cerebral cortex. Frontiers in Cellular Neuroscience, Volumen 8, p.247. 2014.
8. Lawrence, C. & Fraley, G. Galanin-like Peptide (GALP) is a Hypothalamic Regulator of Energy Homeostasis and Reproduction. Frontiers in neuroendocrinology, Volumen 32, pp. 1-9.2011.
9. Bellefontaine, N. et al. Nitric Oxide as Key Mediator of Neuron-to-Neuron and Endothelia-to-Glia Communication Involved in the Neuroendocrine Control of Reproduction. Neuroendocrinology, Volumen 93, pp. 74-89.2011.
10. Han, S., Abraham, I. & Herbison, A. Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. Endocrinology, Volumen 143, pp. 1459-1466. 2002.
11. Ojeda, S. et al. Gene Networks and the Neuroendocrine Regulation of Puberty. Molecular and celular endocrinology, Volumen 324, pp. 3-11. 2010.

12. Gonzales, C. et al. The neuropeptide YY1 receptor mediates NPY-induced inhibition of the gonadotrope axis under poor metabolic conditions. *The FASEB Journal*, Volumen 18, pp. 137-139. 2004
13. Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G. & Kriegsfeld, L. Review: Regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Frontiers in neuroscience*, Volumen 7, p. 60. 2013
14. Tena-Sempere, M. Deciphering puberty: novel mechanism. *European Society of Endocrinology*, Volumen 167, pp. 773-747. 2012.
15. Bilezikjian, L. et al. Cell-type specific modulation of pituitary cell by activin, inhibin and follistatin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volumen 359, pp. 43-52. 2012.
16. Kumar, A., Shekhar, S. & Dhole, B. Thyroid and male reproduction. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, Volumen 18, pp.23-31. 2014.
17. Moshtaghi-Kashanian, G. & Razavi, F. Ghrelin and leptin levels in relation to puberty and reproductive function in patient with beta-thalassemia. *Hormones (Athens)*, Volumen 8, pp.207-213. 2009.
18. Navarro, V., & Kaiser, U. Metabolic influences on neuroendocrine regulation of reproduction. *Current opinion in endocrinology, diabetes and obesity*, Volumen 20, pp. 335-341. 2013
19. García, M. et al. Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction*, Volumen 133, pp. 531-540. 2007
20. El-Eshrawy, M., Abdel Aal, I. & El Hawary, A. Association of ghrelin and leptin with reproductive hormones in constitutional delay of growth and puberty. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Volumen 8, p. 153. 2010.
21. W. Jiang, B. Ogretmen. Autophagy paradox and ceramide, *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013.
22. Galadari et al. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids in health and disease*. Volumen 12, pp.98. 2013.
23. Ramírez, S., Martins, L., Jacas, J., Carrasco, P., Pozo, M., Clotet, J., Serra, D., Hegardt, F.G., Diéguez, C., López, M. and Nuria Casals. Hypothalamic Ceramide Levels Regulated by CPT1C Mediate the Orexigenic Effect of Ghrelin. *Diabetes*, Volumen 62, pp. 2329-2337. 2013.

24. Gaoa, S., Zhub, G., Gaoc, X., Wuc, D., Carrascod, P., Casalsd, N., Hegardte, F.G., Moranb, T.H. and Lopaschuka, G.D. Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *PNAS*, Volumen 108, no 23. 2011.
25. Contreras et al., Central Ceramide-Induced Hypothalamic Lipotoxicity and ER Stress Regulate Energy Balance, *Cell Reports*, Volumen 9, pp. 1-12. 2014.
26. Castellano 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*; Volumen 152, pp. 3396-3408. 2011.
27. Sánchez-Garrido, M. A., Castellano, J. M., Ruiz-Pino, F., Garcia-Galiano, D., Manfredi-Lozano, M., Leon, S., Romero-Ruiz, A., Diéguez, C., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M. Metabolic Programming of Puberty: Sexually Dimorphic Responses to Early Nutritional Challenges. *Endocrinology*, Volumen 154, pp. 3387–3400. 2013.
28. . Castellano, J.M., Navarro, V. M., Fernández-Fernández, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M.J., Vigo, E., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C. and M. Tena-Sempere. Changes in Hypothalamic KiSS-1 System and Restoration of Pubertal Activation of the Reproductive Axis by Kisspeptin in Undernutrition. *Endocrinology*, Volumen 146, pp. 3917–3925.
29. Roa, J., Garcia-Galiano, D., Varela, L., Sánchez-Garrido, MA., Pineda, R., Castellano, JM., Ruiz-Pino, F., Romero, M., Aguilar, E., López, M., Gaytan, F., Diéguez, C., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M. The Mammalian Target of Rapamycin as Novel Central Regulator of Puberty Onset via Modulation of Hypothalamic Kiss1 System. *Endocrinology*, Volumen 150, pp. 5016–5026. 2009.